



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***Fotoderivatização e extração em fase sólida em linha para
determinação de N-nitrosoglifosato em sistema de análises
por injeção sequencial***

Camila Santos Dourado

Orientadora

Prof. Dr^a. Ana Cristi Basile Dias

Brasília-DF

2016



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***Fotoderivatização e extração em fase sólida em linha para
determinação de N-nitrosoglifosato em sistema de análises
por injeção sequencial***

Camila Santos Dourado

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de Brasília
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do Título de Mestre em
Química.*

Orientadora

Prof. Dr^a. Ana Cristi Basile Dias

Brasília-DF

2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Camila Santos Dourado**, matrícula nº **14/0106251**, intitulada *“Fotoderivatização e extração em fase sólida em linha para determinação de N-nitrosoglifosato em sistema de análises por injeção sequencial”*, apresentada no (a) Auditório Verde do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 23 de fevereiro de 2016.

Profª Drª Ana Cristi Basile Dias
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Profª Drª Marly Eiko Osugi
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Carlos Martín Infante Córdova
Membro Titular (FS/UnB)

Profª Drª Fernanda Vasconcelos de Almeida
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 23 de fevereiro de 2016.

“Para mim tenho por certo que as aflições deste tempo presente, não são para comparar com a glória que em nós há de ser revelada”.

- Romanos 8,18.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por toda graça que ele derramou sobre minha vida. Pela paciência, pela perseverança e força que ele me proporcionou. Tenho certeza, que o seu amor move meus objetivos e realizações. Agradeço aos meus pais, Berenice e Sidronio, por acreditarem em mim sempre, por todo apoio, por me ensinarem o caminho certo a seguir. O êxito dessa jornada com certeza é também de vocês.

Agradeço ao meu irmão Marcos, que além de meu irmão é meu segundo pai, meu exemplo e um dos meus maiores incentivadores. Agradeço ao meu namorado e melhor amigo Hélio, pelo otimismo, por toda paciência, por todo companheirismo, por tanto amor e compreensão e por muitas vezes me mostrar a importância de não desistir, mesmo em horas difíceis.

Agradeço as minhas amigas do coração Bárbara, Ruana e Priscila, por acreditarem tanto em mim, muitas vezes até mais do que eu mesma acredito. Por me motivarem a ir em busca dos meus sonhos, por estarem ao meu lado de cada pequeno êxito conseguido e por me mostrarem também que o mundo não acabou quando as coisas não vão tão bem.

Agradeço a minha professora orientadora Ana Cristi, por sempre se interessar e estar disponível as minhas dúvidas, pela paciência, pelo apoio incentivo e dedicação, por compartilhar seu vasto conhecimento, por confiar em meu trabalho e principalmente por ser um exemplo admirável de pessoa e profissional. Agradeço também ao meu coorientador informal, Alexandre Fonseca, que é sem dúvida um dos melhores professores que já conheci. Trabalhar com este profissional serve como inspiração para seguir a carreira acadêmica.

Agradeço ao Grupo de Automação Quimiometria e Química Ambiental (AQUA) e aos professores integrantes, Jez, Fernando, Valéria, Fernanda, pelo acolhimento, pela ótima convivência e pelas inúmeras trocas de conhecimento. Agradeço as amigas que a pesquisa me presenteou, Laíz e Carla, pelas pequenas “orientações”, pelo carinho, pelos momentos de “calma, vai dar certo!” e por tamanho apoio nesta caminhada, juntamente agradeço também aos AQUAmiguinhos:

Angélica, Lílian, Rosy, Victor, Hadassa, Alan, Eduardo, Gerson, Ídio e Gabriel pelas inúmeras conversas e piadas que sem dúvidas, fizeram mais leve esta caminhada.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro, à companhia Monsanto pelo fornecimento das amostras, padrões, insumos e métodos utilizados neste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que são essenciais em minha vida e que contribuíram de uma forma ou de outra para essa caminhada, a vocês: Muito obrigada!

RESUMO

O N-nitrosoglifosato (NNG) é uma impureza altamente tóxica inerente aos produtos à base de glifosato, que é obtida durante a síntese deste herbicida. Órgãos reguladores nacionais e internacionais estabeleceram o limite máximo de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de NNG nos produtos técnicos de glifosato. Apesar desta relevância existem poucos métodos para essa determinação e que ainda são baseados em técnicas e procedimentos de derivatização complexos e demorados. Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um método alternativo baseado na determinação indireta do NNG pela reação de Griess, com automação de duas etapas de preparo de amostra através de um sistema de análises por injeção sequencial – SIA, que proporciona ao procedimento analítico rapidez, simplicidade e maior sensibilidade. As etapas de preparo de amostra automatizadas consistiram na derivatização por fotólise e extração em fase sólida. A fotólise do NNG apresentou expressivas vantagens frente a derivatização química, através da utilização da radiação ultravioleta em 254 nm para a clivagem da ligação N-NO que forma espécies NO_2^- . Esses íons foram concentrados em uma fase sólida de troca aniônica e eluídos com o próprio reagente de Griess para posterior determinação em 540 nm. O método sequencial estabelecido com fotoderivatização e extração em linha apresentou resposta linear para uma ampla faixa de trabalho de 0,05 a $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ NNG. O limite de detecção foi estimado em $3,1 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$, cerca de 32 vezes menor que o limite máximo estabelecido pela normativa e o coeficiente de variação para três injeções de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de NNG foi de 3,74%. O fator de pré-concentração da fase sólida igual a 12 vezes e reprodutibilidade da mesma foi de 48 extrações sucessivas sem mudanças significativas no sinal analítico. Ensaio de recuperação de NNG em diferentes proporções de amostras de produto técnico de glifosato (1:10, 1:100 e 1:1000) apontaram que pode ser possível a determinação de NNG em baixas concentrações de glifosato como, 10 mg L^{-1} .

ABSTRACT

N-nitrosoglyphosate (NNG) is considered a highly toxic impurity originated during the glyphosate synthesis process. National and international regulatory agencies fixed the maximum limit of 1.0 mg kg^{-1} of NNG in technical glyphosate. In despite of this relevance, there are few methods for this determination based on complex procedures and time-consuming derivatization techniques. In this way, the aim of this work is to develop an alternative method based on indirect determination of NNG by Griess reaction, with automation of two sample treatment steps through of a sequential injection system - SIA, that adds a fast and simple analytical procedure besides increase of sensitivity. Automated sample treatment steps consisted of derivatization by photolysis and solid phase extraction. The photolysis of NNG presented significant advantages over chemical derivatization, because of ultraviolet radiation at 254 nm that provides the cleavage of the N-NO, producing NO_2^- species. These ions were concentrated in an anion exchange solid phase and eluted with Griess reagent for subsequent determination at 540 nm. The sequential method with online extraction and photoderivatization provided a linear response in a concentration range of 0.05 to 0.75 mg L^{-1} NNG. A detection limit was estimated as $3.1 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$, that is approximately 32 times higher than the maximum limit established by the regulatory agencies. The coefficient of variation to three injections of the 0.05 mg L^{-1} of NNG was estimated in 3.74%. The preconcentration factor of the solid phase resulted in 12 times and reproducibility was 48 successive extractions without significant changes in the analytical signal. Recovery tests of 1.0 mg L^{-1} NNG for different amounts of technical glyphosate solid samples (1:10, 1: 100 and 1: 1000) showed that can be possible to determine NNG at lower concentrations of glyphosate as, 10 mg L^{-1} .

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE O HERBICIDA GLIFOSATO.....	6
2.1.1 Controle do teor de impurezas toxicologicamente relevantes em formulações de glifosato, com ênfase no N-nitrosoglifosato.....	7
2.1.2 Determinação de N-nitrosoglifosato em formulações à base de glifosato.....	10
2.2 AUTOMAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS.....	14
2.2.1 Fotólise aplicada a procedimentos de derivatização, com ênfase em N-Nitrosaminas	16
2.2.1.1 Fotoderivatização em sistemas de análises em fluxo.....	22
2.3 EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	25
2.3.1 Extração em fase sólida de troca aniônica	29
2.3.2 Extração em fase sólida nos sistemas SIA.....	32
3. DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA SIA PARA EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE NITRITO EM LINHA.....	37
3.1 PARTE EXPERIMENTAL.....	38
3.1.1 Equipamentos e materiais.....	38
3.1.2 Reagentes e soluções.....	40
3.1.3 Procedimentos experimentais	41
3.1.3.1 Otimização do sistema SIA para determinação de NO_2^- via reação de Griess.....	41
3.1.3.2 Automação da SPE para extração de NO_2^- explorando como eluentes soluções alcólicas em meio ácido e solução concentrada de NaCl.....	42
3.1.3.3 Sistema SIA para extração e determinação de NO_2^- em linha explorando o reagente de Griess como eluente.....	44
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.2.1 Otimização do sistema SIA para determinação de NO_2^- via reagente de Griess.....	46

3.2.2	Automação da SPE para extração de NO_2^- explorando eluentes alcóolicos em meio ácido e solução concentrada de NaCl.....	52
3.2.3	Sistema SIA para extração e determinação de NO_2^- em linha explorando o reagente de Griess como eluente	55
3.3	CONCLUSÕES DO CAPÍTULO.....	67
4.	DETERMINAÇÃO INDIRETA DE N-NITROSOGLIFOSATO POR FOTODERIVATIZAÇÃO E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO SISTEMA SIA.....	69
4.1	PARTE EXPERIMENTAL	69
4.1.1	Equipamentos e materiais.....	69
4.1.2	Reagentes e soluções.....	71
4.1.3	Procedimentos experimentais	71
4.1.3.1	Testes em batelada para avaliação da fotólise.....	71
4.1.3.2	Inserção da fotoderivatização no sistema SIA – SPE para determinação indireta de NNG.....	72
4.1.3.3	Estudos de interferência do glifosato com íons nitrito de diferentes fontes na presença da radiação UV.....	76
4.1.3.4	Aplicação do sistema SIA com fotoderivatização e SPE em linha para determinação de NNG em produto técnico e amostras de herbicidas comerciais à base de glifosato.....	77
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.2.1	Estudos relacionados a fotólise.....	78
4.2.1.1	Avaliação da estabilidade e temperatura da fotólise.....	79
4.2.2	Otimização do procedimento analítico de fotoderivatização no sistema SIA-SPE ..	81
4.2.2.1	Avaliação da interferência do glifosato sobre íons nitrito de diferentes fontes.....	96
4.2.3	Aplicação do sistema SIA com fotoderivatização e SPE em linha para determinação de NNG em produto técnico e amostras de herbicidas comerciais à base de glifosato.....	99
4.3	CONCLUSÕES DO CAPÍTULO.....	101
5.	CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	104
6.	REFERÊNCIAS.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

NNG	N-nitrosoglifosato
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SIA	<i>Sequential Injection Analysis</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
EPA - US	<i>Environmental Protection Agency of United States</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
NDMA	N-Nitrosodimetilamina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
SAX	<i>Strong Anion Exchanger</i>
NO•	Radical nitrosil
RG	Reagente de Griess
SAM	Sulfanilamida
NED	Naftiletilenodiamina
PT	Produto Técnico
CCD	Cromatografia de Coluna Delgada
UV	Ultravioleta
LD	Limite de Detecção
CV	Coeficiente de Variação
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>
HC	<i>Holding Coil</i>
PTFE	Politetrafluoretileno

NDELA	N-nitrosodietanolamina
SEC	<i>Size – Exclusion Chromatography</i>
DMA	Dimetilamina
HLB	<i>Hydrophilic – Lipofilic Balance</i>
d.i.	Diâmetro interno

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação da massa de fase sólida com capacidade de retenção e volume de eluente	31
Tabela 2. Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^3 para a otimização da extração em fase sólida de NO_2^-	46
Tabela 3. Volumes utilizados para avaliação da estratégia sanduíche. RG = Reagente de Griess (1:2), solução padrão de NO_2^- 0,55 mg L ⁻¹	49
Tabela 4. Variações na concentração do reagente de Griess através da diluição da solução estoque (v/v)	57
Tabela 5. Tabela dos resultados do planejamento fatorial 2^3 contendo os valores das replicatas e as respectivas médias	65
Tabela 6. Valor dos efeitos obtidos para o planejamento fatorial 2^3	65
Tabela 7. Faixas estudadas e variáveis selecionadas para os sistemas SIA com SPE em linha	66
Tabela 8. Procedimento operacional para determinação indireta de NNG	74
Tabela 9 Especificações do PT e das amostras comerciais de glifosato utilizadas	78
Tabela 10. Medidas da temperatura próxima a lâmpada UV em °C	81
Tabela 11. Tempos de exposição das soluções de NNG nas bobinas reacionais para fotólise	84
Tabela 12. Variações na massa de fase sólida utilizada para construção da minicoluna SPE, n=3.	88
Tabela 13. Faixas dos fatores estudados e valores selecionados para determinação indireta de NNG	88
Tabela 14. Medidas para o volume interno das minicolunas. Água destilada = 0,9969 g cm ⁻³ a 25,5 ° C	91
Tabela 15. Soluções, condições e absorvância obtida para os íons nitrito na presença de glifosato	96
Tabela 16. Resultados obtidos para recuperação de NNG em diferentes concentrações de glifosato	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado da síntese do herbicida glifosato.....	8
Figura 2. Esquema reacional da denitrosação ácida de uma N-nitrosamina. R= radicais, X ⁻ = ânion derivado do ácido.....	9
Figura 3. Estruturas moleculares do glifosato (1) e N-Nitrosoglifosato (2)	10
Figura 4. Diagrama de um sistema SIA. VB = válvula bidirecional, IN/OUT = posições de válvula bidirecional para bombeamento/aspiração de VB, D = descarte	16
Figura 5. Estrutura ressonante de uma N-nitrosamina.	19
Figura 6. Estruturas de uma N-nitrosamina desprotonada, protonada e complexo ácido. X = ânion do ácido utilizado.	19
Figura 7. Esquema reacional para a clivagem homolítica de uma N-nitrosamina.....	20
Figura 8. Esquema reacional para a clivagem heterolítica de uma N-nitrosamina.....	20
Figura 9. Passos para extração em fase sólida das espécies de interesse. (1) condicionamento e ativação do sorvente, (2) percolação da amostra no cartucho e retenção do analito e impurezas, (3) lavagem com solvente, (4) eluição do analito.....	28
Figura 10. Ilustração da ligação do grupo trocador de amina quaternária ligada quimicamente a sílica.	30
Figura 11. Esquema simplificado da reação de Griess para a formação do azo composto. ...	37
Figura 12. Esquema de construção de uma minicoluna SPE com uso de ponteiros de micropipeta para acoplamento no sistema SIA.	39
Figura 13. Diagrama de fluxo do sistema SIA para determinação de nitrito. VB = Válvula Bidirecional, IN/OUT = posições da válvula bidirecional para bombeamento e aspiração, HC = <i>Holding coil</i> ou bobina de retenção, A = solução padrão de NO ₂ ⁻ 0,15 – 0,55 mg L ⁻¹ , RG = Reagente de Griess (1:2), BR = Bobina de Reação , Detector = espectrofotômetro UV-Vis, D = Descarte..	41
Figura 14. Diagrama de fluxo do sistema SIA para determinação de NO ₂ ⁻ com SPE em linha e propulsão do reagente colorimétrico via bomba peristáltica. VB = Válvula Bidirecional, IN/OUT = posições da válvula bidirecional para bombeamento e aspiração, C = solução de condicionamento (acetonitrila 10 %), A = solução padrão NO ₂ ⁻ 0,55 mg L ⁻¹ , E= soluções eluentes [1-etanol 1:1 (v/v) em HCl 0,12 mol L ⁻¹ , 2 - metanol 1:1 (v/v) em HCl 0,12 mol L ⁻¹ , 3 - NaCl 1,0 mol L ⁻¹], BP = Bomba Peristáltica, RG = Reagente de Griess, SPE = minicoluna de	

extração, T = confluência, BPE = Bobina reacional Pós-Extração, Detector = espectrofotômetro e lâmpada UV-Vis, D = Descarte..... 43

Figura 15. Diagrama de fluxo do sistema SIA para extração e determinação de NO_2^- em linha e eluição via reagente de Griess. VB = Válvula Bidirecional, IN/OUT = posições da válvula bidirecional para bombeamento e aspiração, C = solução de condicionamento (acetonitrila 10%), A = soluções padrão NO_2^- 0,05 - 0,55 mg L^{-1} , RG = Reagente de Griess (1:4) – eluente, SPE = minicoluna de extração, T = confluência, BPE = Bobina reacional Pós-Extração, Detector = espectrofotômetro e lâmpada UV-Vis, D = Descarte. 45

Figura 16. Efeito do comprimento da bobina de reação para determinação de NO_2^- 0,25 mg L^{-1} . Volume da solução de NO_2^- = 200 μL , RG 1:2 (v/v) da solução estoque = 600 μL 46

Figura 17. Perfil do pico obtido indicando falta mistura entre os segmentos da zona de amostra. Solução de NO_2^- 0,25 mg L^{-1} = 200 μL , RG 1:2 (v/v) da solução estoque = 600 μL , bobina reacional = 30 cm..... 47

Figura 18. Efeito da vazão de bombeamento da zona de amostra para detecção de NO_2^- 0,25 mg L^{-1} . Volume da solução de NO_2^- = 200 μL , RG 1:2 (v/v) da solução estoque = 600 μL , bobina reacional = 50 cm..... 48

Figura 19. Esquema ilustrativo da estratégia de formação da zona de amostra sanduíche. . 48

Figura 20. Registro dos sinais analíticos para determinação de NO_2^- pelo método de Griess utilizando a amostragem sanduíche. Os volumes das soluções estão listados na Tabela 3 a bobina reacional utilizada foi de 50 cm. 50

Figura 21. Curva analítica para determinação de NO_2^- pelo método de Griess utilizando a amostragem sanduíche. 50

Figura 22. Registro dos sinais analíticos para determinação de NO_2^- com zona de amostragem sanduíche e parada de fluxo de 20 s. Os volumes das soluções estão listados na Tabela 3 a bobina reacional utilizada foi de 50 cm..... 51

Figura 23. Curva analítica para determinação de NO_2^- com zona de amostragem sanduíche e parada de fluxo de 20 s. 52

Figura 24. Registro de sinais obtido para diferentes concentrações de solução de NO_2^- em mg L^{-1} (1800 μL). Solução eluente = 300 μL de etanol 1:1 (v/v) em HCl 0,12 mol L^{-1} , bobina reacional pós-extração = 50 cm..... 54

Figura 25. Registro dos sinais obtidos com a eluição de nitrito com 300 μL de solução de NaCl 1,0 mol L^{-1} , bobina reacional pós extração = 50 cm..... 55

Figura 26. Efeito do volume de RG para a eluição de NO_2^- $0,55 \text{ mg L}^{-1}$ ($1800 \mu\text{L}$). Condições experimentais especificadas no item 3.1.3.3.....	56
Figura 27. Registro do sinal obtido para o branco com $300 \mu\text{L}$ do RG 1:4.....	57
Figura 28. Registro de sinais para verificação do efeito de memória para a extração de NO_2^- ($1800 \mu\text{L}$) e imagem da minicoluna pigmentada após sucessivas extrações. Solução eluente = $600 \mu\text{L}$ RG 1:4, bobina reacional pós extração = 100 cm ,.....	59
Figura 29. Registro de sinais para verificação do efeito de memória com condicionamento entre as extrações. O valor indica a concentração de NO_2^- em mg L^{-1} . Solução eluente = $600 \mu\text{L}$ RG 1:4, bobina reacional pós extração = 100 cm	60
Figura 30. Registro de sinais para determinação de NO_2^- com SPE em linha e eluição direta pelo reagente de Griess. Solução eluente = $600 \mu\text{L}$ RG 1:4, bobina reacional pós extração = 100 cm ,.....	61
Figura 31. Curva analítica para a determinação de NO_2^- com SPE em linha e eluição direta pelo reagente de Griess.....	62
Figura 32. Registro de sinais obtido da pré-concentração de NO_2^- com a ampliação da faixa de trabalho para menores concentrações. Solução eluente = $600 \mu\text{L}$ RG 1:4, bobina reacional pós extração = 100 cm	62
Figura 33. Curva analítica para determinação de NO_2^- com ampliação da faixa de trabalho para menores concentrações. Bobina reacional pós extração: 100 cm , solução eluente: $600 \mu\text{L}$ RG 1:4.	63
Figura 34. Produto colorido formado após a percolação de 55 mL da solução de NO_2^- 45 mg L^{-1} na fase sólida.....	64
Figura 35. Visão interna da estrutura do suporte construído para acoplamento do fotorreator no sistema SIA, mostrando a lâmpada UV (A) e a bobina reacional para fotólise (B). Dimensões (cm): caixa = $10 \times 17 \times 26$, lâmpada UV = 23 cm	70
Figura 36. Fotografia do sistema SIA com fotoderivatização e SPE acoplados em linha. (1) solução transportadora, (2) seringa, (3) Holding Coil, (4) válvula seletora multiportas, (5) fotorreator, (6) minicoluna para SPE, (7) bobina de reação pós coluna, (8) sistema de detecção.....	72
Figura 37. Diagrama de fluxo do sistema SIA para determinação indireta de NNG com automação da fotoderivatização e extração em fase sólida. VB = Válvula Bidirecional, IN/OUT = posições da válvula bidirecional para bombeamento e aspiração, C = solução de condicionamento (acetonitrila 10 %), A = soluções padrão NNG- $0,05 - 1,25 \text{ mg L}^{-1}$, RG =	

Reagente de Griess (1:3) – eluente, R = Bobina de reação para a fotólise, SPE = minicoluna de extração, T = confluência, BPE = Bobina de reação Pós-Extração, Detector = espectrofotômetro e lâmpada UV-Vis, D = Descarte.....	73
Figura 38. Imagens da minicoluna de vidro e produção da minicoluna com seringa de 1 mL: (A) minicoluna de vidro, (B) cortes realizados para a produção da minicoluna, (C) minicoluna com seringas.	76
Figura 39. Espectro da lâmpada UV de mercúrio de baixa pressão utilizada.	79
Figura 40. Gráfico da intensidade da radiação emitida pela lâmpada UV em 254 nm pelo período de 40 minutos.	80
Figura 41. Efeito do volume do padrão de NNG 1,00 mg L ⁻¹ para a fotoderivatização do mesmo e extração em fase sólida de NO ₂ ⁻ gerado. Volume da solução eluente = 600 µL RG 1:4, bobina reacional para fotólise = 50 cm, vazão da fotoderivatização = 20 µL s ⁻¹ , bobina reacional pós extração = 100 cm.	83
Figura 42. Efeito do comprimento da bobina do fotorreator para a fotoderivatização de NNG. Volume da solução padrão = 3600 µL de NNG 0,25 mg L ⁻¹ , volume da solução eluente = 600 µL RG 1:4, bobina reacional pós extração = 100 cm.....	83
Figura 43. Possível mecanismo para clivagem de NDMA e rotas subsequentes em meio aquoso. Adaptado de Lee e colaboradores ⁵⁵ . (1) formação do estado excitado, (2) clivagem homolítica da NDMA, (3) clivagem heterolítica de NDMA.	85
Figura 44. Efeito do tempo de parada de fluxo para a fotoderivatização de NNG 0,25 mg L ⁻¹ . Volume da solução eluente = 600 µL RG 1:4, bobina reacional para fotólise = 720 cm, bobina reacional pós extração = 100 cm.	86
Figura 45. Efeito do comprimento de bobina em diferentes concentrações do reagente de Griess. RG (v/v) = 1:2 (—), 1:3 (—), 1:4 (—) . Bobina reacional para fotólise = 100 cm, vazão da fotoderivatização = 20 µL s ⁻¹	87
Figura 46. Registro de sinais obtido para a determinação indireta de NNG com fotoderivatização e SPE utilizando todos os valores otimizados da Tabela 13.....	89
Figura 47. Curva analítica para determinação de NNG na faixa 0,25 – 1,25 mg L ⁻¹	89
Figura 48. Efeito do volume do padrão de NNG 0,05 mg L ⁻¹ sobre o sinal analítico utilizando os valores otimizados da Tabela 13.....	92
Figura 49. Registro de sinais obtidos com a fotoderivatização e extração em fase sólida de NNG para menores concentrações. Os valores indicam a concentração empregada para a	

nova faixa linear. Os parâmetros utilizados estão listados na Tabela 13 com exceção do volume da solução padrão de NNG que foi de 7200 μL	93
Figura 50. Curva de calibração obtida para a determinação de NNG com menor faixa linear.	93
Figura 51. Conversão fotolítica de NNG 0,75 e 1,00 mg L^{-1} para NO_2^- . As concentrações para o sinal esperado de nitrito são: 0,1875 mg L^{-1} e 0,25 mg L^{-1} , respectivamente. Volumes das soluções padrão de NNG e de $\text{NO}_2^- = 7200 \mu\text{L}$. Os parâmetros utilizados estão listados na Tabela 13 com exceção do volume das soluções padrão.	95
Figura 52 Espectro das soluções de NNG 390 mg L^{-1} e glifosato 340 mg L^{-1}	98

CAPÍTULO 1

Introdução e Objetivos

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Com o fomento e as constantes inovações da produção agrícola no mundo, o uso e comércio dos herbicidas crescem exponencialmente. Neste montante, pode-se destacar o glifosato (N-fosfonometil-glicina), que é o herbicida organofosforado mais utilizado mundialmente para o controle de ervas daninhas em diversos tipos de plantações, como: arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citrus, coco, feijão, fumo, eucalipto, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagens, pêra, pêssego, seringueira, soja, trigo, uva, dentre outras ^{1,2}.

As formulações comerciais dos herbicidas à base de glifosato são misturas de ingredientes ativos e aditivos extras como, tensoativos e surfactantes, denominados componentes inertes, dos quais são protegidos por sigilo industrial ³. Entretanto existem compostos derivados do processo de síntese do glifosato presentes nas formulações que são altamente tóxicos. Diante disso foram estabelecidos por lei teores máximos dessas impurezas nos produtos técnicos deste herbicida ^{4,5}. Dentre as impurezas toxicologicamente relevantes do herbicida glifosato, a principal é o N-Nitrosoglifosato (NNG). Essa espécie pertence ao grupo das N-nitrosaminas, compostos orgânicos, que apresentam efeitos toxicológicos acentuados, principalmente relacionados carcinogenicidade em animais ⁶.

O NNG é gerado em meio reacional através de reações intermediárias com o produto majoritário da síntese, o glifosato. Diante dessa propensão do glifosato a se converter a NNG em pontuadas situações, a determinação deste analito nos produtos comerciais de glifosato é comumente condicionada a procedimentos de separação da espécie, mediante o uso de técnicas analíticas de alto custo e longos e complexos procedimentos de preparo de amostra. Além disto, são poucos os métodos existentes que exploram a determinação deste analito ^{4, 7, 8, 9}.

O preparo de amostras é uma das etapas de maior relevância na sequência analítica. As técnicas empregadas disponibilizam por meio de transformações químicas ou físicas, alíquotas de amostra na qual o analito apresenta-se disponível e com menor quantidade de interferentes. Assim, este processo viabiliza ou melhora a detecção do analito ¹⁰. Este procedimento exige, muitas vezes, várias etapas como, digestão, diluição, decomposição, que despende muito tempo de análise. A automação dessas etapas apresenta expressivas vantagens para as determinações,

proporcionando métodos mais simples, rápidos, com menor produção de resíduos e menos suscetíveis a perdas por manipulação da amostra por realizar o procedimento em ambiente fechado ¹¹.

O preparo de amostra comumente empregado para a determinação de NNG consiste na prévia separação do composto por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), seguida da derivatização química por meio de ácidos fortes como HBr e HCl ^{4, 7, 8, 9}. A automação desse procedimento de derivatização em fluxo apresenta-se desvantajosa devido aos reagentes utilizados que proporciona alto aquecimento e requerem materiais resistentes para suportar as condições reacionais apresentadas ¹².

Em alternativa a esse procedimento, a derivatização por fotólise apresenta maior simplicidade operacional, menor complexidade, com princípios ambientalmente amigáveis. Esta técnica utiliza fótons como reagentes para a quebra das ligações químicas de compostos fotossensíveis e os converte em outras espécies determináveis por métodos de detecções mais simples ¹³, suprimindo as expressivas desvantagens apresentadas pela derivatização química convencional. Muitas vezes após o procedimento de derivatização, são utilizadas técnicas de separação que proporcionam melhorias na detectabilidade do analito ¹⁴.

Uma das técnicas de separação mais utilizadas em preparo de amostras e que se apresenta bastante compatível com a automação é a extração em fase sólida, SPE (do inglês, *Solid Phase Extraction*). A SPE é vastamente utilizada para separar ou concentrar analitos que se encontrem em baixas concentrações em suas matrizes ¹⁵ ou em amostras que contenham espécies em sua composição que reajam diretamente com o analito. O uso deste procedimento proporciona para a determinação analítica maior seletividade, sensibilidade e menor complexidade operacional ¹⁶.

Para a automação de módulos de processamento de amostras, como a fotoderivatização e a SPE, os sistemas de análises em fluxo, como o Sistema de Análise por Injeção Sequencial, SIA (do inglês, *Sequential Injection Analysis*) apresenta-se como alternativa promissora. Esse instrumento possibilita a inserção e manipulação de uma ou mais etapas de preparo de amostra através das diversas vias presentes neste sistema ¹⁷.

Tendo em vista os aspectos descritos, o presente trabalho de dissertação teve como objetivos principais a automação e otimização de duas etapas de preparo de amostras, a derivatização por fotólise e a extração em fase sólida, em um sistema SIA, para a determinação indireta do NNG pelo método de Griess.

Assim, esta dissertação foi dividida em seis capítulos, dos quais, este primeiro capítulo expõe uma breve introdução e os objetivos gerais desta dissertação. No capítulo 2 são explorados os conteúdos bibliográficos e teóricos a respeito dos principais aspectos deste trabalho como, o NNG e suas propriedades físico-químicas, a automação do preparo de amostras, o sistema SIA e características principais da fotoderivatização e extração em fase sólida para o preparo de amostra.

O capítulo 3 explora a primeira etapa experimental deste trabalho que consiste no desenvolvimento de um sistema SIA para determinação e extração de nitrito em linha explorando a reação de Griess. A última etapa experimental abordada no Capítulo 4, compreende os estudos de otimização da automação da fotoderivatização para a determinação indireta do NNG, no sistema resultante do Capítulo 3.

Por fim, o Capítulo 5 apontam as conclusões gerais e perspectivas futuras deste trabalho de dissertação e o Capítulo 6 lista as referências bibliográficas utilizadas.

CAPÍTULO 2
Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE O HERBICIDA GLIFOSATO

O glifosato, N-(fosfonometil)glicina ($C_3H_8NO_5P$), é um herbicida não seletivo amplamente utilizado no combate as plantas infestantes (ervas daninhas) em diversos tipos de cultivo. Este composto é um dos herbicidas mais produzidos e utilizados em escala mundial. Suas aplicações abrangem desde a jardinagem doméstica a enormes plantações. O uso deste herbicida foi também fomentado nos últimos anos, através do advento de culturas geneticamente modificadas resistentes a este produto, proporcionando assim maior seletividade para as culturas de interesse ^{18,19}.

O glifosato é normalmente comercializado em forma de sal, de três tipos: isopropilamônio-glifosato, glifosato-sesquisódio e glifosato trimesium. Os dois primeiros citados são patenteados pela Companhia Monsanto ²⁰ comercializados como *Round up*®, o glifosato trimesium é comercializado pela empresa Syngenta²¹.

As formulações são comercializadas nas formas: líquida, sólida e “*ready-to-use*” ¹. Normalmente, nas composições do herbicida comercial são adicionados outros componentes, com objetivo de aumentar a eficácia do produto. Dentre estes compostos adicionais é possível encontrar surfactantes e outras substâncias que contribuem para a fixação do herbicida na planta ou aumentar a atividade do glifosato, porém essas informações são frequentemente omitidas pelos fabricantes para proteção da formulação. ^{3,22}.

As especificações para ensaios químicos de 2014, disponibilizadas pela FAO - US (*Food and Agriculture Organization – United States*) ⁴ classifica o glifosato como um produto que apresenta baixa toxicidade aguda sem efeitos adversos aos seres humanos, relacionados a carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, e/ou toxicidade reprodutiva ⁴. Entretanto, em março de 2015, a IARC (*International Agency of Research on Cancer*) avaliou a toxicidade de alguns herbicidas organofosforados, dentre eles o glifosato. Após as realizações dos testes adequados e da constatação de níveis de glifosato no ar, água, alimentos, no sangue e urina dos trabalhadores agrícolas, a IARC classificou o produto como classe 2-A (provável cancerígeno em humanos) ^{18,23}. Essa nova classificação para o

glifosato apresenta-se preocupante para o mundo, principalmente para países com alto consumo deste herbicida como o Brasil ²⁴, uma vez que além da potencial toxicidade aliada ao glifosato, as formulações já possuíam algumas impurezas com características expressivamente tóxicas em suas composições. Esses contaminantes e seu relativo controle por órgãos governamentais serão melhores abordados no próximo tópico.

2.1.1 Controle do teor de impurezas toxicologicamente relevantes em formulações de glifosato, com ênfase no N-nitrosoglifosato

Durante a síntese do glifosato são produzidas, por reações concomitantes, várias impurezas como: glifosina, ácido hidroximetilfosfônico, ácido iminobismetilfosfônico, ácido aminometilfosfônico (AMPA), N-metilglifosato, e algumas são consideradas mais tóxicas que o próprio glifosato, como o N-Nitrososfonometil-glicina ou N-Nitrosoglifosato (NNG) e formaldeído ⁴.

O NNG e o formaldeído são classificadas como toxicologicamente relevantes por agências internacionais como a FAO ⁴, EPA-US (*Environmental Protection Agency of United States*) ²⁵ e nacionais como, ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em conjunto com IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis) ⁵.

Para a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) as impurezas toxicologicamente relevantes são substâncias que tem potencial de apresentar efeitos tóxicos intensos ao se comparar com o ingrediente ativo, que podem aumentar a fitotoxicidade, alterar as propriedades físicas do produto, liberar resíduos indesejáveis nos alimentos ou causar contaminação ambiental ²⁶.

Devido a comprovada toxicidade do formaldeído e do NNG aos seres humanos e meio ambiente, os níveis máximos permitidos dessas substâncias nos produtos técnicos de glifosato são de 1,3 g kg⁻¹ e 1,0 mg kg⁻¹, respectivamente ^{4,5}. Os limites normatizados são comuns à agências internacionais como a FAO ⁴, e para agências Brasileiras ANVISA e IBAMA ⁵. Desta maneira, os produtos técnicos em que os teores dessas impurezas estejam superiores aos limites vinculados pelas normativas, não podem ser utilizados para a fabricação dos produtos formulados (herbicidas comerciais). Dessa maneira assegura-se que nos produtos formulados, a

concentração dessas impurezas sejam menores que os limites regulatórios. Assim, as formulações de glifosato em que as concentrações de formaldeído e NNG estejam acima desses limites de regulação não podem ser comercializadas ou exportadas.

Para o formaldeído não há registros claros na literatura de como essa substância é formada nos produtos finais de glifosato. Alguns estudos apontam que a obtenção desta impureza pode estar relacionada a degradação do AMPA ²⁷. Já para o NNG, a literatura pontua possíveis causas para a presença deste contaminante no meio, que pode estar relacionada a reações concomitantes que ocorrem durante o processo de síntese do herbicida ⁴.

Existem diversas rotas sintéticas para obtenção do glifosato, sendo que o procedimento mais utilizado baseia-se na reação com três fases, sendo elas síntese, condensação e hidrólise ²⁸. Um esquema simplificado para a síntese do glifosato está ilustrado na Figura 1.

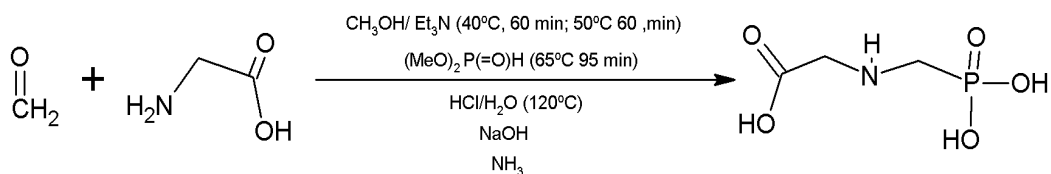


Figura 1. Esquema simplificado da síntese do herbicida glifosato. Adaptado de Zhou e colaboradores ²⁸.

A nitrosação do glifosato é uma reação que ocorre de forma concomitante com a síntese do herbicida e é a principal responsável pela presença do NNG nos produtos finais. A ocorrência desta reação no meio está relacionada com a presença de espécies nitrosantes, [NO]x, na água e/ou no ar que são utilizados nas etapas reacionais ⁴.

O NNG faz parte do grupo das N-nitrosaminas que apresenta efeitos conhecidamente carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos em animais. Estudos realizados por Magee e Barnes ⁶ demonstraram a relação direta da exposição a uma das nitrosaminas mais simples, a NDMA (N-nitrosodimetilamina), com a ocorrência de tumores hepáticos em ratos. Segundo os autores, através de ensaios realizados

com mais de 300 espécies de nitrosaminas foi possível comprovar que 90 % das espécies testadas, apresentaram efeitos carcinogênicos em diferentes animais ⁶.

