

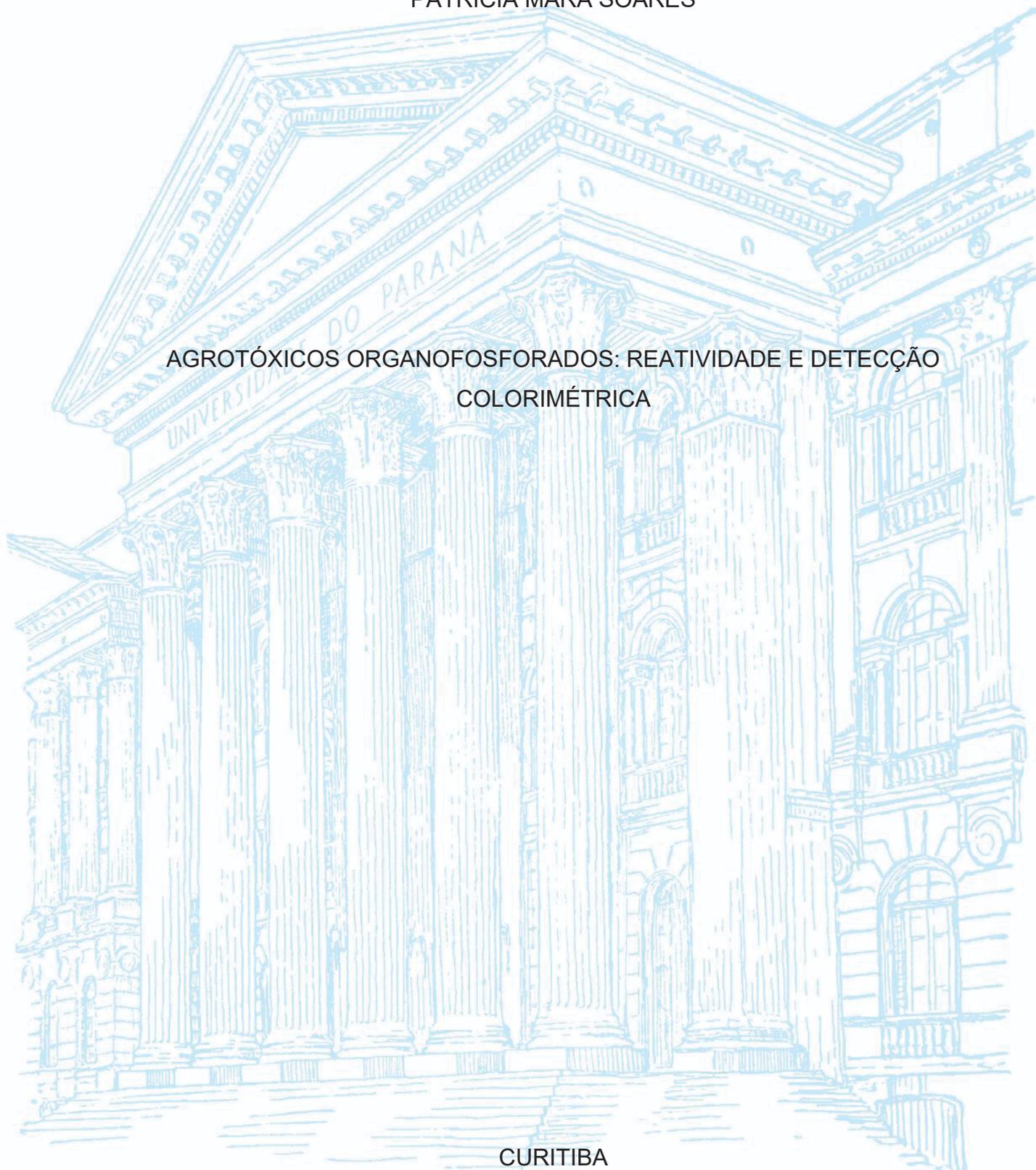
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA MARA SOARES

AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS: REATIVIDADE E DETECÇÃO
COLORIMÉTRICA

CURITIBA

2025



PATRICIA MARA SOARES

AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS: REATIVIDADE E DETECÇÃO
COLORIMÉTRICA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Elisa S. Orth

Coorientador: Prof. Dr. Renan B. Campos

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo A. Toledo

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Soares, Patricia Mara

Agrotóxicos organofosforados: reatividade e detecção colorimétrica /
Patricia Mara Soares. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Elisa Souza Orth

Coorientadores: Renan Borsoi Campos ; Eduardo Aparecido Toledo

1. Glifosato. 2. Acefato. 3. Pesticidas. 4. Organofosfatos. I. Universidade
Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Orth,
Elisa Souza. IV. Campos, Renan Borsoi. V. Toledo, Eduardo Aparecido. VI.
Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PATRICIA MARA SOARES**, intitulada: **Agrotóxicos organofosforados: reatividade e detecção colorimétrica**, sob orientação da Profa. Dra. ELISA SOUZA ORTH, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 11 de Abril de 2025.

Assinatura Eletrônica
14/04/2025 13:44:02.0
ELISA SOUZA ORTH

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
23/04/2025 13:00:33.0
FRANCINE BERTELLA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/04/2025 22:37:33.0
CRISTIANE PILISSÃO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/04/2025 11:24:46.0
KAHLIL SCHWANKA SALOME

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/04/2025 12:15:23.0
ELISANE LONGHINOTTI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

À minha Mãe Everly (*in memoriam*) e à minha filha Larissa,
com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Elisa Souza Orth, por tudo que fez por mim. Seu conhecimento, incentivo e apoio foram fundamentais para a realização deste trabalho e para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Mas isso vai além do trabalho, da orientação e do laboratório. Você me mostrou que eu posso, que eu consigo, você acreditou em mim mais do que eu mesma, em momentos tão difíceis nesse período em que estivemos juntas. Meu profundo agradecimento a você por tudo isso, por ter me permitido ser GCC! Obrigada por estar comigo!

Aos meus coorientadores. Ao Prof. Dr. Eduardo Toledo, pela colaboração e pelo fornecimento das amostras reais que nos enviou, possibilitando a realização desse trabalho, muito obrigada!. Ao Prof. Dr. Renan Borsoi Campos, por ter aceitado participar desse trabalho. Tenho por você uma amizade imensa e uma admiração maior ainda. Obrigada por me incentivar e me apoiar sempre! Com você, esse caminho ficou mais fácil!

Aos membros da banca avaliadora da minha tese de doutorado, Prof^a. Dr^a Cristiane Pilissão, Prof^a. Dr^a Elisane Longhinotti, Prof^a. Dr^a Francine Bertella e Prof. Dr. Kahlil Salomé, pela disponibilidade e por todas as contribuições para a finalização desse trabalho.

Agradeço também à Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Química, por terem permitido que eu realizasse aqui o meu mestrado e o meu doutorado. Aqui me transformei enquanto profissional e também enquanto pessoa. Encerro esse ciclo levando daqui as melhores memórias. Tenho um orgulho imenso por ser UFPR!

Agradeço também ao Centro de Ressonância Magnética Nuclear, em especial à Ana e à Leice, por toda ajuda.

Ao nosso grupo de pesquisa, o GCC, agradeço como um todo pela forma com que me receberam e me apoiaram. Obrigada a todos os integrantes do GCC, os que convivi e os que conheci ao longo dessa jornada. Cada um teve um papel fundamental na minha vida profissional. Alguns, também na vida pessoal. Obrigada Yane e Naiane, vocês tornaram o mestrado mais leve e sem dúvida, vão comigo pra vida! Alex, obrigada, por toda ajuda e suporte que sempre me deu e por ser esse amigo e irmão

tão especial! Agradeço também a você, William, por essa parceria imensa, essa amizade linda que estamos cultivando e me faz muito feliz!

Obrigada também aos colegas de outros laboratórios que compartilharam comigo diversos momentos, seja na rotina de trabalho, seja no café no RU todas as manhãs! Meu sincero muito obrigado! Vocês tornam tudo mais divertido! E sim, é preciso que haja alegria em tudo que fazemos! Assim, a todos os meus colegas, lembrarei de vocês sempre com imenso carinho e gratidão.

À Lilian e à Elise, minhas amigas que são meu apoio, minha força! Eu amo vocês! Muito obrigada, por simplesmente, tudo!

Por fim, agradeço à minha família pelo apoio incondicional, de forma muito especial agradeço aos meus pais, João e Everly (*in memoriam*). Onde quer que esteja, Mãe, foi também por você, pelo teu exemplo de força e resiliência. Sei que hoje você estaria orgulhosa! E agradeço também à Larissa, minha filha e amor maior. Obrigada, pela paciência, pelo apoio, por ser mais do que minha filha, minha força e meu motivo. Amo você, muito obrigada filha!

“Pesquisar é um ato de fé. Não fé religiosa, mas fé no invisível que ainda não tem forma. Fé na idéia que ainda está sendo moldada. Fé de que vale a pena, mesmo sem avanços imediatos. Porque quem pesquisa acredita. Acredita que a dúvida pode ser semente. Que um dado, por menor que seja, pode gerar mudança. Que um incômodo pode virar projeto. E que uma pergunta bem-feita pode transformar vidas – inclusive a sua. Pesquisar é acreditar que buscar sentido é um ato político. É resistir à lógica da pressa e insistir no aprofundamento. Pesquisar não é entender o mundo. É querer transformá-lo. Se você pesquisa com esse tipo de fé, saiba: você não está só.”

(Alessandra Brustolin)

RESUMO

Os agrotóxicos, quando utilizados em excesso, podem representar riscos à saúde humana e ao meio ambiente, tornando essencial o monitoramento de sua presença. Organofosforados (OF's), como acefato e glifosato, estão entre os mais utilizados e comercializados do mundo, porém seu monitoramento é desafiador, especialmente devido às suas características físico-químicas, que dificultam a detecção dessas moléculas. Assim, este estudo tem como foco a busca por reações que possibilitem a detecção desses pesticidas de maneira rápida, reprodutível e eficiente. Neste contexto, buscando detectar colorimetricamente acefato e glifosato, propomos o uso de agentes de derivatização, como o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (DNCB), 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (DNFB) e 4-nitrobenzaléido (4-NBZ), bem como o uso de reações de detecção indireta, como *p*-nitrofenil acetato (APNF) e o dietil 2,4-dinitrofenilfosfato (DEDNPP). Essas moléculas são capazes de tornar uma solução antes incolor, colorida, através dos produtos de reação com os OF's (no caso dos derivatizantes) e dos seus próprios produtos de hidrólise obtidos através do ataque nucleofílico dos OF's (no caso das duas moléculas utilizadas para detecção indireta do glifosato). O acefato foi avaliado frente ao 4-NBZ, DNFB e DNFB, e o estudo de hidrólise dessas moléculas mostrou que essas reações contribuem pouco nas condições avaliadas para as reações de derivatização de interesse. O DNFB mostrou potencial para a detecção de acefato, levando à formação de uma banda de absorção em ~340 nm em aproximadamente 3 horas, que confirma o produto colorido estável, em toda a faixa de pH avaliada. O glifosato também foi avaliado frente ao 4-NBZ e DNFB, além do APNF e DEDNPP. Os derivatizantes 4-NBZ e DNFB levaram à formação de um produto de glifosato derivatizado, sendo que os melhores resultados foram obtidos com o DNFB. Uma condição ideal de reação foi obtida, em pH 10,5 e temperatura ambiente, e nessas condições, o DNFB foi capaz de detectar a presença de glifosato em amostras comerciais, sem nenhum tratamento prévio, o que representa uma grande vantagem frente a outros métodos. Isso evidencia que o método proposto não é afetado pelos interferentes presentes na formulação comercial. Ainda, foi estudada a detecção indireta do glifosato na reação com APNF e do DEDNPP, pela formação dos produtos fenólicos coloridos, que se formam pela hidrólise dessas moléculas e é acelerada pelo glifosato. Observando os resultados obtidos através das 33 reações realizadas, é possível afirmar que conseguimos promover diferentes e promissoras formas de detectar glifosato e acefato: métodos com a utilização de moléculas derivatizantes e também estratégias indiretas. Isso é bastante significativo, pois o método de detecção colorimétrica é simples, rápido e acessível, e, principalmente, pode ser levado a campo, oferecendo uma alternativa promissora às técnicas convencionais. Ainda, contribui para compreender a reatividade dessas moléculas, o que é essencial para propor rotas de detecção e neutralização.