As nitrosaminas são compostos orgânicos que possuem o grupo nitroso [-NO] ligado diretamente ao sítio nitrogênio da amina. A forma mais comum de obtenção de N-Nitrosaminas é reação de nitrosação de aminas secundárias, com agentes nitrosantes, como: NO_3^- , NO_2^- e NO ²⁹.

As N-nitrosaminas podem estar presentes em diversos produtos, como: detergentes, corantes, produtos cárneos, formulações cosméticas e herbicidas, como o glifosato. Devido a sua elevada toxicidade, a literatura aborda alguns procedimentos que buscam a eliminação destas espécies, através de técnicas de destruição segura, baseadas na sua denitrosação de forma a descaracterizar a nitrosamina ²⁹.

A denitrosação consiste na retirada do grupo [NO] da amina. Para esta reação são utilizados comumente ácidos minerais fortes como HCl, HBr, HI e mais raramente, a fotólise direta da espécie ^{29,30}. A denitrosação ácida de N-nitrosaminas, chamada também de derivatização química (Figura 2), leva a formação de uma amina secundária e um grupo nitroso, sendo assim a reação de ordem inversa da nitrosação. A adição de ácido no meio deve ser realizada de modo que favoreça o equilíbrio da reação para formação dos produtos, desta maneira, desfavorecendo a ocorrência da nitrosação ²⁹. A denitrosação por fotólise será melhor abordada no tópico 2.2.1 deste capítulo.

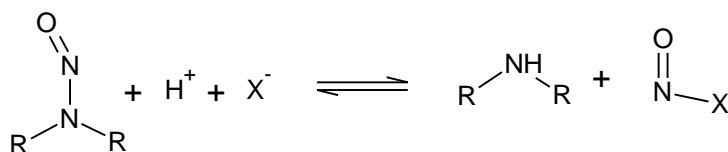


Figura 2. Esquema reacional da denitrosação ácida de uma N-nitrosamina. R= radicais, X^- = ânion derivado do ácido. Adaptado de Loeppky e Michejda ²⁹.

O NNG possui estrutura molecular semelhante a do glifosato, o que acarreta, também, em uma similaridade nas suas características físico-químicas ⁴. A diferença das duas moléculas encontra-se apenas no grupo [NO], ligado ao sítio da amina, característico das N-nitrosaminas (Figura 3). Com isso, a separação desses compostos muitas vezes é dificultada devido a grande semelhança associada a

essas espécies ⁴. Sendo assim, a maioria dos métodos para a determinação do NNG apresentam uma etapa destinada a separação destes compostos, que será melhor abordada no próximo tópico.

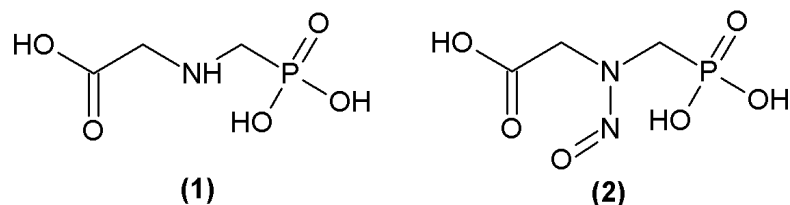


Figura 3. Estruturas moleculares do glifosato (1) e N-Nitrosoglifosato (2).

2.1.2 Determinação de N-nitrosoglifosato em formulações à base de glifosato

A determinação de NNG tem sido pouco abordada na literatura ^{4, 7, 9, 31, 32, 33}. Essa escassez de informações pode estar relacionada com o sigilo industrial ³ a respeito da rota produtiva do herbicida, uma vez que o NNG é uma impureza inerente apenas aos produtos técnicos de glifosato ou de formulações que contenham o glifosato ou seus sais ^{1, 4}.

Dentre os métodos existentes na literatura, a maioria realiza uma separação prévia do NNG da matriz de glifosato. Esta necessidade de isolamento do analito está relacionada, dentre outros aspectos, a ausência de métodos seletivos para essa determinação.

O método indicado pela FAO ⁴ para determinação de NNG em formulações de glifosato é similar ao método oficial da companhia Monsanto ⁷. Este procedimento é destinado a formulações sólidas e utiliza Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a separação do NNG da amostra em forma aniônica em uma coluna SAX (*Strong Anion exchanger*). A eluição é realizada com uma solução de fosfato de amônio/metanol (pH 2,1). Após a separação, o NNG é submetido a derivatização química liberando as espécies nitrosil (NO•) e NO₂⁻. A denitrosação do NNG é realizada com uso de ácido bromídrico (HBr) em concentrações elevadas 48 % (v/v) e temperatura de 95 °C, por aproximadamente 15 minutos. Após essa reação é adicionado o reagente de Griess (RG), que consiste numa solução formada por Sulfanilamida (SAM) 1,0 g L⁻¹ em HCl 1,2 mol L⁻¹ e de 1-Naftiletlenodiamina (NED) 4,35 g L⁻¹ em HBr (48 %) em meio ácido. Esta solução reage com NO• e NO₂⁻ e

forma um composto de coloração rosa, que absorve radiação visível na faixa de 540 nm⁴.

O RG é amplamente utilizado para a determinação espectrofotométrica de espécies NO_2^- ^{34, 35}. Diante da seletividade apresentada pela reação de Griess para espécies nitrito, este método tem sido bastante utilizado para a determinação indireta de espécies que possam gerar nitrito, como nitratos e N-nitrosaminas.

O método mais recente para determinação de NNG da companhia Monsanto (AQC 1140-E) é destinado a formulações líquidas e segue o mesmo procedimento citado acima⁸. Ambos os métodos possuem expressivas desvantagens, como alto número de etapas que favorece a propagação de erros analíticos, uso de alta concentração de ácidos e alta temperatura do reator pós-coluna (95 °C). Além disto, esses métodos apresentam o inconveniente da possível formação de espécies NO_3^- e da reação concomitante entre NO_2^- e HBr, gerando a espécie NOBr, que em ambos casos ocasiona subestimação no produto gerado no meio reacional para detecção³⁶.

Uma tentativa de simplificação dos métodos descritos acima foi proposta por Kim e colaboradores⁹, destinada a amostras de produto técnico (PT) de glifosato. O procedimento emprega a CLAE com coluna SAX e detecção espectrofotométrica. A proposta abordou a realização de todo o procedimento em fluxo contínuo. O preparo de amostra foi realizado com adição de ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ nas amostras de glifosato, que auxiliou na separação do NNG e do glifosato em fase estacionária SAX. A eluição foi realizada com Na_2SO_4 em pH 11,5. O eluato foi direcionado ao mesmo fluxo da solução carregadora que era composta por porcentagens de NED e de SAM em HCl 4,5 mol L⁻¹. Dessa maneira a solução carregadora, além de denitrosante, era também o reagente colorimétrico. O eluato e a solução denitrosante/reagente foram mantidos em aquecimento a 95 °C por 15 minutos. Em seguida o produto foi enviado a um banho gelado antes de seguir para a cela de detecção espectrofotométrica⁹.

Esta proposta apresentou alta complexidade operacional, uso de equipamentos de custo elevado e tempo de procedimento relativamente longo, não abolindo grande parte dos inconvenientes relacionados aos métodos oficiais. Entretanto, o método apresenta a substituição do HBr por HCl em menor

concentração e a realização do procedimento em linha proporcionou a diminuição no consumo de reagentes e também o aumento da sensibilidade analítica quando em comparação aos métodos oficiais.

Outro método que explora a determinação de NNG em amostras de PT de glifosato foi proposto por Pastore e colaboradores³³. Primeiramente, foi realizada uma extração prévia do NNG por meio da diluição de 5,0 g da amostra em 25 mL de solução de H₂SO₄ com agitação, repetindo o procedimento até completar 100 mL. O tempo total do preparo de amostra fora da CLAE foi de 30 minutos. Logo após o extrato foi inserido em uma coluna Dionex de troca aniônica e a separação dos compostos foi realizada. A detecção foi realizada por condutimetria. Os autores relataram a presença de dois confômeros para o NNG, em que a presença de uma das estruturas depende do pH da solução. Como desvantagem o método apresentou um tempo longo de preparo de amostra e os autores relataram o inconveniente da saturação dos sítios da fase estacionária com grandes quantidades de glifosato que pode prejudicar a retenção de NNG na fase estacionária.

Young e colaboradores³⁷, realizaram um dos primeiros estudos que abordam a fotólise do NNG com radiação ultravioleta (UV). A espécie alvo deste trabalho foi o glifosato presente em raízes e folhas. Desta maneira, o glifosato foi submetido a nitroação, para obtenção do NNG, para isso uma solução de glifosato foi misturada a uma solução de NaNO₂ em pH 3. O NNG foi então separado por cromatografia de coluna delgada (CCD), e a clivagem fotolítica do NNG foi realizada por meio da exposição da solução à radiação UV por 10 minutos. Os produtos derivados da clivagem como AMPA e glicina, foram misturados a reagentes fluorescentes, como fluorescamina ou cloreto de difenilamina-paládio. As amostras foram preparadas com extração por solventes e foram fortificadas com o NNG e o procedimento seguiu como descrito acima. Este trabalho relata o primeiro registro encontrado na literatura com o emprego da radiação UV na derivatização do NNG. Mesmo que a aplicação não foi direcionada ao NNG, os autores apontam que esse método pode ser explorado para esta finalidade devido ao baixo limite de detecção (LD) = 0,2 ng e elevadas recuperações desta espécie nas amostras. Assim, este estudo confirma que a denitroação do NNG pode ser realizada por meio da fotólise dessa espécie.

Outra alternativa para a determinação indireta do glifosato por meio da formação de NNG, foi proposta por Bronstad e Friestad³⁸. A matriz deste estudo foram águas naturais. O procedimento utilizou amostras de água fortificadas com glifosato (1:1) em meio ácido e a separação foi realizada por meio de uma coluna Dowex 1X-8. Após a separação, o eluato contendo glifosato, foi submetido a nitroação por meio da adição de uma solução de NaNO_2 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em meio ácido. As medidas do NNG formado foram realizadas por polarografia de pulso diferencial. Este estudo baseou-se na eletroatividade apresentada pelo NNG, enquanto o glifosato não apresentou essa característica. Assim o método apresentou recuperação de 58 %, tempo de análise relativamente alto, de 3 – 4 h para somente uma amostra. O autor relata a boa seletividade para o NNG por parte do sistema de detecção, uma vez que outros compostos mais abundantes da matriz não são nitrosados pela reação, como o AMPA e não se apresentam como interferentes na detecção. Entretanto, apesar desta vantagem apresentada pelo método, seria difícil a automação desse sistema de detecção utilizado em um sistema de análises por injeção sequencial.

Observa-se pelos trabalhos citados que a determinação de NNG é influenciada diretamente pela presença de glifosato no meio, a medida que um pode ser convertido no outro por reações de denitroação e nitroação. Quando a quantidade de NNG no meio é maior em relação ao glifosato^{37, 38} percebe-se pouca influência do glifosato na determinação. Entretanto, quando da presença de elevadas quantidades de glifosato e baixas de NNG são exigidos procedimentos de preparo de amostra mais elaborados que visam separar as duas espécies para posterior quantificação.

Algumas matrizes apresentam componentes que interferem na obtenção do sinal para determinado analito, como é o caso do glifosato e NNG. Esse fenômeno é denominado efeito de matriz e é dependente das características físico-químicas dos componentes da amostra ou a solventes e/ou reagentes utilizados no preparo das soluções de trabalho³⁹. Quando da ocorrência deste efeito, é necessário o uso de técnicas que tornem o analito disponível e apropriado para quantificação. Diante disto, a etapa de preparo de amostra apresenta-se como ferramenta indispensável e a automação dessa técnica possibilita procedimentos analíticos mais simples, rápidos e reprodutíveis.

2.2 AUTOMAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS

O preparo de amostra é um procedimento que visa isolar e/ou concentrar analitos de uma determinada matriz e/ou realizar a limpeza da amostra (*clean up*). O número de etapas destinadas para o preparo de uma amostra depende diretamente do analito, da sua concentração no meio e da composição da matriz ¹⁰.

As técnicas de preparo de amostra podem ser divididas em dois modos de processamento: *off-line* (fora da linha) e *on-line* (em linha). No modo *off-line* todo o procedimento de concentração e/ou extração do analito é realizado fora do instrumento de análises. No modo *on-line*, o procedimento é realizado nos módulos analíticos inseridos em linha no sistema ¹⁰, caracterizando assim, a automação do procedimento de preparo de amostra.

Em geral, a automação visa realizar todas as etapas requeridas pelo método no modo *on-line* e com a menor intervenção humana possível. Isto possibilita a obtenção de resultados analíticos fidedignos e com maior rapidez, por meio do uso de equipamentos mecânicos ou robóticos. Uma alternativa que apresenta excelentes resultados para a automação de preparos de amostra são os sistemas de análises por injeção em fluxo, FIA (do inglês, *Flow Injection Analysis*) devido as características inerentes a esses equipamentos que são essenciais para automação de procedimentos ¹¹.

Os sistemas FIA são instrumentos analíticos empregados em análises químicas que utilizam de movimentos característicos de fluídos (dispersão, convecção e difusão) para a determinação de uma espécie. Alíquotas definidas de amostra e reagente são introduzidas em um fluído transportador, que forma a zona de amostra. Esse fluído tem como função conduzir esses segmentos das soluções até o sistema de detecção ⁴⁰. Quando a zona de amostra passa pelo detector é gerado um sinal transiente, proporcional ao gradiente de concentração, formado pela dispersão da amostra nos segmentos de fluxo. Assim, a temporização reprodutível da análise química, permite com que as reações ocorram em condições controladas de formação dos produtos, minimizando o tempo de análise, uma vez que não há necessidade da ocorrência do equilíbrio da reação ⁴⁰. Assim, no percurso analítico podem ser adicionadas soluções reagentes e módulos de preparo de amostra como:

a SPE ⁴¹, extração líquido – líquido ⁴², câmaras de diluições ⁴³ e lâmpadas para reações fotoquímicas ⁴⁴.

Os sistemas SIA são considerados uma segunda geração dos sistemas FIA, não em questão de avanço da técnica, mas de complementariedade de funções. Os analisadores sequenciais são instrumentos com maior versatilidade que apresentam simplicidade nos comandos operacionais e manipulação das diversas vias por meio de uma válvula multiportas. Devido a presença dessa válvula é possível o acomodamento de diversas soluções reagentes, como também, várias unidades de processamento de amostra ¹².

Basicamente, os sistemas SIA possuem uma seringa como sistema de propulsão, uma válvula multiportas de 8 vias, uma bobina de retenção, do inglês, *Holding coil* (HC) e um sistema de detecção (Figura 4). A seringa realiza dois movimentos: aspiração e bombeamento dependendo do seu sentido. Na ponta da seringa há uma válvula bidirecional que a partir de um comando via *software* abre a porta *IN* ou *OUT* (Figura 4). A válvula multiportas possui oito portas para inserção de soluções e/ou módulos, que se comunicam individualmente com a via central (Figura 4). Nesta via central está conectado o HC que se liga a porta *OUT* da seringa. Desta maneira, para a formação dos segmentos da zona de amostra, primeiramente os volumes são aspirados pela seringa para a bobina de retenção (direção da seta azul, Figura 4) e em seguida, através da reversão do sentido do fluxo (seta verde, Figura 4) a mistura é bombeada para o sistema de detecção ^{17, 45}.

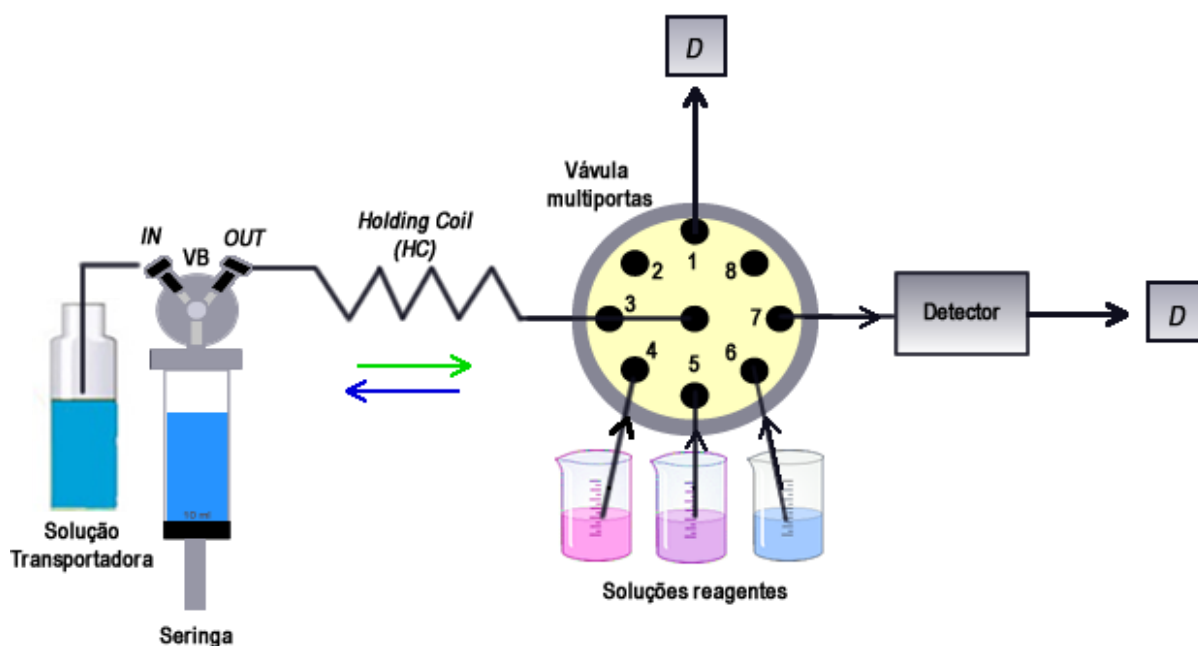


Figura 4. Diagrama de um sistema SIA. VB = válvula bidirecional, IN/OUT = posições de válvula bidirecional para bombeamento/aspiração de VB, D = descarte. As setas indicam a direção do fluxo.

Dentre os diversos módulos de processamento de amostra que podem ser acomodados nos sistemas em linha, como os sistemas FIA e SIA citados acima, encontram-se os módulos de fotoconversão⁴⁶. O uso da radiação tem sido bastante explorado como procedimento de preparo de amostras. Assim, procedimentos de conversão fotoquímica, como a derivatização por fotólise ou fotoderivatização apresenta-se como alternativa para o preparo de amostra de espécies que sejam fotossensíveis, ou seja, apresentem mudanças em sua estrutura molecular quando expostas a radiação eletromagnética. A automação deste módulo para preparo de amostra é bastante comum em instrumentos analíticos, principalmente em modo de derivatização pós-coluna (CLAE) de compostos farmacêuticos¹³, ou com menor aplicação, em sistemas FIA⁴⁶. O próximo tópico aborda a utilização da fotoderivatização como preparo de amostra, em especial para as N-nitrosaminas e a automação deste procedimento em alguns instrumentos analíticos.

2.2.1 Fotólise aplicada a procedimentos de derivatização, com ênfase em N-Nitrosaminas

Em geral, a fotoquímica aborda estudos reacionais de moléculas eletronicamente excitadas e suas propriedades químicas e físicas, desde a absorção

da radiação na região ultravioleta e visível, até o retorno ao estado fundamental ⁴⁷. O preparo de amostra envolvendo radiação eletromagnética, normalmente é direcionado para a decomposição, degradação e rompimento de ligações químicas de determinadas espécies. A radiação UV é vastamente utilizada para o preparo de amostras e abrange a região do espectro eletromagnético de 190 a 380 nm ⁴⁸.

Procedimentos direcionados a derivatização de espécies permite obter novos compostos que apresentam-se melhores adequados a sistemas de detecção mais simples ¹³. As espécies químicas fotossensíveis podem ser submetidas a procedimentos de derivatização por fotólise que proporciona maior detectabilidade a espécie. A fotoderivatização é uma técnica ambientalmente amigável, que aliada aos princípios de química verde, produz mínima quantidade de resíduos ao utilizar fótons nas reações, em alternativa aos reagentes químicos comumente utilizados nas derivatizações convencionais ¹³.

O uso de reações fotoquímicas no preparo de amostra, proporciona diversas vantagens ao procedimento analítico, como, flexibilidade, rapidez, simplicidade, seletividade e minimização na geração de resíduos ¹⁴. Em comparação com as derivatizações químicas convencionais, a fotoderivatização apresenta as seguintes vantagens: i) a utilização dos fótons como reagentes, sem precisar de preparo, armazenamento e controle de degradação de soluções, ii) especificidade para quebra energética da ligação, devido a sensibilidade que algumas ligações da estrutura molecular do analito apresenta para determinados comprimentos de onda, iii) não há necessidade da reação atingir o equilíbrio reacional quando a eficiência de conversão for considerada reprodutível ¹⁴. Além disso, fotoderivatização tem sido apontada como um dos agentes de derivatização mais baratos atualmente ¹³.

Para utilização desta técnica, os módulos empregados são simples, normalmente fotorreatores, constituídos de lâmpadas de mercúrio, nos quais por meio de tubos de diâmetro reduzido, as soluções são expostas a radiação para ocorrência da reação química ¹³. Os fotorreatores tem sido miniaturizados, aliando ainda mais os princípios da química verde para a técnica ^{13, 49}.

A fotoderivatização pode ser facilmente adaptada em equipamentos que possuam linhas de conexão contínua como cromatógrafos e analisadores em fluxo. Para o acoplamento em linha nestes sistemas, utiliza-se comumente tubos de PTFE

(Politetrafluoretileno) para expor as soluções a radiação e conseqüentemente realizar as conexões do fotorreator com o instrumento analítico ^{13, 50}.

Assim, para compostos que apresentem a fotolabilidade, como as N-nitrosaminas, a fotoderivatização pode ser adequadamente aplicada como preparo de amostra. Dessa forma, através dos compostos derivados da fotólise podem ser aplicadas reações sequenciais, como a reação de Griess, que podem proporcionar determinações seletivas dessas espécies ⁵¹. Entretanto, para a utilização da fotoderivatização é necessário conhecer alguns comportamentos básicos do analito de interesse quando da exposição a radiação. As N-nitrosaminas são compostos fotossensíveis e as características fotoquímicas relacionadas à exposição da espécie à radiação UV serão melhores exploradas abaixo.

As propriedades fotoquímicas das N-nitrosaminas tem sido extensamente estudadas desde as décadas de 1960 e 1970 ^{52, 53, 54}. O crescimento nos estudos das propriedades dessas espécies foi fomentado com a descoberta da sua alta toxicidade apresentada nos estudos publicados por Maggee e Barnes em 1956 ⁶. As N-nitrosaminas são compostos fotolábeis, que sofrem clivagens de algumas ligações de sua estrutura quando expostas a radiação UV, em comprimento de onda de específico. Os compostos formados pela clivagem das N-nitrosaminas são comumente: NO_2^- , $\text{NO}\cdot$, glicina ⁵³.

Apesar da dificuldade na indicação de rotas reacionais, a literatura apresenta alguns trabalhos que propõe mecanismos para a fotoderivatização de N-Nitrosaminas simples, como a NDMA ⁵⁵. Outros estudos abordam a fotoquímica geral dessas espécies, expondo propriedades e explicando os diferentes tipos de reações que podem ocorrer com outras nitrosaminas, como, a N-nitrosopiperidina, N-nitrosodipentilamina e N-nitrosohidroxilamina ⁵². Além disso, a forma e o meio em que essas espécies se encontram são etapas definitivas para o bom rendimento da conversão fotoquímica.

Devido à estrutura ressonante presente nas N-nitrosaminas, essas são classificadas como *zwiterions* (Figura 5). Essas espécies apresentam a densidade de carga eletrônica concentrada no átomo de oxigênio, favorecendo com que a protonação da espécie ocorra na terminação em que o oxigênio se encontra ⁵².

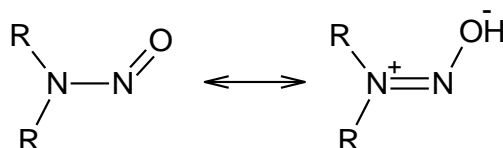


Figura 5. Estrutura ressonante de uma N-nitrosamina. Adaptado de Chow ⁵².

Segundo Chow ⁵³, as N-nitrosaminas desprotonadas (Figura 6, A) ou protonadas (Figura 6, B) sofrem pouca ou nenhuma fotólise. Em A (Figura 6), devido a concentração de carga no oxigênio essa espécie tem tendência a converter-se em B. A formação de B (Figura 6) está condicionada à presença de elevadas concentrações de ácidos, como HCl e H₂SO₄, com aproximadamente 4 mol L⁻¹ (pH menor que 1). Assim, o autor aponta que as N-Nitrosaminas em forma de complexo ácido (Figura 6, C), que é formado na presença de menores concentrações ácidas, 2 mol L⁻¹ (pH maior que 2), são as mais suscetíveis a clivagem fotolítica de suas ligações ⁵³.

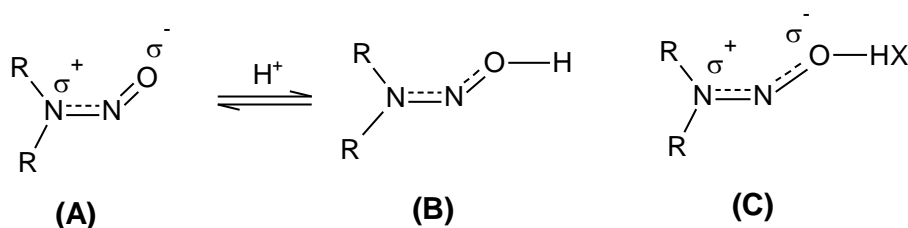


Figura 6. Estruturas de uma N-nitrosamina desprotonada, protonada e complexo ácido. X = ânion do ácido utilizado. Adaptado de Change Lee e colaboradores ⁵⁵.

Estudos para a fotólise de uma das N-nitrosaminas mais simples, a NDMA, indicam a existência dois mecanismos reacionais de quebra de ligação: a clivagem homolítica e heterolítica ⁵⁵. A clivagem homolítica consiste na quebra da ligação N-NO, conforme é possível observar na Figura 7, na qual os radicais amino derivado e nitrosil são formados. O nitrosil, por sua vez, sofre rápida oxidação a NO₂⁻ em meio aquoso ⁵⁵.

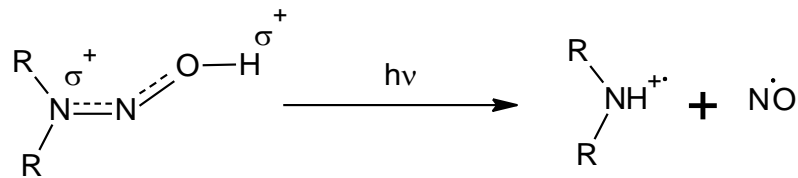


Figura 7. Esquema reacional para a clivagem homolítica de uma N-nitrosamina.

O segundo mecanismo consiste na clivagem heterolítica da ligação N-NO, que tem como produtos uma amina e o íon NO_2^- (Figura 8), proveniente da dissociação do ácido nitroso ⁵⁵.

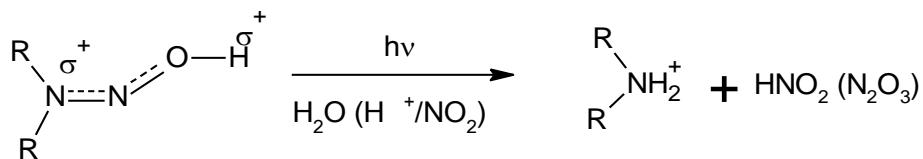


Figura 8. Esquema reacional para a clivagem heterolítica de uma N-nitrosamina.

Como resultados dos seus estudos, Wang ³⁶ e colaboradores apontam que de acordo com princípios termodinâmicos, a clivagem homolítica é mais favorecida que a heterolítica. Entretanto, outros estudos evidenciam o favorecimento da clivagem heterolítica devido ao ataque nucleofílico da água ao grupo nitroso da espécie ⁵². Desta forma, ambas as reações podem ocorrer em meio aquoso, sendo que nos dois casos há a formação de NO_2^- no meio. Ademais, Lee ⁵⁵ e colaboradores realizaram estudos de otimização da clivagem fotolítica da NDMA. Os resultados demonstraram que o comprimento de onda responsável pela quebra da ligação N-NO se encontra em torno de 254 nm e que em pH maior que 2 até o neutro, a NDMA apresentou maior eficiência de conversão em produtos ⁵⁶. Assim, de uma forma geral, pode-se atribuir essas características e mecanismos reacionais ao NNG, uma vez que na literatura não há registros para a fotólise dessa espécie.

Em cromatografia líquida, a fotoderivatização pós-coluna é bastante utilizada para análises de fármacos ^{49, 57, 58}, alimentos ^{59, 60, 61, 62} dentre outros. Desta forma, espécies complexas são separadas e convertidas a novos produtos, por meio da incidência de radiação. Essas novas espécies, apresentam propriedades que possibilitam a determinação em detectores comuns como: UV-Vis, fluorescência ou eletroquímicos.

Uma aplicação interessante da fotoderivatização de N-nitrosaminas em CLAE foi o procedimento proposto por Lee e seus colaboradores⁵¹. O estudo consistia na determinação espectrofotométrica do NO_2^- gerado pela fotólise de algumas N-nitrosaminas, como a NDMA, N-nitrosodietanolamina (NDELA) e mais outras sete nitrosaminas presentes em água. Os compostos eram previamente separados em uma fase estacionária SEC (*Size – Exclusion Chromatography*), e com o procedimento em linha, o eluato era exposto a radiação em um fotorreator composto por uma lâmpada UV e uma bobina reacional de capacidade para 1 mL. Um sistema pós-coluna foi empregado para adição do reagente de Griess e posterior detecção. Os autores relacionam dados importantes de eficiência para a fotólise, dos quais a NDELA apresentou 80 % de liberação de NO_2^- em 15 minutos de exposição e para N-nitrosaminas aromáticas, como a N-dimetilnitrosoanilina, a conversão foi de apenas 10 % em 30 minutos de exposição⁵¹. Assim, para esse estudo essas N-nitrosaminas não foram classificadas como fotolábeis. Os autores ainda realizaram a determinação de outros compostos nitrosados como nitrito e nitrato, que demonstraram que para esta matriz a fotólise apresentou-se como seletiva para as N-nitrosaminas.

Outra aplicação para a fotoderivatização de N-nitrosaminas em CLAE foi proposta por Bellec e colaboradores⁶³ na qual a determinação foi realizada também por espectrofotometria pela reação de Griess com o nitrito proveniente da fotólise das espécies. A aplicação foi direcionada a amostras de cerveja e de suco gástrico. Os compostos foram separados em fase estacionária reversa e o eluato da coluna foi enviado, em linha, a um fotorreator com uma bobina reacional com capacidade de aproximadamente 1,7 mL, que foi envolta na lâmpada UV. A linha que levava o produto fotoderivatizado foi conectada a linha em que o RG era bombeado formando o produto para a detecção. O estudo demonstrou valores de conversão de 90 % quando da presença de pequenas concentrações para as nove N-nitrosaminas analisadas (5 – 9 nanogramas - ng), dentre elas o NDMA em concentração de 1 ng.

Os trabalhos supracitados evidenciam os excelentes resultados da fotoderivatização como preparo de amostra de diferentes N-nitrosaminas que possuem estruturas moleculares próximas a do NNG, proporcionando a esses métodos maior sensibilidade, seletividade e eficiência. Porém os métodos apresentados utilizam de técnicas de custo elevado e com tempo de análise

relativamente altos, dos quais apenas para a separação das espécies na fase estacionária são gastos de 30 a 50 minutos.

Os sistemas de análises em fluxo apresentam-se como uma excelente alternativa para suprir as desvantagens apresentadas pela técnica citada acima, uma vez que são equipamentos mais simples, versáteis com custo relativamente menor e apresentam alto processamento amostral.

2.2.1.1 Fotoderivatização em sistemas de análises em fluxo

Métodos analíticos que envolvem o uso de radiação tem sido bastante empregados em sistemas FIA, para fins diversos como, degradação de resíduos tóxicos reacionais ⁶⁴, na derivatização de espécies ^{32, 65, 66}, especiação de metais ⁶⁷, digestão de amostras ⁶⁸ ou digestão e especiação conjunta de espécies químicas ⁶⁹.

A utilização de lâmpadas como módulos de preparo de amostra nos sistemas FIA é facilitada adaptando os fotorreatores em linha. Normalmente esses módulos são compartimentos fechados que minimiza a exposição do analista a radiação UV e diminui perdas do analito por manipulação ou contaminação das soluções, que comumente acontecem nos preparos de amostra em ambiente aberto. Além disso, dependendo do tipo de lâmpada utilizada, o aquecimento é menor do que o gerado pelas derivatizações químicas convencionais e devido a temporização controlada dos sistemas FIA, é possível explorar o uso de reações incompletas ⁴⁶. Diante disto, os trabalhos abaixo relacionados demonstram os excelentes resultados para algumas aplicações de fotorreações em fluxo aliadas a derivatização do analito.

O uso da radiação foi aplicado para fotoderivatização dos íons cloreto presente em águas e urinas em um sistema FIA por multi-impulsão desenvolvido por Rocha e colaboradores ⁶⁵. A amostra era bombeada juntamente com uma solução de persulfato de potássio em meio ácido, para um fotorreator UV com 375 μL de volume interno (v.i). Com a inversão do solenóide, era acionado um tempo de parada de fluxo de 15 s da solução no fotorreator. A radiação possibilitou a conversão de cloreto a Cloro que reagiu com a solução de alaranjado de metila promovendo descoloração do reagente, proporcional à sua concentração. O método além de apresentar características analíticas satisfatórias, como baixo LD. e alta frequência analítica de 75 det h^{-1} (determinações por hora), apresentou-se como uma alternativa promissora aos procedimentos oficiais ⁷⁰ que utilizam reagentes

altamente tóxicos, evidenciando os preceitos ambientalmente amigáveis associados à fotoderivatização. Além disto, esta técnica corrobora o sucesso da automação da fotoderivatização, aliada a determinações espectrofotométricas nos sistemas FIA.

Um sistema FIA por multicomutação foi proposto por Pérez-Ruiz e colaboradores, no qual empregava a fotoderivatização do NDMA ⁷¹ com detecção por quimiluminescência. A aplicação do método foi destinada a águas naturais e produtos cárneos ⁷¹. Dois fotorreatores foram utilizados no procedimento, um para a fotólise da ligação N-NO da N-nitrosamina e outro para a foto-oxidação de 3-(2,2'-bipiridil)rutênio II com peroxidissulfato de potássio que gerou a espécie 3-(2,2'-bipiridil)rutênio III que reagia com a dimetilamina (DMA), proveniente da fotólise de NDMA gerando um composto quimiluminescente. Com isso duas bombas peristálticas gerenciaram as soluções. Uma era destinada para bombear as soluções para a foto-oxidação do reagente, e a outra para fotólise do NDMA. Para a foto-oxidação, o reagente era bombeado juntamente com um tampão (pH 7,0) para o fotorreator com lâmpada UV onde a espécie era foto-oxidada. A fotoderivatização do NDMA foi realizada em um fotorreator em linha, composto por uma lâmpada UV e uma bobina de 600 μ L v.i. onde a solução era exposta por 30 s. Após a fotólise, foi realizada uma etapa de *clean - up* da amostra, com uma minicoluna, *on-line* recheada com resina de troca aniônica Dowex, para retenção das espécies NO• e NO₂⁻ provenientes da fotólise de NDMA, antes da mistura com o reagente quimiluminescente, evitando a provável nitrosação da DMA a NDMA. Assim, por uma confluência a DMA e o 3-(2,2'-bipiridil)rutênio III eram direcionados ao detector quimiluminescente. Como desvantagens, o método apresentou-se bastante sensível a mudanças de pH, pois utilizou três tampões diferentes, além de reagentes com custo relativamente altos como o 3-(2,2'-bipiridil)rutênio II. Para o fotólise de NDMA os autores relatam que apenas 30 s de exposição foi suficiente para conversão de quase 100 % da NDMA com frequência analítica satisfatória de 50 det h⁻¹, entretanto, não expuseram dados sobre o potencial aquecimento que pode ser ocasionado no sistema quando do uso de dois fotorreatores.

Uma aplicação interessante para fotoderivatização seguida da extração em fase sólida de N-nitrosaminas em um sistema FIA por multicomutação foi realizada por Luque-Pérez e colaboradores ⁷². O método proposto foi direcionado à determinação de NDMA em produtos alimentícios, mediante a conversão

fotoquímica da espécie em íons NO_2^- , que foram determinados por espectrofotometria pelo método de Griess. O sistema proposto abordava todo o preparo da amostra em fluxo e era composto por duas bombas peristálticas. A primeira bomba, tinha por função levar a mistura da amostra para filtração e logo após transportá-la até uma minicoluna de extração de 2 cm preenchida com resina trocadora de ânions (Dowex), que era destinada ao *clean – up* do NO_2^- que fosse inerente a amostra. Assim o extrato da coluna seguia para a câmara de quartzo onde a solução era exposta à radiação UV por dez minutos. A segunda bomba peristáltica era conectada na câmara de radiação que aspirava a solução fotoderivatizada, rumo a uma coluna de extração (1 cm), recheada completamente com alumina onde ficavam retidos os íons nitrito. A eluição do nitrito foi realizada diretamente com o reagente de Griess seguindo para o detector. A técnica proposta possuía um arranjo operacional complexo e por consequência o tempo de análise foi bastante demorado, sendo destinados dez minutos somente para a fotólise do NDMA. Porém a realização de todo o procedimento em linha, demonstrou maior reprodutibilidade nas várias etapas que compõem o método. Essa aplicação evidencia a grande versatilidade inerente aos sistemas FIA ao comportar três módulos de preparo de amostra diferentes.

O único trabalho que aborda a fotoderivatização de NNG em sistemas FIA foi realizado por Lins ³² empregando multicomutação. O método foi baseado na conversão fotoquímica do NNG a espécies $\text{NO}\cdot$ e NO_2^- , pela radiação UV (254 nm), que reagiram em linha com o RG e foram determinadas espectrofotometricamente. O autor conseguiu uma resposta linear satisfatória para fotoderivatização de NNG em linha, com apenas 20 segundos de exposição e frequência analítica de aproximadamente 46 det h^{-1} . Entretanto nas aplicações com amostras reais, um efeito de interferência matriz acentuado foi identificado e de acordo com o autor haveria a necessidade da realização de estratégias de preparo de amostras, que não foram realizadas. Este estudo confirma a hipótese da aplicação da fotoderivatização para determinação de NNG, que com o devido preparo de amostra permite estabelecer um método inovador e seletivo para este analito.

Os métodos citados acima evidenciam os ótimos resultados que os sistemas FIA ^{32,73} seja por multicomutação ^{71, 72} ou multi-impulsão ⁷⁴ apresentam na acomodação de reações fotoquímicas em linha. Embora os trabalhos citados

apresentem bons resultados foi possível notar que alguns sistemas necessitaram de arranjos operacionais mais complexos quando do uso de várias etapas de preparo de amostra em linha. Desta forma, o sistema SIA pode ser considerado uma alternativa eficaz para a manipulação desses procedimentos mais complexos, devido a maior quantidade de vias disponíveis no sistema que podem acomodar de forma simples diferentes módulos de preparo de amostra ¹².

No entanto, na literatura existem poucos trabalhos que abordam reações fotoquímicas empregando os sistemas SIA ⁴⁶. Os estudos encontrados abordam diversas matrizes e diferentes procedimentos fotoquímicos, como: especiação de carbono em águas por fotooxidação ⁷⁵, digestão fotoquímica de matéria orgânica em águas ⁶⁸, otimização da reação foto-Fenton em fluxo ⁷⁶, fotoindução da fluorimetria de fármacos ⁷⁷, síntese de nanopartículas por fotólise ⁷⁸ e a oxidação fotocatalítica do fósforo em leite ⁷⁹. De acordo com a pesquisa realizada nenhum trabalho foi encontrado abordando a fotólise de N-nitrosaminas ou do NNG em sistemas SIA, demonstrando assim, a inovação inerente ao objetivo deste trabalho de dissertação.

Os métodos descritos acima para determinação de N-nitrosaminas ^{32, 71, 72} em fluxo com uso da fotoderivatização apontaram a necessidade de que uma etapa de separação dos produtos derivados da clivagem seja realizada para melhorias na seletividade do método. Uma das estratégias de separação mais utilizadas e que apresenta ótimos resultados para automação em sistemas FIA é a extração em fase sólida. Esta ferramenta tem seu uso consolidado como módulo de preparo de amostras nesses sistemas, devido à facilidade encontrada para a inserção dos suportes contendo as fases sólidas nas vias destes equipamentos. A SPE apresenta excelentes resultados como estratégia de separação de analitos em pequenas concentrações e para o isolamento de espécies em meios que são propícios a apresentar eventual efeito de interferência matriz, como o NNG.

2.3 EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A SPE é uma das técnicas mais utilizadas no preparo de amostra para o isolamento do(s) analito(s), a remoção de interferentes ou a concentração de espécies presente em baixas concentrações na amostra. Sua aplicação baseia-se na interação de espécies em solução com uma fase sólida porosa que tem por função isolar/reter a espécie de interesse e/ou potenciais interferentes da amostra ¹⁵.

A SPE vem sendo estudada desde 1970 como técnica complementar em outros procedimentos instrumentais de separação como: cromatografia gasosa, CLAE ou eletroforese capilar. A junção da SPE a essas técnicas proporciona amostras mais limpas e por consequência maior seletividade e sensibilidade para os métodos analíticos ¹⁵.

Para grande parte das aplicações, os dispositivos SPE mais empregados são os cartuchos de extração, em forma de seringa, preenchidos com massas variadas de fase sólida. Nas extremidades do cartucho são dispostos filtros que evitam a saída do material sólido do dispositivo. Os materiais sorventes empregados são similares aos utilizados nas colunas de cromatografia líquida, fazendo com que os mecanismos de separação e eluição possuam certa semelhança ¹⁵.

As fases sólidas são fabricadas de forma a obter um sólido rígido, poroso mas com elevada área superficial. Alguns são compostos por bases poliméricas porosas, como: metacrilato por ligações entrecruzadas, copolímero de poliestireno e divinilbenzeno, outros por sílica ou sílica modificada e carbono grafitizado ¹⁶. Atualmente existem uma diversidade de fases sólidas disponíveis comercialmente, dentre as principais estão: compostos de grupos orgânicos como C18, C8, C2, ciclo exil, fenil, responsáveis por realizar ligações com espécies apolares e de média polaridade, cianoaminopropil, aminopropil (NH₂) que faz ligações com espécies polares por meio de interações hidrofílicas e trocadores iônicos como, aminopropil ligado a sílica ou ácido sulfônico que são caracterizados por interações iônicas com espécies carregadas (ânions e cátions) ¹⁵.

Para a extração das espécies de determinada matriz, a solução é percolada através do sólido e a(s) espécie(s) de interesse são retidas na fase sólida por meio das interações com os grupos presentes ⁸⁰. Assim, pode-se isolar determinada espécie e/ou outras espécies que façam parte da matriz e que eventualmente possam também ter afinidade com a fase sólida. Para a retirada da(s) espécie(s) da fase sólida são comumente empregadas soluções para eluição, que tem por função retirar as espécies da fase sólida.

O analito é extraído da amostra por meio de processos químicos, físicos e mecânicos de separação, como: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão ⁸¹. Assim, cada tipo de interação dependerá da ligação seletiva

das espécies de interesse com os grupos funcionais dispostos na superfície do sólido ^{16, 82}. Para as extrações de compostos orgânicos são comumente empregadas fases sólidas polares (fase normal) para separação de espécies orgânicas que são polares, ou fases sólidas apolares (fase reversa) para separação de compostos apolares. Os mecanismos aplicados nestes casos são de partição e adsorção conduzidos por forças de Van der Waals ¹⁵. As fases sólidas de troca iônica são geralmente utilizados na separação de espécies aniônicas e catiônicas por meio de interações eletrostáticas ¹⁵.

A extração em fase sólida possui quatro etapas básicas, que estão ilustradas na Figura 9 e podem ser enumeradas da seguinte forma: 1) condicionamento, destinado a ativação dos grupos da fase sólida ajustando-a para interagir com determinada força com os solventes da amostra e forças diferentes para o solvente de eluição, é utilizada também para regenerar a fase sólida ao realizar sucessivas extrações, 2) extração do analito, através da percolação da solução de amostra pelo sorvente que promove a retenção do analito e/ou de impurezas, 3) lavagem com solvente, na qual utiliza-se uma solução de lavagem apropriada para remover as impurezas e não o analito e 4) eluição do analito e/ou impurezas que acontece por meio de mecanismos que interrompam a interação do analito com a fase sólida por meio da ação química de uma solução eluente. Após a eluição, o analito se encontrará como componente do eluente e disponível para a determinação ⁸¹.

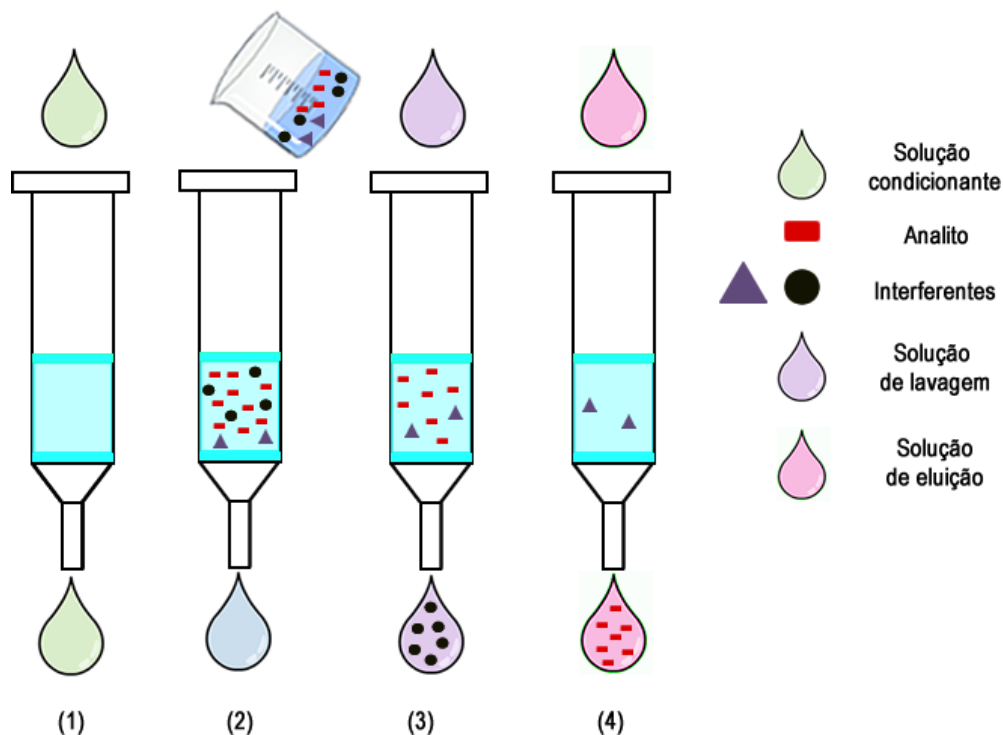


Figura 9. Passos para extração em fase sólida das espécies de interesse. **(1)** condicionamento e ativação do sorvente, **(2)** percolação da amostra no cartucho e retenção do analito e impurezas, **(3)** lavagem com solvente, **(4)** eluição do analito.

Em amostras que contém pequenas concentrações do analito de interesse, normalmente é utilizado o procedimento de pré-concentração das espécies que consiste na passagem de maiores volumes pela fase sólida e a eluição é realizada com volume reduzido de eluente que remove a espécie de interesse, proporcionando a quantificação de analitos em baixas concentrações e o aumento da sensibilidade do método ¹⁵.

Considerando estes aspectos é possível observar que a extração em fase sólida apresenta-se como uma técnica de fácil operação e com consumo moderado de reagentes, quando comparada a outros métodos de separação, como a extração líquido-líquido. Como o objetivo deste trabalho de dissertação envolve a separação do ânion nitrito proveniente da denitrosação do NNG, a extração por troca iônica será abordada em mais detalhes no próximo tópico.

2.3.1 Extração em fase sólida de troca aniônica

As primeiras constatações a respeito de materiais trocadores de íons foram realizadas por Way e Thompson em 1850⁸³. Através de testes realizados com amostras de solo, os autores comprovaram a eficiência do mesmo na remoção de espécies iônicas de soluções reagentes de amônia e potássio. Atualmente, as resinas trocadoras são constituídas por material poroso, natural ou sintético, inerte, insolúvel em água e solventes orgânicos.⁸³

Resinas trocadoras baseadas em matrizes orgânicas com alto grau de polimerização e ligações cruzadas são comumente utilizadas na fabricação de fase sólida de troca iônica através de ligações covalentes com os grupos trocadores iônicos. Estas fases sólidas apresentam elevada capacidade de troca e estabilidade de pH. Entretanto, a presença das muitas ligações cruzadas na resina afeta sua capacidade e seletividade de troca para íons volumosos devido ao difícil acesso dessas espécies aos grupos trocadores que se encontram dentro dos poros do suporte^{83, 84}.

As fases sólidas fabricadas à base de sílica são bastante utilizadas devido à alta resistência desse material, que não sofre com facilidade alterações em sua estrutura devido a processos térmicos ou mecânicos. Os grupos silanóis presentes em sua superfície podem realizar ligações com uma variedade de grupos trocadores como: C18, NH₂ dentre outros¹⁶, apresentando-se como uma fase sólida bastante versátil aplicada para extração de íons em diversas matrizes.

O mecanismo de troca iônica ocorre por meio de interação eletrostáticas do grupo trocador com soluções líquidas ou gasosas que contenham analitos carregados positivamente ou negativamente. Os trocadores iônicos são classificados em catiônicos e aniônicos a depender do grupo trocador ligado covalentemente à matriz. Os trocadores catiônicos possuem grupos com carga negativa ligados ao suporte e um contra - íon de carga oposta ligado a esse grupo. Por sua vez os trocadores aniônicos possuem grupos com carga positiva ligados a matriz e um contra – íon de carga negativa ligado a este grupo.^{15, 83}

A extração de um ânion em uma determinada matriz ocorre por meio da permuta entre essa espécie com o contra-íon, como o Cl⁻ representado na Figura 10, ligado na fase sólida⁸⁰. Este íon encontra-se ligado a um grupo trocador, que por

sua vez está ligado ao suporte sólido, que possui os sítios carregados positivamente para a retenção do ânion na fase sólida. Para a eluição do ânion podem ser utilizados alguns mecanismos como, neutralização das espécies dispostas na superfície da fase sólida, aumento da concentração de ânions que provoca a competição pelo sítio do grupo trocador e “força” a saída do ânion de interesse para a solução eluente, uso de soluções tampão ou a adição de um ânion que contenha melhor afinidade pelo grupo trocador do que o ânion retido ⁸⁰.

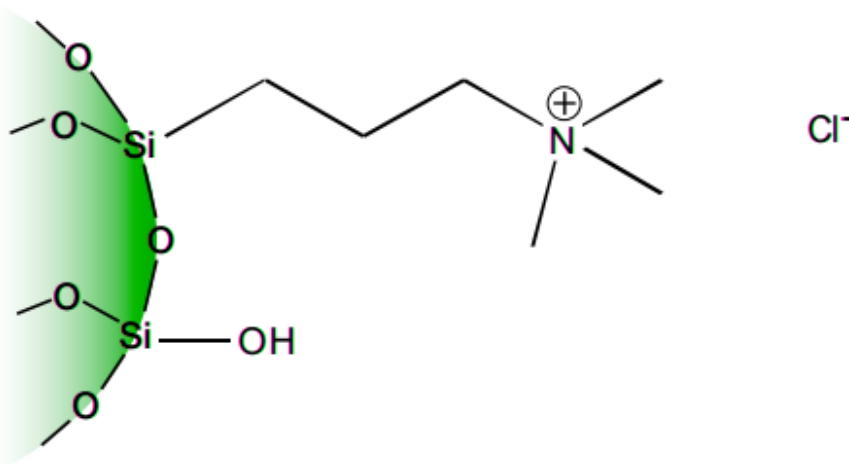


Figura 10. Ilustração da ligação do grupo trocador de amina quaternária ligada quimicamente a sílica. Adaptado de Phenomenex ⁸⁵.

Os grupos trocadores podem ser classificados em trocadores iônicos fracos, médios e fortes de acordo com sua dissociação no meio reacional. A dissociação dos trocadores iônicos fracos é dependente do pH, ocasionando restrições na estabilidade da troca que varia em função do pH. Por sua vez os grupos trocadores fortes possuem maior estabilidade e apresentam-se dissociados em ampla faixa de pH ⁸⁶. Trocadores baseados em aminas e amônio quaternário são os que tem maior utilização para extração de espécies aniônicas. As aminas alifáticas primárias, secundárias e terciárias são classificadas como trocadores fracos, exigindo mecanismos de controle de pH do solvente e do eluente para extração ^{85, 86}. Já o amônio quaternário é classificado como um trocador forte de ânions, assim como o tetrametilamônio (Figura 10) que possui estabilidade de dissociação em ampla faixa de pH. O mecanismo de troca para esse tipo de fase sólida, baseia-se na permuta do contra-íon, geralmente cloreto, com o ânion de interesse. Baixas recuperações do analito podem acontecer na presença de outros ânions no meio que tenham maior

afinidade ao sítio trocador do que o analito ou quando da presença de elevada força iônica no meio (competição pelo sítio). A afinidade dos ânions pelos grupos trocadores normalmente obedecem à seguinte ordem: $I^- > Br^- > NO_3^- > Cl^- > H_2PO_4^- > CH_3COO^- > F^-$ ^{83, 85}.

O volume de amostra a ser percolado no sorvente pode variar de microlitros (μL), mililitros (mL) até litros (L) a depender do interesse da aplicação. As fases sólidas possuem quantidades específicas de sítios ativos para realizar interações. O volume de *breakthrough* ^a, é atingido quando todos os sítios disponíveis na superfície do sorvente foram ocupados e não há perda para a retenção do analito contido na amostra ⁸². Esse dado é encontrado no laudo específico do fabricante da fase sólida e apresenta bastante relevância para relacionar o volume de amostra e a massa de fase sólida, além de estimar a quantidade de eluente para retirar todo o analito, sem perdas ou efeito de memória ⁸⁵.

A massa adequada de fase sólida para determinada extração é aquela que fornece um número suficiente de sítios hábeis para realizar a troca com a quantidade de analito contido na amostra. A Tabela 1, relaciona alguns valores de massa de sorvente de troca iônica com sua respectiva capacidade de retenção e o volume mínimo de eluente a ser utilizado para retirar todo o analito da fase sólida. É possível observar que a capacidade de retenção da fase sólida não ultrapassa 5% da massa total de material sorvente utilizada ⁸⁵.

Tabela 1. Relação da massa de fase sólida com capacidade de retenção e volume de eluente. Dados extraídos do guia Phenomenex ⁸⁵

Massa de fase sólida (mg)	Capacidade de retenção de espécie média (mg)	Volume mínimo de eluição (μL)
50	2,5	125
100	5	250
200	10	500
500	25	1200
1000	50	2400

^a *Breakthrough*: Para a SPE indica o volume que contém quantidade máxima de massa em miligramas do analito que pode ser pré - concentrada na fase sólida de acordo com a massa e capacidade de retenção da fase sólida e/ou por falta de otimização dos parâmetros da SPE.

Em geral, os dispositivos para SPE mais comuns, seringas, cartuchos ou discos são utilizados quando o modo de condução da técnica analítica é realizada de forma *off-line* (ou em batelada). Para procedimentos automatizados, o ideal é que a extração ocorra em linha com uso de componentes específicos que acomodem a fase sólida para serem inseridos no percurso analítico ¹¹.

A automação da extração em fase sólida, torna-se atrativa como módulo de preparo de amostra nos sistemas SIA por diversas vantagens, como: a redução significativa nas perdas das amostras por contaminação e manipulação, redução no consumo de amostras e massas de fase sólida, redução dos erros analíticos, reutilização da fase sólida, redução dos custos e da quantidade de resíduos gerados e maior processamento amostral ¹⁵.

2.3.2 Extração em fase sólida nos sistemas SIA

Procedimentos de extração em fase sólida em sistemas de análises em fluxo foram propostos com objetivo de suprir as desvantagens da SPE em batelada ¹⁵. A inserção de módulos para SPE em sistemas em fluxo, proporciona maior controle das etapas de extração, refletindo em maior reprodutibilidade para os resultados obtidos. Ademais, o procedimento é realizado em ambiente fechado, com melhor gerenciamento do tempo de análise, minimizando possíveis evaporações, o que torna a extração mais eficaz, dinâmica e com menor consumo de reagentes ^{11, 73}.

Em geral, os procedimentos SPE em fluxo englobam as mesmas etapas da extração em batelada (Figura 9), porém com o material sorvente inserido em linha por meio de um suporte. Este suporte deve ter tamanho adequado para acoplar-se nos tubos de diâmetro reduzidos que integram os sistemas em fluxo. Frequentemente são utilizadas minicolunas como suporte para o sorvente, normalmente em formatos cilíndricos, fabricadas manualmente ou comercializadas, permitindo a automação da SPE em fluxo, principalmente nos sistemas SIA e FIA ¹¹.

Para construção manual dos suportes para a fase sólida são utilizados materiais comuns em laboratórios, como: seringas, ponteiros de micropipetadores, tubos de vidro, tubos de PTFE, algodão, lã de vidro, dentre outros. O primordial é garantir que a vedação das extremidades da coluna impeça o escoamento da fase

sólida pelas tubulações, mas permita a passagem do fluxo sem a elevação da pressão hidrodinâmica ¹¹.

Nos sistemas SIA, a minicoluna pode ser inserida em diferentes locais do percurso analítico, por meio de conexões com os tubos das várias vias do sistema. Essa versatilidade permite a realização de procedimentos que exijam mais de uma etapa de extração ou da extração de produtos derivados de outro procedimento de preparo de amostra também alocado ao sistema ¹².

Uma aplicação interessante para automação da SPE em sistemas SIA (SIA - SPE), para determinação espectrofotométrica de íons nitrito em águas naturais, foi realizada por Miró e colaboradores ⁸⁷. A minicoluna utilizada consistia de um tubo de vidro (1,5 cm x 0,4 mm d.i.) preenchido completamente com 55 mg de fase sólida C18, e as extremidades preenchidas com lã de vidro. A minicoluna foi conectada em linha depois da bobina de reação e antes do sistema de detecção. Assim, a zona de amostra aplicada foi em formato “sanduíche”, na qual uma alíquota de amostra encontrava-se disposta entre duas alíquotas do reagente RG. Essa zona de amostra foi enviada para a minicoluna para retenção do composto colorido da reação de Griess. Em uma confluência antes da minicoluna, era injetada a solução eluente (metanol 80 %), através de outra seringa acoplada ao sistema que era acionada após a etapa de SPE. Para cada extração foi realizado o condicionamento da fase sólida com a mesma solução usada como eluente. O método apresentou baixo LD = 0,32 µg L⁻¹ e um fator de pré-concentração de 170 vezes, para 10 mL de amostra. Os autores indicaram que a eficiência para reutilização da fase sólida foi de 45 injeções e que o volume de *breakthrough* foi de 10 mL de uma solução de NO₂⁻ 0,01 mg L⁻¹, sendo considerado um baixo volume diante da concentração de NO₂⁻ empregada. Entretanto o método apresentou adequadas recuperações de nitrito maiores que 93 % e alta sensibilidade.

Outra estratégia que abordou a automação da SPE em sistema SIA foi proposta por Zhang e colaboradores ⁸⁸ para a determinação espectrofotométrica de NO₂⁻ em nmol L⁻¹ em água do mar. Neste procedimento foram utilizados 200 mg fase sólida *HLB* (do inglês, *Hidrofílic-Lipofílic Balance*), da qual foi acomodada em uma coluna comercial de SPE. A minicoluna, por sua vez, foi acoplada ao sistema antes do detector e depois da bobina de reação. Uma outra linha conectava a

minicoluna a um frasco com as alíquotas da amostra misturadas ao RG. O produto colorido era percolado pela fase sólida e posteriormente eluído com uma solução de etanol 25 % em meio ácido. Os autores não citam informações a respeito do volume de *breakthrough* da fase sólida nem sobre fatores de pré-concentração, apenas apontam que a reutilização da fase sólida foi satisfatória resultando em 55 extrações. O método apresentou LD satisfatório, igual a $0,5 \text{ nmol L}^{-1}$ e recuperações de 92,2 a 108,4 %. Os autores relataram a presença do efeito Schlieren nas medidas em que utilizaram soluções eluentes com concentrações mais elevadas dos reagentes, maior que 50 % de etanol e maior que $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 . Assim, o efeito foi minimizado nos sinais pela diminuição da concentrações dos reagentes e pelo preenchimento da linha que liga a detecção a SPE com uma solução de etanol 50%.

Quando da inserção da SPE em fluxo, comumente ocorrem perturbações nos sinais óticos que são atribuídas ao efeito Schlieren. Esse fenômeno é decorrente do uso de eluentes constituídos por diversos reagentes em elevadas concentrações que por consequência possuem diferentes índices de refração. Essas diferenças proporcionam mudanças na direção do feixe de radiação gerando distorções no sinal analítico. Assim, quando da ocorrência desse efeito, faz-se necessário o uso de ferramentas de compensação ou correção de forma a impedir a interferência desse efeito no sinal para o analito ⁸⁹.

Uma aplicação abordando a extração de uma espécie na forma aniônica por SIA – SPE foi proposta Vidal e colaboradores ⁹⁰ para a determinação fluorimétrica de ácido 2-fenildenzimidazol-5-sulfônico (Eusolex) em amostras de urina. A minicoluna foi construída em laboratório e consistia de um tubo de PTFE 20 cm x 3,0 d.i preenchido com 150 mg de fase sólida de troca aniônica SAX *Lichrolut*. A minicoluna foi então conectada antes do sistema de detecção e depois da bobina de reação do sistema. O método utilizou a técnica de adição de padrão nas quais os padrões e amostras foram preparados em solução de hidróxido de sódio 1 %. Primeiramente, a amostra era percolada pela fase sólida. Em seguida era percolada uma solução de lavagem (NaCl) da fase sólida e a eluição foi realizada por HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O método apresentou baixo limite de detecção 12 ng mL^{-1} e elevada sensibilidade para a resposta linear. Os autores abordam que a etapa de lavagem neste estudo foi de extrema importância para a seletividade do método devido à presença de outros

ânions na amostra que ficavam também retidos na fase sólida. Além da lavagem, o autor não aborda outros dados sobre a otimização da SPE.

Além dessas aplicações, a literatura apresenta um acervo diversificado para a aplicação SIA–SPE para outros analitos em diversas matrizes, ambientais^{91, 92, 93} alimentos⁹⁴, monitoramento do corpo humano^{95, 96, 97} fármacos⁹⁸, cosméticos⁹⁹ dentre outras. Essas aplicações confirmam o êxito da automação da SPE em sistemas SIA.

Os trabalhos supracitados demonstram as características benéficas da aplicação e os excelentes resultados da estratégia SIA-SPE na obtenção de métodos com maior sensibilidade, obtida através de elevados fatores de concentração, com reutilização da fase sólida para consecutivas extrações e principalmente com baixos limites de detecção possibilitando determinações em baixas concentrações, como $\mu\text{g L}^{-1}$ ou mg L^{-1} . Essa característica atribui uma vantagem especial para a aplicação proposta neste trabalho de dissertação, que propõe o uso da SPE para a retenção do NO_2^- proveniente da fotoderivatização do NNG, que normalmente encontra-se em sua matriz em concentrações muito baixas.

Considerando os aspectos abordados acima, conclui-se que o sistema SIA apresenta vantagens expressivas para manipulação de procedimentos em linha acomodando diferentes módulos de preparo de amostra destinados a um mesmo analito, como a fotoderivatização e a extração em fase sólida. Diante disto, propõe-se nesta dissertação o emprego da fotoderivatização e extração em fase sólida como módulos de preparo de amostra em linha em um sistema SIA para a determinação indireta de N-nitrosoglifosato.

CAPÍTULO 3

Desenvolvimento de um sistema SIA para extração e determinação de nitrito em linha

3. DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA SIA PARA EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE NITRITO EM LINHA

A literatura abrange um acervo de inúmeros métodos para a determinação de NO_2^- em diferentes matrizes utilizando diversas técnicas analíticas, como: cromatografia gasosa (CG), CLAE, análise em fluxo, eletroforese capilar, aliados a diferentes sistemas de detecção como, eletroquímicos, fluorescência, UV-Vis ¹⁰⁰, e até mesmo a determinação direta por sensores eletroanalíticos ¹⁰¹. Essa diversidade de métodos está relacionada, dentre outros aspectos, à presença abundante deste íon em diferentes meios como, alimentar, industrial, corpo humano e meio ambiente ¹⁰⁰.

Dentre esses métodos, o mais utilizado para determinação espectrofotométrica de NO_2^- é a reação de Griess (Figura 11) desde que Johann Peter Griess em 1879, demonstrou a seletividade dessa reação para íons nitrito ^{34, 102}. A Figura 11 demonstra um esquema simplificado para essa reação que consiste na diazotização do SAM seguido do acoplamento de NED que produz um produto cromóforo azo proporcional à concentração do íon no meio que absorve em 540 nm ¹⁰².

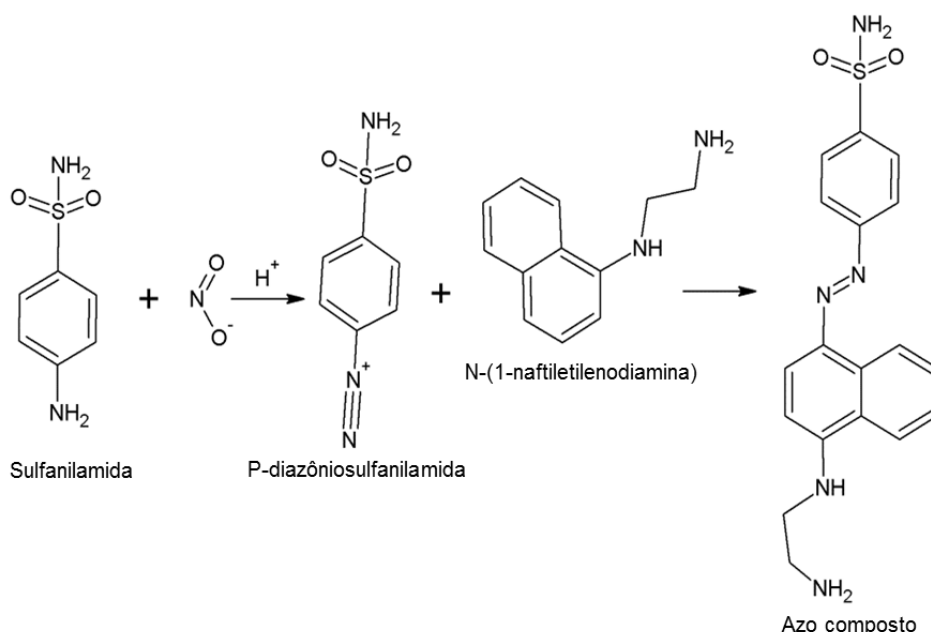


Figura 11. Esquema simplificado da reação de Griess para a formação do azo composto.

Métodos para determinação de NO_2^- baseados em sistemas FIA, apresentam-se ambientalmente amigáveis devido à diminuição no consumo do reagente de

Griess proporcionada pela realização de procedimentos em tubos de diâmetro reduzido. Essa redução apresenta-se benéfica devido às propriedades tóxicas e cancerígenas atribuídas aos compostos presentes nessa solução^{64, 103}.

O método de Griess também se apresenta como alternativa para determinação indireta de moléculas maiores que possam gerar nitrito como produto reacional. Desta maneira, relaciona-se, por estequiometria as concentrações da espécie alvo e do NO_2^- gerado. Assim, é possível determinar espécies complexas, por meio de detecções mais simples como a espectrofotometria UV-Vis^{7, 8, 9, 51}. Esta estratégia apresenta-se promissora para as N-nitrosaminas, como o NNG, que geram nitrito por meio de reações químicas^{7, 8, 9} ou fotoquímicas⁵¹. Devido às baixas concentrações de nitrito geradas por esses procedimentos de conversão, o uso da SPE em linha, alia maior sensibilidade e seletividade para a determinação deste íon.

O desenvolvimento de métodos que abordam a estratégia SIA-SPE exploram diversos parâmetros que influenciam na eficiência da extração. Os principais aspectos a serem avaliados são: volume da amostra, composição e volume da solução eluente, reprodutibilidade da fase sólida, dentre outros a depender da aplicação de interesse. Assim, a otimização dos parâmetros da SPE torna-se uma etapa de extrema importância para o sucesso da aplicação¹⁰⁴.

Nesta dissertação foram desenvolvidos três sistemas em fluxo para determinação de nitrito. O primeiro sistema objetivou a otimização das variáveis hidrodinâmicas explorando a reação de Griess para determinação espectrofotométrica do NO_2^- . Os dois sistemas restantes empregaram a inserção da SPE para extração e determinação de nitrito em linha, que devido ao uso de duas soluções eluentes diferentes foram necessárias duas configurações de fluxo distintas.

3.1 PARTE EXPERIMENTAL

3.1.1 Equipamentos e materiais

O instrumento utilizado para automação da SPE e manipulação dos reagentes foi o sistema FIAlab 3500 (*FIAlab Instruments*, USA). Este equipamento é composto por uma válvula seletora de oito portas – válvula multiportas, um sistema de

propulsão de seringa (CAVRO XL 3000) no qual foram utilizadas seringas com capacidades volumétricas de 5 mL e 10 mL, e uma bomba peristáltica. Para o gerenciamento das programações e aquisição dos dados foi utilizado o software FIALab 5.0 versão para Windows. Para construção do percurso analítico foram utilizados tubos de PTFE com 0,8 mm de d.i. (diâmetro interno) e quando do uso da bomba peristáltica foi utilizado um tubo de Tygon branco-branco (1,02 d.i, 30 cm de comprimento). O sistema de detecção consistiu de um espectrofotômetro UV-Vis USB 2000 (*Ocean Optics*) com fonte USB-ISS UV-Vis (*Ocean Optics*) composto por lâmpada de tungstênio – halogênio e deutério. A cela de detecção consistiu em uma cubeta de fluxo em quartzo (Hellma) com caminho ótico de 10 mm e 80 μ L de volume interno.

Foram utilizados cartuchos de extração em fase sólida de amina quaternária Stracta – SAX (Phenomenex®), 100 mg – 5 mL. Esses cartuchos foram abertos e a fase sólida contida no seu interior foram retiradas. Para a automação da SPE no sistema SIA foi construída uma minicoluna, para suportar a fase sólida, baseada na proposta de Dias e colaboradores¹¹ (Figura 12).

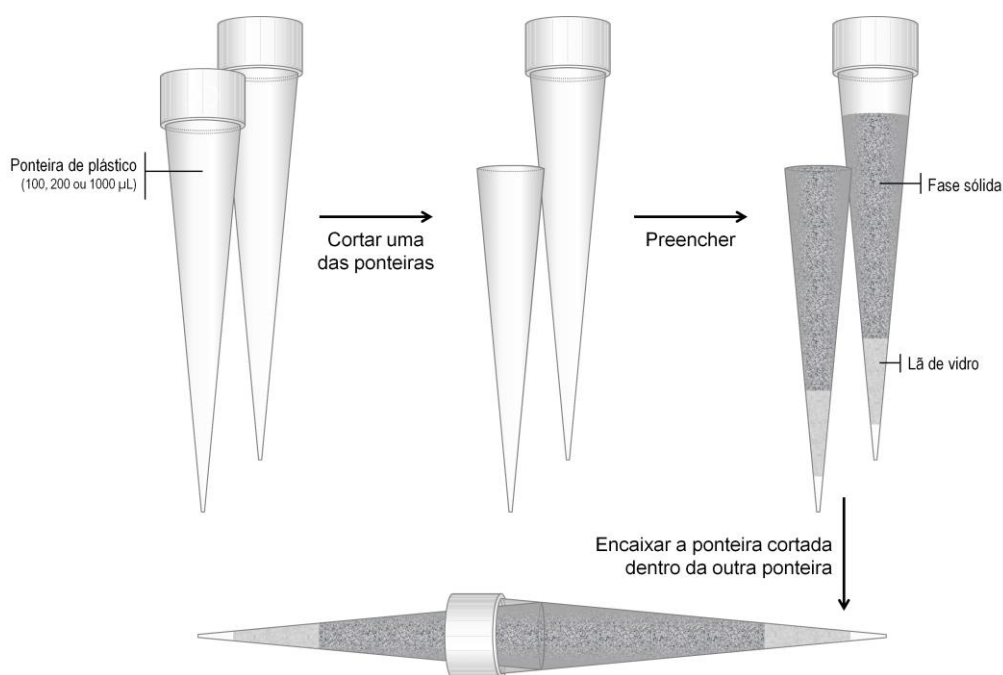


Figura 12. Esquema de construção de uma minicoluna SPE com uso de ponteiros de micropipeta para acoplamento no sistema SIA. Imagem adaptada de Dias e colaboradores¹¹.

Foram utilizadas duas ponteiros de micropipetas de 10 – 100 μ L, das quais em uma das ponteiros a parte superior foi cortada de modo a acoplar uma na outra.

As extremidades afuniladas das ponteiros foram preenchidas com uma pequena quantidade de algodão de modo a impedir o vazamento da fase sólida. Uma quantidade de 80 mg de fase sólida foi inserida em uma das ponteiros. Logo após, as duas ponteiros foram coladas com auxílio de uma resina polimérica.