Palavras-chave: glifosato, acefato, derivatizantes, pesticidas, organofosforados.

ABSTRACT

Pesticides, when used in excess, can pose risks to both human health and the environment, making the monitoring of their presence essential. Organophosphates (OPs), such as acephate and glyphosate, are among the most widely used and commercialized worldwide; however, their monitoring remains challenging, mainly due to their physicochemical characteristics, which hinder the detection of these molecules. Thus, this study focuses on the search for reactions that enable the detection of these pesticides in a rapid, reproducible, and efficient manner. In this context, aiming at the colorimetric detection of acephate and glyphosate, we propose the use of derivatizing agents such as 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB), and 4-nitrobenzaldehyde (4-NBZ), as well as indirect detection reactions employing p-nitrophenyl acetate (APNF) and diethyl 2,4-dinitrophenyl phosphate (DEDNPP). These molecules are capable of turning a previously colorless solution into a colored one, either through their reaction products with OPs (in the case of derivatizing agents) or through their own hydrolysis products generated by the nucleophilic attack of OPs (in the case of the two molecules employed for the indirect detection of glyphosate). Acephate was evaluated against 4-NBZ, DNFB, and DNFB, and the hydrolysis study of these molecules showed that such reactions contribute little, under the conditions tested, to the derivatization reactions of interest. DNFB demonstrated potential for acephate detection, leading to the formation of an absorption band at ~340 nm in approximately 3 hours, which confirms the generation of a stable colored product across the entire pH range investigated. Glyphosate was also evaluated against 4-NBZ and DNFB, as well as APNF and DEDNPP. The derivatizing agents 4-NBZ and DNFB led to the formation of a derivatized glyphosate product, with the best results obtained using DNFB. An optimal reaction condition was established at pH 10.5 and room temperature, and under these conditions, DNFB was capable of detecting glyphosate in commercial samples without any prior treatment, representing a significant advantage over other methods. This demonstrates that the proposed method is not affected by the interferents present in the commercial formulation. In addition, the indirect detection of glyphosate was investigated through its reaction with APNF and DEDNPP, based on the formation of colored phenolic products generated by the hydrolysis of these molecules, a process accelerated by glyphosate. From the results obtained in the 33 reactions performed, it is possible to conclude that we successfully established different and promising strategies for the detection of glyphosate and acephate: methods employing derivatizing agents as well as indirect approaches. This is highly significant, as colorimetric detection methods are simple, rapid, and accessible, and, most importantly, can be applied in field conditions, offering a promising alternative to conventional techniques. Furthermore, this study contributes to a better understanding of the reactivity of these molecules, which is essential for proposing both detection and neutralization pathways.

Keywords: glyphosate, acephate, derivatizing, pesticides, organophosphate.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- DETECÇÃO DE AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS EM RELAÇÃO AO TOTAL DE AMOSTRAS ANALISADAS PELA ANVISA, NO PERÍODO DE 2012-2025.....	28
FIGURA 2- OS DEZ INGREDIENTES ATIVOS MAIS VENDIDOS NO BRASIL EM 2023.....	29
FIGURA 3- REDE DE CONTAMINAÇÃO E BIOACUMULAÇÃO DOS PESTICIDAS.	31
FIGURA 4- INGREDIENTES ATIVOS DETECTADOS EM AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA NO BRASIL NO PERÍODO DE 2019-2021.	32
FIGURA 5- DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DE INTOXICAÇÃO POR AGROTÓXICOS POR ANO, ESTUDO DE 2020.	34
FIGURA 6- REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS AGENTES DE GUERRA SARIN E VX (EM VERMELHO) E COMPOSTOS OF's UTILIZADOS COMO PESTICIDAS (EM PRETO).	36
FIGURA 7- REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DE MOLÉCULAS OF's E SEUS RESPECTIVOS NOMES DE ACORDO COM O GRUPO SUBSTITUINTE.....	37
FIGURA 8- REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ÉSTERES DE FOSFATO (MONO-, DI- OU TRIÉSTERES).....	38
FIGURA 9- ESTRATÉGIAS POSSÍVEIS PARA A DETOXIFICAÇÃO DE OF's	38
FIGURA 10- CAMINHOS PREFERENCIAIS DO IMZ FRENTE A DIFERENTES OF's E OTF's.....	40
FIGURA 11- EFEITO TIO EM REAÇÕES COM OP's.....	41
FIGURA 12- ESQUEMA DA REAÇÃO DE NEUTRALIZAÇÃO E A POSIÇÃO DE GRUPOS ABANDONADORES E GRUPOS ESPECTADORES NA ESTRUTURA QUÍMICA DE OF's.	42

FIGURA 13- PLOT DE BRONSTED BILINEAR PARA COMPOSTOS (A) P=O E (B) P=S.....	42
FIGURA 14- REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO ACEFATO E OS PRODUTOS RESULTANTES DAS 4 POSSÍVEIS CLIVAGENS DE LIGAÇÕES (P–O, P–S, P–N E C–N).....	45
FIGURA 15- REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO GLIFOSATO E A SEQUÊNCIA DE DISSOCIAÇÕES COM SEUS RESPECTIVOS VALORES DE pKa.	47
FIGURA 16- REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO GLIFOSATO E SEU PRINCIPAL PRODUTO DE DEGRADAÇÃO – AMPA.....	48
FIGURA 17- REPRESENTAÇÃO DA INIBIÇÃO DE TCh NA PRESENÇA DE OF's.	55
FIGURA 18- EXEMPLOS DE MOLÉCULAS DERIVATIZANTES E OS RESPECTIVOS PRODUTOS FORMADOS COM GLIFOSATO PARA DERIVATIZAÇÃO E DETECÇÃO COLORIMÉTRICA (NA COR AZUL O COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO DE ABSORÇÃO PARA CADA PRODUTO).....	57
FIGURA 19- EM (A) ESQUEMA DOS POSSÍVEIS CAMINHOS PARA A REAÇÃO ENTRE DNFB E GLIFOSATO: FORMAÇÃO DE UM NOVO PRODUTO OU HIDRÓLISE DO DNFB EM MEIO AQUOSO; (B) FORMAÇÃO DO PRODUTO COLORIDO, CONJUNTO DE TODOS OS ESPECTROS E PERFIL CINÉTICO PARA A REAÇÃO DO DNFB COM GLIFOSATO EM CONDIÇÃO DE EXCESSO DE GLIFOSATO E (C) COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DNFB (LINHA PRETA) E REAÇÃO DO DNFB COM GLIFOSATO (LINHA VERMELHA).....	59
FIGURA 20- REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DAS MOLÉCULAS UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO QUE FORAM AVALIADAS NESSE ESTUDO (OF'S: ACEFATO E GLIFOSATO; DERIVATIZANTES: 4-NBZ, DNFB E DNCB; MOLÉCULAS PARA DETECÇÃO INDIRETA: DEDNPP E APNF).	62

FIGURA 21- ESQUEMA DA SEQUÊNCIA DOS ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS OF's, REAÇÕES DE HIDRÓLISE QUE FORAM REALIZADAS E REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO PARA A DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DIRETA E INDIRETA DESSES PESTICIDAS.	66
FIGURA 22- ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ACEFATO, 200 MHz, D_2O	68
FIGURA 23- ESPECTRO DE RMN DE ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ DO ACEFATO, 81 MHz, D_2O	69
FIGURA 24- ESPECTRO DE RMN DE ^{31}P ACOPLADO DO ACEFATO, 81 MHz, D_2O	69
FIGURA 25- ESPECTRO DE UV-Vis DO ACEFATO PURO EM ÁGUA, pH 8,0 e $[\text{ACF}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$	70
FIGURA 26- ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO GLIFOSATO, 200 MHz, D_2O	71
FIGURA 27- ESPECTRO DE RMN DE ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ DO GLIFOSATO, 81 MHz, D_2O . ..	72
FIGURA 28- ESPECTRO DE RMN DE ^{31}P ACOPLADO DO GLIFOSATO, 81 MHz, D_2O	73
FIGURA 29 - ESQUEMA DAS REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO QUE ESTÃO SENDO AVALIADAS NESSE ESTUDO.	74
FIGURA 30- ESQUEMA DAS REAÇÕES DE HIDRÓLISE DAS MOLÉCULAS QUE FORAM AVALIADAS NESSE ESTUDO.	76
FIGURA 31- ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO GLIFOSATO.	77
FIGURA 32- ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DNFB.	77
FIGURA 33- REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ACEFATO ACOMPANHADA POR 17 h, EM pH 9,5, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{ACF}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$	78
FIGURA 34- REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ACEFATO ACOMPANHADA POR 17 h, EM $[\text{NaOH}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 13,0), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{ACF}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$	79
FIGURA 35- ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DNCB.	80
FIGURA 36- REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DNCB ACOMPANHADA POR 17 h, EM pH 9,0, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{DNCB}] = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	80

FIGURA 37- REAÇÃO DE HIDRÓLISE ALCALINA DO DNCB ACOMPANHADA POR 17 h, T= 25 °C, [DNCB]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ . (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS DA HIDRÓLISE ALCALINA COM [NaOH]= 0,1 mol L ⁻¹ , (B) AJUSTE CINÉTICO PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE COM [NaOH]= 0,1 mol L ⁻¹ OBTIDO UTILIZANDO A EQUAÇÃO 1, (C) ESPECTROS CONSECUTIVOS DA HIDRÓLISE ALCALINA COM [NaOH]= 1,0 mol L ⁻¹ , (D) AJUSTE CINÉTICO PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE COM [NaOH]= 1,0 mol L ⁻¹ OBTIDO UTILIZANDO A EQUAÇÃO 2 E (E) AJUSTE CINÉTICO PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE COM [NaOH]= 1,0 mol L ⁻¹ OBTIDO UTILIZANDO A EQUAÇÃO 1.....	82
FIGURA 38- ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO 4-NBZ.....	83
FIGURA 39- REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO 4-NBZ ACOMPANHADA POR 17 h, EM pH 10,0, T= 25 °C, [4-NBZ] = 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	84
FIGURA 40- REAÇÃO DE HIDRÓLISE ALCALINA DO 4-NBZ ACOMPANHADA POR 17 h, T= 25 °C, [4-NBZ] = 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ . (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS DA HIDRÓLISE ALCALINA COM [NaOH]= 0,1 mol L ⁻¹ , (B) ESPECTROS CONSECUTIVOS DA HIDRÓLISE ALCALINA COM [NaOH]= 1,0 mol L ⁻¹	85
FIGURA 41- ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO APNF FORMANDO O PNF, PRODUTO QUE POSSIBILITA A DETECÇÃO INDIRETA DO GLIFOSATO.....	86
FIGURA 42- REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO APNF ACOMPANHADA POR 2 h, EM pH 10,0, T= 25 °C, [APNF]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ . (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS DA HIDRÓLISE EM MEIO AQUOSO DO APNF, (B) AJUSTE CINÉTICO OBTIDO UTILIZANDO A EQUAÇÃO 1 (PARA PRODUTO).....	86
FIGURA 43-ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DEDNPP FORMANDO O DNP, PRODUTO QUE POSSIBILITA A DETECÇÃO INDIRETA DO GLIFOSATO.....	87