3.1.2 Reagentes e soluções

As soluções utilizadas foram preparadas com reagentes de grau analítico e água destilada/deionizada. A solução corante de azul de bromotimol 0,1 % foi preparada a partir da dissolução de 0,1 g de azul de bromotimol (Vetec) em 10 mL de etanol e o volume foi completado com 100 mL de água em um balão volumétrico. Em seguida foi adicionado aproximadamente 2,0 mL de uma solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de modo a permanecer a coloração azul.

A solução de acetonitrila 10 % (v/v) foi preparada a partir da diluição de 10 mL de acetonitrila (Merck) em um balão volumétrico de 100 mL que foi completado com água até o volume. A solução de metanol 1:1 (v/v) em HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada adicionando-se 50 mL de metanol (J. T. Baker) em um pouco de água, seguido da adição de 1 mL de HCl concentrado (Vetec), sendo o volume completado até 100 mL com água. A solução de etanol 1:1 (v/v) em HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$: preparada mediante a adição de 50 mL de etanol (Merck) em um volume de água, em seguida foi adicionado 1 mL de HCl concentrado e volume foi completado até 100 mL.

A solução de cloreto de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada mediante a dissolução de 5,844 g de NaCl (J. T. Baker) em 100 mL de água aferida em um balão volumétrico. A solução estoque de NO_2^- 1000 mg L^{-1} foi preparada a partir da dissolução de 0,3865 g de NaNO_2 (Aldrich, $\geq 97 \%$) em 250 mL de água destilada. Foi realizada uma segunda diluição de forma a obter uma solução padrão de 45 mg L^{-1} e uma terceira diluição resultou na solução estoque intermediária de $23,5 \text{ mg L}^{-1}$. A partir da diluição dessa solução foram preparadas as soluções padrão de NO_2^- utilizadas para as curvas analíticas.

A solução estoque do RG composta por SAM $7,0 \text{ g L}^{-1}$, NED $1,0 \text{ g L}^{-1}$ em HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir da dissolução de 0,7 g de sulfanilamida (Synth) em 80 mL de água e adição de 1 mL de HCl concentrado (Vetec). Esta solução permaneceu em agitação magnética por 10 minutos. Após esse período, foi adicionado 0,1 g de 1-naftiletilenodiamino bicloridrato - NED (Vetec) e o volume foi

completado com água até 100 mL. Foram realizadas diluições apropriadas do RG que serão citadas ao longo do texto.

3.1.3 Procedimentos experimentais

3.1.3.1 Otimização do sistema SIA para determinação de NO_2^- via reação de Griess

O diagrama de fluxo da Figura 13 apresenta o sistema SIA utilizado para a determinação de nitrito explorando a reação de Griess.

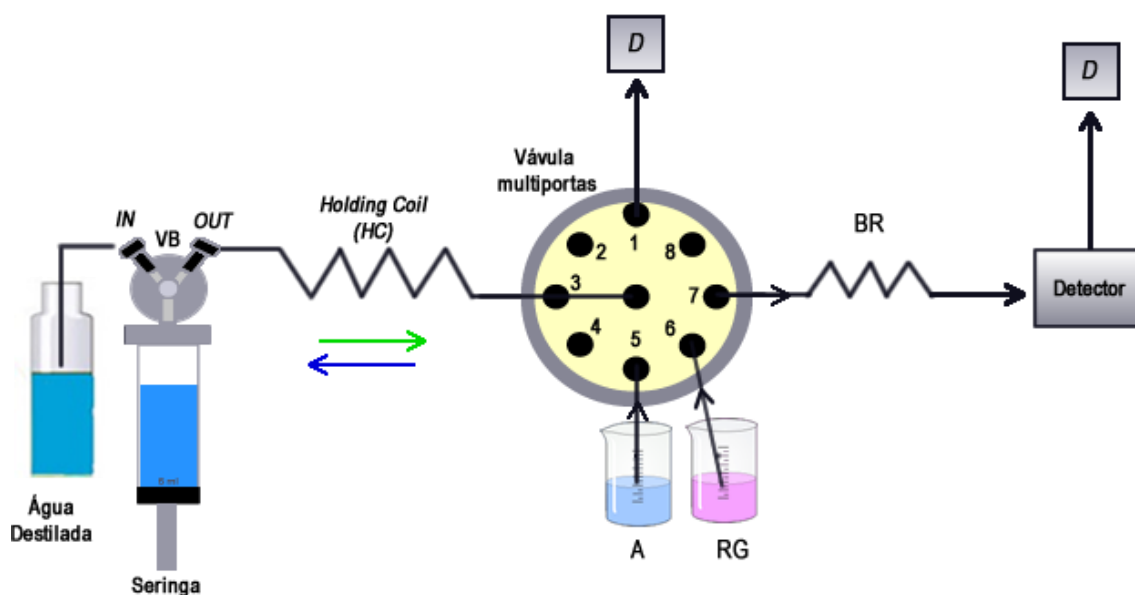


Figura 13. Diagrama de fluxo do sistema SIA para determinação de nitrito. VB = Válvula Bidirecional, IN/OUT = posições da válvula bidirecional para bombeamento e aspiração, HC = *Holding coil* ou bobina de retenção, A = solução padrão de NO_2^- 0,15 – 0,55 mg L⁻¹, RG = Reagente de Griess (1:2), BR = Bobina de Reação, Detector = espectrofotômetro UV-Vis, D = Descarte. As setas indicam a direção do fluxo.

Para aspiração e propulsão dos reagentes foi utilizada uma seringa de 5 mL e como solução transportadora, água destilada. Todos os procedimentos de aspiração foram realizados em vazão de 200 $\mu\text{L s}^{-1}$ com uma seringa de 5 mL. Inicialmente, com válvula da seringa na posição IN foi aspirado 1000 μL da solução transportadora. Com a mudança da válvula para a posição OUT, 200 μL do padrão de NO_2^- foram aspirados para o HC. Em seguida, 600 μL do RG 1:2 (v/v) foram aspirados também para o HC, formando a zona de amostra. Com a posição da seringa em OUT, no modo de bombeamento, o sentido do fluxo transportador foi invertido e a zona de amostra foi conduzida pela bobina de reação até o sistema de

detecção com vazão de $50 \mu\text{L s}^{-1}$. Todas as medidas de absorbância para o azo composto neste trabalho foram realizadas em 540 nm.

Testes envolvendo a formação de zona de amostra com variações nos segmentos, volumes de reagentes e soluções padrão foram realizados. Para a formação da zona de amostra, foi avaliada a estratégia sanduíche através da aspiração intercalada de uma alíquota de RG, em seguida alíquota de solução padrão de NO_2^- e outra alíquota de RG de $300 \mu\text{L}$. Os volumes da solução padrão de NO_2^- foram avaliados de 100 a $350 \mu\text{L}$. Vazões do fluxo transportador para bombeamento da zona de amostra foram estudadas de 50 a $80 \mu\text{L s}^{-1}$. Bobinas reacionais foram estudadas de 30 a 80 cm. Para construção das curvas analíticas foram utilizados soluções padrão nas concentrações de 0,15, 0,25, 0,35, 0,45 e 0,55 mg L^{-1} de NO_2^- .

Cabe salientar que para as modificações das variáveis hidrodinâmicas do sistema SIA foram realizados testes com o corante azul de bromotimol 1%, em todos os procedimentos experimentais desse trabalho de dissertação, para a avaliação da capacidade volumétrica dos tubos empregados.

3.1.3.2 Automação da SPE para extração de NO_2^- explorando como eluentes soluções alcóolicas em meio ácido e solução concentrada de NaCl

Com base no sistema obtido no tópico anterior foi inserida a minicoluna para SPE construída conforme demonstrado na Figura 12. A inserção foi realizada na linha do sistema de detecção antes da bobina de reação pós-extração do sistema, conforme pode ser observado no diagrama de fluxo da Figura 14. Além disso, inseriu-se mais um componente ao sistema, a bomba peristáltica da qual foi interligada ao percurso analítico por meio de uma confluência em forma de “T” na linha após a minicoluna. Para aspiração e propulsão dos reagentes foi utilizada uma seringa de 10 mL. Todos os procedimentos de aspiração foram realizados na vazão de $100 \mu\text{L s}^{-1}$. Apenas no início das atividades diárias era realizado o condicionamento da fase sólida, no qual, com a seringa na posição *IN* eram aspirados $1500 \mu\text{L}$ de solução transportadora e em seguida na posição *OUT* eram aspirados $2000 \mu\text{L}$ de solução condicionante (acetonitrila 10 % v/v) da porta 4, para o HC. Através da inversão do fluxo, este segmento era bombeado para a mini-

coluna de SPE que estava acoplada na porta 7 da válvula seletora (Figura 14), em vazão de $40 \mu\text{L s}^{-1}$. Para percolação da solução padrão, com a válvula na posição *IN* eram aspirados $1000 \mu\text{L}$ de solução transportadora e em seguida na posição *OUT* eram aspirados $1800 \mu\text{L}$ do padrão de NO_2^- $0,55 \text{ mg L}^{-1}$ para o HC. Através da inversão do fluxo, estes segmentos eram bombeados para minicoluna (porta 7, Figura 14) com vazão de $40 \mu\text{L s}^{-1}$. Logo após a bomba peristáltica era acionada e o RG (1:2) era bombeado para a linha após a minicoluna por 10 s para preencher toda a linha. Em seguida para eluição do NO_2^- , na posição *IN* foram aspirados $2000 \mu\text{L}$ de solução transportadora e na posição *OUT* $300 \mu\text{L}$ das soluções eluentes para o HC. A bomba peristáltica era acionada novamente e o reagente de Griess era bombeado para a linha em vazão de $40 \mu\text{L s}^{-1}$ durante 60 s. Através da inversão do fluxo, o segmento de eluente disposto no HC era bombeado pela porta 7, em vazão de $40 \mu\text{L s}^{-1}$ para eluição do nitrito e consequente mistura como RG. A mistura do eluato com o RG ocorria na bobina reacional pós-extração de 50 cm e seguia até o sistema de detecção para aquisição do sinal analítico.

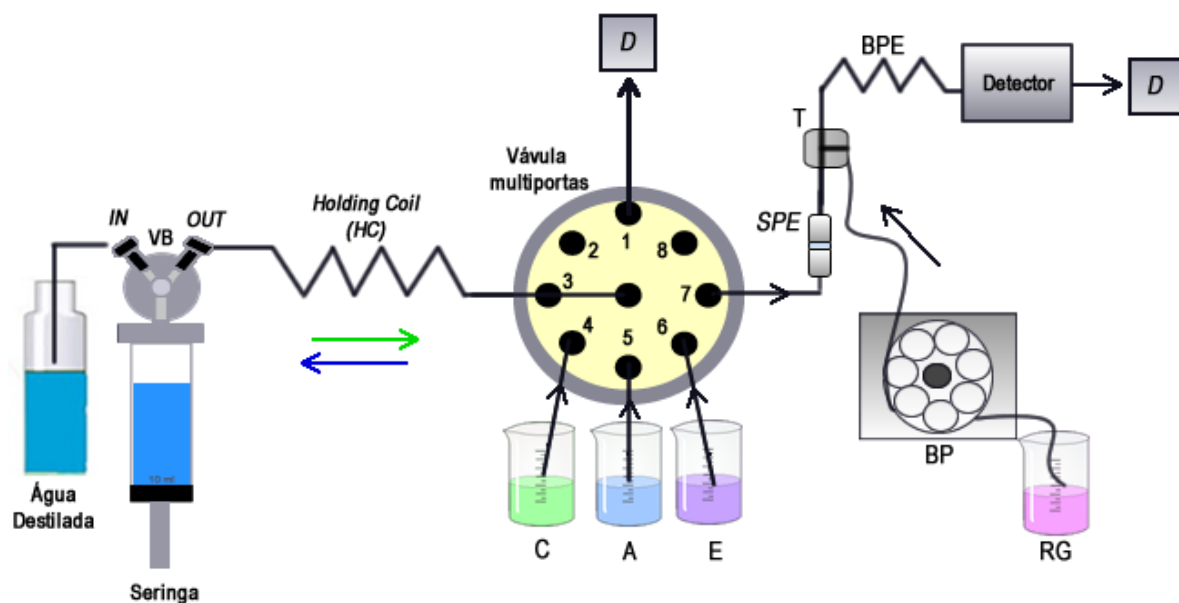


Figura 14. Diagrama de fluxo do sistema SIA para determinação de NO_2^- com SPE em linha e propulsão do reagente colorimétrico via bomba peristáltica. VB = Válvula Bidirecional, *IN/OUT* = posições da válvula bidirecional para bombeamento e aspiração, C = solução de condicionamento (acetonitrila 10 % v/v), A = solução padrão NO_2^- $0,55 \text{ mg L}^{-1}$, E = soluções eluentes [1-etanol 1:1 (v/v) em HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$, 2 - metanol 1:1 (v/v) em HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$, 3 - NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$], BP = Bomba Peristáltica, RG = Reagente de Griess, SPE = minicoluna de extração, T = confluência, BPE = Bobina reacional Pós-Extração, Detector = espectrofotômetro UV-Vis, D = Descarte. As setas indicam a direção do fluxo.

3.1.3.3 Sistema SIA para extração e determinação de NO_2^- em linha explorando o reagente de Griess como eluente

Uma configuração alternativa à anterior foi proposta para resolver alguns problemas que serão discutidos no item 3.2.2 e 3.2.3, deste capítulo. Um sistema similar ao da Figura 14 foi usado, inutilizando-se a bomba peristáltica e inserindo o RG como solução eluente do nitrito retido na minicoluna (Figura 15). Assim a minicoluna permaneceu posicionada na porta 7 (Figura 15) que também se ligava a bobina de reação e detector. Para aspiração e propulsão dos reagentes foi utilizada uma seringa de 10 mL e os procedimentos de aspiração das soluções foram realizadas a uma vazão de $100 \mu\text{L s}^{-1}$. O condicionamento da fase sólida foi realizado igual ao citado no item anterior, com a diferença que neste sistema essa etapa foi inserida no procedimento a cada extração realizada. Em seguida, para extração de NO_2^- foram aspirados sequencialmente 2000 μL de solução transportadora (*IN*) e 1800 μL de solução padrão (*OUT*). Através da inversão de fluxo o segmento foi transportado para a minicoluna em vazão de $40 \mu\text{L s}^{-1}$. Para eluição foram aspirados 3800 μL de transportador (*IN*) e uma alíquota de 300 μL do RG (*OUT*) para o HC. O fluxo foi invertido e o segmento foi percolado pela fase sólida em vazão de $40 \mu\text{L s}^{-1}$ passando pela bobina pós-extração seguindo para o sistema de detecção para aquisição do sinal analítico.

Nesta configuração foram avaliados: volumes para o reagente de Griess de 100 a 400 μL , proporções do RG (v/v), bobinas reacionais pós-extração em comprimentos de 60 a 100 cm, os efeitos da inserção de duas etapas de lavagem e da etapa condicionamento da fase sólida entre as extrações, volume de *breakthrough* para a fase sólida, fator de pré-concentração obtido e eficiência da coluna após sucessivas injeções.

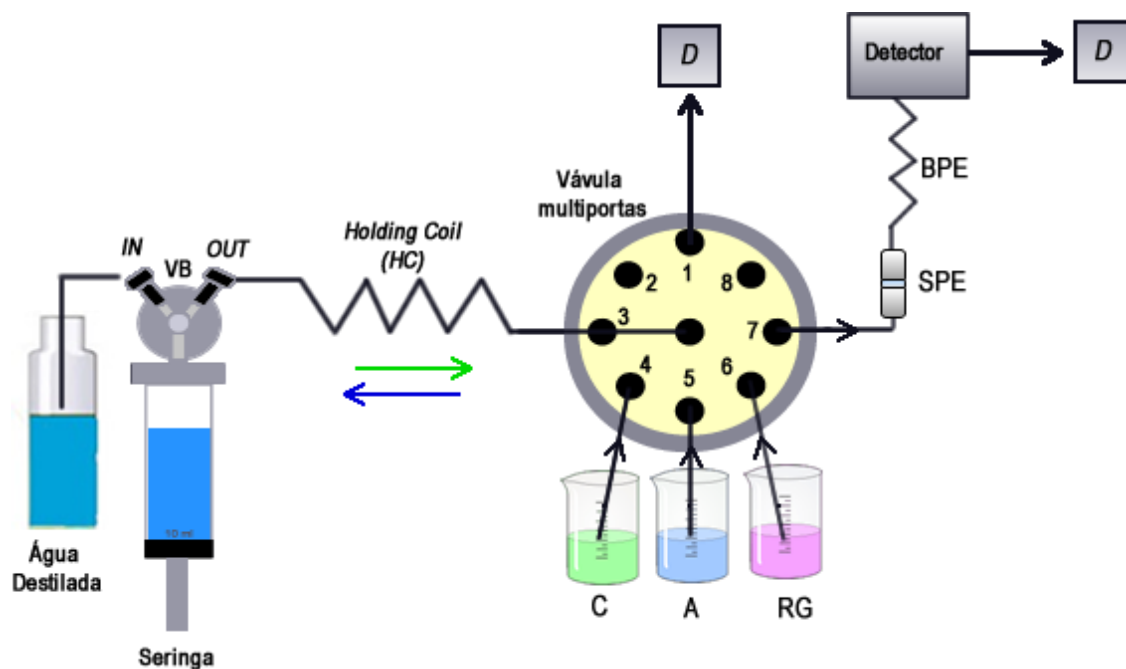


Figura 15. Diagrama de fluxo do sistema SIA para extração e determinação de NO_2^- em linha e eluição via reagente de Griess. VB = Válvula Bidirecional, IN/OUT = posições da válvula bidirecional para bombeamento e aspiração, C = solução de condicionamento (acetonitrila 10%), A = soluções padrão NO_2^- 0,05 - 0,55 mg L^{-1} , RG = Reagente de Griess (1:4) – eluente, SPE = minicoluna de extração, T = confluência, BPE = Bobina reacional Pós-Extração, Detector = espectrofotômetro UV-Vis, D = Descarte. As setas indicam a direção do fluxo.

Para estimar o volume de *breakthrough* da massa de fase sólida utilizada, foi realizado um teste qualitativo baseado no sistema SIA da Figura 15 sendo que foi desconectada a linha entre a minicoluna e a bobina reacional pós-extração, da qual a solução proveniente da extração era coletada em um béquer de 50 mL. Em uma minicoluna que não havia sido realizada nenhuma extração foram feitos o condicionamento com 2000 μL de solução condicionante e em seguida foram percolados 10 mL de solução de NO_2^- 45 mg L^{-1} , e na solução remanescente recolhida no béquer foi adicionado 1 mL da solução estoque do RG para verificação da formação de cor. Esse procedimento foi repetido cinco vezes, sendo que após a quinta vez, a solução foi percolada de 1 em 1 mL repetindo por mais cinco vezes.

Com intuito de avaliar as melhores condições e as contribuições de algumas variáveis para a pré-concentração e extração de NO_2^- , aplicou-se um planejamento fatorial 2^3 para otimização. Os fatores e níveis avaliados estão listados na Tabela 2. O procedimento analítico foi realizado com base também no sistema obtido da Figura 15 e com o mesmo procedimento descrito no item 3.1.3.3.

Tabela 2. Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^3 para a otimização da extração em fase sólida de NO_2^-

Fatores	Níveis	
	-1	1
1 Diluição da solução estoque do RG (v/v)	(1:2)	(1:3)
2 Volume RG (μL)	300	600
3 Volume de solução padrão NO_2^- (μL)	1800	2400

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Otimização do sistema SIA para determinação de NO_2^- via reagente de Griess

A otimização das variáveis hidrodinâmicas do sistema SIA para adequar o método de Griess à determinação de NO_2^- foi iniciada com o estudo do comprimento da bobina reacional, que variou em 30, 50 e 80 cm nas condições do sistema da Figura 13 utilizando uma solução padrão de NO_2^- $0,25 \text{ mg L}^{-1}$. Testes iniciais indicaram que a vazão ideal de bombeamento da zona de amostra (solução padrão/RG), era de $60 \mu\text{L s}^{-1}$. As absorbâncias obtidas estão plotadas na Figura 16 e é possível observar a menor magnitude de sinal obtida com o uso da bobina de 30 cm.

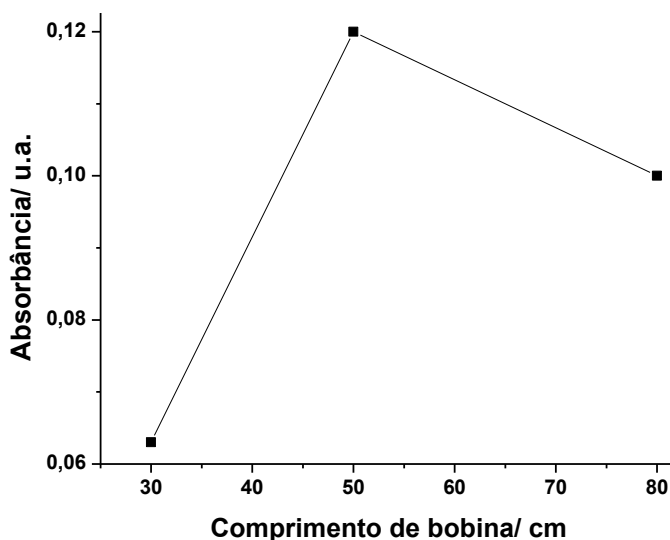


Figura 16. Efeito do comprimento da bobina de reação para determinação de NO_2^- $0,25 \text{ mg L}^{-1}$. Volume da solução de NO_2^- = $200 \mu\text{L}$, RG 1:2 (v/v) da solução estoque = $600 \mu\text{L}$.

Essa menor absorbância pode estar relacionada a presença de picos duplos (Figura 17), que ocorre comumente quando há mistura ineficiente dos reagentes que compõem a zona de amostra na bobina reacional (Figura 17). Quando o comprimento da bobina foi aumentado para 50 cm, o sinal analítico dobrou sua intensidade. Este aumento está relacionado ao maior tempo de residência que favorece a mistura das alíquotas reagentes. Assim, a bobina reacional de 50 cm foi escolhida para realização dos próximos testes devido a de 80 cm apresentar um pequeno decréscimo em magnitude.

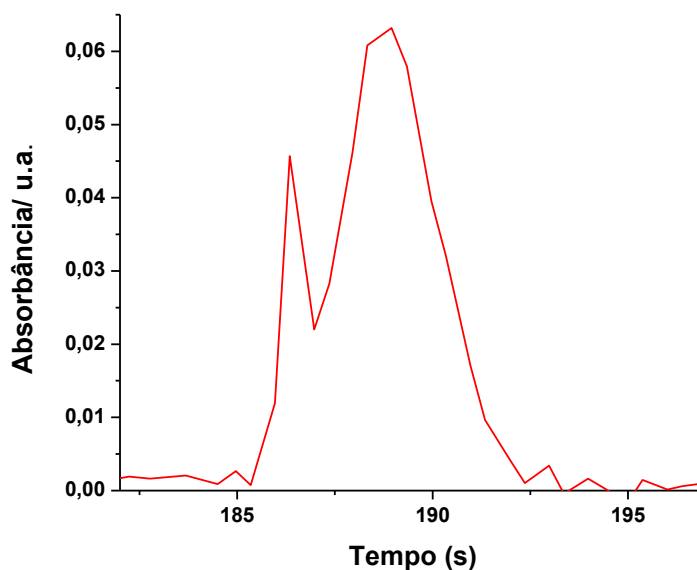


Figura 17. Perfil do pico obtido indicando falta mistura entre os segmentos da zona de amostra. Solução de NO_2^- $0,25 \text{ mg L}^{-1} = 200 \text{ }\mu\text{L}$, RG 1:2 (v/v) da solução estoque = $600 \text{ }\mu\text{L}$, bobina reacional = 30 cm.

A vazão de bombeamento da zona de amostra para a cela de detecção foi avaliada de 50 a $80 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$. Vazões mais altas como 70 e $80 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ proporcionaram a formação de picos duplos devido ao pouco tempo para a mistura dos segmentos na bobina de reação, que resultou em menor magnitude do sinal analítico. A vazão de $50 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ foi escolhida para os próximos ensaios, já que foram obtidos sinais com perfil e intensidade satisfatórios, obtendo ainda uma frequência analítica adequada (Figura 18).

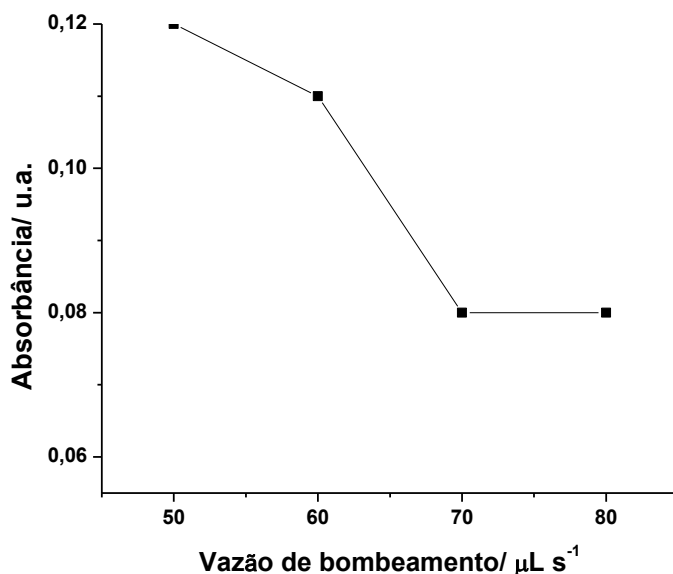


Figura 18. Efeito da vazão de bombeamento da zona de amostra para detecção de NO_2^- $0,25 \text{ mg L}^{-1}$. Volume da solução de NO_2^- = $200 \mu\text{L}$, RG 1:2 (v/v) da solução estoque = $600 \mu\text{L}$, bobina reacional = 50 cm .

Em um terceiro ensaio, foi avaliada a influência da estratégia de formação da zona de amostra sob o sinal analítico. A estratégia alternativa de formação abordada denomina-se amostragem sanduíche e é realizada por meio da inserção de uma alíquota de amostra/padrão intercalada por duas porções de reagente, obtendo a seguinte ordem no percurso analítico: reagente, amostra e reagente ¹⁰⁵ (Figura 19). Desta maneira, uma alíquota de padrão de NO_2^- em concentração de $0,55 \text{ mg L}^{-1}$ foi intercalada entre duas alíquotas iguais de reagente colorimétrico, conforme é ilustrado na Figura 19. Os volumes estudados de RG e da solução padrão de nitrito estão descritos na Tabela 3.

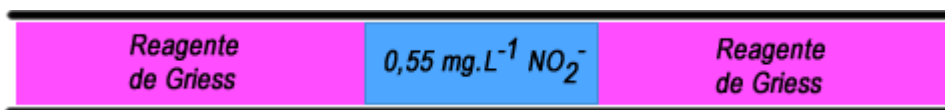


Figura 19. Esquema ilustrativo da estratégia de formação da zona de amostra sanduíche.

Testes com a estratégia de formação com aspiração sequencial foram realizados para obter uma comparação dos valores de absorbância para a solução padrão de $0,55 \text{ mg L}^{-1}$, que foi empregada na estratégia sanduíche. O ensaio seguiu conforme o procedimento experimental descrito no item 3.1.3.1 no qual foram utilizados $200 \mu\text{L}$ solução padrão de NO_2^- $0,55 \text{ mg L}^{-1}$ e o sinal obtido para esta estratégia foi em média $0,1998 \text{ u.a.}$, para $n = 3$.

A estratégia sanduíche aumentou o sinal analítico de 35 a 65 % quando em comparação com a estratégia de aspiração sequencial das duas alíquotas A/RG. Este tipo de amostragem proporciona maior dispersão do segmento da solução padrão nas duas alíquotas de reagente, favorecendo a mistura. Desta maneira proporciona um sinal analítico de maior magnitude. Pôde-se observar que ao aumentar o volume da alíquota da solução padrão de nitrito, não houve alterações significativas nos sinais a partir do segundo ensaio (Tabela 3). Sendo assim, para a realização da curva de calibração foram utilizados os volumes encontrados para o ensaio 2 na Tabela 3.

Tabela 3. Volumes utilizados para avaliação da estratégia sanduíche. RG = Reagente de Griess (1:2), solução padrão de NO_2^- $0,55 \text{ mg L}^{-1}$

Ensaio	Volumes de RG (μL)	Volume do padrão NO_2^- (μL)	Sinal analítico (u.a.)
1	300	100	0,27
2	300	200	0,33
3	300	300	0,32
4	300	350	0,33

Com estes parâmetros otimizados, foi realizada uma curva analítica que abrangeu a faixa de $0,15$ a $0,55 \text{ mg L}^{-1}$ de NO_2^- com incrementos de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ a cada padrão. Os sinais analíticos foram obtidos pela média das três medidas da altura dos picos para cada concentração (Figura 20). O sinal do branco para esta curva resultou em $0,0102$ u.a e foi subtraído dos valores para as respectivas alturas dos picos para cada concentração de NO_2^- . A resposta linear (Figura 21) foi satisfatória para os objetivos desta primeira etapa, na qual $R^2 = 0,9833$.

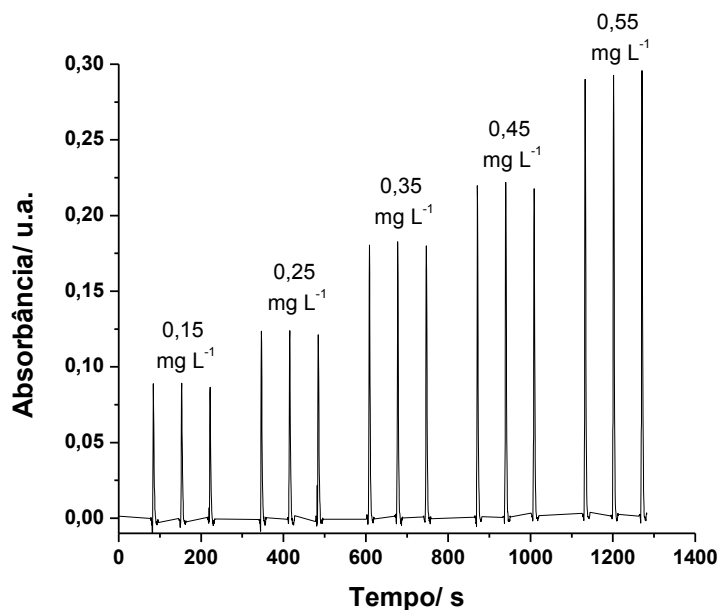


Figura 20. Registro dos sinais analíticos para determinação de NO_2^- pelo método de Griess utilizando a amostragem sanduíche. Os volumes das soluções estão listados na Tabela 3 e a bobina reacional utilizada foi de 50 cm.

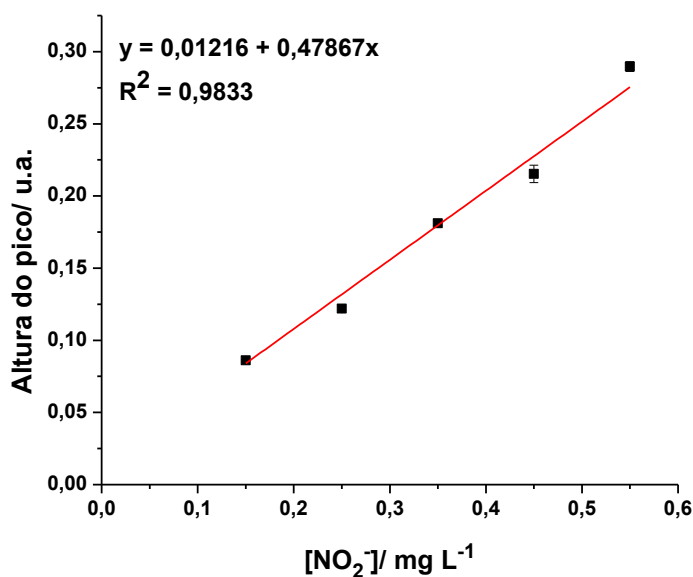


Figura 21. Curva analítica para determinação de NO_2^- pelo método de Griess utilizando a amostragem sanduíche.

Com os mesmos volumes e com a zona de amostra sanduíche, foi avaliada outra estratégia para melhoramento da mistura reacional e conseqüente aumento na magnitude do sinal analítico. A técnica denominada parada de fluxo (do inglês, *stopped flow*) foi empregada parando-se o fluxo por 10, 20 e 30 s no momento em que a zona de amostra encontrava-se no HC. O sinal analítico diminuiu quando

aumentou-se o tempo de parada de fluxo, com de 10 s o pico apresentou magnitude de 0,2422 u.a., com 20 s foi de 0,1992 u.a. e com 30 s foi de 0,2042 u.a. Essa redução em maiores intervalos de parada de fluxo, pode estar relacionada com leve dispersão da zona de amostra. Foi possível constatar que o *stopped flow* favorece a presença de picos mais definidos, pois favorece maior tempo de contato entre as alíquotas. Assim, assegurando que o tempo de 20 s apresentou um perfil de pico adequado e o tempo de 30 s apresentou mínima diferença de sinal, foi empregado o intervalo de 20 s como estratégia de parada de fluxo. O diagrama e a curva de calibração com o procedimento de parada de fluxo estão representados na Figura 22 e 23, respectivamente.

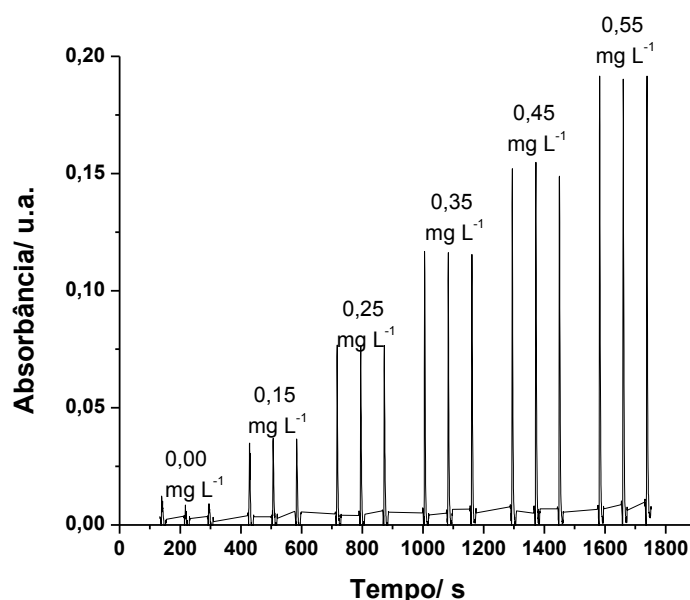


Figura 22. Registro dos sinais analíticos para determinação de NO_2^- com zona de amostragem sanduíche e parada de fluxo de 20 s. Os volumes das soluções estão listados na Tabela 3 e a bobina reacional utilizada foi de 50 cm.

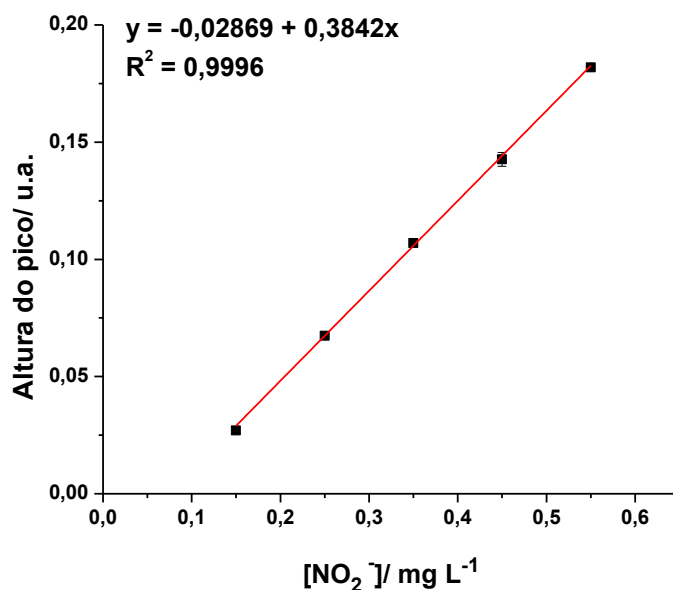


Figura 23. Curva analítica para determinação de NO₂⁻ com zona de amostragem sanduíche e parada de fluxo de 20 s.

Ao comparar as duas curvas analíticas (Figuras 21 e 23) é possível observar que a sensibilidade diminui ao utilizar a estratégia de parada de fluxo, devido ao aumento da dispersão da zona de amostra. Assim, para o próximo sistema será mantido o procedimento de movimento do fluxo, pois apresentou maior sensibilidade, que possibilita o emprego do sistema para determinação de menores concentrações de nitrito.