FIGURA 44- (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DEDNPP EM pH 8,0 e T=25 °C, [DEDNPP]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 400 nm, pH 8,0, (C) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DEDNPP EM pH 10,0 e T = 25 °C; [DEDNPP]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , e (D) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO PNP EM 400 nm, pH 10,0.....	88
FIGURA 45- ESQUEMA DO EQUILÍBRIO DE DISSOCIAÇÃO DO ACEFATO EM pKa 8,35.	91
FIGURA 46- POSSÍVEL REAÇÃO ENTRE ACEFATO E 4-NBZ.	92
FIGURA 47- (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO ACEFATO COM O 4-NBZ, COM [ACEFATO]=0,05 mol L ⁻¹ , [4-NBZ] = 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; pH 11,0 e T=25 °C, (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 250 nm e (C) COMPARATIVO ENTRE OS PERFIS DE HIDRÓLISE DO 4-NBZ EM [NaOH]= 1,0 mol L ⁻¹ COM OS PERFIS DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DO 4-NBZ COM O ACEFATO EM pH 11,0.....	93
FIGURA 48- POSSIBILIDADES REACIONAIS ENTRE ACEFATO E DNCB: FORMAÇÃO DE UM NOVO PRODUTO OU HIDRÓLISE DO DNCB EM MEIO AQUOSO.	94
FIGURA 49- (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO ACEFATO COM O DNCB, COM ACEFATO EM EXCESSO. [ACF]=0,05 mol L ⁻¹ ; [DNCB]= 1,0.10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; pH 11,0 e T=25 °C. (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 340 nm COM ACEFATO EM EXCESSO e (C) COMPARATIVO ENTRE OS PERFIS DE HIDRÓLISE DO DNCB EM [NaOH]=1,0 mol L ⁻¹ E DA REAÇÃO DO DNCB COM ACEFATO EM pH 11,0.	95
FIGURA 50- POSSIBILIDADES REACIONAIS ENTRE ACEFATO E DNFB: FORMAÇÃO DE UM NOVO PRODUTO E HIDRÓLISE DO DNFB EM MEIO AQUOSO.....	96

FIGURA 51- (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO ACEFATO COM O DNFB, COM ACEFATO EM EXCESSO. [ACEFATO]=0,05 mol L ⁻¹ ; [DNFB]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; pH 8,0 e T=25 °C , (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 340 nm COM ACEFATO EM EXCESSO EM pH 8,0, (C) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO ACEFATO COM O DNFB, COM ACEFATO EM EXCESSO [ACEFATO]=0,05 mol L ⁻¹ ; [DNFB]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; pH 9,5 e T=25 °C e (D) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 340 nm COM ACEFATO EM EXCESSO EM pH 9,5.	97
FIGURA 52- COMPARATIVO ENTRE (A) OS PERFIS DE HIDRÓLISE DO DNFB E DA REAÇÃO DO DNFB COM ACEFATO E EM (B) OS PERFIS DAS REAÇÕES ENTRE O DNFB E O DNCB COM O ACEFATO. T=25 °C, [ACF]=0,05 mol L ⁻¹ , [DNFB]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , [DNCB]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	99
FIGURA 53- PROVÁVEIS PRODUTOS QUE PODEM SER OBTIDOS A PARTIR DA HIDRÓLISE DA MOLÉCULA DO ACEFATO.....	102
FIGURA 54- ESPECTROS SUCESSIVOS ³¹ P {H} NMR (50 MHz, D ₂ O) PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ACEFATO (0,1 mol L ⁻¹), pD 10,4, 25 °C.	103
FIGURA 55- ESPECTROS SUCESSIVOS ³¹ P NMR (50 MHz, D ₂ O) PARA A REAÇÃO DO DNFB (0,1 mol L ⁻¹) COM ACEFATO (0,1 mol L ⁻¹), pD 10,4, 25 °C.....	104
FIGURA 56- EQUILÍBRIO ENTRE AS ESPÉCIES DO GLIFOSATO.....	105
FIGURA 57- POSSIBILIDADE DE REAÇÃO ENTRE GLIFOSATO E 4-NBZ.	106
FIGURA 58- (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM O 4-NBZ, COM GLIFOSATO EM EXCESSO. [GLIFOSATO]=0,01 mol L ⁻¹ ; [4-NBZ]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; e T=25 °C, em pH 11,0 e (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 244 nm E (C) COMPARATIVO ENTRE OS PERFIS DE HIDRÓLISE DO 4-NBZ EM Ph 10,0, HIDRÓLISE ALCALINA DO 4-NBZ ([NaOH]= 1,0 mol L ⁻¹ E DA REAÇÃO DO 4-NBZ COM GLIFOSATO pH 11,0.	107

FIGURA 59- POSSIBILIDADES REACIONAIS ENTRE GLIFOSATO E DNCB: FORMAÇÃO DE UM NOVO PRODUTO OU HIDRÓLISE DO DNCB EM MEIO AQUOSO.	108
FIGURA 60- ESPECTROS CONSECUTIVOS E PERFIS CINÉTICOS OBTIDOS ATRAVÉS DA REAÇÃO ENTRE GLIFOSATO (0,05 mol L ⁻¹) E DNCB (10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) EM T = 25 °C, ACOMPANHADA POR 10 h. Em (A) , pH= 10,5; (B) , pH = 11; (C) pH = 12 e (D) pH = 13.	110
FIGURA 61- PERIL DE pH PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM DNCB.	111
FIGURA 62- (A) PERFIL CINÉTICO PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM O DNCB. [GLIFOSATO]=0,05 mol L ⁻¹ ; [DNCB]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; pH 10,5 e T=25 °C. OBTIDO PARA O REAGENTE EM 268 nm. A LINHA SÓLIDA EM AZUL CORRESPONDE AO AJUSTE DOS DADOS UTILIZANDO A EQUAÇÃO 2. (C) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 400 nm. A LINHA SÓLIDA EM AZUL CORRESPONDE AO AJUSTE DOS DADOS UTILIZANDO A EQUAÇÃO 1.	112
FIGURA 63- COMPARATIVO ENTRE OS PERFIS DOS ESPECTROS INICIAIS E FINAIS DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ALCALINA DO DNCB ([NaOH]= 1,0 mol L ⁻¹ E DA REAÇÃO DO DNCB COM GLIFOSATO EM pH 10,5, T=25 °C, 17 h.	113
FIGURA 64- (A) ESPECTRO FINAL PARA CADA REAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLIFOSATO (0,01, 0,03, 0,05, 0,07 E 0,09 mol L ⁻¹) FRENTE AO DNCB E (B) GRÁFICO DAS CONSTANTES DE VELOCIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO GLIFOSATO, OBTIDAS ATRAVÉS DOS AJUSTES CINÉTICOS PARA PRODUTO (EQUAÇÃO 7). [DNCB]=10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; pH 10,5 E T=25 °C.	113
FIGURA 65- ESPECTROS INICIAIS E FINAIS PARA CADA REAÇÃO (DNCB COM GLIFOSATO PURO E DNCB COM AS DUAS AMOSTRAS COMERCIAIS. A LINHA AZUL MOSTRA O PERFIL DA REAÇÃO DO DNCB COM GLIFOSATO PURO, A LINHA LARANJA SE REFERE A REAÇÃO DO DNCB COM A AMOSTRA COMERCIAL ROUNDUP WG® E A LINHA VERDE É REFERENTE A REAÇÃO DO DNCB COM	

A AMOSTRA COMERCIAL SINGER WG [®] . (T= 25 °C, pH 10,5, ACOMPANHADA POR 17 h).....	115
Figura 66- PERFIL CINÉTICO DA FORMAÇÃO DE GFTD, A PARTIR DA REAÇÃO ENTRE GLIFOSATO (PRESENTE NAS AMOSTRAS REAIS) E O DERIVATIZANTE DNCB: [DNCB]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , pH 10,5, T = 25 °C, 17 h.O AJUSTE DOS DADOS FOI OBTIDO UTILIZANDO A EQUAÇÃO 1. EM (A) , A AMOSTRA COMERCIAL UTILIZADA FOI STINGER WG [®] , [GFT] = 0,1 mol L ⁻¹ ; EM (B) , A AMOSTRA É DA MARCA ROUNDUP ORIGINAL MAIS [®] , [GFT] = 0,05 mol L ⁻¹	116
FIGURA 67- ESPECTROS SUCESSIVOS ¹ H NMR (200 MHz, D ₂ O), PARA A REAÇÃO DO DNCB (1x10 ⁻³ mol L ⁻¹) COM GLIFOSATO (0,1 mol L ⁻¹), pD 10,4, 25 °C.	118
FIGURA 68- ESPECTROS SUCESSIVOS ³¹ P RMN (50 MHz, D ₂ O) PARA A REAÇÃO DO DNCB (1x10 ⁻³ mol L ⁻¹) COM GLIFOSATO (0,1 mol L ⁻¹), pD 10,4, 25 °C.	119
FIGURA 69- CAMINHOS POSSÍVEIS PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM APNF.	120
FIGURA 70- (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM O APNF, COM GLIFOSATO EM EXCESSO [GLIFOSATO]=0,15 mol L ⁻¹ ; [APNF]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ ; , pH 10,0 e T=25 °C e (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO PNP EM 400 nm COM GLIFOSATO EM EXCESSO EM pH 10,0.	121
FIGURA 71- CAMINHOS POSSÍVEIS PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM APNF.	123
FIGURA 72- (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO DEDNPP E DO GLIFOSATO EM pH 8,0 e T=25 °C , [DEDNPP]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , [GLIFOSATO]= 0,05 mol L ⁻¹ , (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 400 nm, pH 8,0, (C) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM O DEDNPP EM pH 10,0 e T = 25 °C, [GLIFOSATO]=0,05 mol L ⁻¹	

¹; [DEDNPP]= 10⁻⁵ mol L⁻¹; , e **(D)** PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA
O PRODUTO DNP EM 400 nm, pH 10,0..... 124