3.2.2 Automação da SPE para extração de NO₂⁻ explorando eluentes alcóolicos em meio ácido e solução concentrada de NaCl

Para a extração e concentração dos íons NO₂⁻ almeçadas nesse trabalho, foi acoplada uma minicoluna de SPE (Figura 14) no sistema SIA otimizado no item anterior (Figura 13). Assim, para a recuperação do nitrito em linha, foi necessário realizar um estudo prévio de potenciais soluções para eluir esse ânion da fase sólida. Segundo o fabricante da fase sólida utilizada neste trabalho⁸⁵, para o modo de eluição, são indicados os seguintes reagentes: solventes orgânicos polares, soluções com grande quantidade de íons ou com elevada força iônica. De acordo com Fritz e Gjerde¹⁰⁶, as soluções de ácidos fortes são excelentes eluentes, pois além de fornecer mudanças no pH no meio, disponibiliza alta quantidade de ânions para realizar a troca¹⁶. Por sua vez, soluções que contenham solventes orgânicos

polares na sua composição favorecem a solvatação das espécies facilitando a permuta aliada a presença de íons de outras fontes em solução ⁸⁰.

Considerando estas informações foram realizados testes em batelada (fora do sistema SIA) para avaliação qualitativa de potenciais eluentes. Através desses ensaios foram encontradas as seguintes soluções que apresentaram resultados satisfatórios para a eluição do NO_2^- : metanol 1:1 (v/v) em HCl 0,12 mol L⁻¹, etanol 1:1 (v/v) em HCl 0,12 mol L⁻¹ e NaCl 1 mol L⁻¹. As soluções alcoólicas apresentaram eficiência para eluir o nitrito somente na presença de ácido clorídrico. Tal fato pode estar relacionado com a contribuição do íon cloreto fornecida pelo HCl para troca com o nitrito retido, uma vez que concentrações do ácido menores que 0,12 mol L⁻¹ não conseguia de retirar todo NO_2^- da fase sólida. Já a solução de NaCl apresentou bons resultados quando do uso concentrações não menores que 1 mol L⁻¹ devido a grande quantidade de ânions que essa espécie libera no meio reacional.

As soluções alcólicas em meio ácido foram avaliadas como soluções eluentes no procedimento descrito no item 3.1.3.2. A Figura 24 demonstra o registro de sinais obtido para o branco e duas soluções de nitrito quando a eluição foi efetuada com etanol 1:1 (v/v) em HCl 0,12 mol L⁻¹. Pode-se observar que os sinais analíticos apresentaram a mesma magnitude com soluções de concentrações diferentes de NO_2^- . Para a solução de metanol em meio ácido o resultado obtido foi similar ao representado na Figura 24. Considerando estes resultados, não foi viável utilizar estas soluções como eluente de NO_2^- . Além disso, foi observado no registro dos sinais analíticos (Figura 24) uma distorção no perfil que poderia ser resultado de perturbações ópticas a partir da falta de mistura das soluções. Para averiguar, foi realizado o mesmo procedimento com leituras em outro comprimento de onda (700 nm). Nesse comprimento não era esperado a obtenção de sinal analítico para nitrito, entretanto, se observou que os sinais analíticos apresentaram a mesma intensidade e perfil de pico daqueles obtidos em 540 nm. Desta forma, pode-se confirmar a presença do efeito Schlieren ⁸⁹, que promove uma variação no percurso normal do feixe de radiação quando este atravessa uma interface de soluções de composição química diferentes, variando o índice de refração do meio. Este efeito é bastante comum quando se utiliza extração em fase sólida em linha, que requer o uso soluções de diferentes composições em altas concentrações. Por muitas vezes este efeito encobre o sinal do analito não possibilitando a quantificação deste.

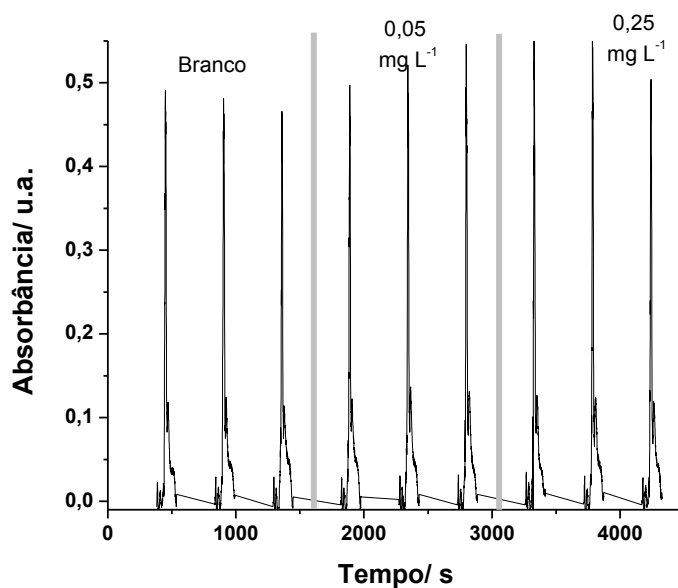


Figura 24. Registro de sinais obtido para diferentes concentrações de solução de NO_2^- em mg L^{-1} (1800 μL). Solução eluente = 300 μL de etanol 1:1 (v/v) em HCl 0,12 mol L^{-1} , bobina reacional pós-extração = 50 cm.

Na intenção de diminuir o efeito Schlieren foram realizados testes para equilibrar a quantidade de ácido no meio, realizando um ajuste na concentração das soluções ⁸⁹. A solução transportadora foi substituída por HCl 0,12 mol L^{-1} , igualando assim a concentração do ácido em todo percurso analítico. Este ajuste não foi efetivo para minimização do efeito, e outros ajustes como a diminuição da quantidade de álcool ou ácido utilizados, também não apresentaram resultados positivos. Diante disto as soluções de metanol 1:1 (v/v) em HCl 0,12 mol L^{-1} e etanol 1:1 (v/v) em HCl 0,12 mol L^{-1} foram descartadas como possíveis eluentes, devido a incompatibilidade com o sistema de detecção escolhido.

Para a solução de NaCl 1,0 mol L^{-1} , o efeito Schlieren apresentou-se na forma de lente para as medidas do branco (Figura 25). Isto ocorre devido a variação no índice de refração da interface dos segmentos, formando os fenômenos de lente ou espelho. O efeito de lente acontece por que a radiação é concentrada no detector e por consequência a absorbância diminui ⁸⁹. É possível verificar, também, que os sinais referentes a concentração de NO_2^- utilizada apresentam magnitude bem inferior ao que deveria ser. Neste caso, o sinal do analito pode ter sido encoberto pelo efeito. Assim, não foi possível utilizar essa solução como eluente sem que uma estratégia de correção seja empregada.

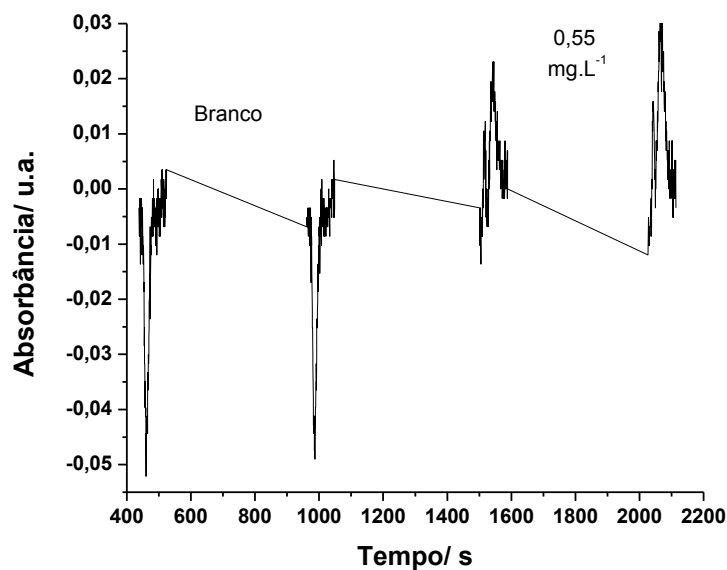


Figura 25. Registro dos sinais obtidos com a eluição de nitrito com 300 μL de solução de NaCl 1,0 mol L^{-1} , bobina reacional pós extração = 50 cm.

Diante desses impasses, foi testada uma alternativa para a correção do efeito com base nos estudos realizados por Dias e colaboradores⁸⁹. Esta estratégia de correção foi realizada por meio da subtração do valor do sinal relativo ao efeito pelo sinal da soma do analito mais o efeito. Assim, durante a realização das medidas pelo detector, aquisições em dois comprimentos de ondas foram realizadas concomitantemente, uma com o comprimento de onda relativo ao composto de interesse (540 nm) e outra em um comprimento de onda distante (700 nm), no qual o analito não absorve radiação.

Após a obtenção dos dados, os sinais foram subtraídos manualmente. Não foi possível obter uma correção satisfatória devido a pequena diferença entre o sinal relativo ao branco, do sinal relativo ao padrão de 0,55 mg L^{-1} de NO_2^- que resultou em 0,0348 u.a.. Desta forma não seria possível obter uma curva de calibração com boa sensibilidade, com este pequeno aumento de absorbância para um alto incremento na concentração da solução padrão.

3.2.3 Sistema SIA para extração e determinação de NO_2^- em linha explorando o reagente de Griess como eluente

Devido aos problemas apresentados no item anterior, foi avaliada a possibilidade de eluir o nitrito com o próprio reagente de Griess. Essa escolha se deu por conta dos estudos realizados por Lins³², onde o RG era empregado como

eluente, que já removia o nitrito na própria fase sólida e formava o azo composto. Entretanto, o autor realizou apenas alguns testes preliminares que apontaram que essa estratégia poderia funcionar se todos os parâmetros da SPE fossem otimizados.

Para isto, o sistema da Figura 15 foi utilizado para as otimizações. A influência do volume de RG foi estudada em uma faixa de 100 a 400 μL (Figura 26). Ao aumentar o volume 100 para 300 μL foi possível observar que a absorvância praticamente dobrou. É provável que 100 μL seja insuficiente para retirar todo o nitrito isolado, eluindo apenas parte das espécies e outra permanecendo ainda retida na fase sólida. Este teste confirma os dados expostos na Tabela 1 na qual estima-se que volume mínimo de eluente para 80 mg de fase sólida, se encontraria entre 125 e 250 μL , ou seja, em média 200 μL . A medida que o volume foi elevado, a magnitude do sinal aumentou estabilizando na faixa de 300 e 400 μL , dos quais apresentaram absorvâncias muito próximas. Desta maneira, objetivando a redução da quantidade de resíduos aliada a maior sensibilidade, o volume do eluente foi mantido em 300 μL para realização da curva de calibração.

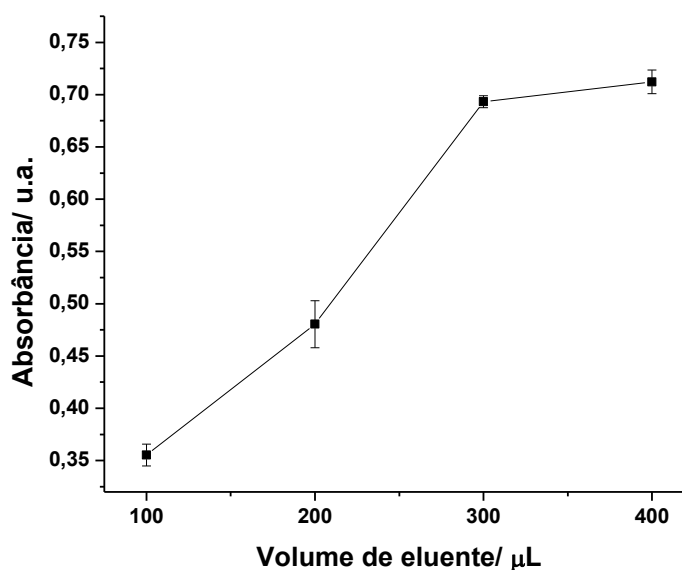


Figura 26. Efeito do volume de RG para a eluição de NO_2^- 0,55 mg L^{-1} (1800 μL). Condições experimentais especificadas no item 3.1.3.3.

Testes de variação da concentração do RG (v/v) foram realizados com objetivo de reduzir os sinais do branco (água destilada) e minimizar possíveis perturbações relacionadas ao efeito Schlieren. Assim os sinais obtidos para o branco ($n = 2$) com 300 μL de RG diluídos da solução estoque estão relacionados na Tabela

4. É possível observar que o menor valor apresentado para o branco encontra-se para a diluição 1:4 que também apresenta menor efeito Schlieren (Figura 27). Cabe salientar que este maior fator de diluição pode diminuir também as absorbâncias obtidas para o azo composto quando da extração de NO_2^- , entretanto, a otimização outros parâmetros do sistema, como o tamanho da bobina reacional, pode auxiliar para melhor formação do produto mantendo a sensibilidade do método com menores LD e LQ provenientes de menores sinais relativos ao branco. Dessa forma, a concentração do RG em 1:4 foi utilizada para os próximos estudos de otimização.

Tabela 4. Variações na concentração do reagente de Griess através da diluição da solução estoque (v/v)

Concentração do RG (v:v)	Absorbância (u.a.)	Desvio padrão
(1:1)	0,062	$1,4 \times 10^{-3}$
(1:2)	0,043	$2,1 \times 10^{-3}$
(1:3)	0,040	$6,5 \times 10^{-4}$
(1:4)	0,021	$2,5 \times 10^{-3}$

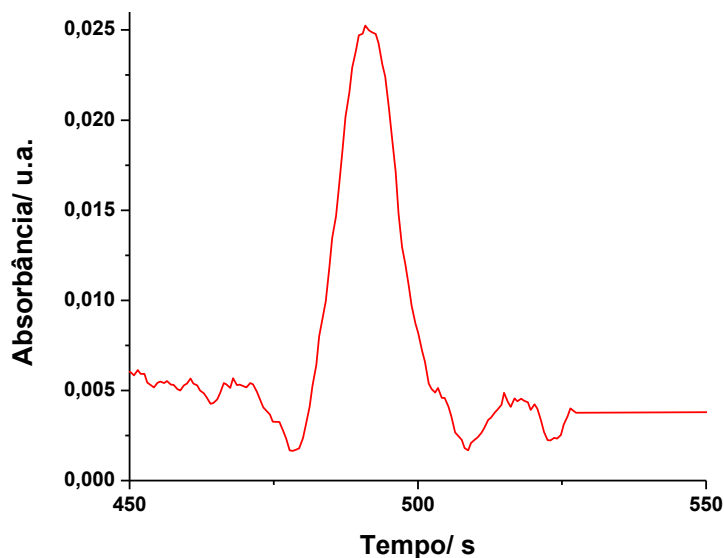


Figura 27. Registro do sinal obtido para o branco com 300 μL do RG 1:4

Os comprimentos da bobina de reação foram avaliados de 50 a 100 cm. Para esta nova condição, foi necessário aumentar o tamanho de bobina devido o emprego da diluição do RG em 1:4 (v/v). Desta forma no instante em que reagente e o NO_2^- saem da coluna, a mistura desses dois reagentes necessita de percurso

maior para a ocorrência da reação, assim, os sinais analíticos apresentaram melhores resultados no comprimento de bobina de 100 cm.

Durante os testes para extração em linha de NO_2^- foi verificada visualmente a presença de uma leve coloração rosa dentro da minicoluna, que poderia ser resíduos de RG e/ou produtos da reação. Considerando estes aspectos, foram realizados testes para averiguar a possível presença de efeito de memória entre as sucessivas extrações. Um dos fatores que pode causar efeito memória na SPE em linha é a ausência de etapas de lavagem entre as extrações ou condicionamento inadequado da fase sólida. Para avaliar esses fatores, duas minicolunas iguais foram utilizadas em dois testes com condições de extração diferentes. No primeiro teste, o condicionamento foi realizado apenas no início das atividades e uma etapa de lavagem era realizada após a eluição passando 2000 μL de água pela fase sólida. No segundo teste, o condicionamento foi realizado entre as extrações com a adição de mais uma etapa de lavagem que consistiu no aumento do volume de solução transportadora para conduzir a solução padrão de nitrito de 1000 μL para 2000 μL e o aumento da alíquota de lavagem após a eluição utilizada do primeiro teste, de 2000 μL para 3800 μL .

Para o primeiro teste, foram realizadas três extrações da solução de NO_2^- 0,25 mg L^{-1} seguida de três medidas para o branco, para melhor visualização de potenciais resíduos do produto na fase sólida. A Figura 28 demonstra os sinais analíticos obtidos. Foi possível observar que o primeiro sinal do branco apresentou 0,0308 u.a., enquanto o segundo e terceiro apresentaram 0,0114 u.a e 0,0075 u.a, respectivamente. O primeiro sinal relacionado ao branco apresentou magnitude maior do que os outros dois e é possível perceber a diminuição gradativa entre os sinais, isso é um fator relevante que pode indicar efeito de memória pela fase sólida.

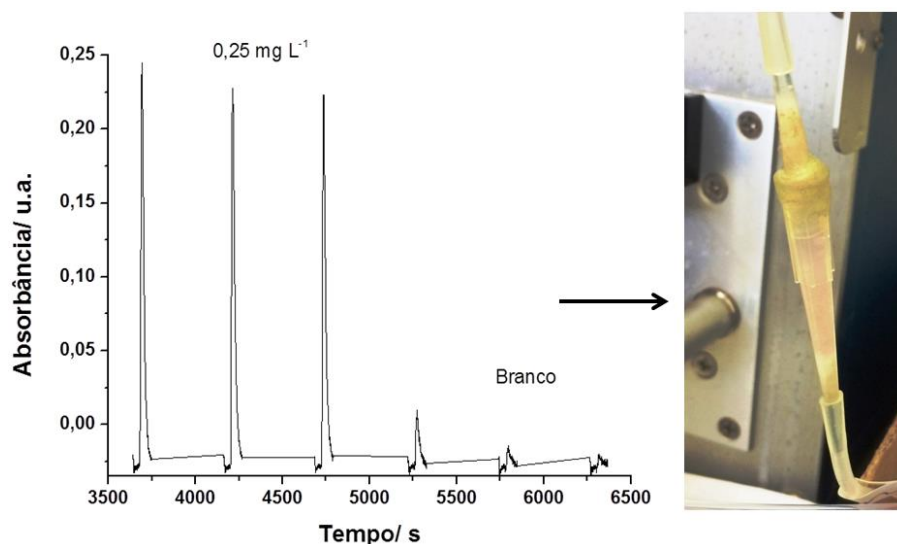


Figura 28. Registro de sinais para verificação do efeito de memória para a extração de NO_2^- (1800 μL) e imagem da minicoluna pigmentada após sucessivas extrações. Solução eluente = 600 μL RG 1:4, bobina reacional pós extração = 100 cm.

A repetibilidade entre os sinais foi avaliada em termos de coeficiente de variação (CV), sendo que para o branco resultou em 75,31 % ($n = 3$) e para o padrão de nitrito 5,04 % ($n = 3$). A repetibilidade inadequada para os sinais relativos ao branco reforça ainda mais a ideia de que os resíduos de extrações anteriores estariam sendo acumulados na fase sólida, apontando possível efeito memória. Outro fator que evidencia esse efeito é a coloração da fase sólida dentro da minicoluna SPE, que indica a presença de produto da reação de Griess no sólido (Figura 28).

O segundo teste foi realizado inserindo uma etapa de condicionamento entre os procedimentos de extração e duas etapas de lavagem. Desta maneira, antes de iniciar a percolação da amostra, uma alíquota de acetonitrila 10 % (v/v) era percolada pela fase sólida. Neste ensaio foi utilizado o padrão de NO_2^- 0,55 mg L^{-1} com objetivo de aumentar o potencial de acúmulo do analito.

Neste teste foram realizadas medidas do branco antes e depois da extração do nitrito para constatar possíveis diferenças entre os sinais. Observa-se na Figura 29 que o primeiro sinal do branco após as extrações não apresentou aumento na magnitude como observado no teste anterior. Tal fato aponta que possivelmente o efeito de memória pode ter sido minimizado através da realização das etapas de lavagem e condicionamento da fase sólida. Para as primeiras replicatas do branco, o

o sinal médio resultou em 0,0165 u.a. com CV = 2,62 %, n = 4. Para as replicatas do branco após o padrão o valor médio foi de 0,0183 u.a. com CV = 2,10 %, n = 4. Comparando-se os valores do sinal do branco com os do teste anterior, pode-se perceber melhorias na precisão. As medidas para a solução padrão de NO_2^- (CV = 1,72 %, n = 4) também apresentaram melhor precisão. Estes resultados demonstraram a importância das etapas de condicionamento e lavagem quando sucessivas extrações são realizadas com a mesma fase sólida.

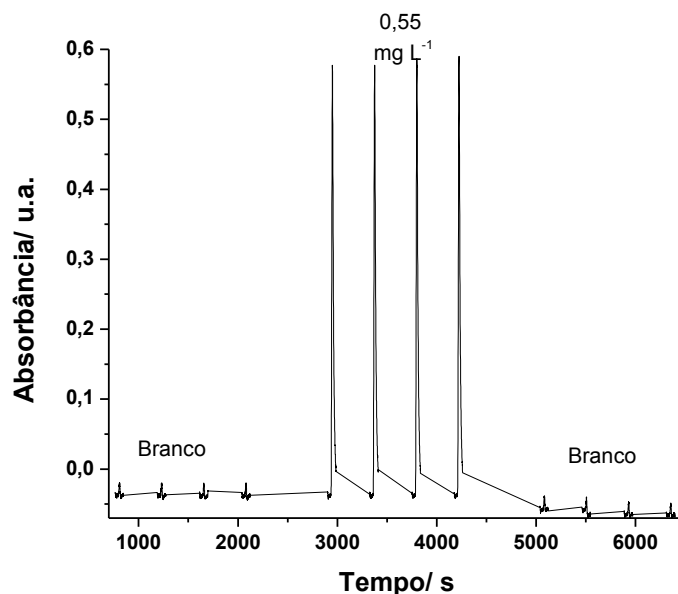


Figura 29. Registro de sinais para verificação do efeito de memória com condicionamento entre as extrações. O valor indica a concentração de NO_2^- em mg L^{-1} . Solução eluente = 600 μL RG 1:4, bobina reacional pós extração = 100 cm.

Segundo Poole e colaboradores, o condicionamento da fase sólida é uma etapa de extrema importância para a eficiência da extração, pois proporciona melhores condições ao procedimento por meio da ativação das espécies dispostas na superfície do sólido e da retirada de possíveis interferentes que possam permanecer entre os interstícios da fase sólida ¹⁰⁴. Desta maneira, para este procedimento que considera o uso da mesma fase sólida em sucessivas extrações, o condicionamento torna-se essencial para obtenção de resultados com maior precisão e exatidão. Após essa constatação, em todas as extrações realizadas neste trabalho foi realizado um condicionamento prévio da fase sólida e foram mantidas as etapas de lavagem adicionais.

Uma estimativa de reprodutibilidade da fase sólida foi realizada da qual resultou que em média 67 extrações foram realizadas com a mesma fase sólida sem mudanças expressivas no sinal analítico.

Com os parâmetros otimizados, foi obtida uma curva de calibração na faixa de 0,15 – 0,55 mg L⁻¹ de NO₂⁻ seguindo o procedimento descrito no item 3.1.3.3. O registro de sinais obtidos e a curva analítica estão apresentados na Figura 30 e 31, respectivamente. A curva apresentou R² = 0,9954 e o LD foi estabelecido conforme o seguinte critério ¹⁰⁷ $y - y_b = 3.S_B$, em que y = sinal para o LD, y_b = sinal do branco, S_B = desvio padrão do branco, no qual resultou em 8,81 x 10⁻³ mg L⁻¹ de NO₂⁻ e o limite de quantificação (LQ) de 8,1 x 10⁻² mg L⁻¹ de NO₂⁻.

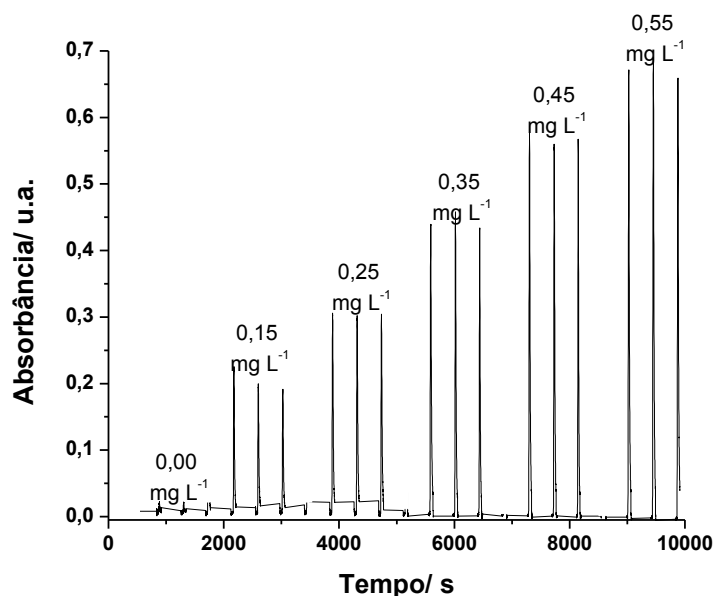


Figura 30. Registro de sinais para determinação de NO₂⁻ com SPE em linha e eluição direta pelo reagente de Griess. Solução eluente = 600 µL RG 1:4, bobina reacional pós extração = 100 cm,

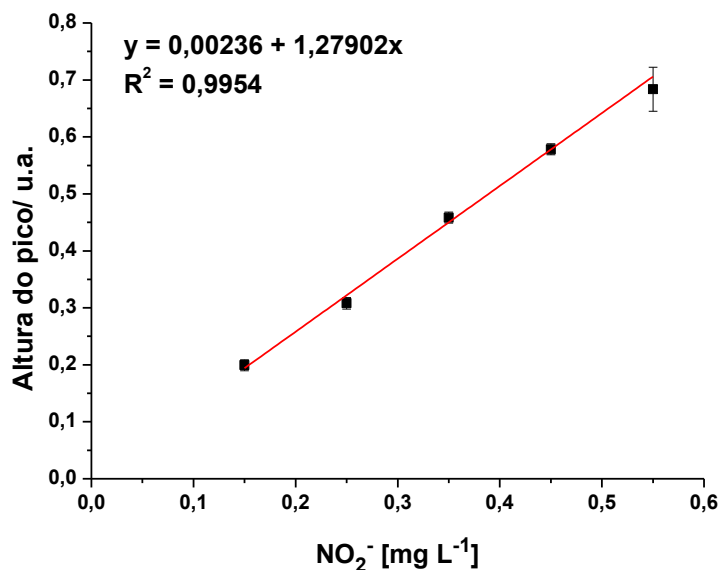


Figura 31. Curva analítica para a determinação de NO_2^- com SPE em linha e eluição direta pelo reagente de Griess.

Devido a alta sensibilidade obtida na curva analítica anterior, foi possível ampliar a faixa de trabalho para menores concentrações. Uma nova curva foi construída com os padrões NO_2^- 0,05 mg L^{-1} , 0,10 mg L^{-1} , 0,15 mg L^{-1} , 0,20 mg L^{-1} , 0,25 mg L^{-1} . O registro de sinais obtido está demonstrado na Figura 32 e a curva de calibração na Figura 33.

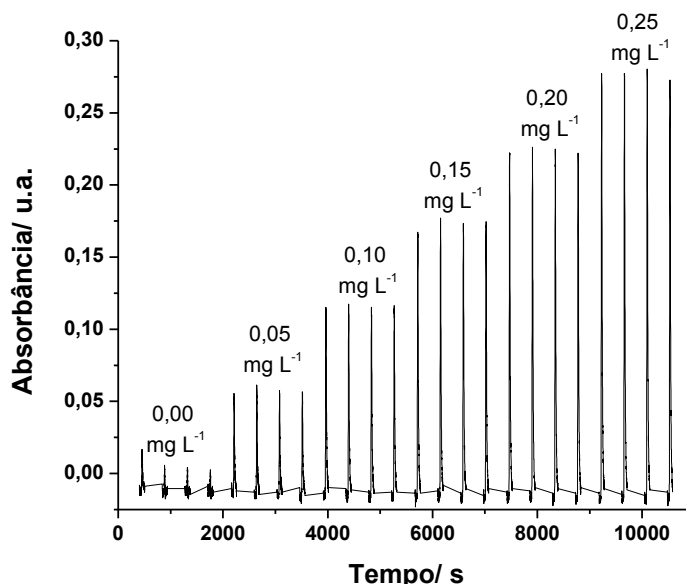


Figura 32. Registro de sinais obtido da pré-concentração de NO_2^- com a ampliação da faixa de trabalho para menores concentrações. Solução eluente = 600 μL RG 1:4, bobina reacional pós extração = 100 cm.

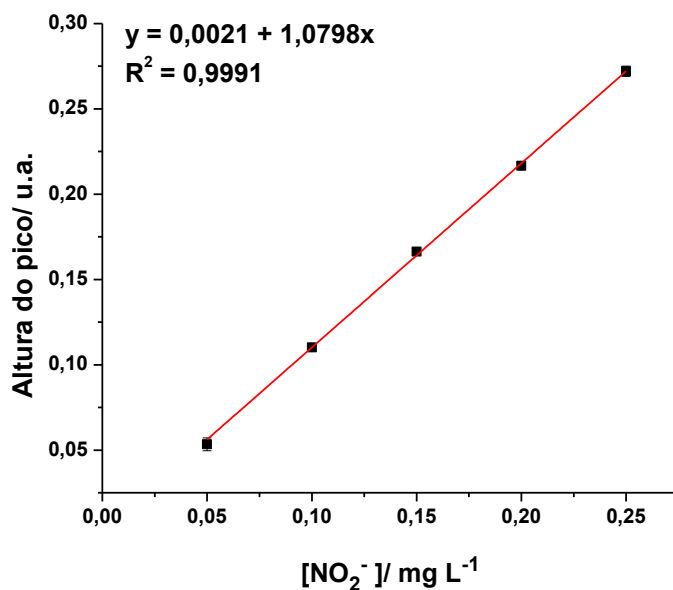


Figura 33. Curva analítica para determinação de NO₂⁻ com ampliação da faixa de trabalho para menores concentrações.

A curva apresentou linearidade adequada ($R^2 = 0,9973$) e mesmo com a redução da faixa de trabalho, a sensibilidade do método não foi prejudicada. O LD e LQ foram estimados em $1,8 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ e $1,86 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, demonstrando a adequação do sistema desenvolvido para determinação de nitrito em baixas concentrações. A frequência analítica foi estabelecida em $8,3 \text{ det h}^{-1}$ e o fator de pré-concentração para extração foi estimado 6 vezes.

Testes direcionados a estimar o volume de *breakthrough* da fase sólida foram realizados conforme o procedimento descrito no item 3.1.3.3 e avaliados de forma qualitativa. Para os primeiros 50 mL de solução de NO₂⁻ 45 mg L^{-1} percolados pela fase sólida, não houve formação de cor na solução coletada no béquer. Após a passagem de 50 mL, a solução padrão foi percolada de 1 em 1 mL de solução, até que em 55 mL, houve a formação do produto rosa no béquer, conforme pode ser observado na Figura 34, indicando que a fase sólida começou a deixar de reter os ânions provenientes da solução e os mesmos começaram a ser perdidos na solução remanescente coletada no béquer.



Figura 34. Produto colorido formado após a percolação de 55 mL da solução de NO_2^- 45 mg L^{-1} na fase sólida

Assim, a massa estimada de retenção de nitrito foi de 2,430 mg de NO_2^- que apresenta-se bem próxima da capacidade de troca da fase sólida indicada no certificado de análise do fabricante⁸⁵ que é de $0,8 \text{ meq g}^{-1}$, resultando em 2,944 mg de nitrito para 80 mg de fase sólida.

Para avaliar a resposta obtida quando da variação de alguns fatores que foram considerados importantes para a extração de nitrito em linha no sistema SIA, foi aplicada a ferramenta de planejamento fatorial completo 2^3 em triplicata. Essa ferramenta foi escolhida para avaliação desses parâmetros pois possibilita a otimização multivariada, identificando os fatores que possuem maior influência na resposta de interesse, permitindo assim escolher melhores condições para o sistema por meio de um número reduzido de ensaios. Neste teste, a única diferença do procedimento experimental descrito no item 3.1.3.3, é a vazão de percolação do padrão na fase sólida que foi de $10 \mu\text{L s}^{-1}$ para garantir o maior contato da solução padrão com a fase sólida.

Os testes foram realizados em triplicata para a estimativa do erro dos ensaios e os valores dos efeitos principais e de interação obtidos estão listados na Tabela 5.

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA SIA PARA EXTRAÇÃO E
DETERMINAÇÃO DE NITRITO EM LINHA

Tabela 5. Tabela dos resultados do planejamento fatorial 2^3 contendo os valores das replicatas e as respectivas médias

Experimento	Diluição do RG (v/v)	Volume reagente RG (μL)	Volume de padrão NO_2^- (μL)	Sinal analítico (altura)			Média
1	-1	-1	-1	0,0826	0,0946	0,0769	0,0847
2	1	-1	-1	0,1292	0,1425	0,1322	0,1346
3	-1	1	-1	0,2938	0,3010	0,2918	0,2955
4	1	1	-1	0,2324	0,2262	0,2303	0,2297
5	-1	-1	1	0,2240	0,2361	0,1927	0,2176
6	1	-1	1	0,0239	0,0312	0,0343	0,0298
7	-1	1	1	0,3896	0,4328	0,3956	0,4060
8	1	1	1	0,2556	0,2506	0,2512	0,2525

Diante dos resultados obtidos na Tabela 5 foi construída uma tabela de coeficientes de contraste e foi aplicada a operação com matrizes para obter um vetor coluna ($X^T \cdot Y$) que permitiu o cálculo dos efeitos para os ensaios realizados. Os resultados estão expostos na Tabela 6.

Tabela 6. Valor dos efeitos obtidos para o planejamento fatorial 2^3

Efeitos	$X^t \cdot Y$	Valor efeito
Média	1,6505	0,2063
1	-0,3572	-0,0893
2	0,7169	0,1792
3	0,1614	0,0403
12	-0,0815	-0,0204
13	-0,3254	-0,0813
23	0,1052	0,0263
123	0,1501	0,0375

Para avaliação dos efeitos significativos foi realizada a análise por meio da estimativa de erros da qual o intervalo de confiança obtido para a distribuição t de Student a 95 % com oito graus de liberdade, foi igual a (+/-) 0,0144. Assim, foi possível observar que os efeitos principais e as interações, até mesmo a interação de três níveis apresentam-se significativos para o estudo, demonstrando assim que todas as variáveis são importantes para a extração de NO_2^- . A interação principal 1,

que se refere a diluição do RG apresenta melhor eficiência da extração em menor diluição (1:2), indicada pelo nível baixo do planejamento (-1), entretanto, deve-se assegurar que este menor fator de diluição seja aliado a outras características do sistema para não gerar aumento para o branco analítico e perturbações decorrentes do efeito Schlieren. Já os efeitos principais 2 e 3 apresentam melhores resultados para a extração nos níveis altos (1), ou seja, maiores volumes para o RG e de solução padrão de NO_2^- , respectivamente. Esses valores indicam as condições que conduzem a um aumento na recuperação do nitrito retido na fase sólida e serão considerados nos estudos de otimização do próximo capítulo.

Considerando todos os aspectos abordados, observa-se que cada sistema estudado neste capítulo foi importante para a automação da SPE no sistema. O sistema SIA obtido no item 3.1.3.3 possibilitou explorar as características da reação de Griess para determinação de nitrito em fluxo permitindo conhecer as variáveis necessárias para a inserir a SPE no sistema SIA. Após a inserção da SPE, a maioria das faixas estudadas foram modificadas para os outros dois sistemas obtidos. O último sistema apresentado no item 3.1.3.3 demonstrou melhores condições para a extração do nitrito em linha, sendo este mantido para prosseguir com os estudos no próximo capítulo com determinação indireta do nitrito gerado pela fotólise de NNG. A Tabela 7 apresenta um resumo das faixas estudadas para os sistemas com SPE em linha e as respectivas variáveis escolhidas.

Tabela 7. Faixas estudadas e variáveis selecionadas para os sistemas SIA com SPE em linha

Variável	Faixas estudadas	Variável selecionada
Soluções eluentes (sem unidade)	Etanol ou metanol em HCl^+ , NaCl 1 mol L^{-1} , RG	RG
Diluição do RG (v/v)	1:1 - 1:4	(1:4)
Comprimento de bobina (cm)	50 – 100	100
Volume de eluente (μL)	100 – 600	600
Condicionamento entre extrações (sem unidade)	Sim ou Não	Sim

⁺ 50 mL dos álcoois diluídos em 50 mL HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$

3.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

Os estudos realizados permitiram a inserção de uma unidade de extração em fase sólida em um sistema SIA para determinação de nitrito, com redução de reagentes tóxicos e de resíduos. As características analíticas apresentadas foram satisfatórias e a automação desse procedimento de preparo de amostra acrescentou diversas vantagens ao método, como menor suscetibilidade para erros sistemáticos, melhorias na precisão assim como a possibilidade de se determinar baixas concentrações de nitrito devido ao fator de pré-concentração satisfatório obtido. Considerando os aspectos abordados neste capítulo, pode-se concluir que o sistema desenvolvido constitui uma alternativa simples, rápida e precisa para a determinação de nitrito. Assim, no próximo capítulo, será abordada a utilização deste sistema para determinação indireta de NNG por meio da retenção do nitrito gerado pela fotólise dessa espécie.