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- MÉTODOS DE DETECÇÃO DE OF'S.	53
TABELA 2- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS SINAIS DOS OF's ACEFATO E GLIFOSATO.....	73
TABELA 3- RESUMO DOS DADOS DAS REAÇÕES DE HIDRÓLISE DOS OF's E DERIVATIZANTES E DAS MOLÉCULAS PARA DETECÇÃO INDIRETA DE GLIFOSATO A T=25 °C.....	89
TABELA 4- RESUMO DOS DADOS DAS REAÇÕES DOS OF's E DERIVATIZANTES A T=25 °C.	100
TABELA 5- CONSTANTES DE VELOCIDADE OBTIDAS COM A VARIAÇÃO DO pH NA REAÇÃO DE PSEUDO-PRIMEIRA ORDEM ENTRE GLIFOSATO (0,05 mol L ⁻¹) E DNCB (10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) EM T= 25 °C, ACOMPANHADA POR 10 h.....	110
TABELA 6- CONSTANTES DE VELOCIDADE DE HIDRÓLISE DO APNF E CONSTANTES DE VELOCIDADE DAS REAÇÕES DO GLIFOSATO COM APNF.....	122
TABELA 7- RESUMO DOS DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DAS REAÇÕES AVALIADAS NESTA PARTE DO TRABALHO, REFERENTE AO GLIFOSATO FRENTE AO 4-NBZ, DNCB, APNF E DEDNPP.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
AMPA – Ácido aminometilfosfônico
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APNF – Acetato de *p*-nitrofenila
BNP-Cl - 4-(((3-cloropiridin-4-il)imino)metil)-N,N-dimetilanilina
CHO – Colina oxidase
CNFB – 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto
CNP-Cl - 4-((3-((3-cloropiridin-4-il)imino)propenil)-N,Ndimetilanilina
CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DTNB - 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)
DEDNPP - Dietil-2,4-dinitrofenil-fosfato
DEDNPSP - Dietil-2,4-dinitrofenil-tiofosfato
DMAB - *p*-dimetilaminobenzaldeído
DMPT – O,S-dimetil-O-fosforotioato
DNCB – 2,4-dinitroclorobenzeno
DNFB – 2,4-dinitrofluorbenzeno
DNP – 2,4-dinitrofenol
DNPRT - Derivado de ácido tiofosfórico
DZN - Diazinon
DZO – Diazoxon
ECHA - European Chemicals Agency
EPO – Paraoxon
EPSPS – Enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase
EPT – Paration
FAO – Food and Agriculture Organization of the United States
FMOC – Cloroformato de 9-fluorenilmetil
GFTD - N-(2,4-dinitrofenil)-N-(fosfometil) glicina
HRP – Enzima peroxidase de raiz forte
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis

IARC - International Agency for Research on Cancer
LC-SPE-ESI/MS/MS - Cromatografia líquida usando extração em fase sólida acoplada à espectrometria de massa com ionização por eletrospray
LMR – Limite máximo residual
IMZ-P - Imidazol fosforilado
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MPT - Metil-paration
MRM – Multiresidue Methods
4-NBZ – 4-nitrobenzaldeído
OF – Organofosforado
OP's – Organofosforados
OMAPAA - O-metil-N-acetilfosforamidato
OMS - Organização Mundial de Saúde
ONU – Organização das Nações Unidas
OTP's - Organotiofosforados
PARA - Programa Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PNP - *p*-nitrofenolato
RLEL - Relações Lineares de Energia Livre
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
SERS - Espalhamento Raman de superfície aprimorada
SMPT - S-metil-N-acetilfosforamidatoato
TCh - Tiocolina
US EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UV-Vis - Ultravioleta-Visível
VIGIÁGUA - Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano

LISTA DE SÍMBOLOS

A_0 - Absorbância inicial

A_i - Absorbância no infinito

A_{prod} - Absorbância dos produtos

A_{reag} - Absorbância dos reagentes

Abs - Absorbância

DCI - Cloreto de deutério

D_2O - Monóxido de didutério

δ_P - Deslocamento químico de fósforo

HCl - Ácido clorídrico

H_3PO_4 - Ácido fosfórico

k_O - Taxa de velocidade na reação com OP tipo PO

k_S - Taxa de velocidade na reação com OP tipo PS

k_{obs} - Constante de velocidade de pseudo-primeira ordem

k_N - Constante de velocidade de segunda ordem

λ_{max} - Comprimento de onda máximo

$NaHCO_3$ - Bicarbonato de sódio

$NaOD$ - Deuteróxido de sódio

$NaOH$ - Hidróxido de sódio

Nu - Nucleófilo

^-OH - Íon hidróxido

pD - Potencial deuteriônico

pH - Potencial hidrogeniônico

^{31}P RMN - RMN de ^{31}P fósforo

ppm - partes por milhão

ppb - partes por bilhão

pKa - constante de acidez

TMSP-*d*4 - Ácido trimetilsililpropanóico tetradeuterado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 AGROTÓXICOS: BREVE CENÁRIO SOBRE USO, OCORRÊNCIA E TOXICIDADE	26
1.2.1 ACEFATO	43
1.2.2 GLIFOSATO	46
1.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE OF's.....	49
2 JUSTIFICATIVA	60
3 OBJETIVOS	62
3.1 OBJETIVO GERAL	62
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
4 MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1 MATERIAIS.....	63
4.2 PURIFICAÇÃO DO ACEFATO	63
4.3 PURIFICAÇÃO DO GLIFOSATO.....	64
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS	64
4.5 ESTUDOS CINÉTICOS	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS OF's ACEFATO E GLIFOSATO.....	67
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO DO ACEFATO.....	67
5.1.2 CARACTERIZAÇÃO DO GLIFOSATO	70
5.2 ESTUDOS DAS REAÇÕES DE HIDRÓLISE E DERIVATIZAÇÃO COM ACEFATO E GLIFOSATO: DETECÇÃO COLORIMÉTRICA.....	73
5.2.1 REAÇÕES DE HIDRÓLISE	75
5.2.2 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES COM O ACEFATO.....	91
5.2.2.1 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO ACEFATO COM 4-NITROBENZALDEÍDO (4-NBZ).....	91
5.2.2.2 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO ACEFATO COM DNCB. 94	
5.2.2.3 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO ACEFATO COM DNFB . 96	
5.2.2.3 RESUMO DAS REAÇÕES DO ACEFATO COM 4-NBZ, DNCB E DNFB.....	99
5.2.3 ESTUDO MECANÍSTICO DAS REAÇÕES DO ACEFATO	101
5.2.3.1 REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ACEFATO	101

5.2.3.2 ESTUDO MECANÍSTICO DA REAÇÃO DO ACEFATO COM DNFB.	103
5.2.4 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES COM O GLIFOSATO	105
5.2.4.1 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO GLIFOSATO COM 4-NBZ.	106
5.2.4.2 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO GLIFOSATO COM DNCB.	108
5.2.4.3 DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DO GLIFOSATO EM AMOSTRAS COMERCIAIS	114
5.2.4.4 ESTUDO DO MECANISMO DA REAÇÃO DO GLIFOSATO COM DNCB ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RMN.....	117
5.2.4.5 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO GLIFOSATO COM APNF	119
5.2.4.6 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO GLIFOSATO COM DEDNPP.	122
5.2.4.7 RESUMO DAS REAÇÕES DO GLIFOSATO COM OS DERIVATIZANTES (4-NBZ E DNCB) E COM AS MOLÉCULAS PARA DETECÇÃO INDIRETA (APNF E DEDNPP).	125
6 CONCLUSÕES	127
REFERÊNCIAS	129
ANEXOS	142

1 INTRODUÇÃO

1.1 AGROTÓXICOS: BREVE CENÁRIO SOBRE USO, OCORRÊNCIA E TOXICIDADE

O desenvolvimento do modelo agrícola no Brasil é baseado na produção de *commodities* que são ofertadas ao mercado mundial, no qual o Brasil ocupa posição de destaque. O país é um grande produtor e exportador de produtos de origem agrícola, entre eles: açúcar, milho e soja¹. Além disso, é também um grande produtor e exportador mundial de etanol, um agrocombustível (não *commodity*) produzido principalmente a partir da cana-de-açúcar.² A produção total do etanol brasileiro, que inclui tanto o derivado da cana-de-açúcar quanto o do milho, deverá atingir 36,08 bilhões de litros nessa safra 2024/25, representando um crescimento de 1,3% em comparação à safra anterior.³ Ainda, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), produtoras e produtores brasileiros devem colher cerca de 325,7 milhões de toneladas de grãos na safra 2024/25, o que representa um crescimento de 9,4% em relação à temporada anterior e se deve, em parte, ao aumento de 2,1% na área cultivada, estimada em 81,6 milhões de hectares.⁴ É inegável a expansão das áreas de cultivo dessas culturas, o que se deu em grande parte com a ampla utilização de agrotóxicos, visto que somente soja, milho e cana-de-açúcar consomem cerca de 76% de todo agrotóxico utilizado no país. O Brasil ocupa a primeira posição no consumo anual de agrotóxicos, tendo consumido no ano de 2021 cerca de 720 mil toneladas, superando em 1,57 vezes o consumo dos Estados Unidos, que registrou 457 mil toneladas no mesmo ano.⁵

O uso dessas substâncias, que hoje são largamente consumidas no Brasil, tiveram início do incentivo ao seu uso na década de 1960 com a proposta de desenvolver a agricultura brasileira buscando ampliar a produtividade e solucionar a questão da fome.⁶ Claramente essa questão não está solucionada, ao contrário, ainda é bastante desafiadora. Segundo dados e projeção da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), baseada em uma estimativa da Organização das Nações Unidas (ONU), a população mundial atingirá em 2050 o número de 9,73 bilhões de pessoas. Assim, para que seja possível suprir a demanda, a agricultura precisará produzir quantidade 50% maior de alimentos, rações e biocombustíveis.⁷ Os agrotóxicos serão ferramenta importante para que se atinja essa alta produção, entretanto, a aplicação dessas substâncias também é

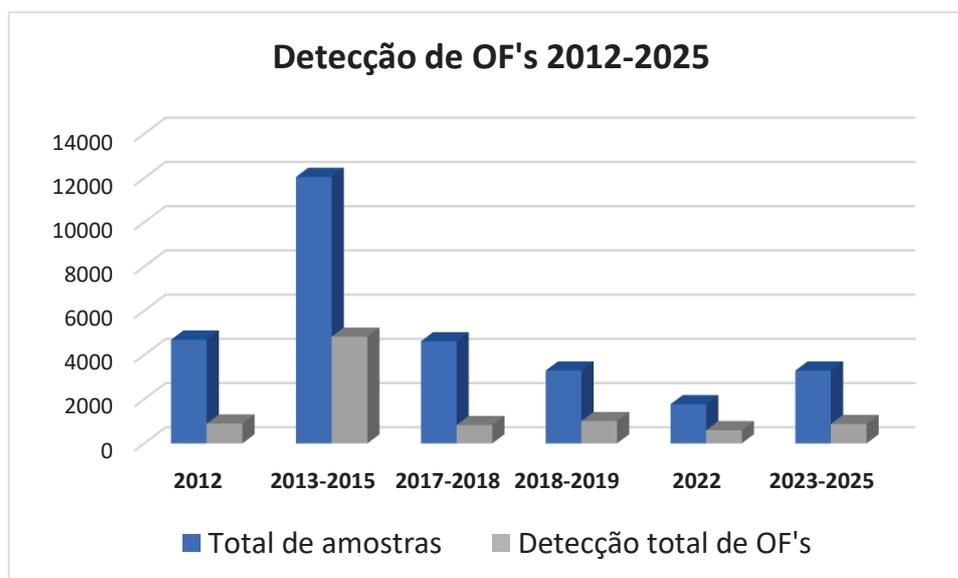
acompanhada de sérios danos ao meio ambiente e, por consequência, à saúde da população.