CAPÍTULO 4

Determinação indireta de N – Nitrosoglifosato com fotoderivatização e extração em fase sólida em linha no sistema SIA

4. DETERMINAÇÃO INDIRETA DE N-NITROSOGLIFOSATO POR FOTODERIVATIZAÇÃO E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO SISTEMA SIA

Conforme destacado na seção 2.1.2 do capítulo 2, os poucos procedimentos para a quantificação de NNG em formulações à base de glifosato, baseiam-se na determinação indireta desse composto pelo método de Griess, após sua conversão em nitrito por derivatização química ^{4, 7, 8, 9}. Na literatura não foram encontrados trabalhos que realizem a quantificação de NNG em outras matrizes, nem alternativas ao preparo de amostra severo e complexo que os métodos envolvendo CLAE demandam.

Em geral, os métodos para determinação de NNG exploram técnicas analíticas de alto custo, além de exigirem procedimentos de preparo de amostras complexos e morosos, com grande consumo de reagentes. Assim, o desenvolvimento de novos métodos para esta determinação explorando os sistemas FIA apresenta-se como alternativa expressivamente vantajosa, diante do menor custo, alto processamento amostral e simplicidade inerente a esses sistemas ⁷³. Outra vantagem relevante é a versatilidade em automatizar diversos módulos de preparo de amostra no mesmo sistema, como a derivatização por fotólise e SPE, proporcionando assim, métodos rápidos, menos suscetíveis a erros sistemáticos e com maior reprodutibilidade para o preparo de amostra. Além disso, esses sistemas possuem compatibilidade com vários detectores, possibilitando utilizar detecções mais simples e por consequência reações bem consolidadas analiticamente, como a reação de Griess ¹².

Considerando esses aspectos, neste capítulo foi desenvolvido um sistema SIA explorando a automação da fotoderivatização e extração em fase sólida como módulos de preparo de amostra sequenciais para determinação indireta de NNG.

4.1 PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1 Equipamentos e materiais

Foram utilizados os mesmos equipamentos da seção 3.1.1 do capítulo 3, sendo que para a construção do fotorreator foi utilizada uma lâmpada UV – 11 W ³²

DETERMINAÇÃO INDIRETA DE N-NITROSOGLIFOSATO COM FOTODERIVATIZAÇÃO E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM LINHA

de baixa pressão, fluorescente (Sylvania), código: GCF11DS/G23/SE/OF. Interruptor 200 V para acionamento da lâmpada, papel alumínio, caixa em madeira MDF (*Medium Density Fiberboard*) dimensões (cm): 10 x 17 x 26 , termômetro de mercúrio -10 a 50 °C, 0,1 °C (Incoterm), fita de pH 0 - 14 (Macherey – Nagel), centrífuga de bancada KC5 (Kindly) velocidade máxima 4000 rpm, seringas para insulina de 1 mL (Descarpack), tubo de PTFE (1,58 d.i.), cooler com ventoinha, dimensões (cm) 11,5 x 11,5.

Para a inserção da fotoderivatização no sistema SIA foi construído um suporte (Figura 35) para acomodar a lâmpada e para proteção do analista a radiação UV. Foi utilizada uma caixa de madeira, da qual foi revestida com papel alumínio e uma bobina reacional composta por um tubo de PTFE, foi envolta na lâmpada. O reator permanecia sempre fechado e a lâmpada permanecia ligada durante todas as etapas do procedimento analítico para a determinação de NNG.

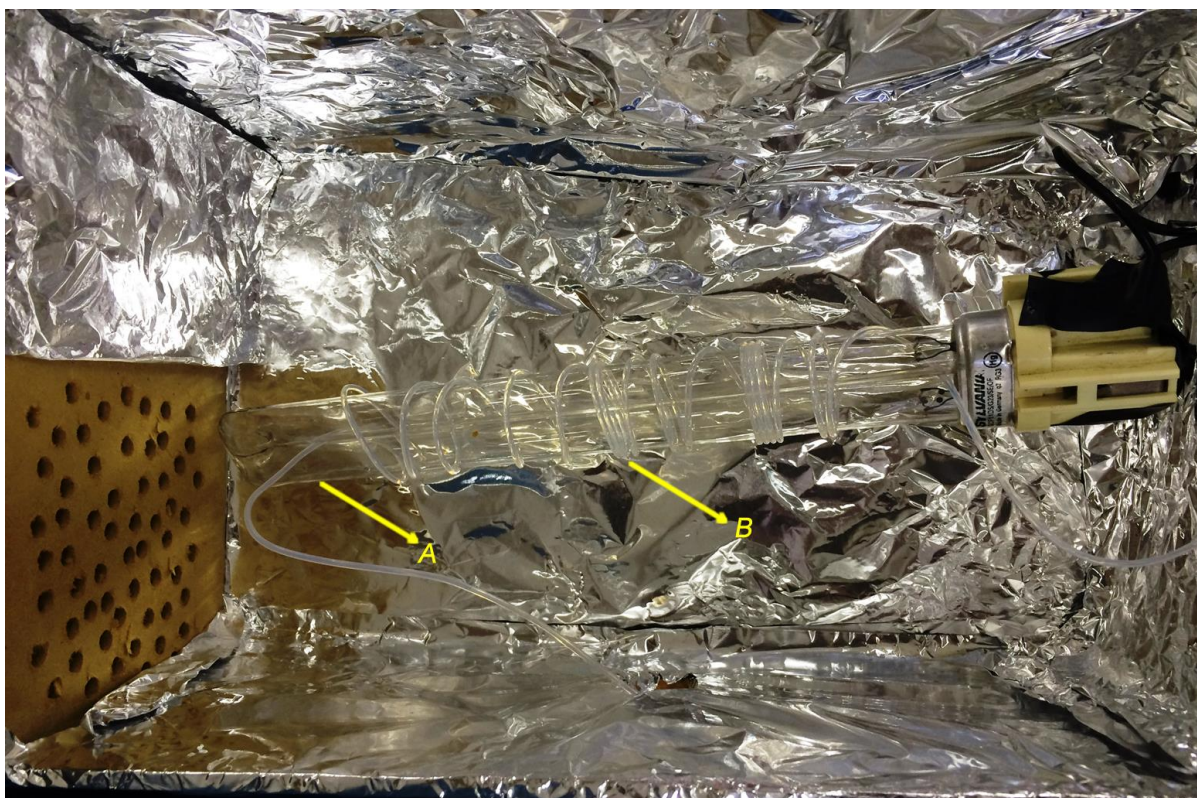


Figura 35. Visão interna da estrutura do suporte construído para acoplamento do fotorreator no sistema SIA, mostrando a lâmpada UV (A) e a bobina reacional para fotólise (B). Dimensões (cm): caixa = 10 x 17 x 26, lâmpada UV = 23 cm.

4.1.2 Reagentes e soluções

Foram utilizados os mesmos reagentes da seção 3.1.2 do capítulo 3, com exceção das seguintes soluções: metanol 1:1 (v/v) em HCl 0,12 mol L⁻¹, etanol 1:1 (v/v) em HCl 0,12 mol L⁻¹ e NaCl 1,0 mol L⁻¹. Ademais as seguintes soluções foram preparadas com água destilada/deionizada.

A solução estoque de NNG 500 mg L⁻¹ foi preparada por meio da dissolução de 0,05 g do padrão analítico 100 % (Monsanto) em uma quantidade de água que foi transferida para um balão volumétrico e completado até o volume de 100 mL. A solução foi mantida em frasco âmbar e refrigerada para evitar a decomposição. Uma solução intermediária de 50 mg L⁻¹ foi preparada e as soluções da curva de calibração foram obtidas a partir da diluição dessa com água, conforme o propósito. A solução estoque de glifosato 1000 mg L⁻¹ foi preparada a partir da dissolução de 0,1036 g do glifosato PT, 96,5 % (Monsanto) em uma quantidade de água, este volume foi transferido para um balão volumétrico e completado até o volume de 100 mL. Devido a alta toxicidade inerente ao NNG, faz-se necessário destacar que durante o preparo e manuseio das soluções deste composto foram utilizados os seguintes equipamentos de proteção individual: luva nitrílica, óculos de proteção, jaleco e máscara.

4.1.3 Procedimentos experimentais

4.1.3.1 Testes em batelada para avaliação da fotólise

Primeiramente foram realizados alguns testes em batelada para explorar os efeitos quando da inserção da unidade de fotólise no sistema. Assim, foi avaliado o tempo de estabilização e variação da radiação emitida pela lâmpada UV no comprimento de onda de 254 nm, e a temperatura do fotorreator sem e com o sistema de ventilação.

A avaliação da estabilidade da radiação do fotorreator foi realizada por meio de medidas espectrofotométricas da radiação da lâmpada UV. O espectrômetro UV-Vis USB 2000 (*Ocean Optics*) foi conectado ao suporte do fotorreator por meio de um tubo. Esse tubo possuía o caminho ótico da largura do colimador do equipamento e a intensidade que a radiação chegava no detector foi controlada pelo

comprimento do tubo inserido, que foi de 11 cm. Assim que a lâmpada foi acoplada, o espectrômetro começou a realizar a aquisição dos espectros da radiação emitida. As medidas foram realizadas pelo software Spectra Suite 2.0, versão para Windows (*Ocean Optics*), durante 40 minutos, sendo que a cada 1 minuto um espectro da lâmpada era armazenado, assim $n = 40$. Para avaliação da temperatura interna do suporte construído para acomodar o fotorreator foi inserido um termômetro de mercúrio próximo a lâmpada e as medidas de temperatura foram realizadas de 5 em 5 minutos durante 50 minutos, que resultou em $n = 10$. As medidas foram realizadas sem e com ventilação.

4.1.3.2 Inserção da fotoderivatização no sistema SIA – SPE para determinação indireta de NNG

Com base no sistema obtido no capítulo anterior, o fotorreator construído conforme descrito no item 4.1.1 foi inserido em linha no sistema SIA. A inserção foi realizada em uma via da válvula multiportas que foi interligada a linha da SPE por meio de uma confluência em forma de “T”. Assim, a fotoderivatização e a SPE eram realizadas de forma sequencial, porém para cada um dos módulos foram acomodados em vias distintas. A Figura 36 demonstra as disposições dos equipamentos utilizados no sistema SIA.

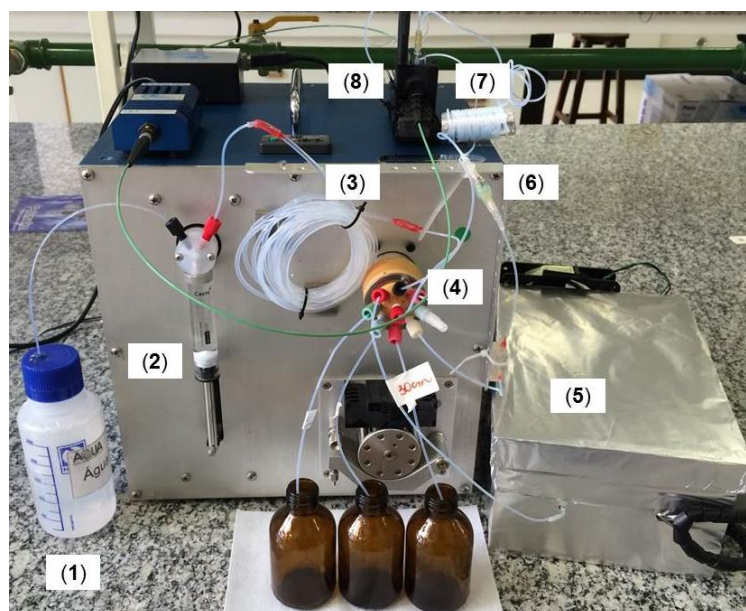


Figura 36. Fotografia do sistema SIA com fotoderivatização e SPE acoplados em linha. (1) solução transportadora, (2) seringa, (3) Holding Coil, (4) válvula seletora multiportas, (5) fotorreator, (6) minicoluna para SPE, (7) bobina de reação pós coluna, (8) sistema de detecção.

O sistema SIA empregado para as determinações de NNG está apresentado na Figura 37, no qual após a inserção da fotoderivatização em linha foram exploradas as duas etapas para o preparo da amostra do analito de forma sequencial. Este sistema teve como base os mesmos parâmetros hidrodinâmicos e físico-químicos do sistema SIA obtido no capítulo anterior, item 3.1.3.3. O princípio deste método foi baseado na denitrosação do NNG por meio da fotólise da espécie gerando nitrito, do qual estimou-se que por estequiometria que $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ de NNG converte-se em $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de NO_2^- . O nitrito gerado é retido em fase sólida (SAX) e posteriormente eluído pelo RG para determinação por espectrofotometria. O procedimento experimental detalhado está disposto na Tabela 8.

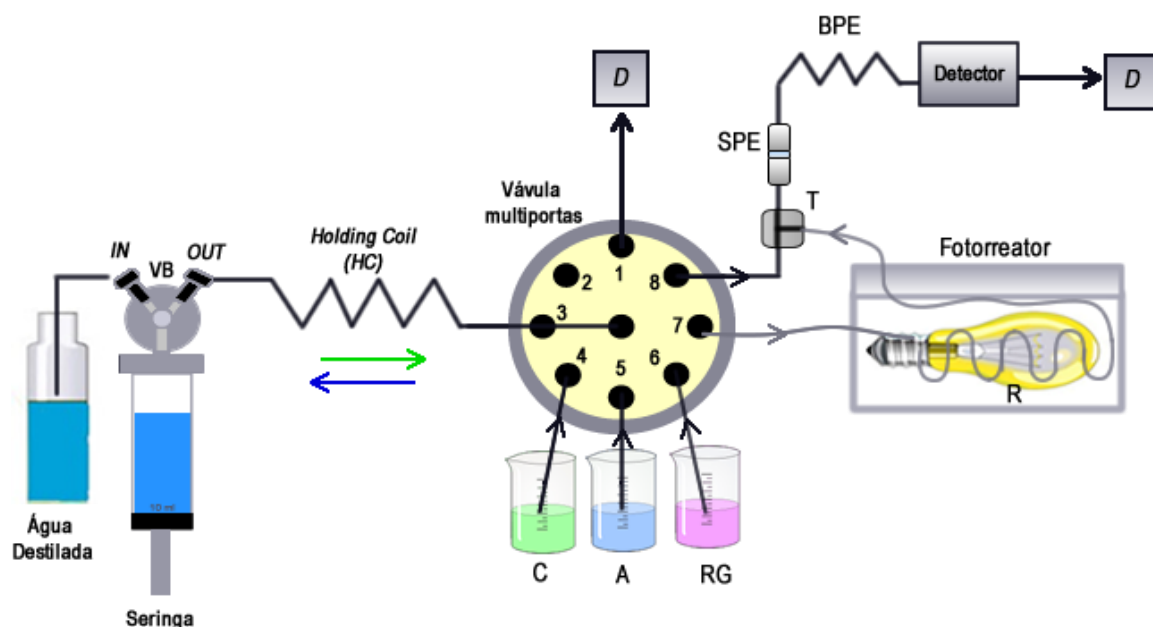


Figura 37. Diagrama de fluxo do sistema SIA para determinação indireta de NNG com automação da fotoderivatização e extração em fase sólida. VB = Válvula Bidirecional, IN/OUT = posições da válvula bidirecional para bombeamento e aspiração, C = solução de condicionamento (acetonitrila 10 %), A = soluções padrão NNG- 0,05 - 1,25 mg L⁻¹, RG = Reagente de Griess (1:3) – eluente, R = Bobina de reação para a fotólise, SPE = minicoluna de extração, T = confluência, BPE = Bobina de reação Pós-Extração, Detector = espectrofotômetro UV-Vis, D = Descarte. As setas indicam a direção do fluxo. A seringa de 10 mL foi utilizada em todos os procedimentos deste capítulo.

DETERMINAÇÃO INDIRETA DE N-NITROSOGLIFOSATO COM
FOTODERIVATIZAÇÃO E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM LINHA

Tabela 8. Procedimento operacional para determinação indireta de NNG

Etapa	Operação	Porta válvula	Vazão SR ($\mu\text{L s}^{-1}$)	Direção SR	Volume (μL)
1	Aspiração da solução transportadora	-	100	In	4000
2	Aspiração da solução condicionante da fase sólida	4	100	Out	2000
3	Bombeamento da solução condicionante para a minicoluna	8	40	Out	6000
4	Aspiração de solução transportadora	-	100	In	4000
5	Aspiração da solução padrão de NNG	5	100	Out	3600 [1]
6	Bombeamento da solução de NNG para fotoderivatização	7	20	Out	7600
7	Aspiração de solução transportadora	-	100	In	4000
8	Aspiração do RG	6	100	Out	600
9	Aquisição do sinal analítico pelo espectrofotômetro	-	-	-	-
10	Bombeamento do RG para eluição	8	40	Out	4600
11	Fim da aquisição do sinal analítico pelo espectrofotômetro	-	-	-	-
12	Aspiração da solução transportadora	-	200	In	1000
13	Aspiração da solução de NNG para ambientar o caminho [2]	5	200	Out	800
14	Bombeamento da solução para o descarte	1	200	Out	1800

SR = seringa, [1] = para a segunda curva analítica foi de 7200 μL , [2] = a cada triplicata de sinais

Testes para avaliar a aplicação da estratégia de parada de fluxo durante a fotoderivatização do NNG foram realizados. O procedimento operacional teve início de forma similar ao descrito acima (Tabela 8), com uma diferença na etapa de fotólise (Operações 4-6, Tabela 8), que consistia na aspiração de 600 μL de solução transportadora com a válvula bidirecional na posição *IN* e 3600 μL de solução padrão de NNG $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ na posição *OUT* para o HC. Com a inversão do fluxo este segmento era impulsionado para o fotorreator (Porta 7) em vazão de $80 \mu\text{L s}^{-1}$. Após o bombeamento, toda a bobina reacional do fotorreator encontrava-se preenchida com solução de NNG e o fluxo era parado. Foram testados de forma univariada tempos de parada de 30 a 180 s de parada de fluxo. Após isso, eram aspirados 4800 μL de carregador (*IN*) e o fluxo era invertido para bombear apenas água destilada no caminho da lâmpada (porta 7, Figura 37) em vazão de $40 \mu\text{L s}^{-1}$, que tinha por função transportar a solução fotoderivatizada para a percolar a fase

sólida e limpar o caminho reacional. As outras etapas seguiram conforme o procedimento citado na Tabela 8.

Volumes do padrão/amostra foram estudados de 1800 – 7200 μL . O comprimento de bobina pós-extração foi estudado em conjunto com diferentes diluições para o RG. Os comprimentos foram variados de 100 a 200 cm e as diluições do RG foram de 1:2 – 1:4 (v/v). O comprimento de bobina reacional para fotólise foi estudado de 100 a 500 cm. Foram avaliados fatores relativos a SPE, como: massas de fase sólida da minicoluna na faixa de 40 a 120 mg, estimativa da reprodutibilidade entre sucessivas extrações e fator de pré-concentração nas curvas de calibração. A eficiência de conversão de NNG a NO_2^- foi avaliada em duas concentrações de NNG 0,75 e 1,00 mg L^{-1} .

Foram avaliados também, diferentes formatos para a minicoluna que acomodava a fase sólida, além daquela citada na Figura 12. Os formatos testados foram os seguintes: um tubo de vidro 8,5 cm e 0,5 d.i., seringa de insulina com capacidade de 1 mL e um tubo de PTFE de comprimento de 25 cm e 1,58 d.i. O procedimento de confecção seguiu de forma similar a descrição do item 3.1.1, do capítulo 3 (Figura 12), com pequenas alterações. No tubo de vidro, somente uma das extremidades foi adaptada com um segmento de ponteira de micropipeta (200 – 1000 μL). Em seguida as duas extremidades foram preenchidas com algodão e aproximadamente 80 mg de fase sólida foram transferidos para seu interior. A extremidade com a ponta de plástico foi selada ao tubo de vidro com resina polimérica (Figura 38, A). A minicoluna da Figura 38 (B) foi construída a partir de duas seringas de 1 mL que foram cortadas na graduação referente a 200 μL (Figura 38, B), as extremidades foram preenchidas com algodão, a massa de fase sólida foi transferida para o interior e as partes foram acopladas e coladas com resina polimérica (Figura 38, C). A minicoluna coluna com tubo de PTFE foi confeccionada a partir do preenchimento com algodão de uma das extremidades seguida da transferência da massa de fase sólida (80 mg) para dentro do tubo e em seguida a outra extremidade do tubo também foi preenchida com algodão. Dessa forma, as diferentes minicolunas foram avaliadas no sistema SIA proposto com a solução padrão de 0,05 mg L^{-1} NNG.

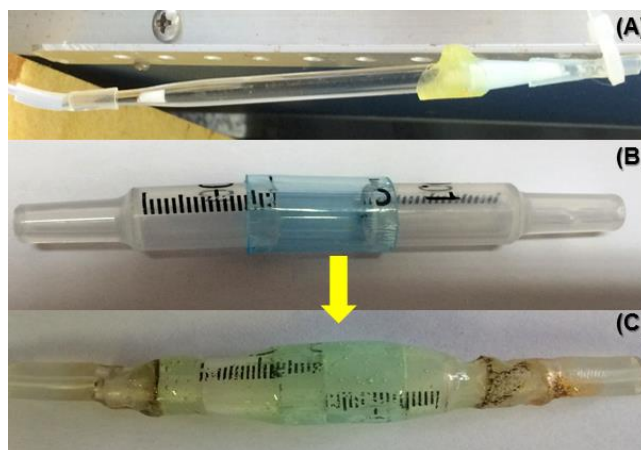


Figura 38. Imagens da minicoluna de vidro e produção da minicoluna com seringa de 1 mL: (A) minicoluna de vidro, (B) cortes realizados para a produção da minicoluna, (C) minicoluna com seringas.

4.1.3.3 Estudos de interferência do glifosato com íons nitrito de diferentes fontes na presença da radiação UV

Testes em batelada foram realizados para avaliar a interferência no sinal analítico que o glifosato proporciona aos íons nitrito de diferentes fontes, utilizando a fotólise como parâmetro investigativo. As fontes de nitrito utilizadas foram uma solução concentrada de sal de nitrito (NaNO_2) e o nitrito advindo da fotólise do NNG. Para isso, soluções de 10 mL de PT de glifosato foram fortificadas com soluções de NO_2^- 1000 mg L^{-1} e NNG 500 mg L^{-1} . A solução do PT de glifosato foi obtida mediante o procedimento de extração aquosa proposto por Bioagri Laboratórios¹⁰⁸. Assim, pesou-se 3,0010 g de PT em um béquer que foram homogeneizados em 10 mL de água destilada (aferido em uma micropipeta 1000 – 5000 μL). Esta suspensão foi submetida ao banho ultrassom por 10 minutos e logo após foi centrifugada por mais 10 minutos em 2500 rpm. A parte superior foi aspirada e transferida para um béquer de 50 mL.

Dessa forma, três soluções testes foram preparadas por meio da mistura das soluções de glifosato com soluções padrão de NO_2^- e NNG conforme a descrição a seguir: em dois béqueres foram adicionados 10 mL da solução de PT e 50 μL da solução padrão de NO_2^- . No terceiro béquer foi adicionado 10 mL do extrato do PT com 400 μL da solução padrão de NNG. Assim, as concentrações finais obtidas para

as soluções fortificadas com NO_2^- foi de aproximadamente $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e de NNG foi de 20 mg L^{-1} .

Das soluções fortificadas com nitrito, somente uma foi submetida a fotólise por dez minutos juntamente com a solução fortificada com NNG. A outra solução fortificada com NO_2^- não foi submetida a fotólise, com objetivo de investigar se a reação do nitrito com o glifosato ocorreria da mesma forma durante os mesmos dez minutos sem a presença da radiação UV. Para a fotoderivatização os béqueres foram dispostos logo abaixo da lâmpada, para garantir a incidência da radiação na solução. Logo após o término dessa etapa, foi adicionado 2 mL de reagente de Griess 1:2 (v/v) em todas as soluções. Os espectros dos produtos formados foram adquiridos através do software Spectra Suite 2.0, versão para Windows (*Ocean Optics*). Adicionalmente, foi preparada uma solução para comparação dos sinais obtidos nos ensaios, na qual foram adicionados 50 μL de solução padrão de NO_2^- em 10 mL da solução do PT, em seguida foi adicionado 2 mL de RG 1:2 e o espectro dessa solução foi adquirido imediatamente. Foram realizadas medidas qualitativas de pH em todas as soluções desse ensaio.

4.1.3.4 Aplicação do sistema SIA com fotoderivatização e SPE em linha para determinação de NNG em produto técnico e amostras de herbicidas comerciais à base de glifosato

As amostras utilizadas neste trabalho foram cedidas pela companhia Monsanto, das quais todas possuíam certificados de análises e a concentração de NNG encontrava-se bem abaixo do permitido pela legislação que é de 1 mg kg^{-1} .

Primeiramente foi realizado um estudo para verificar a interferência de diferentes quantidades de PT de glifosato em uma concentração fixa de NNG. Assim, as soluções foram preparadas através da adição de diferentes quantidades de glifosato de 10, 100 e 1000 mg L^{-1} em 100 mL de soluções de NNG $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Para a realização das medidas foi construída uma curva de calibração conforme o procedimento analítico citado no item 4.1.3.2 deste capítulo. Os sinais analíticos foram obtidos em triplicata e a recuperação do NNG adicionado foi estimada para os três ensaios.

Através do sistema SIA obtido foram realizados ensaios para a determinação de NNG em formulações comerciais do herbicida e posteriormente no PT de glifosato. Para isto, foram selecionadas duas amostras líquidas: *Round up transorb R*®, *Round up original*®, duas sólidas: *Round up WG*®, *Round up ultra*® e uma de glifosato PT. A Tabela 9 relaciona os principais dados a respeito das amostras utilizadas.

Tabela 9 Especificações do PT e das amostras comerciais de glifosato utilizadas.

Amostra do herbicida	Princípio ativo	Concentração de Glifosato (%)	Concentração de NNG (mg L ⁻¹)
<i>Round up original</i>	Sal de isopropilamina de glifosato	30,6	0,1
<i>Round up transorb r</i>	Sal de isopropilamina de glifosato	36,2	0,2
<i>Round up WG</i>	Sal de amônio de glifosato	65,7	0,2
<i>Round up ultra</i>	Sal de amônio de glifosato	65,7	0,2
Glifosato técnico	Glifosato	96,5	0,2

As soluções com as amostras comerciais foram preparadas diluindo-se 5 mL de cada amostra líquida e 5 g de cada amostra sólida em 50 mL de água, que em seguida foram fortificadas com o equivalente a 1,0 mg L⁻¹ de NNG em sua concentração final. Essas soluções foram injetadas diretamente no sistema analítico obtido. Para o produto técnico, foi utilizado o mesmo método de extração aquosa do PT de glifosato descrito no item 4.1.3.3. Desse modo foram preparadas quatro soluções com de 3,0 g do PT que resultaram em quatro alíquotas de 10 mL para leitura. Esses extratos foram fortificados com a solução estoque de NNG de forma que duas soluções obtiveram concentração final de 2,0 e duas de 3,0 mg L⁻¹ do analito, respectivamente. Essas soluções foram analisadas segundo o procedimento analítico descrito na Tabela 8.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Estudos relacionados a fotólise

Como abordado na seção 2.2.3 do capítulo 2, as N-nitrosaminas em geral, sofrem alterações em sua estrutura molecular quando expostas a radiação UV.⁵⁴ As

reações fotoquímicas na região UV se processam normalmente na região UV - C (190 a 280 nm)⁴⁸, que é a faixa mais energética do espectro UV.

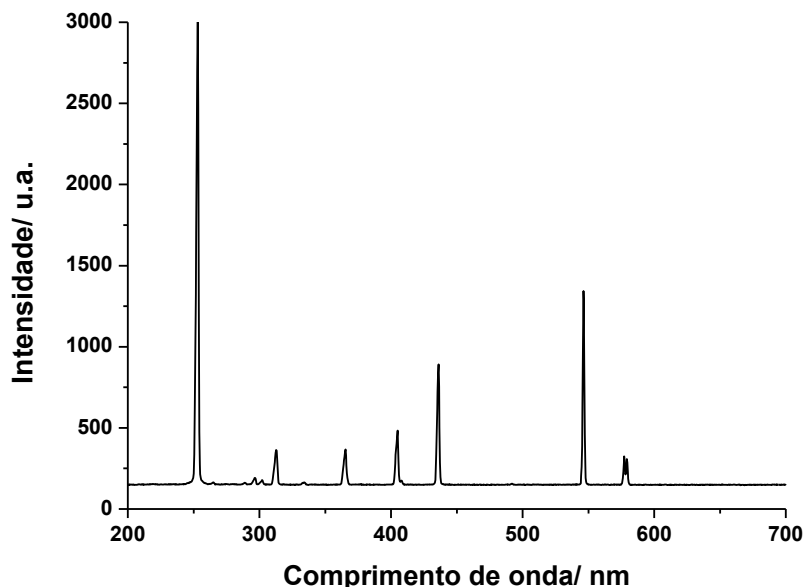


Figura 39. Espectro da lâmpada UV de mercúrio de baixa pressão utilizada.

A lâmpada UV de baixa pressão utilizada nos estudos de fotoderivatização deste trabalho de dissertação foi empregada devido aos bons resultados obtidos por Lins, na utilização deste aparato para a fotólise do NNG³². Como pode ser observado no espectro obtido dessa lâmpada (Figura 39), o comprimento de onda mais intenso de emissão da radiação é em 254 nm, que é justamente o responsável pela clivagem das N-nitrosaminas^{52, 54}. Isso demonstra a adequação dessa lâmpada para os propósitos deste trabalho, uma vez que 80% da radiação emitida encontra-se no comprimento de onda ideal para a fotólise do NNG⁴⁸.

4.2.1.1 Avaliação da estabilidade e temperatura da fotólise

Para avaliar alguns fatores relacionados a lâmpada UV foram realizados os testes descritos na seção 4.1.3.1 deste capítulo. Através da obtenção dos espectros e análise do CV (%) da intensidade de radiação no comprimento de onda de interesse, 254 nm, foi possível avaliar após quanto tempo a emissão da radiação estabilizou-se e também o CV da emissão após 40 minutos. Os valores de intensidade foram plotados no gráfico ilustrado na Figura 40. A linha vermelha apresenta o valor médio de intensidade obtida. O CV total do procedimento foi 3,36 %, n = 40, que representa pequena variação para as medidas.

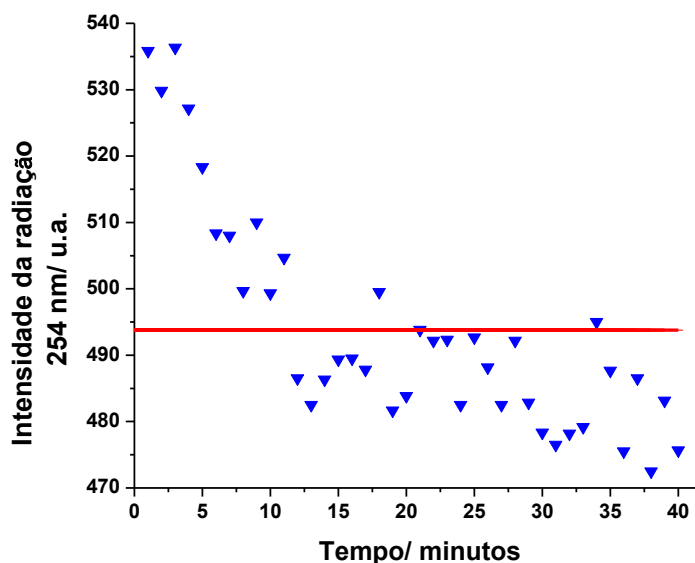


Figura 40. Gráfico da intensidade da radiação emitida pela lâmpada UV em 254 nm pelo período de 40 minutos.

Para as 11 primeiras medidas, a redução da intensidade de emissão apresentou-se gradativa, e depois estabilizou-se em 12 minutos (Figura 40). Assim, para as 29 medidas restantes, o CV = 1,37 % foi obtido até o final do estudo (40 min). A redução gradativa da intensidade para os primeiros 11 minutos ocasionou maior variação nas medidas (CV = 2,71 %). Tal fato indica que a lâmpada necessita desse período de tempo para estabilizar a intensidade de emissão da radiação. Sendo assim, foi estabelecido que em todos os procedimentos realizados, a lâmpada ficaria ligada por no mínimo 15 minutos antes da realização das atividades.

A temperatura de aquecimento da lâmpada UV foi avaliada durante 50 minutos e os valores aferidos estão apresentados na Tabela 10. Foi possível constatar que a temperatura elevou-se durante os primeiros 25 minutos, estabilizando-se em média 45 °C até o final do estudo. Para certificar das consequências que o aumento de temperatura poderia proporcionar ao procedimento físico-químico de extração, foram realizadas algumas extrações no sistema SIA, com o procedimento analítico otimizado no item 3.1.3.3, empregando 2400 µL de solução de NO₂⁻ 0,50 mg L⁻¹. Para as sucessivas extrações foi obtido CV = 25 %, n = 4, confirmando assim a hipótese de que o aquecimento influenciava negativamente no procedimento de extração, demonstrando que uma estratégia para diminuir este aquecimento deveria ser empregada.

Tabela 10. Medidas da temperatura próxima a lâmpada UV em °C

Nº de medidas	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
1	5	37
2	10	39
3	15	41
4	20	42
5	25	45
6	30	45
7	35	46
8	40	48
9	45	46
10	50	45

Diante disso, foram realizados pequenos furos no suporte do fotorreator e um cooler com ventoinha foi acoplado logo a frente desses furos. Uma abertura maior foi realizada no lado apostado para circulação do ar. Este sistema permanecia ligado durante todos os ensaios, juntamente com a lâmpada UV. Para verificação de sua eficiência, foram realizadas medidas de temperatura interna do reator com o sistema de ventilação empregado, que resultaram em diminuição de 10 °C da temperatura interna e o valor médio constatado foi de 33,3 °C, n = 10. Assim, foi repetido novamente o procedimento de extração para a solução de NO₂⁻ 0,50 mg L⁻¹ e o CV obtido foi de 2,35 %, n = 4. Portanto a inserção de um sistema de ventilação no suporte do fotorreator promoveu a redução da temperatura interna do fotorreator possibilitando que o procedimento de extração fosse realizado adequadamente.

4.2.2 Otimização do procedimento analítico de fotoderivatização no sistema SIA-SPE

A fotoderivatização empregada como preparo de amostra para o NNG foi escolhida devido a clivagem que a radiação UV em 254 nm proporciona na ligação N-NO liberando íons NO₂⁻, que são determináveis por espectrofotometria UV-Vis. Todavia, de forma a proporcionar maior seletividade ao método, os íons advindos da fotólise foram extraídos em fase sólida de troca aniônica. A unidade de fotoderivatização foi inserida no sistema SIA-SPE pré-estabelecido no capítulo 3 (Figura 15), que já possui suas variáveis hidrodinâmicas e físico-químicas

otimizadas. Porém com o emprego de mais uma etapa no sistema, alguns parâmetros teriam de ser novamente avaliados.

O primeiro parâmetro avaliado foi o volume de solução padrão de NNG a ser fotoderivatizado. Os resultados do planejamento fatorial descritos na seção 3.2.3 do capítulo 3, indicaram que o aumento do volume da solução padrão de NO_2^- apresentam melhores resultados para a extração do íon. Partindo deste resultado, pôde-se considerar que o aumento do volume da solução padrão de NNG a ser fotoderivatizada, aumentará por consequência a quantidade de NO_2^- disponível para a SPE. Dessa maneira, os volumes foram variados em 1800, 2400, 3000 e 3600 μL para a solução padrão de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ NNG. A bobina reacional para fotólise foi fixada inicialmente em 50 cm e a bobina reacional pós-extração manteve-se igual a otimizada no sistema SIA-SPE (100 cm). O volume de eluente foi fixado em 600 μL (RG 1:4) e o padrão de NNG foi bombeado através da bobina reacional para fotólise a uma vazão de $20 \mu\text{L s}^{-1}$. Por meio da transparência dessa do tubo de PTFE a radiação UV emitida pela lâmpada entrava em contato com a solução promovendo a fotólise e o revestimento de alumínio empregado no suporte garantiu reflexão da radiação, fazendo com que mais fótons participem da fotoderivatização. Assim, neste teste, o tempo de exposição da fotólise foi controlado pelo tamanho da bobina reacional para fotólise, sendo fixo para todos os volumes empregados. Para uma bobina de 50 cm, em vazão de $20 \mu\text{L s}^{-1}$, estimou-se que o tempo de exposição foi igual a 12,5 s. O gráfico para o efeito do volume está exposto na Figura 41.

A tendência do aumento do volume de solução obtido para NO_2^- (item 3.2.3, capítulo 3) também foi obtida para este ensaio com NNG. Foi possível perceber que o aumento ou decréscimo do sinal analítico neste ensaio está relacionado diretamente com a quantidade de espécies nitrito que são liberadas pela denitrosação do NNG por fotólise. Como é possível observar no gráfico (Figura 41), o sinal aumenta de forma proporcional ao aumento no volume de solução. Dessa maneira, a resposta analítica obtida para 3600 μL aumentou aproximadamente quatro vezes mais do que a obtida para o volume de 1800 μL . Assim, o volume de solução padrão estabelecido para os próximos ensaios foi de 3600 μL .