Agrotóxicos, além de serem amplamente utilizados para fins agrícolas, também tem importante função na saúde pública, onde são aplicados em jardinagem doméstica, controle de doenças transmitidas por vetores como a malária, por exemplo, e, ainda, no tratamento de animais domésticos contra pulgas e carrapatos.⁸ O Brasil está entre os maiores consumidores mundiais dessas substâncias, e, desde o ano 2016, têm batido recordes na liberação de novos pesticidas⁹, sendo que somente em 2024 foram liberados 663 agrotóxicos.¹⁰ A liberação dessas substâncias depende: do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que avalia a eficácia dessas substâncias; também do Ministério da Saúde, que atua através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), avaliando a toxicidade e riscos à saúde que essas moléculas podem causar; e, ainda, do Ministério do Meio Ambiente, representado pelo IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, que estuda os possíveis impactos que esses pesticidas podem causar ao meio ambiente. Apesar das tentativas em aprovar um pacote de leis flexibilizando ainda mais a liberação dos agrotóxicos, em 27/12/2023, foi aprovada com vetos pelo Presidente da República, a Lei nº14.785, que mantém a ANVISA e o IBAMA como órgãos responsáveis pela reanálise dos riscos à saúde e ao meio ambiente. Além disso, essa lei também determinou que a autorização de novos ingredientes ativos só poderá ocorrer mediante consulta prévia a esses órgãos e ao final das análises de riscos.¹¹ Apesar disso, o ritmo de liberação de agrotóxicos em 2024 ainda foi muito alto, e o uso intensificado dessas substâncias pode acarretar danos sérios à saúde humana, ao meio ambiente e à biodiversidade.

É nesse contexto de promover maior segurança alimentar que a ANVISA elabora um estudo acerca da presença (resíduos) dos agrotóxicos em alimentos, o PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos), que, após suas análises e avaliação de riscos dispõe de uma série de recomendações aos produtores e consumidores. De acordo com o último relatório do PARA referente ao período de 2023-2025, foram analisadas 3.294 amostras de 14 alimentos diferentes. Dessas amostras, 26,1% (859) foram consideradas insatisfatórias.¹² Os agrotóxicos da classe dos organofosforados (OF's) foram identificados em 875 das 3.294 amostras analisadas, e estão entre as classes de pesticidas mais

detectados¹², o que já foi observado em relatórios de ciclos anteriores, como o relatório do ciclo 2017-2018 e, também, 2018-2019 e 2022.^{13,14} Esses dados podem ser observados na Figura 1, que reúne dados de detecção de OF's ao longo dos 13 últimos anos.¹²⁻¹⁶

FIGURA 1- DETECÇÃO DE AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS EM RELAÇÃO AO TOTAL DE AMOSTRAS ANALISADAS PELA ANVISA, NO PERÍODO DE 2012-2025.



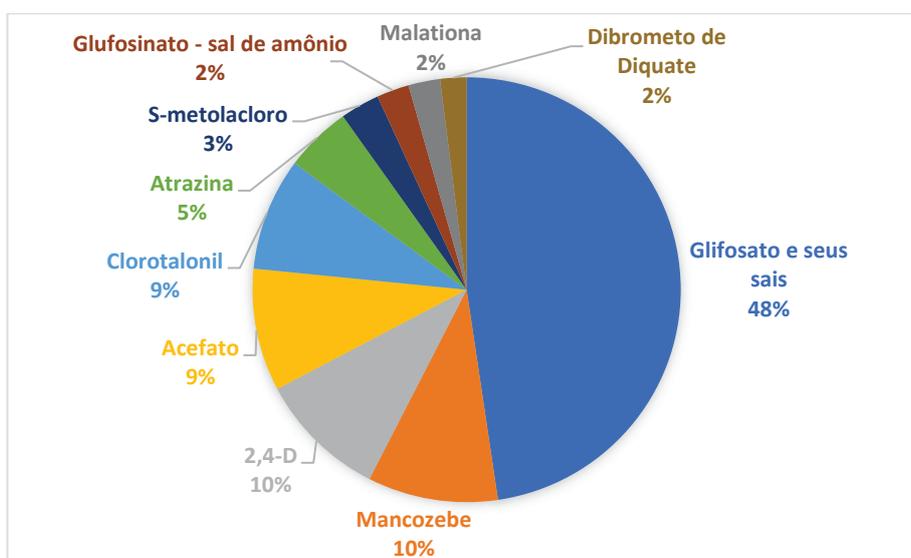
Fonte: Adaptado de ANVISA (RELATÓRIO PARA (2012,2013-2015,2017-2018,2018-2019, 2022 E 2023-2025).

Dentre esses pesticidas da classe dos organofosforados estão o acefato e o glifosato, um inseticida e um herbicida, respectivamente. Das 3.294 amostras analisadas no ciclo atual, o acefato foi identificado regularmente em 0,8% (26) das amostras analisadas e detectado de forma irregular em 4,9% (160) do total de amostras. Esse resultado o posiciona entre os 13 agrotóxicos mais frequentemente encontrados em situação de irregularidade.¹² Já o glifosato foi avaliado pela primeira vez no PARA (ciclo 2017-2018), o que se deve à dificuldade em encontrar técnicas simples de análise desse organofosforado. A técnica comumente utilizada pela ANVISA é o método multirresíduo (MRM, do inglês *Multiresidue Methods*), que consegue analisar simultaneamente diferentes ingredientes ativos e seus metabólitos em uma mesma amostra, porém o glifosato é uma das moléculas para as quais essa técnica não se aplica, sendo necessário o uso de uma metodologia *single* para a sua análise. Dessa forma, somente mais recentemente o glifosato tem

sido avaliado no relatório PARA. No ciclo de 2017-2018 foram encontrados resíduos da sua aplicação nas três culturas nas quais foi avaliado: manga, arroz e uva. No relatório PARA referente ao ciclo 2018-2019 esse herbicida foi avaliado para soja, trigo e milho, num total de 638 amostras, sendo detectados seus resíduos em 30 delas.¹³ No relatório de 2022, seus resíduos foram pesquisados em um número maior de produtos, incluindo amendoim, batata, café, feijão, mandioca e trigo. Nesse estudo, de um total de 866 amostras, em 47 o glifosato foi detectado, e em 10 dessas amostras seu limite máximo residual foi superior ao permitido pela legislação¹⁴. No relatório referente ao ciclo de avaliação mais recente, 2023/25, a quantidade de alimentos analisados para detectar o glifosato foi ampliada para 1.938 amostras, incluindo arroz, abacaxi, beterraba, cenoura, goiaba, laranja, manga, trigo e uva. O glifosato foi detectado em 37 dessas amostras, sendo duas delas não conformes por estar em concentração residual superior à permitida por lei.¹²

Sabe-se que o glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo e um recordista em vendas, 253 mil toneladas comercializadas no Brasil em 2023, representando cerca de 48% do total de vendas, superando todos os demais. A Figura 2 mostra o ranking dos dez ingredientes ativos mais vendidos, dentre eles também o acefato, que ocupa a quarta posição, com cerca de 50 mil toneladas (9%) negociadas no mesmo ano.¹⁰

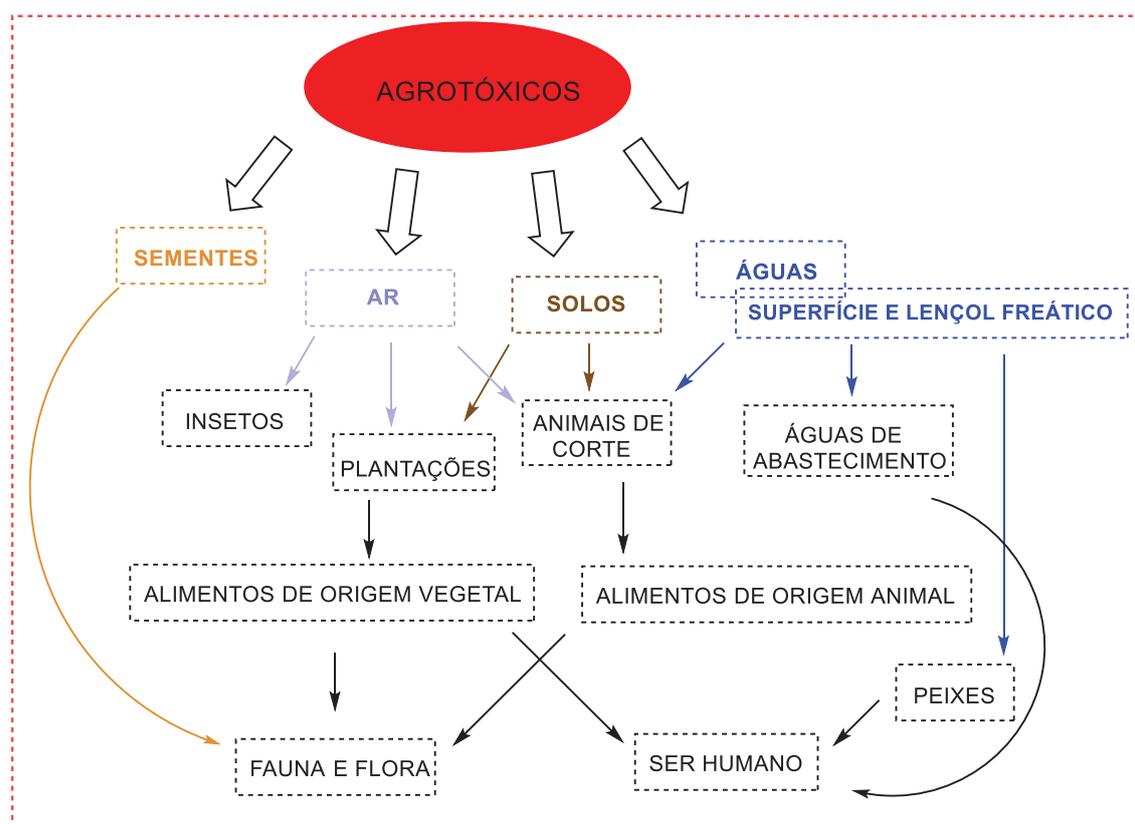
FIGURA 2- OS DEZ INGREDIENTES ATIVOS MAIS VENDIDOS NO BRASIL EM 2023.



Fonte: Adaptado de MAPA (2024).¹⁰

Tanto acefato como glifosato já tiveram seu uso reavaliado pela ANVISA, o glifosato em 2020¹³ e o acefato em 2013¹⁶. Visando reduzir a dispersão dessas substâncias através da pulverização, seu uso teve algumas restrições relativas às formas de aplicação, mas ambos foram mantidos, apesar de suas características de carcinogenicidade (relacionados a casos de câncer do tipo Linfoma não Hodgkin e leucemias).¹⁷ Além disso, em relação ao glifosato, se observam altos índices de mortalidade infantil em regiões onde as culturas têm aplicação desse pesticida e de sua capacidade de atuar como um desregulador endócrino. Essas substâncias são, portanto, motivo de grande preocupação, pois também são altamente persistentes no ambiente, e os desdobramentos acerca de seu uso irrestrito podem levar a sérios danos ao ecossistema e à saúde humana. O ser humano pode absorver pesticidas através de inalação, ingestão e absorção dérmica¹⁸. Após a aplicação desses pesticidas todo o ambiente pode ser contaminado, uma vez que a ação e a permanência dessas substâncias não se restringem ao local onde foram utilizados, pois, devido à volatilização e lixiviação, podem causar danos ao ar, solos e águas, levando a uma rede de contaminação que ao final atinge o ser humano e o ecossistema como um todo (Figura 3)^{8,18,19}. O glifosato, por exemplo, pode afetar o solo e as plantas de diferentes formas, diretas e indiretas. Sua ação sobre as bactérias e os fungos presentes no solo pode ocorrer por longos períodos após sua aplicação, cerca de até 11 meses, e pode levar a alterações na composição de nutrientes nesse solo. Dessa forma a penetração de água após as chuvas fortes fica dificultada, favorecendo a contaminação dos corpos d'água por glifosato. Nas plantas, o glifosato altera as funções metabólicas, impactando os mecanismos de regulação e defesa contra as doenças, facilitando sua ocorrência.⁹ Já o acefato, devido à sua característica de hidrofobicidade e baixa adsorção, resulta em uma elevada mobilidade em solos e facilidade em atingir recursos hídricos.²⁰

FIGURA 3- REDE DE CONTAMINAÇÃO E BIOACUMULAÇÃO DOS PESTICIDAS.

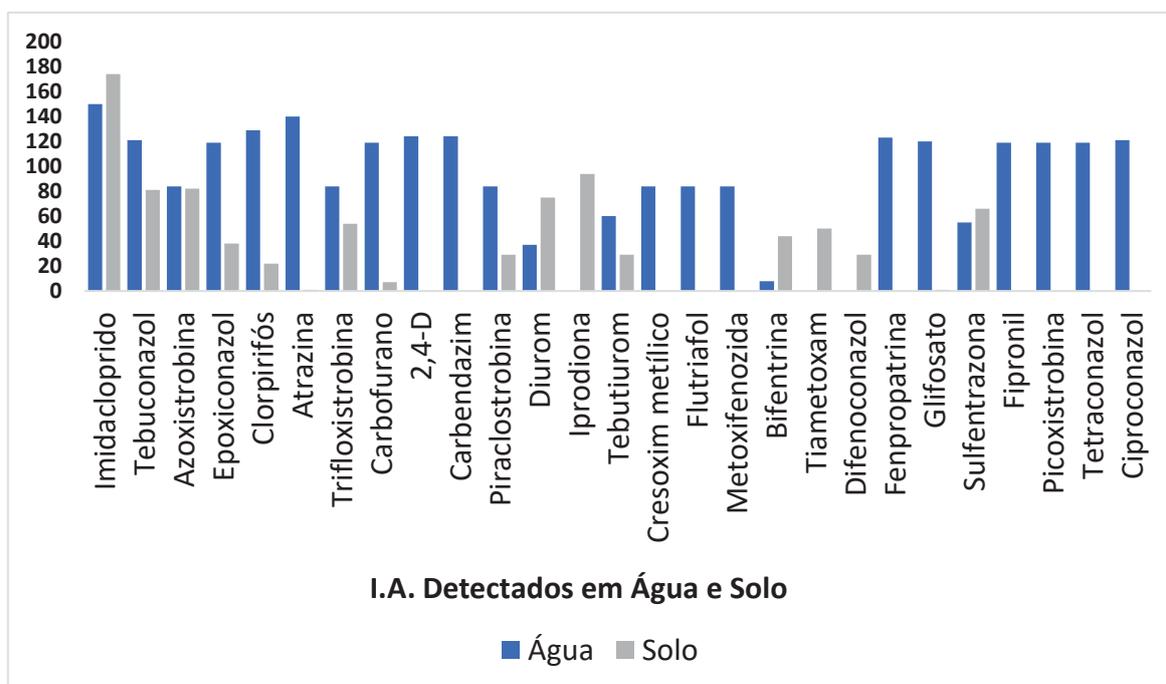


Fonte: Adaptado de Chawla, et al.¹⁸

A contaminação dos corpos hídricos e da água da rede de abastecimento é um assunto importante quando se fala em pesticidas. O Brasil possui as maiores reservas hídricas de água doce, a maior floresta úmida e as maiores áreas continentais alagadas do planeta, mas é também um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e está entre os maiores produtores agrícolas. Se olharmos dessa forma, a questão da contaminação das águas brasileiras pode ser vista como uma ameaça em escala global, com possível comprometimento da biodiversidade.⁹ Além das reservas hídricas, as águas da rede abastecimento também tem sido motivo de preocupação. Estudos já mostraram que em alguns estados, como Paraná, Santa Catarina, São Paulo, dentre outros, foram encontrados todos os 27 agrotóxicos testados na água potável distribuída à população.²¹ O Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Vigiágua) analisou dados coletados de 2018-2021, e constatou que do total de 41.780 amostras que foram analisadas, menos de 10% apresentaram quantidades de agrotóxicos acima do permitido por lei. Mais recentemente, em outubro de 2024,

foram divulgados dados de análise de agrotóxicos em água e solo, obtidos através do Projeto Piloto de Monitoramento Ambiental de Agrotóxicos em Água e Solo, realizado pelo IBAMA. A Figura 4 apresenta esses dados de detecção de ingredientes ativos em amostras de solo que foram coletados em áreas de diferentes cultivos e, também, em áreas de mata nativa próximas às áreas agrícolas. As amostras de águas superficiais foram coletadas em córregos, riachos, rios e represas, além de água da chuva. Foram 498 amostras analisadas para 300 substâncias diferentes, e, em 26,51% dos casos foi detectada a presença de pesticidas, dentre eles o glifosato em 120 dessas amostras de água e uma amostra de solo.²²

FIGURA 4- INGREDIENTES ATIVOS DETECTADOS EM AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA NO BRASIL NO PERÍODO DE 2019-2021.



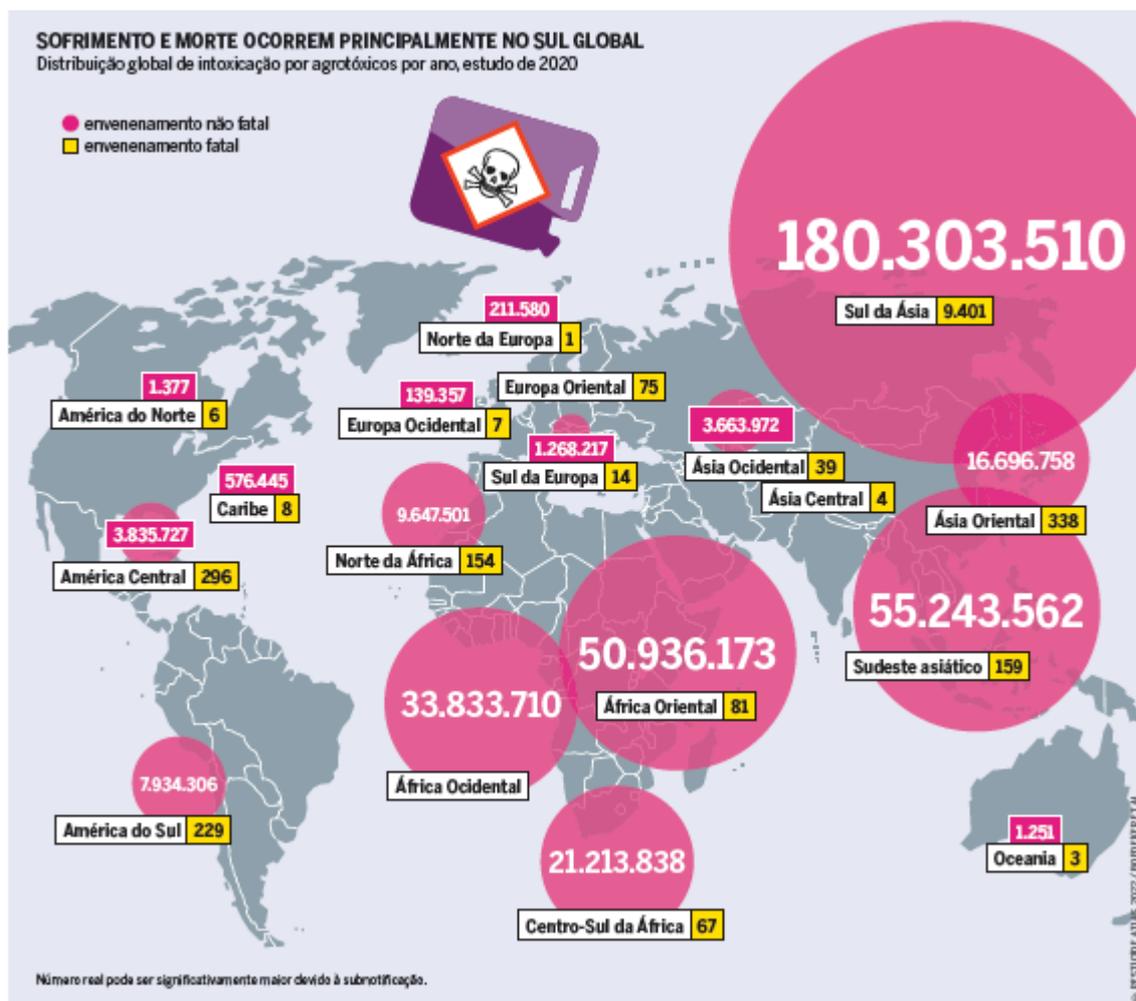
Fonte: Adaptado de IBAMA (2024).²²

Além desses agrotóxicos que estavam presentes em níveis detectáveis, outros pesticidas presentes em níveis não quantificáveis também foram detectados, o que pode evidenciar que as técnicas utilizadas não são as mais adequadas em relação aos limites de quantificação. Além disso, o Brasil apresenta uma legislação branda com relação a esses limites, na qual a quantidade permitida de glifosato, por exemplo, em água potável é 5000 vezes maior em relação ao limite estabelecido na União Européia (0,1 µg/L). Ainda, a legislação brasileira não considera o somatório dos resíduos dos ingredientes ativos presentes em uma

única amostra.⁹ Assim, o fato de não serem quantificáveis, não significa que não apresentem riscos, pois podem não estar sendo corretamente quantificados, e, mesmo em concentrações menores, quando misturados os efeitos tóxicos dessas substâncias podem ser potencializados.

Há que se ressaltar que nos mesmos estados e regiões em que foram encontrados esses agrotóxicos nas águas de abastecimento, também se encontram os maiores números de casos de intoxicação por uso dessas substâncias.²¹ As pessoas podem estar expostas a essas substâncias de modo intencional, ocupacional e acidental, sendo a primeira uma das principais formas de tentativas de suicídio e abortos, perdendo apenas para o uso de medicamentos e produtos domissanitários, ou seja, a 2° classe de produtos químicos mais relevantes nesse campo.⁸ O uso de agrotóxicos em tentativas de suicídio pode ser justificado pela facilidade de aquisição e acesso a essas substâncias, como o glifosato, por exemplo. De acordo com o Atlas dos Agrotóxicos 2023, no Brasil, o número de casos de intoxicação por agrotóxicos aumentou 97% no período entre 2010 e 2019. A nível mundial os números são alarmantes e são notificados cerca de 385 milhões de casos de intoxicação aguda não intencionais a cada ano, dos quais 11.000 são casos fatais. A Figura 5, compila dados de estudos científicos no mundo todo e apresenta um panorama geral dos números de casos em diferentes regiões do mundo. Nessa Figura pode-se observar que desse total de pessoas intoxicadas, aproximadamente 95% vivem em países do sul global, o que é justificado pelas regulamentações ambientais, de saúde e segurança mais brandas. Ainda, é estimado que cerca de 15 pessoas são intoxicadas por dia no Brasil, contabilizando um total de 5687 casos em um ano, onde cerca de 15% desses casos são crianças e adolescentes de 0-19 anos.⁹ Salientando que, apesar de alto o número de casos de intoxicação no país, a realidade é ainda pior quando se analisa que para cada caso de intoxicação registrado, há pelo menos outros 50 casos não notificados, um grave problema de saúde pública.^{6,21} Os riscos à saúde são diversos, e dependem não só da toxicidade do ingrediente ativo utilizado, mas também da quantidade da substância que a pessoa ficou exposta e do tempo que durou esse contato. Os efeitos vão desde dores de cabeça, diarreia, irritação na pele, tosse, mas também doenças crônicas como diabetes, obesidade, diferentes tipos de câncer, defeitos congênitos, doenças reprodutivas, desregulação endócrina, mal de Parkinson, entre outros.⁸

FIGURA 5- DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DE INTOXICAÇÃO POR AGROTÓXICOS POR ANO, ESTUDO DE 2020.