DETERMINAÇÃO INDIRETA DE N-NITROSOGLIFOSATO COM FOTODERIVATIZAÇÃO E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM LINHA

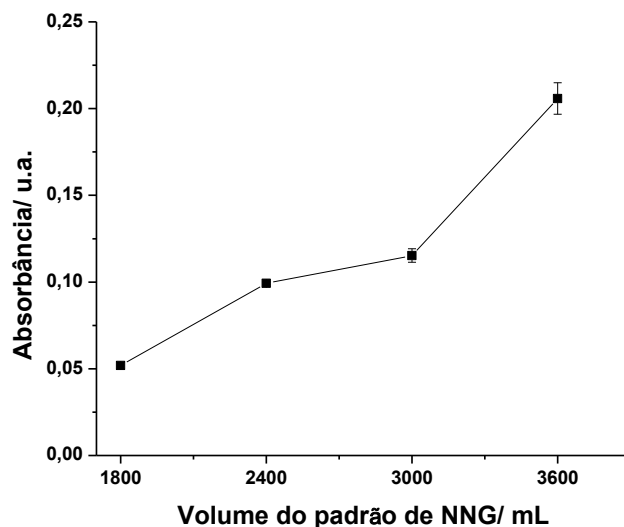


Figura 41. Efeito da fotoderivatização de diferentes volumes da solução padrão de NNG $1,00 \text{ mg L}^{-1}$. Volume da solução eluente = $600 \mu\text{L}$ RG 1:4, bobina reacional para fotólise = 50 cm , vazão da fotoderivatização = $20 \mu\text{L s}^{-1}$, bobina reacional pós extração = 100 cm .

Em um segundo teste foi avaliado o efeito do comprimento da bobina reacional para fotólise. A faixa avaliada foi de 100 a 500 cm e foi utilizada uma solução padrão de NNG $0,25 \text{ mg L}^{-1}$. Neste ensaio, foi empregada uma solução de NNG menos concentrada com objetivo de avaliar a eficiência da fotólise para menores concentrações de NNG, buscando abranger menores faixas de trabalho. Os sinais analíticos obtidos estão demonstrados no gráfico da Figura 42.

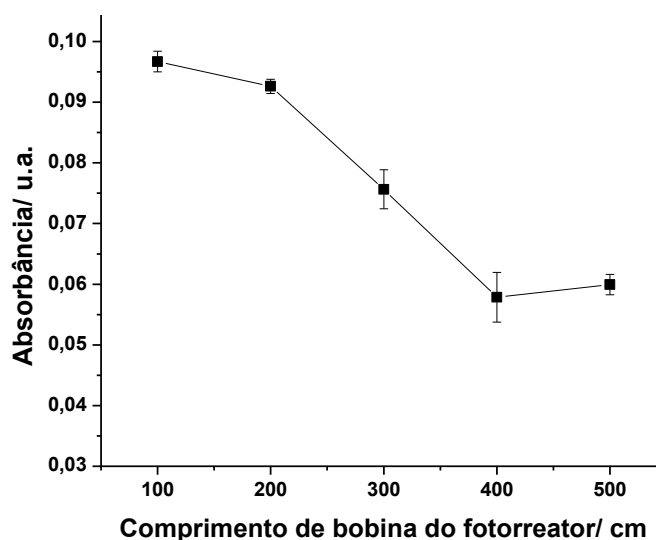


Figura 42. Efeito do comprimento da bobina do fotorreator para a fotoderivatização de NNG $0,25 \text{ mg L}^{-1}$. Volume da solução padrão = $3600 \mu\text{L}$, volume da solução eluente = $600 \mu\text{L}$ RG 1:4, bobina reacional pós extração = 100 cm .

Para uma mesma vazão o tempo de exposição da solução a radiação UV é controlado pelo comprimento do tubo empregado para a fotoderivatização. Portanto, tamanhos maiores apresentam maior tempo de exposição. A Tabela 11 relaciona os tempos de exposição com os comprimentos de bobina empregados neste teste.

Tabela 11. Tempos de exposição das soluções de NNG nas bobinas reacionais para fotólise.

Comprimento de bobina (cm)	Tempo de exposição (s)
100	25
200	50
300	75
400	100
500	125

Para os tempos de exposição de 25 e 50 s, os sinais analíticos apresentaram-se similares. Houve um decréscimo expressivo da magnitude do sinal para maiores tempos de exposição 75 – 125 s. Esses testes demonstram a dependência do tamanho da bobina para o sucesso da conversão de NNG em NO_2^- , uma vez que a exposição da solução reagente a radiação depende diretamente desse fator. Todavia, pôde-se observar que a eficiência de conversão/extração de NO_2^- decresce a medida que o tempo de exposição aumenta. Esta tendência pode estar relacionada a formação de potenciais produtos intermediários derivados da fotólise das N-nitrosaminas^{55, 56}.

Como foi discutido no item 2.2.3 do capítulo 2, a fotólise das N-nitrosaminas pode ser conduzida por dois caminhos reacionais, o da clivagem homolítica ou heterolítica, sendo que ambos mecanismos conduzirão a formação de NO_2^- , seja pela conversão de nitrosil em nitrito ou pela dissociação do ácido nítrico formado⁵⁵. Assim, a quantificação realizada será de NO_2^- seja qual for a rota estabelecida (Figura 43).

A literatura aborda alguns possíveis mecanismos para a fotólise de N-nitrosaminas (Figura 43) mais simples como a NDMA. Assim, pressupõe-se que o mecanismo reacional para a fotólise do NNG ocorra de forma semelhante.

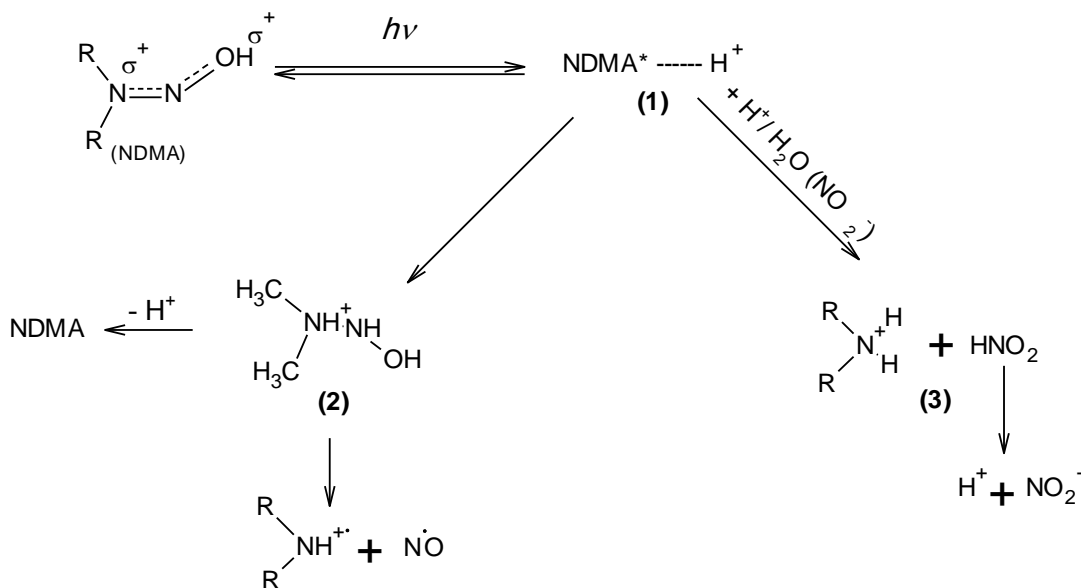


Figura 43. Possível mecanismo para clivagem de NDMA e rotas subsequentes em meio aquoso. Adaptado de Lee e colaboradores ⁵⁵. (1) formação do estado excitado, (2) clivagem homolítica da NDMA, (3) clivagem heterolítica de NDMA.

Considerando estes aspectos é possível observar que a redução do sinal analítico pode estar relacionada a presença de outros produtos diferentes do nitrito no meio reacional como, radicais livres e íons hidroxila que podem ser formados através de exposições prolongadas da solução contendo nitrito a radiação UV ⁵⁵. Dessa maneira, devido ao melhor sinal apresentado e a menor suscetibilidade de formação de potenciais produtos intermediários, a bobina para fotólise de 100 cm foi empregada para os estudos posteriores.

Ainda com objetivo de avaliar a eficiência da fotólise em relação ao tempo de exposição da solução padrão foi testado o procedimento de parada de fluxo, utilizando 3600 μL de NNG 0,25 mg L^{-1} . Diferentemente do procedimento de fotoderivatização em movimento, nesta estratégia, a exposição do analito é controlada pelo tempo em que a solução fica parada na bobina reacional para fotólise. O procedimento seguiu conforme descrito no item 4.1.3.2 e com algumas mudanças nos parâmetros físicos do sistema. Para comportar o volume de 3600 μL parado no fotorreator, foi empregada uma bobina reacional para fotólise de aproximadamente 720 cm, envolta na lâmpada UV. Assim, os tempos de parada de fluxo foram avaliados na faixa de 30, 60, 90, 120 e 180 s (Figura 44). Percebeu-se que após 90 s o sinal analítico estabiliza-se, não apresentando melhorias

significativas do que as obtidas no procedimento de fotoderivatização por movimento da solução de NNG. Este resultado confirma ainda o constatado no teste anterior que tempos de exposição prolongados podem favorecer a formação de produtos diferentes do nitrito no meio reacional. Desse modo, foi mantido o procedimento de derivatização por movimento da zona de amostra, que apresentou resultados similares ao procedimento de parada de fluxo com frequência analítica mais adequada de $5,2 \text{ det h}^{-1}$ contra $3,75 \text{ det h}^{-1}$ para o tempo de parada de fluxo de 90 s.

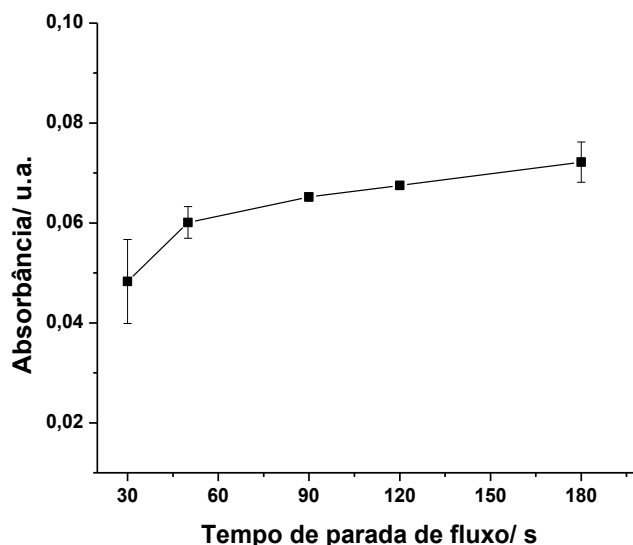


Figura 44. Efeito do tempo de parada de fluxo para a fotoderivatização de NNG $0,25 \text{ mg L}^{-1}$. Volume da solução eluente = $600 \mu\text{L}$ RG 1:4, bobina reacional para fotólise = 720 cm , bobina reacional pós extração = 100 cm .

Com o objetivo de formar maior quantidade de produto da reação de Griess, foram avaliados diferentes comprimentos para a bobina reacional pós-extração: 100, 150 e 200 cm. Como este parâmetro apresenta certa dependência para a concentração do RG aplicada, foram realizados ensaios univariados com três diluições do RG, nas seguintes proporções (v/v), 1:2, 1:3 e 1:4. Dessa forma, para cada diluição, foram avaliados os sinais obtidos com as três bobinas citadas. Os testes foram realizados utilizando uma solução de NNG $0,25 \text{ mg L}^{-1}$.

É possível observar no gráfico exposto na Figura 45, que os sinais obtidos para os comprimentos de bobina de 100 e 150 cm, em todas as concentrações de RG empregadas não apresentaram relevantes diferenças entre si, apenas no comprimento de 150 cm para a concentração do RG 1:3 que pode-se perceber um pequeno aumento de magnitude de sinal. Para a bobina de 200 cm, as diluições do

RG 1:2 e 1:3 apresentaram os maiores sinais analíticos. Entretanto, para o RG 1:2, foi possível perceber um alto pronunciamento do efeito Schlieren e altos valores de absorvância para o branco, indicando pouca mistura das alíquotas, já que o RG estava mais concentrado. Dessa maneira, para os próximos ensaios, a bobina reacional pós-extração foi estabelecida em 200 cm e a diluição do RG em 1:3, por apresentar melhores sinais analíticos para as soluções padrão, menor magnitude de sinal para o branco e praticamente nenhum efeito Schlieren.

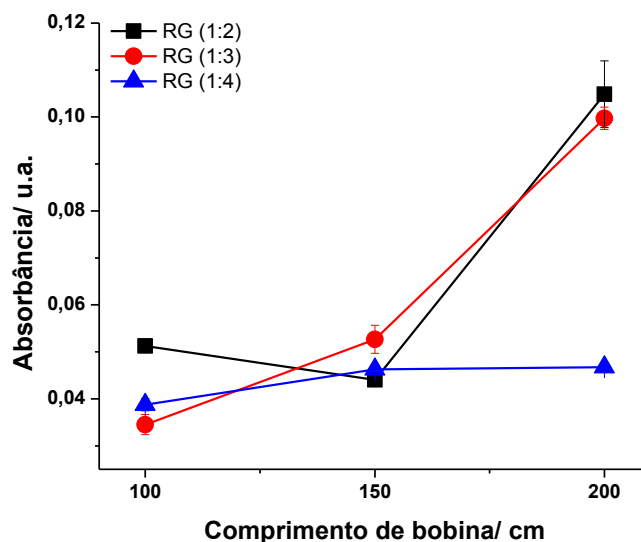


Figura 45. Efeito do comprimento de bobina em diferentes concentrações do reagente de Griess. RG (v/v) = 1:2 (—), 1:3 (—), 1:4 (—). Bobina reacional para fotólise = 100 cm, vazão da fotoderivatização = 20 $\mu\text{L s}^{-1}$.

Com o objetivo de melhorar a pré-concentração dos íons nitrito derivados da fotólise foi avaliada a influência da massa de fase sólida para a eficiência de extração. Foram estudadas três quantidades diferentes de fase sólida, 40, 80 e 120 mg, inseridas nas minicolunas. O procedimento foi realizado com todas as variáveis acima otimizadas e o padrão utilizado foi de 0,75 mg L^{-1} de NNG. Os respectivos sinais analíticos estão demonstrados na Tabela 12.

Para as massas de 40 e 80 mg foi possível notar certa proximidade entre os sinais obtidos, sendo que para 80 mg o sinal apresentou-se um pouco maior. Já para 120 mg percebeu-se após o experimento, que ocorreram vazamentos nas conexões da minicoluna e até o rompimento da mesma, que pode estar relacionado ao aumento da pressão hidrodinâmica proporcionada pela maior quantidade de massa dentro da minicoluna ¹¹. Ao comparar as absorvâncias obtidas utilizando as

DETERMINAÇÃO INDIRETA DE N-NITROSOGLIFOSATO COM
FOTODERIVATIZAÇÃO E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM LINHA

minicolunas com 40 e 80 mg foi possível perceber uma redução para as extrações utilizando 40 mg de fase sólida. Este efeito está relacionado com o maior “volume morto” atribuído a essa minicoluna que proporciona maior diluição do produto colorido. Diante disso, não foi alterada a massa de fase sólida para a confecção da minicoluna, sendo mantida em 80 mg.

Tabela 12. Variações na massa de fase sólida utilizada para construção da minicoluna SPE, n=3.

Massa sorvente (mg)	Absorbância Média (u.a.)	Desvio padrão
40	0,1846	$4,6 \times 10^{-3}$
80	0,2196	$6,4 \times 10^{-3}$
120	0,1010	$8,0 \times 10^{-2}$

Considerando todos os aspectos de otimização abordados, um resumo das faixas estudadas e dos valores otimizados estão dispostos na Tabela 13. Estes parâmetros foram utilizados para a construção da curva de calibração na seguinte faixa de trabalho: 0,25 – 1,25 mg L⁻¹ de NNG. Assim, o registro de sinais e a curva analítica estão representados nas Figuras 46 e 47, respectivamente.

Tabela 13. Faixas dos fatores estudados e valores selecionados para determinação indireta de NNG.

Variável	Faixas estudadas	Valor selecionado
Volume da solução padrão de NNG (µL)	1800 - 3600	3600
Comprimento de bobina pós-extração (cm)	100 - 200	200
Diluição do RG (v/v)	1:2, 1:3, 1:4	1:3
Comprimento da bobina fotorreator (cm)	100 - 500	100
Massa de fase sólida (mg)	40 - 120	80

DETERMINAÇÃO INDIRETA DE N-NITROSOGLIFOSATO COM FOTODERIVATIZAÇÃO E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM LINHA

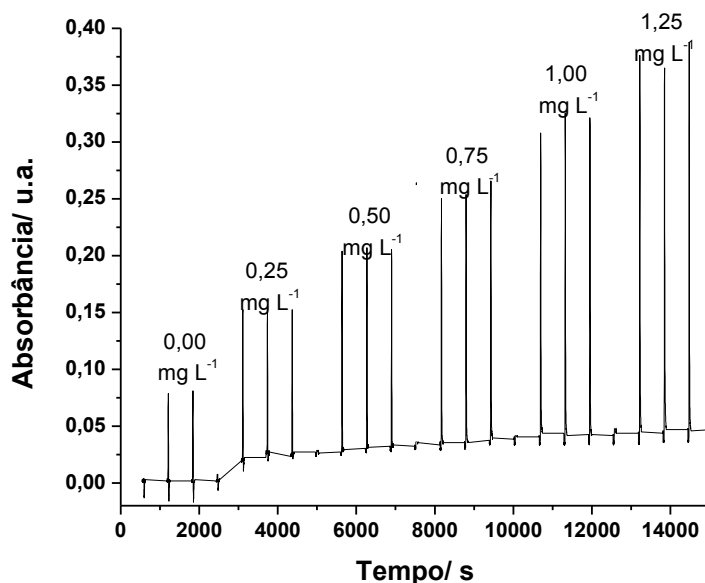


Figura 46. Registro de sinais obtido para a determinação indireta de NNG com fotoderivatização e SPE utilizando os valores otimizados da Tabela 13.

A curva analítica (Figura 47), apresentou linearidade adequada ($R^2 = 0,9957$) e limites de detecção e quantificação estimados em $5,18 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ e $5,18 \times 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Essa faixa linear apresenta-se adequada para determinação de NNG em amostras que apresente teores da impureza acima do permitido por lei ($1,00 \text{ mg Kg}^{-1}$ de NNG)^{4,5}, na qual o LD obtido apresenta-se 19 vezes menor do que este limite. O fator de pré-concentração obtido apresentou-se em 6 vezes.

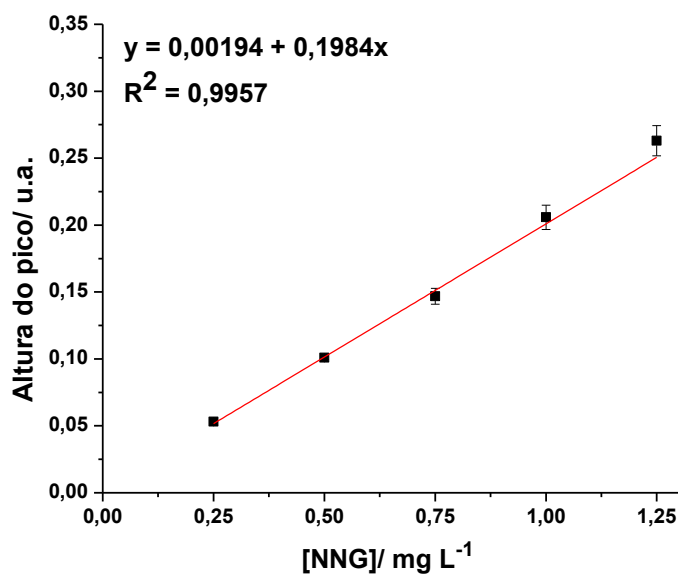


Figura 47. Curva analítica para determinação de NNG na faixa 0,25 – 1,25 mg L⁻¹.

Algumas variações nos sinais analíticos foram observadas no decorrer dos ensaios, quando da reposição de uma minicoluna. Essas oscilações podem estar relacionadas com a dificuldade de reproduzir fielmente a confecção das minicolunas. Como já salientado, as minicolunas produzidas tendem a apresentar um “volume morto” em seu interior, que ocasiona pequenas diluições no produto formado pelo RG e por consequência diminui o sinal analítico. Esse tipo de coluna utilizada é denominada de fluidizada e é bastante utilizada em procedimentos de automação da SPE em sistemas FIA, já que a fase sólida se encontra solta dentro da minicoluna, o que permite a passagem do fluxo sem aumento da pressão interna em todo o sistema analítico ¹⁰⁹.

A dificuldade em reproduzir manualmente a confecção desses suportes podem afetar alguns parâmetros da minicoluna que podem acarretar em variações na pressão hidrodinâmica e no volume interno. Esses inconvenientes podem proporcionar efeitos negativos para as extrações e aos sinais analíticos obtidos de uma coluna para outra.

Considerando esses aspectos, foi realizado um estudo para avaliar novas estruturas de suporte para a fase sólida, para tentar garantir maior reprodução na confecção das minicolunas e menor diluição interna para o analito. As diferentes minicolunas testadas estão descritas na página 76 e algumas ilustradas na Figura 38.

Seguindo o mesmo procedimento para realização da curva de calibração anterior, foram avaliados os sinais obtidos para a fotoderivatização de NNG utilizando os quatro suportes propostos. Essas minicolunas apresentaram diferentes volumes internos (Tabela 14), assim, com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método e ampliar a faixa de trabalho foi empregada uma menor concentração para a solução de NNG ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) e foi realizado um pequeno aumento no volume dessa solução de $3600 \mu\text{L}$ para $4200 \mu\text{L}$.

O volume interno de todas as minicolunas foram estimados e os valores obtidos estão demonstrados na Tabela 14. A minicoluna fabricada com tubo de vidro e a com tubo de PTFE apresentaram os menores volumes internos, por consequência menores volumes mortos. Entretanto, estes suportes demonstraram uma pressão interna muito alta, quando da passagem dos fluídos pela fase sólida.

Esse aumento de pressão pode estar relacionado com a estrutura desses suportes, que foram constituídos de tubos retos sem a estrutura abalada que as minicolunas com ponteiros possuem. Sendo assim, o percolamento da solução apresentou-se com maior velocidade, levando a fase sólida para o orifício da saída do líquido que agiu como uma tampa obstruindo o escoamento do fluido e por consequência, ocasionou o rompimento das conexões próximas a minicoluna ¹¹⁰.

Tabela 14. Medidas para o volume interno das minicolunas. Água destilada = 0,9969 g cm⁻³ a 25,5 °C.

	Material da minicoluna	Volume interno (µL)
1	Vidro	286,2
2	Tubo de PTFE	244,3
3	Seringas	397,3
4	Ponteiros de micropipetas 10 - 100 µL	662,0

Dessa forma, foram utilizadas nas extrações, as minicolunas 3 e 4 (Tabela 14) e os sinais obtidos, para n = 3 foram respectivamente de 0,0541 u.a. e 0,0361 u.a. Os sinais analíticos obtidos para as extrações realizadas com a minicoluna 3, apresentaram maior magnitude quando em comparação com os sinais obtidos utilizando a minicoluna 4. Esse aumento de absorvância está relacionado com o menor volume interno apresentado pela minicoluna 3. Esse suporte também apresentou características satisfatórias relacionadas ao escoamento do fluido nesse tipo de estrutura (cilíndrica). O escoamento das soluções dentro da minicoluna 3, apresentou-se mais favorecido devido estrutura reta do tubo que ocasiona menor perturbação no fluxo, diferente da minicoluna 4, que possui afunilamentos cônicos na entrada e na saída do líquido que causa grande pressão interna dentro do tubo ¹¹⁰ favorecendo o rompimento das conexões do sistema. Outra vantagem apresentada para a minicoluna 3 foi a melhor reprodutibilidade na confecção, uma vez que as seringas possuem marcas de graduação (1 mL) na qual o corte pode ser realizado sempre na mesma posição. Considerando esses aspectos vantajosos, a minicoluna 4 foi substituída pela minicoluna 3 para os próximos estudos.

Como foi possível obter um sinal analítico satisfatório com a solução de NNG 0,05 mg L⁻¹ e pelo fato do novo suporte para a fase sólida utilizado apresentar menor

volume interno, foi avaliado novamente o volume do padrão de NNG a ser fotoderivatizado, com o objetivo de ampliar a faixa de trabalho com maior sensibilidade. Assim os volumes foram avaliados na faixa de 3600 a 7200 μL (Figura 48), com a minicoluna 3. Como esperado, o sinal analítico obtido praticamente dobrou quando o volume aumentou de 3600 para 7200 μL , já que possui o dobro de espécies de NNG (Figura 48). É provável que volumes maiores que 7200 μL melhorariam ainda mais a magnitude do sinal analítico, porém tornaria o procedimento extremamente lento impactando na frequência analítica do método.

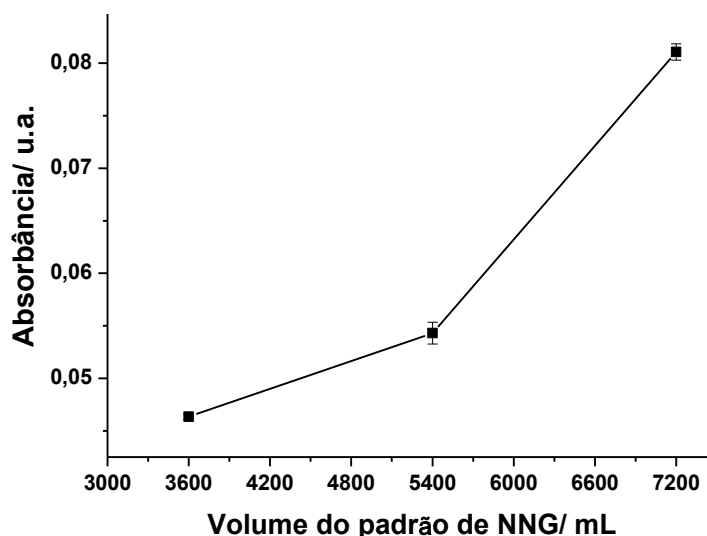


Figura 48. Efeito do volume do padrão de NNG $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ sobre o sinal analítico utilizando os valores otimizados da Tabela 13.

Sob todas as condições otimizadas, a faixa de trabalho foi ampliada para $0,05, 0,15, 0,25, 0,50$ e $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ de NNG. Assim, o registro de sinais e a curva analítica para esta faixa linear estão dispostos na Figura 49 e 50, respectivamente. Durante a realização deste procedimento houve imprevistos como, quedas sucessivas na rede elétrica que impactaram em alguns registros dos sinais obtidos para as soluções padrão de $0,50$ e $0,75 \text{ mg L}^{-1}$. Desta maneira só foi possível considerar duplicata de sinais. Para o sinal do branco, houve a entrada de bolhas, para a terceira medida, que prejudicou uma das leituras, assim só foi possível considerar, também, duplicatas de sinais.

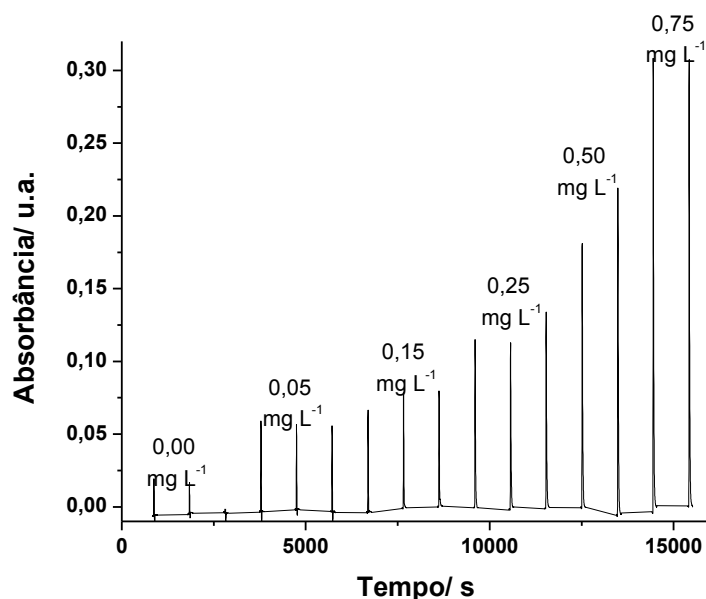


Figura 49. Registro de sinais obtidos com a fotoderivatização e extração em fase sólida de NNG para menores concentrações. Os valores indicam a concentração empregada para a nova faixa linear. Os parâmetros utilizados estão listados na Tabela 13 com exceção do volume da solução padrão de NNG que nesta aplicação foi de 7200 µL.

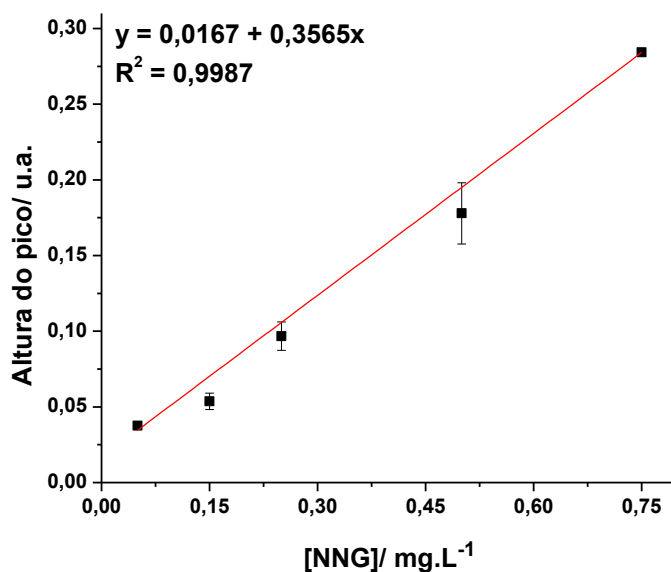


Figura 50. Curva de calibração obtida para a determinação de NNG com menor faixa linear.

As duas curvas analíticas resultantes (Figuras 47 e 50) dos dois procedimentos foram comparadas e foi possível constatar que o maior volume empregado da solução padrão proporcionou aumento na sensibilidade em quase 2 vezes em comparação a resposta linear da Figura 47. Foi possível observar

também, redução no LD para $3,1 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ e mesmo com a ampliação da faixa para menores concentrações, a resposta linear apresentou-se adequada com $R^2 = 0,9987$. O fator de pré-concentração para nesta curva analítica foi maior, estimado em 12 vezes e $CV = 3,75 \%$ para a solução padrão de menor concentração de NNG $0,05 \text{ mg L}^{-1}$. Uma estimativa da reprodutibilidade da fase sólida nesta aplicação foi realizada, e resultou em média 48 extrações sem mudanças no sinal analítico. Essa menor reprodutibilidade da fase sólida, quando comparada ao sistema SIA para determinação de nitrito obtido no capítulo anterior, pode estar relacionada com o aumento da quantidade de etapas do procedimento, que por consequência acarreta em maior passagem de soluções pelo sólido, que eventualmente podem danificar os sítios trocadores, comprometendo a capacidade de troca do material extrator. Apesar da quantidade de procedimentos destinados ao preparo de amostra e da sequencialidade inerente ao sistema SIA, a frequência analítica se apresentou dentro do esperado para este tipo de sistema, sendo estimada em $5,7 \text{ det h}^{-1}$.

Todavia, ao comparar a frequência analítica obtida com o tempo gasto somente com o preparo de amostra (separação e derivatização) dos métodos por CLAE para a determinação de NNG (em média 23 minutos) ^{4,7,8}, a frequência analítica de $5,7 \text{ det h}^{-1}$, apresenta-se satisfatória para os objetivos propostos, uma vez que este valor foi estimado relacionando todo o procedimento desde as etapas de o preparo de amostra (fotoderivatização e SPE) até a aquisição do sinal analítico. Para os métodos convencionais ^{7,8} relacionando todo o tempo de análise, a frequência analítica é estimada em 2 det h^{-1} . Para o método que realizou todo o procedimento de separação por CLAE e derivatização química em linha, a frequência analítica não foi relatada pelos autores, porém estima-se de acordo com os dados expostos que seja em média $4,0 \text{ det h}^{-1}$ ⁹.

Após a otimização completa do sistema, foi realizado um procedimento para constatar da eficiência de conversão de NNG em NO_2^- . A Figura 51 demonstra os resultados obtidos para a fotoderivatização das soluções de NNG em duas concentrações: $0,75$ e $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ (linha azul, Figura 51), e os sinais relativos as quantidade de nitrito, $0,1875 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ (linha rosa, Figura 51), que seria liberada, teoricamente, se a taxa conversão apresentasse em 100% .

A solução de $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ de NNG, apresentou eficiência de conversão de 62,35 % em nitrito e para a solução de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ foi de 60,20 % sendo que a diferença entre as taxas de conversão foram de aproximadamente 2,15 % e os CV para as soluções padrão de NNG $0,75$ e $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ foram iguais a 3,01 e 2,45 % respectivamente. Para as soluções padrão de NO_2^- $0,1875 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ os CV foram iguais a 2,88 % e 1,33 %, respectivamente. A pequena diferença nas taxas de conversão encontradas entre as concentrações diferentes de NNG pode estar relacionada, dentre outros fatores, com a variação na emissão de radiação pela lâmpada que se encontra em 1,37 %. A taxa de eficiência de conversão inferior a 100 % não afeta a precisão do método devido a temporização controlada inerente ao sistema SIA, que garante a aquisição do sinal analítico sempre no mesmo ponto reacional.

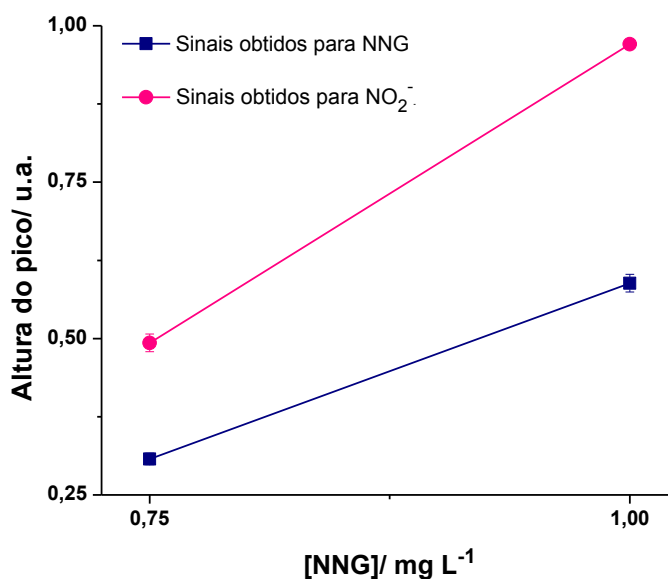


Figura 51. Conversão fotolítica de NNG $0,75$ e $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ para NO_2^- . As concentrações para o sinal esperado de nitrito são: $0,1875 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,25 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Volumes das soluções padrão de NNG e de $\text{NO}_2^- = 7200 \mu\text{L}$. Os parâmetros utilizados estão listados na Tabela 13 com exceção do volume das soluções padrão.

Cabe salientar que o aumento de volume não impactou sobre a capacidade de troca da fase sólida (volume de *breakthrough*), uma vez que $7200 \mu\text{L}$ de NNG $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ liberou o equivalente $0,1148 \text{ mg}$ de NO_2^- em potencial conversão de

61,3%. Essa massa de nitrito liberada apresenta-se menor que capacidade máxima de pré-concentração de 80 mg de fase sólida que é de 2,944 mg de nitrito.

Considerando os aspectos abordados neste item, foi possível estabelecer um sistema SIA com automação da fotoderivatização e extração em fase sólida, com características analíticas satisfatórias que permite a determinação de NNG em baixas concentrações. Assim, os próximos tópicos abordarão estudos para a determinação de NNG em amostras de PT e formulações comerciais de glifosato.

4.2.2.1 Avaliação da interferência do glifosato sobre íons nitrito de diferentes fontes

Antes de prosseguir com as análises das amostras de glifosato no sistema obtido, foram realizados estudos em batelada para avaliar a possível interferência do PT de glifosato nas medidas dos íons nitrito provenientes de diferentes soluções. Nos testes com as misturas da solução de sal de NO_2^- , a radiação UV foi empregada como parâmetro avaliativo de contribuição para interferência do glifosato conforme o procedimento descrito no item 4.1.3.3. Dessa maneira foram realizados três testes com as soluções descritas na Tabela 15. As soluções 1 e 2 (Tabela 15) foram fortificadas com NO_2^- em mesma concentração final ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$) e somente a solução 1 foi submetida a fotólise por 10 minutos. A solução 2 permaneceu reagindo pelo mesmo período de tempo em meio externo. A solução 3 foi submetida a fotólise pelo mesmo tempo de 10 minutos, para obter o nitrito, uma vez que 20 mg L^{-1} de NNG converte-se teoricamente em $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NO_2^- . O pH das três soluções foi avaliado qualitativamente.