Fonte: Adaptado de Atlas dos Agrotóxicos (2023).⁹

Além de tudo que foi exposto acerca da quantidade de uso desses pesticidas no Brasil e no mundo, das detecções em alimentos, água e solos e dos casos de intoxicação, é preciso lembrar que não são utilizados somente agrotóxicos liberados no país. De acordo com dados fornecidos pela Polícia Federal, obtidos através de um levantamento realizado entre 2012-2022, tem aumentado a oferta de produtos não registrados nacionalmente. Em 538 ações de fiscalização foram apreendidas 46.212,8 kg e 65.789,3 L de agroquímicos que entraram de forma ilegal no país.²³ Esses produtos podem ser contrabandeados (trazidos de outros países para o Brasil, sem autorização das autoridades e sem registro para seu uso no país), e podem ser falsificados (produzidos a partir de produtos regularmente registrados no Brasil, mas não apresentam a concentração correta do ingrediente ativo registrado). De acordo com o MAPA, esses pesticidas ilegais devem

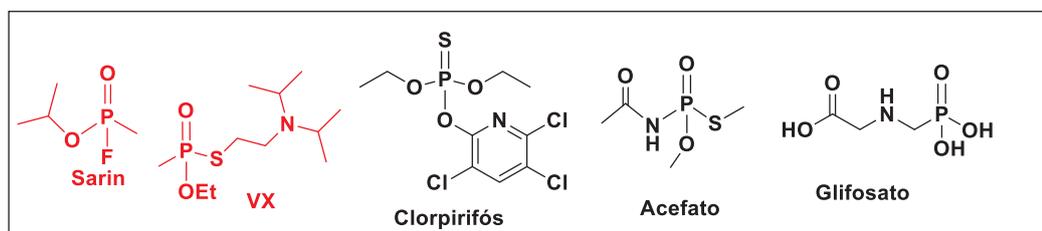
representar cerca de 20-25% do mercado de agrotóxicos no país.²⁴ É importante ressaltar que essas substâncias representam ainda mais riscos aos consumidores e também aos trabalhadores expostos à essas substâncias, pois não oferecem qualquer garantia de segurança aos trabalhadores e ao meio ambiente. Frente ao exposto, é clara a necessidade de se compreender como agem essas substâncias após sua aplicação, como se comportam no ambiente e de quais formas poderia ser possível minimizar suas consequências. É importante lembrar que essas substâncias são persistentes no ambiente e de difícil degradação devido a algumas de suas características químicas, que precisam ser estudadas e entendidas. Assim, conhecer melhor essa relação entre a estrutura química dos agrotóxicos e quais efeitos ela tem sobre a reatividade de cada molécula é de suma importância quando se busca a detecção, detoxificação e monitoramento dessas substâncias.

1.2 A QUÍMICA DOS AGROTÓXICOS: CLASSE DOS OF's

Desde a descoberta do dietil-difenil-tricloroetano (DDT) por Paul Muller em 1939, um pesticida organoclorado com alto poder tóxico e que foi largamente utilizado no combate de pragas e vetores de doenças durante as grandes guerras mundiais, muitas mudanças ocorreram em relação às estruturas químicas dos pesticidas.⁸ Quando em 1962 Rachel Carson publica seu livro “Primavera Silenciosa”, no qual levanta o alarme em relação ao uso do DDT e a possível extinção das populações de pássaros devido ao uso dessa substância, ocorre o banimento desse pesticida e o surgimento de novas classes de compostos, entre eles os organofosforados, carbamatos, piretróides, neonicotinóides, e outras.^{8,25} Vale ressaltar que mesmo essas outras classes de compostos também têm sido responsáveis pelo declínio das populações de aves, conforme constatado em estudos recentes nos Estados Unidos da América, em que se observou que essa taxa de declínio chega a 3% ao ano.⁹ O uso de OF's na agricultura é intenso e se justifica pelo amplo espectro em que agem essas substâncias, e, ainda, por seu custo relativamente baixo.^{19,26} Essas substâncias possuem uma estrutura química bastante semelhante à de algumas armas de guerra química, como o Sarin e os compostos da série VX, sendo essas também pertencentes à ampla classe de compostos OF's, o que evidencia a necessidade de detecção, monitoramento eficaz e detoxificação para esses compostos. Alguns exemplos dessas estruturas

podem ser observados na Figura 6, na qual, em vermelho estão representadas as estruturas do Sarin e do VX, e, na cor preta, alguns exemplos de pesticidas OF's.

FIGURA 6- REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS AGENTES DE GUERRA SARIN E VX (EM VERMELHO) E COMPOSTOS OF's UTILIZADOS COMO PESTICIDAS (EM PRETO).

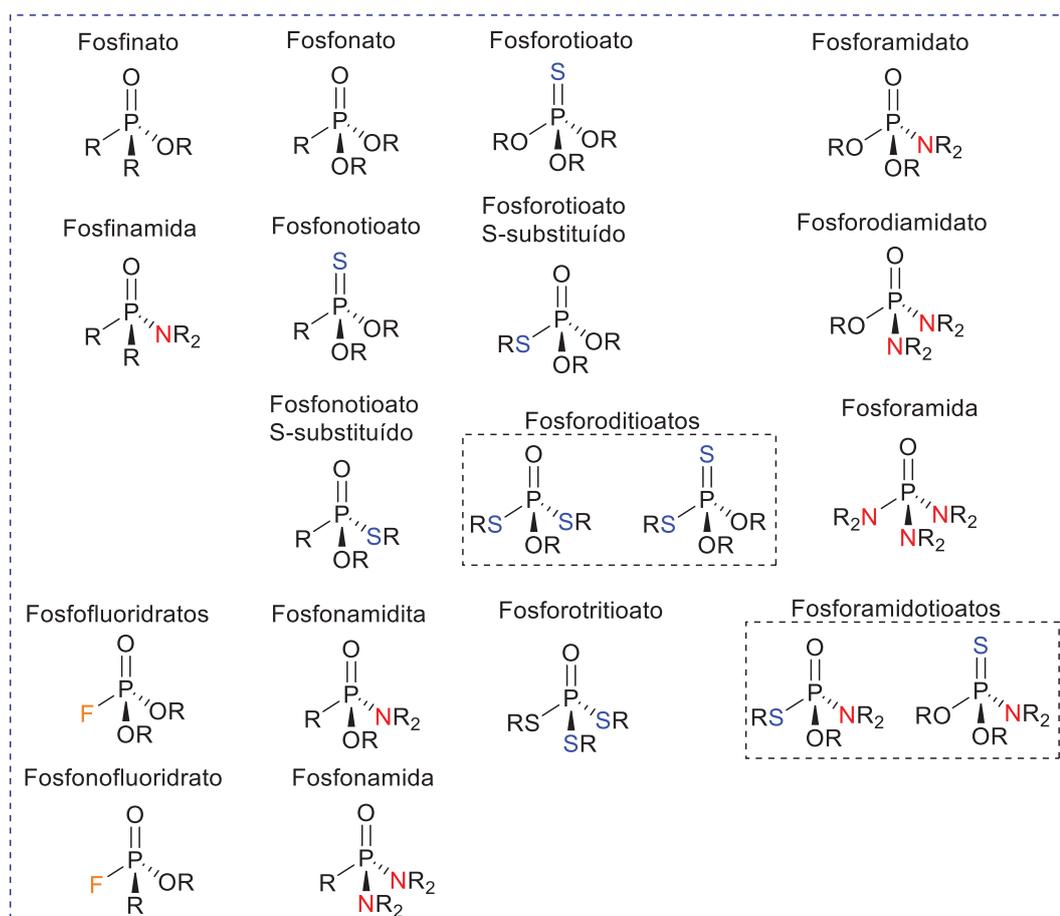


Fonte: O Autor (2025).

O mecanismo de ação da maioria desses agentes neurotóxicos (pesticidas OF's e armas químicas) se dá pela inibição irreversível da acetilcolinesterase (AChE), a enzima responsável por catalisar a reação de hidrólise da acetilcolina (ACh), que é um neurotransmissor do sistema nervoso central. Essa inibição ocorre por uma ligação covalente entre o sítio ativo da enzima e o organofosforado, fosforilando de forma não reversível a enzima e causando seu envelhecimento. Com o envelhecimento da enzima há acúmulo da ACh e as sinapses são interrompidas, ocasionando a síndrome colinérgica e podendo levar à morte.^{27,28}

O grupo de compostos OF's inclui todas as moléculas orgânicas que contém o átomo de fósforo, não somente a ligação carbofósforo (P-C), mas, também, as ligações P-O, P-N ou P-S. A fim de facilitar a nomenclatura dessas moléculas, os OF's form divididos em dois grandes grupos, de acordo com o número de ligações desses átomos de fósforo, podendo ser trivalentes ou pentavalentes, com números de oxidação de -3, como na fosfina (PR₃), a +5, como nos fosfatos P(O)(OR)₃. OF's pentavalentes são relativamente pouco reativos em relação aos OF's trivalentes, e, ainda, apresentam um grupo fosforil (P=O) ou tiofosforil (P=S) e geometria tetraédrica.²⁹ Quando essas moléculas apresentam o grupo P=S, são denominadas organotiofosforados (OTF's). Essas moléculas onde o fósforo faz cinco ligações com outros átomos ou grupos químicos são derivadas do ácido fosfórico e do ácido fosfônico³⁰ e exemplos de suas estruturas químicas e respectivas nomenclaturas podem ser observadas na Figura 7.

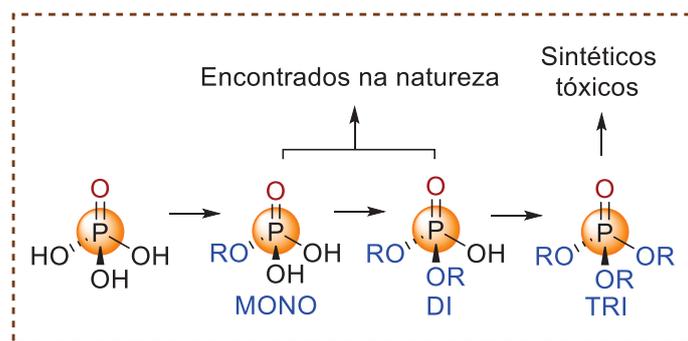
FIGURA 7- REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DE MOLÉCULAS OF's E SEUS RESPECTIVOS NOMES DE ACORDO COM O GRUPO SUBSTITUINTE.