Tabela 15. Soluções, condições e absorvância obtida para os íons nitrito na presença de glifosato

Solução	Composição	Fotólise (10 minutos)	Absorvância (u.a)	Faixa de pH
1	$5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NO_2^- em 10 mL solução PT de glifosato	Sim	1,732	2-3
2	$5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NO_2^- em 10 mL solução PT de glifosato	Não	2,031	2-3
3	$20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NNG em 10 mL solução PT de glifosato	Sim	0,052	2-3

Foi utilizada uma solução para comparação dos sinais obtidos nos testes da Tabela 15. Dessa forma, uma solução de PT glifosato foi misturada a solução de nitrito, de modo a conter $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NO_2^- da qual foi adicionada o RG 1:2. O espectro do produto formado foi adquirido imediatamente após a mistura do reagente e o máximo de absorvância apresentou-se em 2,896 u.a. Esse resultado foi utilizado como parâmetro para avaliar as absorvâncias obtidas nos testes das soluções de 1 a 3 (Tabela 15).

Ao comparar o valor de absorvância obtida para a solução 1, com a absorvância esperada de 2,896 u.a., percebe-se um decréscimo de 40 % do sinal que pode indicar tendência a nitrosação do glifosato. Essa hipótese é reforçada ao observar o resultado do ensaio 2, no qual o decréscimo de sinal foi de 30 % em relação ao valor esperado de comparação e 10 % a menos do que o ensaio 1. Esses resultados apontam que, seja com ou sem incidência de radiação, o glifosato tende a reagir com o nitrito por uma possível nitrosação e que a radiação pode ter pequena contribuição para esta interferência. Todavia, o decréscimo mais expressivo do sinal foi encontrado para o ensaio 3, que resultou em 98,2 %. Esse resultado indicou que as espécies nitrito derivadas da fotólise do NNG na presença do glifosato, possui efeito de interferência maior no sinal analítico do que o constado com o nitrito derivado de outra fonte, como nos testes 1 e 2.

Uma das hipóteses que pode explicar este efeito de interferência ocorrido nos ensaios acima é a propensão do glifosato a reagir com espécies nitrosantes, como o nitrito. Os resultados demonstram que a nitrosação ocorre com o nitrito adicionado na solução, porém preferencialmente com o nitrito derivado da fotólise do NNG. Essa potencial interferência pode estar relacionada, dentre outros fatores, ao pH do meio que favorece tanto a nitrosação (pH 3,0-3,4)¹¹¹ quanto a fotólise (pH 2-8)⁵⁵. Assim, se essas duas reações ocorrerem de forma concomitante e houver pouca dissociação ácido nitroso formado, há maior propensão a nitrosação do glifosato, devido a grande quantidade dessa espécie disponível para a reação de nitrosação. Outra explicação possível para o decréscimo de sinal do ensaio 3 (Tabela 15) pode estar relacionada com o radical nitrosil que por ser mais reativo pode reagir também com a grande quantidade de glifosato, antes de ser oxidado a nitrito⁵⁵. Assim, a

ocorrência de qualquer um desses fatores implicam na indisponibilidade de nitrito para a determinação, prejudicando o sinal analítico.

Uma hipótese alternativa para este efeito de interferência baseia-se na potencial competição entre o NNG e o glifosato pelos fótons emitidos no comprimento de onda de 254 nm. De modo a certificar esse possível efeito foram adquiridos espectros de duas soluções nas seguintes concentrações: NNG 390 mg L⁻¹ e glifosato 340 mg L⁻¹. Conforme é possível observar na Figura 52, a absorção do glifosato nesse comprimento de onda é mínima quando comparada a absorção de NNG. Dessa maneira é pouco provável que a radiação UV, neste comprimento de onda, possa provocar modificações na estrutura molecular do glifosato ou a competição entre as duas espécies pelos fótons emitidos pela lâmpada UV.

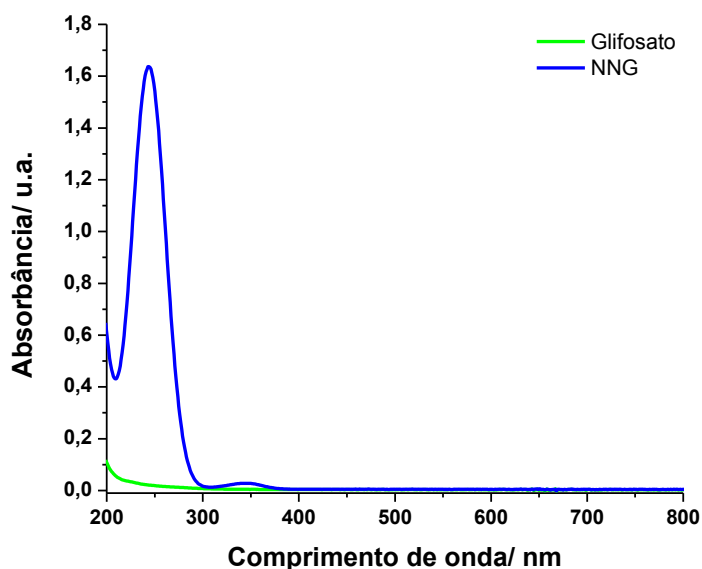


Figura 52 Espectro das soluções de NNG 390 mg L⁻¹ e glifosato 340 mg L⁻¹.

Dessa maneira, os resultados obtidos apontam que possivelmente a nitrosação pode estar ocorrendo nesta amostra em específico, devido a grande quantidade de glifosato (96,5 %) presente. Para os trabalhos que exploraram a fotólise de outras N-nitrosaminas, não há relatos sobre limites de interferência do produto principal, nem de outras impurezas presentes que possam vir a reagir com o nitrito.^{71, 72}

De forma a certificar este efeito de interferência foram realizados estudos de fortificação de soluções de NNG com quantidades diferentes de glifosato para verificar a proporção em mg L⁻¹ de glifosato, em relação ao NNG que proporciona

maior interferência no sinal analítico. Para tanto, os testes realizados e a aplicação do sistema para amostras reais serão melhores explorados no próximo item.

4.2.3 Aplicação do sistema SIA com fotoderivatização e SPE em linha para determinação de NNG em produto técnico e amostras de herbicidas comerciais à base de glifosato

Inicialmente foi realizado um estudo para constatar a proporção ou quantidade de glifosato:NNG, que promove interferência no sinal analítico. Assim, foi construída uma curva de calibração na faixa de 0,50, 0,75, 1,00 e 1,25 mg L⁻¹ de NNG e três soluções de PT foram fortificadas nas seguintes proporções 1:10, 1:100 e 1:1000 (NNG : glifosato) em mg L⁻¹, das quais foram avaliadas as taxas de recuperação (%) de NNG na presença de glifosato. A equação linear para a curva analítica foi de $y = 0,0906 + 0,2232x$, a linearidade foi adequada ($R^2 = 0,9993$), o limite de detecção foi estimado em 0,0274 mg L⁻¹, foram realizadas um total de 3 replicatas para cada padrão e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 16.

A recuperação de NNG, para o primeiro teste, foi de 109,15 %, demonstrando que essa quantidade de glifosato em relação a de NNG não apresentou interferência potencial relativa a nitrosação do glifosato. Todavia, para a proporção de 1:100 percebe-se um decréscimo de 76 % na recuperação do NNG adicionado, demonstrando um efeito de interferência no sinal mais acentuado que na proporção de 1:10. Este decréscimo indica maior interferência para o sinal analítico que pode estar relacionada a potencial nitrosação do glifosato, mesmo o pH não estando adequado para a ocorrência dessa reação. Já para a proporção de 1:1000 não houve recuperação do NNG adicionado apontando maior favorecimento da nitrosação do glifosato e neste caso o pH da amostra encontrava-se adequado a essa reação.

Tabela 16. Resultados obtidos para recuperação de NNG em diferentes concentrações de glifosato.

Proporção de NNG:glifosato	Concentração adicionada de NNG (mg L ⁻¹)	Concentração obtida de NNG (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	pH resultante da solução
(1:10)	1,005	1,097 ± 0,015	109,15	5
(1:100)	1,005	0,237 ± 0,026	23,68	4-5
(1:1000)	1,005	0,00	0,00	2-3

Ao analisar esses resultados é factível a interferência de sinal para a determinação de NNG na presença de glifosato. Os dados apontam que essa interferência pode estar relacionada a grandes quantidades do glifosato como reagente potencial a nitrosação. Nesta condição o glifosato pode reagir com os dois produtos da fotólise de NNG, $\text{NO}\cdot$ e HNO_2 (Figura 43), que são as fontes de nitrito para esse método. Lins ³² aponta em seus resultados que essa interferência de matriz acontece também sem a presença da SPE, assim acredita-se que a influência da etapa de extração para este efeito de interferência é mínima.

No entanto, em menores proporções de glifosato como a de 1:10, foi possível recuperar todo o analito adicionado, demonstrando que nesta condição pode ser viável determinar o NNG. Todavia, não há dados de formulações de PT que apresentem concentrações de glifosato menores que 90 %, ou produtos formulados (herbicidas comerciais) que sejam compostos por menos de 30,6 % de glifosato ^{20, 21}. Sendo assim, seriam necessárias diluições na ordem de 10^5 vezes, para obter soluções com essa concentração resultante do estudo, o que proporcionaria uma quantidade inexpressiva de NNG, inviável de ser determinada já que esse se encontra em baixas concentrações nas formulações e no PT de glifosato.

Os ensaios realizados acima utilizaram PT de glifosato que é proveniente da síntese do herbicida no qual contém 96,5% de glifosato e as impurezas advindas do processo reacional. Tendo em vista a determinação de NNG nos produtos formulados de glifosato, que possui composições diferentes do produto técnico, prosseguiu-se com os próximos estudos explorando a análise das amostras de herbicidas comerciais.

Através das soluções listadas na Tabela 9 do item 4.1.3.4, realizou-se medidas para as amostras, fortificadas com NNG em diferentes concentrações.

As formulações comerciais sólidas e líquidas apresentam em sua composição, surfactantes e outros ativos para formação do veículo de contato com as plantas ^{112, 113}. Assim, ao realizar a diluição dessas amostras, observou-se a formação de espuma. Por consequência, essas foram levadas ao banho ultrassônico por 30 minutos após a diluição. Mesmo após este tratamento da amostra, ao injetá-la no sistema SIA, ocorreu a formação de muitas bolhas nos tubos que prejudicaram a obtenção do sinal analítico. Para solucionar este problema, foi empregada uma

etapa de limpeza que consistia da aspiração de 5000 µL de solução transportadora com a seringa na posição *IN* e que através da inversão do fluxo (*OUT*) essa alíquota foi bombeada pela bobina para fotólise, percolou a fase sólida e seguiu rumo ao descarte levando as bolhas e potenciais impurezas que estavam presentes nos tubos para o descarte. Prosseguiu-se novamente com a análise, agora com outra etapa de lavagem adicionada, entretanto, as amostras analisadas não apresentaram sinais relativos ao NNG.

Como não foi possível determinar o NNG nas amostras comerciais de glifosato, tentou-se uma nova estratégia de fortificar as soluções de PT descritas no item 4.1.3.4, com concentrações maiores de NNG 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ de forma diminuir a proporção de NNG : glifosato, por meio do aumento da quantidade de NNG na solução. Procedeu-se a injeção dessas amostras no sistema SIA e não foram obtidos sinais relativos ao NNG, demonstrando que mesmo com o aumento da proporção e quantidade de NNG nas soluções, não foi possível determiná-lo. Considerando que a solução continha 145 mg de glifosato, as proporções seriam 2:145 e 3:145 (NNG:Glifosato). Esse resultado reafirma que a interferência está mais relacionada a maior quantidade de glifosato, do que com a proporção que o NNG se encontra em relação a matriz.

Considerando estes aspectos, foi possível verificar que existe um importante efeito de interferência do glifosato na determinação de NNG. Somente em concentração de 10 mg L⁻¹ de glifosato foi possível obter um sinal que corresponde a quantidade de NNG na solução preparada. Este efeito pode estar relacionado aos vários aspectos discutidos acima, dos quais demandariam de maior tempo e estudos mais aprofundados para sua compreensão.

4.3 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO

Um sistema SIA foi desenvolvido com automação da fotoderivatização e da extração em fase sólida, proporcionando resultados satisfatórios e precisos para a conversão do NNG ao nitrito, e posterior extração e pré-concentração dessa espécie. A fotoderivatização por movimento do fluxo apresentou características benéficas quando em comparação a estratégia de parada de fluxo, através de melhores taxas de conversão do NNG, com menor tempo de análise e sem a

formação de eventuais bolhas nos tubos do sistema. A reprodutibilidade da fase sólida foi reduzida em comparação ao sistema SIA–SPE do capítulo anterior, mas ainda apresentou-se satisfatória. O fator de pré-concentração obtido permitiu obter sensibilidade adequada e um limite de detecção atrativo para a determinação. Apesar da inviabilidade da determinação do NNG em formulações comerciais de herbicidas a base de glifosato, foi possível certificar que pequenas quantidades de glifosato não provocam potenciais interferências relativas a determinação do analito neste sistema. Dessa maneira, estudos mais aprofundados de outras variáveis analíticas como o pH, parâmetros da fotólise, testes com quantidades diferentes de NNG e glifosato, podem contribuir para melhor compreensão desta interferência. Considerando todos os aspectos abordados neste capítulo conclui-se que este método apresenta-se como uma alternativa simples e rápida aos procedimentos oficiais para esta determinação ^{4, 7, 8}.

CAPÍTULO 5

Conclusões gerais e perspectivas futuras

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Foi obtido um sistema para determinação indireta de NNG com inserção da fotoderivatização e da SPE, que permitiu a realização de praticamente todo procedimento analítico em linha. A montagem do módulo de fotoderivatização é simples, assim como a sua inserção no sistema SIA. A derivatização por fotólise seguida da extração em fase sólida mostrou-se adequada e apresenta bons resultados para os objetivos propostos. Assim, a estratégia de derivatização empregada neste trabalho superou as desvantagens apresentadas pela técnica de derivatização química convencional para a mesma determinação.

O método obtido demonstrou vantagens relacionadas a simplicidade operacional, configurações de fluxo mais simples, menor tempo de análise e características limpas alcançadas pela redução do uso de reagentes tóxicos e ácidos fortes, com procedimentos mais reprodutíveis e com menor custo do que aqueles realizados em batelada.

São evidentes as características benéficas do emprego da SPE para determinações em linha, uma vez que após a otimização das etapas de lavagem e condicionamento da fase sólida, foi possível realizar com êxito diversas extrações sucessivas, sem prejudicar o sinal relativo ao analito. A automação da SPE utilizou pequenos volumes de amostra e reagente, quando comparados a pré-concentração convencional. Os fatores de pré-concentração obtidos foram satisfatórios e possibilitaram a obtenção sinais com magnitudes relevantes para pequenas concentrações como, $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de NNG, que equivale a $7,65 \mu\text{g L}^{-1}$ de NO_2^- .

A fotoderivatização apresentou-se como uma alternativa viável para a clivagem da ligação N-NO do NNG. Ficou claro que apenas 25 s são necessários para a conversão de aproximadamente 61 % de NNG a NO_2^- . Essa eficiência de conversão aliada a SPE proporcionou sensibilidade satisfatória e um limite de detecção de $3,1 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ menor do que o obtido por CLAE, para a mesma determinação em linha que foi de $4,0 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ ⁹. Além disso, a lâmpada utilizada apresenta potência intermediária e tempo de vida útil bastante extenso o que minimiza preocupações a respeito da reposição desse equipamento. Cabe salientar também que este tipo de lâmpada se apresenta acessível comercialmente e de baixo custo.

Cabe destacar também os aspectos inovadores acerca do procedimento desenvolvido, uma vez que a literatura não aborda métodos de determinação de N-nitrosaminas empregando a fotólise ou SPE nos sistemas SIA e os poucos são os métodos para esta determinação de NNG que apresenta automação de maior parte do procedimento de preparo de amostra.

Com relação ao efeito de interferência encontrado nas análises das amostras de glifosato, acredita-se que um melhor entendimento pode ser obtido através da otimização de outros parâmetros da fotoderivatização de NNG na presença de glifosato, como: i) identificação dos produtos reacionais da fotólise de NNG, ii) estudos das reações de fotólise e nitrosação em diferentes faixas de pH. Outros fatores podem ser empregados adicionalmente como, etapa de *clean-up* na amostra para retirar ou reduzir a quantidade de glifosato presente, ou uso de fases sólidas que possam extrair o NNG da matriz, considerando não reduzir a frequência analítica do método.

Dessa maneira, apesar da inviabilidade encontrada para determinação do NNG nas amostras escolhidas, os estudos realizados neste presente trabalho de dissertação corroboram a viabilidade do método desenvolvido e apontam direções para resolver os percalços encontrados como propostas para trabalhos futuros. Esses estudos também abrem novas perspectivas a respeito da expansão dessa aplicação para outras N-nitrosaminas em diferentes amostras, dos quais a amina derivada encontra-se em menor concentração, como: cosméticos e produtos de higiene ¹¹⁴, águas naturais ⁵¹, produtos alimentícios ^{71, 72}, dentre outros.

6. REFERÊNCIAS

1. Junior, O. P. de A. J., Santos, T. C. R. dos. & Brito. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova* **25**, 589–593 (2002).
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, A. Anvisa - Monografia de Agrotóxico. G01- *Glifosato* 1689–1699 (2013). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>.
3. Presidência da República, C. C. *Lei 9279/1996*. (1996). Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9279.htm>.
4. Food And Agriculture Organization of the United Nations - FAO Especification and Evaluations for Agricultural Pesticides. Glyphosate. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/glypho01.pdf>.
5. IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis & MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Conjunta N° 2/2008, 2008 - Diário Oficial da União - DOU. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areastematicas-qa/controle-de-impurezas-relevantes>>.
6. Magee, P. N. & Barnes, J. M. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br. J. Cancer* **10**, 114 – 122 (1956).
7. Monsanto Agricultural Products Company. Standard Analytical Method n° AQC 684-86. (1986).
8. Monsanto Agricultural Products Company. Standard Analytical Method n° AQC 1140-E. (2011).
9. Kim, M., Stripeikis, J., Iñón, F. & Tudino, M. A simplified approach to the determination of N-nitrosoglyphosate in technical glyphosate using HPLC with post-derivatization and colorimetric detection. *Talanta* **72**, 1054 – 1058 (2007).
10. Junior, C. S. N. & Borges, K. B. *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos* (ed. LTC) 9 – 14 (2015).
11. Dias, A. C. B., Fonseca, A. & Sodr , F. F. *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos* (ed. LTC) 183–201 (2015).
12. Economou, A. Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *TrAC Trends Anal. Chem.* **24**, 416–425 (2005).
13. Lavilla, I., Romero, V., Costas, I. & Bendicho, C. Greener derivatization in analytical chemistry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **61**, 1–10 (2014).
14. Fedorowski, J. & LaCourse, W. R. A review of post-column photochemical reaction systems coupled to electrochemical detection in HPLC. *Anal. Chim. Acta* **657**, 1–8 (2010).

15. Jardim, I. C. S. F. *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos* (ed. LTC) 62–79 (2015).
16. Biziuk, M. Solid Phase Extraction Technique – Trends , Opportunities and Applications. *Polish J. Environ. Stud.* **15**, 677–690 (2006).
17. Santos, A. C. V. & Masini, J. C. A Análise Por Injeção Sequencial (SIA): Vinte Anos De Uma Perspectiva Brasileira. *Quim. Nova* **33**, 1949–1956 (2010).
18. Guyton, K. Z. *et al.* Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* **2045**, 1–2 (2015).
19. Cressey, D. *Widely used herbicide linked to cancer.* (2015). Disponível em: <<http://www.nature.com/news/widely-used-herbicide-linked-to-cancer-1.17181>>
20. Monsanto Web Site. Disponível em: <<http://www.monsanto.com/products/pages/roundup-safety-background-materials.aspx>>.
21. Syngenta Web Site. Disponível em: <<http://www.syngenta.com/global/corporate/en/products-and-innovation/product-brands/crop-protection/herbicides/Pages/touchdown.aspx>>
22. Sihtmäe, M. *et al.* Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Appl. Soil Ecol.* **72**, 215 – 224 (2013).
23. International Agency for Research on Cancer/World Health Organization. Glyphosate. **112**, 1–92 (2015).
24. ALICEWEB. *Sistema de Agrotóxicos e Fitossanitários, Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.* Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>.
25. EPA - U.S. Environmental Protection Agency. Glyphosate. 8 (1993). Disponível em: <<http://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/glyphosate>>.
26. Ambrus, A., Hamilton, D. J., Kuiper, H. A. & Racke, K. D. Chemistry and the environment division. Significance of impurities in the safety evaluation of crop protection products (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **75**, 937–973 (2003).
27. Figueiredo, L. A. Nutrição nitrogenada (15N) em soja convencional e transgênica sob aplicação do herbicida glifosato. (Universidade de São Paulo, 2009). Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64134/tde-09122009-102645/publico/Mestrado.pdf>>
28. Zhou, J., Li, J., An, R., Yuan, H. & Yu, F. Study on a new synthesis approach of glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 6279–85 (2012).
29. Loeppky, R. N. & Michejda, C. J. *Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds Chemistry and Biochemistry* . (1994).
30. Anselme. J. American Chemical Society - Series (ACS symposium series). *N-*

nitrosamines. (1979).

31. Monsanto Agricultural Products Company. Standard Analytical Method n° AQC 1140-E. (2011).
32. Lins, E. S. Desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo com fotoderivatização para determinação de NNG em glifosato. (Universidade de Brasília, 2014). Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/18364>>
33. Pastore, P., Lavagnini, I., Boaretto, A. & Magno, F. Ion chromatographic determination of N-nitrosoglyphosate in a glyphosate matrix. *Anal. Chim. Acta* **230**, 29–34 (1990).
34. Ivanov, V. M. The 125th anniversary of the Griess reagent. *J. Anal. Chem.* **59**, 1002 – 1005 (2004).
35. Schulz, K., Kerber, S. & Kelm, M. Reevaluation of the Griess Method for Determining NO/NO₂⁻ in Aqueous and rotein-Containing Sample. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **3**, 225 – 234 (1999).
36. Wang, P. G. *et al.* Nitric oxide donors: Chemical activities and biological applications. *Chem. Rev.* **102**, 1091–1134 (2002).
37. Young, J. C., Khan, S. U. & Marriage, P. B. Fluorescence detection and determination of glyphosate via its N-nitroso derivative by thin-layer chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **25**, 918–922 (1977).
38. Friestad, H. O. & Bronstad, J. O. Method for determination of glyphosate residues in natural waters based on polarography of the N-nitroso derivative. *Analyst* **101**, 820 – 824 (1976).
39. Skoog, Douglas, A., West, Donald, M., Holler, James, F. & Crouch, Stanley, R. *Fundamentos da Química Analítica*. (2013).
40. Zagatto, E. A. G., Oliveira, C. A. ., Townshend, A. & Worsfold, P. J. *Flow Analysis and spectrofotometric and luminometric detection*. (Elsevier, 2012).
41. Bergamin, H. F., Reis, B. F., Jacintho, A. O. & Zagatto, E. A. G. Ion exchange in Flow Injection Systems: Determination of ammonium ions at mg L⁻¹ level in natural waters with pulsed nessler reagent. *Anal. Chim. Acta* **117**, 81 – 89 (1980).
42. Nord, L. & Karlberg, B. O. Extraction based on the flow injection principle. Part 6. Film formation and dispersion in liquid-liquid segment flow extraction systems. *Anal. Chim. Acta* **164**, 233–249 (1984).
43. Reis, B. F. *et al.* Zone-sampling processes in flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta* **123**, 221–228 (1981).
44. Leon, L. E., Rios, A., Castro, M. D. L. De & Valcarcel, M. Use of Photochemical Reactions in Flow Injection: Determination of Oxalate in Urine. **115**, (1990).
45. Ruzicka, J. & Marshall, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Anal. Chim. Acta* **237**, 329–343 (1990).

46. Rocha, D. L., Kamogawa, M. Y. & Rocha, F. R. P. A critical review on photochemical conversions in flow analysis. *Anal. Chim. Acta* **896**, 11–33 (2015).
47. Rothagi - Mukherjee, K. *Fundamentals of photochemistry*. (1986).
48. Golimowski, J. & Golimowska, K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. *Anal. Chim. Acta* **325**, 111–133 (1996).
49. Fernández García-Borregón, P., Lores, M. & Cela, R. Analysis of barbiturates by micro-high-performance liquid chromatography with post-column photochemical derivatization. *J. Chromatogr. A* **870**, 39–44 (2000).
50. Johnson, C. R. & Asher, S. A. Use of Teflon Components in Photochemical Reactors Resolution Requirements for Middle-Molecule Mass Spectrometry. 2261–2262 (1984).
51. Lee, M., Lee, Y., Soltermann, F. & von Gunten, U. Analysis of N-nitrosamines and other nitro(so) compounds in water by high-performance liquid chromatography with post-column UV photolysis/Griess reaction. *Water Res.* **47**, 4893–4903 (2013).
52. Chow, Y. L. Nitrosamine photochemistry: Reactions of aminium radicals. *Acc. Chem. Res.* **6**, 354–360 (1973).
53. Chow, Y. L. Photolysis of N-nitrosamines. *Tetrahedron Lett.* 2333–2338 (1964).
54. Burguess, E. M. & Lavanish. Photochemical decomposition of N-nitrosamines. *Tetrahedron Lett.* 1221–1226 (1964).
55. Lee, C., Choi, W. & Yoon, J. UV photolytic mechanism of N-nitrosodimethylamine in water: roles of dissolved oxygen and solution pH. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 9702–9 (2005).
56. Stefan, M. I. & Bolton, J. R. UV direct photolysis of N-nitrosodimethylamine (NDMA): Kinetic and product study. *Helv. Chim. Acta* **85**, 1416–1426 (2002).
57. Romerob, A. M. Photochemical derivatization and spectrophotometric determination of thioridazine by flow injection. **2670**, (1996).
58. Osório, A. C. P., da Cunha, A. L. M. C., Khan, S., Ponciano, C. R. & Aucélio, R. Q. Spectrofluorimetric determination of tetrabenazine after photochemical derivatization in basic medium. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **100**, 166–70 (2013).
59. Wen, J., Kong, W., Wang, J. & Yang, M. Simultaneous determination of four aflatoxins and ochratoxin A in ginger and related products by HPLC with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and postcolumn photochemical derivatization. *J. Sep. Sci.* **36**, 3709–16 (2013).
60. Cao, J. *et al.* Simultaneous determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in *Fructus Bruceae* by high-performance liquid chromatography with online postcolumn photochemical derivatization. *J. Sep. Sci.* **37**, 2771–2778 (2014).
61. Campone, L., Piccinelli, a. L., Celano, R. & Rastrelli, L. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁

- and G₂ in cereal products. *J. Chromatogr. A* **1218**, 7648–54 (2011).
62. Galera, M. M., García, M. D. G. & Valverde, R. S. Determination of photoirradiated high polar benzoylureas in tomato by HPLC with luminol chemiluminescence detection. *Talanta* **76**, 815–23 (2008).
63. Bellec, G. *et al.* Analysis of N-nitrosamines by high-performance liquid chromatography with post-column photohydrolysis and colorimetric detection. *J. Chromatogr. A* **727**, 83–92 (1996).
64. Melchert, W. R., Infante, C. M. C. & Rocha, F. R. P. Development and critical comparison of greener flow procedures for nitrite determination in natural waters. *Microchem. J.* **85**, 209–213 (2007).
65. Rocha, D. L. & Rocha, F. R. P. An environmentally friendly flow-based procedure with photo-induced oxidation for the spectrophotometric determination of chloride in urine and waters. *Microchem. J.* **108**, 193–197 (2013).
66. Rocha, D. L. & Rocha, F. R. P. Photochemical micro-digestion in a multi-pumping flow system for phosphorus fractionation in cereals. *Microchem. J.* **109**, 139–144 (2013).
67. Bendicho, C., Pena, F., Costas, M., Gil, S. & Lavilla, I. Photochemistry-based sample treatments as greener approaches for trace-element analysis and speciation. *TrAC Trends Anal. Chem.* **29**, 681–691 (2010).
68. Siringkhawut, W., Grudpan, K. & Jakmunee, J. Sequential injection anodic stripping voltammetry with monosegmented flow and on-line UV digestion for determination of Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II) in water samples. *Talanta* **84**, 1366–73 (2011).
69. Angeli, V. *et al.* Flow injection-chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry hyphenated system for organic mercury determination: A step forward. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **66**, 799–804 (2011).
70. Eaton, A. D., Clesceri, L. S. & Greenberg, A. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th. *Am. Public Heal. Assoc.* (1995).
71. Pérez - Ruiz, T., Martínez - Lozano, C., Tomar, V. & Martín, J. Flow injection chemiluminescent determination of N-nitrosodimethylamine using photogenerated cysteine and -cystine using photogenerated tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium (III). *Anal. Chim. Acta* **541**, 69 – 74 (2005).
72. Luque-Pérez, E., Ríos, A. & Valcárcel, M. Automated flow-injection spectrophotometric determination of nitrosamines in solid food samples. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **371**, 891–5 (2001).
73. Cerdá, V., Avivar, J. & Cerdá, A. Laboratory automation based on flow techniques. *Pure Appl. Chem.* **84**, 1983–1998 (2012).
74. Lapa, R. A. S., Lima, J. L. F. C., Reis, B. F., Santos, J. L. M. & Zagatto, E. A. G. Multi-pumping in flow analysis : concepts, instrumentation, potentialities. *Anal. Chim. Acta* **466**, 125–132 (2002).

75. Santos, I. C., Mesquita, R. B. R., Machado, A., Bordalo, A. A. & Rangel, A. O. S. S. Analytica Chimica Acta Sequential injection methodology for carbon speciation in bathing waters. *Anal. Chim. Acta* **778**, 38–47 (2013).
76. Santos, A. C. V dos & Masini, J. C. Sequential injection analysis (SIA) and response surface methodology: A versatile small volume approach for optimization of photo-Fenton processes. *Microchem. J.* **93**, 110–114 (2009).
77. Passos, M. L. C. *et al.* A reagent-free method based on a photo-induced fluorimetry in a sequential injection system. *Talanta* **84**, 1309–1313 (2011).
78. Passos, M. L. C., Costa, D., Lima, J. L. F. C. & Saraiva, M. L. M. F. S. Sequential injection technique as a tool for the automatic synthesis of silver nanoparticles in a greener way. *Talanta* **133**, 45–51 (2015).
79. Lima, M. J. R., Fernandes, S. M. V. F. & Angel, A. O. S. S. R. A Sequential Injection System for the on-line Digestion and Colorimetric Determination of Phosphorus in Milk. **67**, 3280–3283 (2002).
80. Telepchak, M. J., August, T. F. & Chaney, G. *Forensic and clinical applications of solid phase extraction*. (Humana Press, 2004).
81. Simpson, Nigel, J. K. *Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications*. *Acta chemica Scandinavica* (Copenhagen, Denmark: 1989) **45**, (2000).
82. Jardim, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. *Scientia Chromatographica* **2**, 13 – 25 (2010).
83. Collins, H., Braga, G. L. & Bonato, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. (2006).
84. Buszewski, B. & Szultka, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **42**, 198–213 (2012).
85. Phenomenex. SPE Reference Manual & Users Guide. (2014).
86. Bocian, S., Studzińska, S. & Buszewski, B. Functionalized Anion Exchange Stationary Phase for Separation of Anionic Compounds. *Talanta* **127**, 133–139 (2014).
87. Miró, M., Cladera, A., Estela, J. M. & Cerdà, V. Sequential injection spectrophotometric analysis of nitrite in natural waters using an on-line solid-phase extraction and preconcentration method. *Analyst* **125**, 943–948 (2000).
88. Zhang, M., Yuan, D., Huang, Y., Chen, G. & Zhang, Z. Sequential injection spectrophotometric determination of nanomolar nitrite in seawater by on-line preconcentration with HLB cartridge. *Acta Oceanol. Sin.* **29**, 100–107 (2010).
89. Dias, A. C. B., Borges, E. P., Zagatto, E. A. G. & Worsfold, P. J. A critical examination of the components of the Schlieren effect in flow analysis. *Talanta* **68**, 1076 – 1082 (2005).
90. Vidal, M. T., Chisvert, a & Salvador, a. Sensitive sequential-injection system

- for the determination of 2-phenylbenzimidazole-5-sulphonic acid in human urine samples using on-line solid-phase extraction coupled with fluorimetric detection. *Talanta* **59**, 591–9 (2003).
91. Ma, J., Yuan, D. & Liang, Y. Sequential injection analysis of nanomolar soluble reactive phosphorus in seawater with HLB solid phase extraction. *Mar. Chem.* **111**, 151–159 (2008).
92. Zhu, G., Wang, H., Gao, X. & Fan, J. on-Line Mini-Column Solid-Phase Extraction Coupled With Sequential Injection for the Determination of Cadmium in Environmental Samples. *Instrum. Sci. Technol.* **42**, 320–330 (2014).
93. Huclová, J., Šatínský, D., Pavlíček, O., Vedralová, L. & Karlíček, R. Using on-line solid phase extraction for determination of amiloride in human urine by sequential injection technique. *Anal. Chim. Acta* **573-574**, 376–82 (2006).
94. Sartini, R. P. & Oliveira, C. C. A New Strategy for Exploiting Ion Exchange in Sequential Injection Analysis: On-Line Phytic Acid Separation / Determination in Foods as an Example. **18**, 675–679 (2002).
95. Idris, A. M. & Alnajjar, A. O. Exploiting sequential injection analysis technique to automate on-line sample treatment and quantitative determination of morphine in human urine. *Talanta* **77**, 522–526 (2008).
96. Iakisikli, G. G. *et al.* Automatic On-line Solid-phase Extraction – Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Exploiting Sequential Injection Analysis for Trace Vanadium, Cadmium and Lead Determination in Human Urine Samples. *Anal. Sci.* **31**, 15–17 (2015).
97. Huclová, J., Šatínský, D., Sklenářová, H. & Karlíček, R. Determination of salbutamol using on-line solid-phase extraction and sequential injection analysis. Comparison of chemiluminescence and fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 448–454 (2003).
98. Legnerová, Z. Using on-line solid phase extraction for simultaneous determination of ascorbic acid and rutin trihydrate by sequential injection analysis. *Anal. Chim. Acta* **497**, 165–174 (2003).
99. Chisvert, A., Vidal, M. T. & Salvador, A. Sequential injection analysis for benzophenone-4 and phenylbenzimidazole sulphonic acid in sunscreen sprays by solid-phase extraction coupled with ultraviolet spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **464**, 295–301 (2002).
100. Moorcroft, M. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta* **54**, 785–803 (2001).
101. Ribeiro, F. W. P., Moraes, F. C., Pereira, E. C., Marken, F. & Mascaro, L. H. New application for the BiVO₄ photoanode: A photoelectroanalytical sensor for nitrite. *Electrochem. commun.* **61**, 1–4 (2015).
102. Fox, J. B. Kinetics and mechanisms of the Griess reaction. *Anal. Chem.* **51**, 1493–1502 (1979).

103. Miró, M., Estela, J. M. & Cerdà, V. Application of flowing stream techniques to water analysis. Part I. Ionic species: Dissolved inorganic carbon, nutrients and related compounds. *Talanta* **60**, 867–886 (2003).
104. Poole, C. F., Gunatilleka, A. D. & Sethuraman, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **885**, 17–39 (2000).
105. Vieira, J. A. Estudo comparativo de sistemas de análises químicas em fluxo empregando FIA com multicomutação e amostragem binária, FIA com multicomutação e amostragem sanduíche, fluxo monossegmentado e injeção sequencial. (Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, 2001).
106. Fritz, J. S. & Gjerde, D. T. *Ion Chromatography* (ed. Wiley - VCH) (2009).
107. J. C, M. & J. N, M. *Statistics for analytical chemistry* (ed. Pearson) (1993).
108. *Bioagri Laboratórios*. POP M–1894 revisão 02.
109. Cho, D. *et al.* Solids circulation rate and static bed height in a riser of a circulating fluidized bed. *Korean J. Chem. Eng.* **32**, 284–291 (2015).
110. Brunetti, F. in *Mecânica dos Fluidos* (ed. Hall, P. P.) 163 – 205 (2008).
111. Mirvish, S. S. Formation of N-nitroso compounds: Chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **31**, 325–351 (1975).
112. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Toxicologia. *Intoxicação por agrotóxicos*. Disponível em: <<http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mXII.glify.htm>>
113. INCHEM. International Programme on Chemical Safety - INCHEM. *Environmental programme on chemical safety 159 14* Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>>
114. Rath, S. & Canaes, L. S. Contaminação de produtos de higiene e cosméticos por N-nitrosaminas. *Quim. Nova* **32**, 2159–2168 (2009).