Fonte: Adaptado de Ung (2023) e Gupta (2006).^{29,30}

A maioria das substâncias utilizadas como agrotóxicos e que pertencem à classe dos OF's fazem parte do grupo dos ésteres de fosfato. Essas moléculas são derivadas do ácido fosfórico e possuem um átomo de fósforo duplamente ligado a um átomo de oxigênio ou enxofre, formando um grupo fosforila ou tiosforila, respectivamente (Figura 8). Ressaltando que os triésteres não ocorrem de forma natural, enquanto mono e diésteres têm papel fundamental em diversas transformações bioquímicas.³¹ Essa ligação dupla do átomo de oxigênio com o átomo de fósforo é considerada não reativa, devido à alta energia necessária para sua dissociação, sendo, inclusive, força motriz para a reação de Wittig, por exemplo, onde há a formação desse tipo de ligação.²⁹ É importante ressaltar que as ligações P-O também são altamente estáveis, de difícil clivagem, o que acarreta longos tempos de degradação desses compostos.

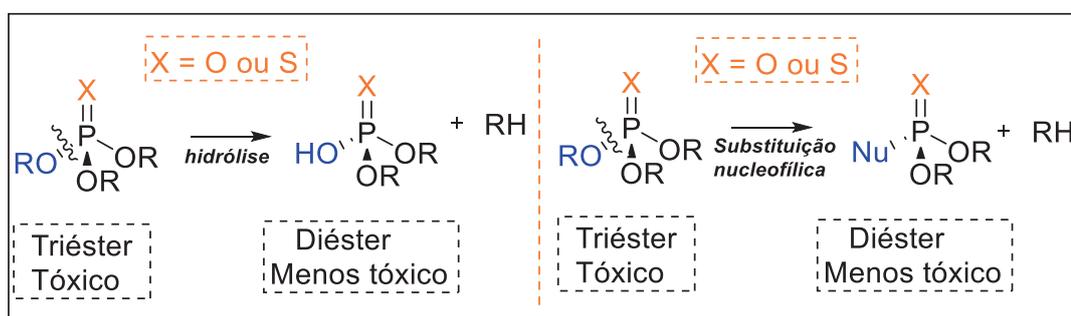
FIGURA 8- REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ÉSTERES DE FOSFATO (MONO-, DI- OU TRIÉSTERES).



Fonte: O Autor (2025).

Vale lembrar que essa estabilidade é bastante desejável quando se trata de armas químicas ou pesticidas, pois confere a essas substâncias alta persistência no ambiente e resistência a modificações químicas que possam alterar suas propriedades.³²⁻³⁴ Por esse motivo os processos de detoxificação (neutralização) dessas moléculas são necessários, pois através da neutralização pode-se obter produtos menos tóxicos em relação aos reagentes de partida (Figura 9). A compreensão dessas reações, bem como seus subprodutos também é relevante, visto que muitas vezes as reações de derivatização e/ou colorimétricas são fundamentais para a detecção de OF's. Diferentes possibilidades tem sido reportadas para se obter essa neutralização, via mecanismos de hidrólise e de reações de substituição nucleofílica, por exemplo.^{35,36}

FIGURA 9- ESTRATÉGIAS POSSÍVEIS PARA A DETOXIFICAÇÃO DE OF's



Fonte: Adaptado de Ferreira (2019).³⁶

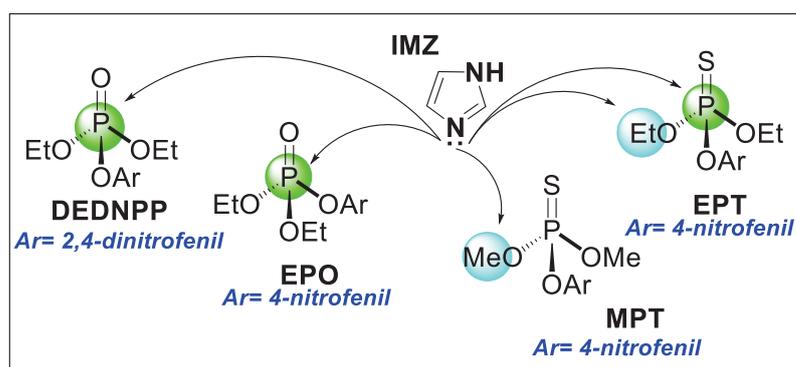
A hidrólise dos triésteres de fosfato, de forma geral, passa pela quebra da ligação P-O, levando, na maioria das vezes, a produtos menos tóxicos. Assim, é fundamental que se conheçam os possíveis produtos obtidos, pois em meios

aquosos a hidrólise pode ser competitiva a outras reações, impedindo a correta e eficiente detecção e detoxificação dessas substâncias. O mecanismo de hidrólise dessas moléculas, que é bastante lenta, pode se dar, em meio alcalino, pelo ataque do hidróxido ao átomo de fósforo, deslocando o álcool ou alcóxido. Já em valores de pH mais baixo, o grupo abandonador fosfato não apresenta carga (o grupo de saída é o ácido fosfórico neutro) e ocorre preferencialmente a quebra da ligação C-O.^{31,33,37,38} A hidrólise dos triésteres ocorre a uma velocidade maior em comparação com os ésteres mono- e dissustituídos. Esse comportamento pode ser explicado pela ausência de oxigênio aniônico na estrutura dos triésteres, o que reduz a repulsão eletrostática entre o nucleófilo e o substrato. Como consequência, a interação entre essas espécies é facilitada, tornando o processo de hidrólise mais eficiente.^{37,38}

Outra estratégia para a detoxificação de OF's se baseia na neutralização nucleofílica, que consiste na substituição de um dos grupos ligados ao átomo de fósforo por um nucleófilo, levando também à formação do diéster menos tóxico em relação ao triéster de partida, muitas vezes regenerando o nucleófilo. Diferentes reações de neutralização nucleofílica promissoras têm sido relatadas e utilizam nucleófilos como aminas, tióis, alfa nucleófilos, imidazol (IMZ) e seus derivados. Entretanto, uma dificuldade nesses processos de detoxificação via reações com nucleófilos, é que variações na estrutura do nucleófilo e também do OF influenciam na reatividade dessas moléculas e ocasionam mudanças mecanísticas podendo dar origem a diferentes produtos, nem sempre menos tóxicos do que os materiais de partida.³⁵ Por exemplo, a alta versatilidade catalítica do IMZ atuando como nucleófilo fica evidente em reações frente a diferentes compostos OF's e OTF's nas quais se pode constatar os diferentes caminhos pelos quais essas reações podem ocorrer. Ora o ataque do IMZ ocorre exclusivamente no átomo de fósforo,³⁹ no caso de OF's, ora o caminho preferencial é o ataque via S_N2 ao carbono alifático, levando ao IMZ metilado⁴⁰, quando frente à OTF's. Ainda, outra mudança ocorre quando o IMZ reage com o OTF etilparation (EPT, que contém o grupo P=S). Nesse caso, os grupos etila levam à ocorrência de ataques concomitantes ao átomo de fósforo e ao carbono alifático, conforme representado na Figura 10. O que pode ser justificado pelo efeito estérico do grupo metil ligado ao carbono que sofre o ataque do IMZ, e também, pela diminuição da eletrofilicidade desse carbono alifático, causada pelo efeito indutivo doador de elétrons do grupo metila ligado a esse

carbono.⁴¹ Essa diminuição na eletrofilicidade faz com que esse carbono alifático e o fósforo tenham um caráter eletrofílico mais próximo em intensidade, e, assim, a reação nucleofílica via fósforo ocorre competitivamente. Ainda, frente ao dietil-2,4-dinitrofenilfosfato (DEDNPP), que possui o grupo P=O (Figura 10), o ataque também é exclusivo no átomo de fósforo, formando o diéster menos tóxico, regenerando o catalisador nucleofílico.

FIGURA 10- CAMINHOS PREFERENCIAIS DO IMZ FRENTE A DIFERENTES OF's E OTF's.



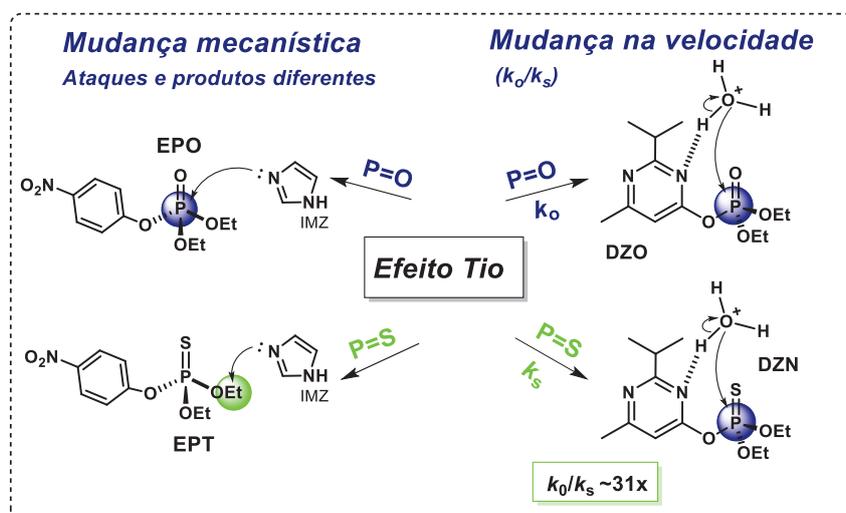
Fonte: O Autor (2025).

Outra questão importante referente à química dos compostos OF's é o “*thio effect*” (efeito tio, causado pela troca do átomo de oxigênio pelo de enxofre, representado na Figura 11), que leva a uma alteração na velocidade da reação. Isso explica a maior reatividade de OF's contendo o grupo P=O em relação aos OF's que contêm o grupo P=S.⁴⁰⁻⁴² Uma das explicações para essa diferença se baseia nas eletronegatividades relativas a esses átomos, de 2,1, 2,5 e 3,5 para o fósforo, enxofre e oxigênio, respectivamente. Dessa forma, a diferença nos valores de eletronegatividade entre as ligações P=O e P=S resulta em uma maior polarização da ligação entre fósforo e oxigênio, tornando-o mais eletrofílico em comparação ao átomo de fósforo na ligação com o enxofre.⁴⁰ Além disso, o efeito tio também pode afetar os mecanismos pelos quais esses compostos reagem. De forma geral, para ésteres contendo P=O e P=S, em meios ácidos o grupo de saída é, respectivamente, o ácido fosfórico e o ácido tiosfosfórico.^{32,33} Mas, frente a um nucleófilo, como o IMZ, por exemplo, esse comportamento não se mantém, e OTF's como o MPT (Figura 11) podem sofrer também o ataque no carbono alifático, exclusivo ou concomitante ao ataque ao fósforo.⁴⁰ Outro exemplo de mudança decorrente do efeito tio ocorre com o pesticida Diazinon, que, em meio ácido, tanto

o Diazinon como seu análogo P=O, o Diazoxon, sofrem ataque via átomo de fósforo, não apresentando mudanças mecanísticas, mas, sim, sofrendo modificação na sua velocidade, diminuindo sua reatividade (k_0/k_s) para o composto P=S em aproximadamente 31 vezes (Figura 11).

Em resumo, pode haver mudanças de velocidade, onde os compostos P=S são menos reativos, mas também pode haver mudanças mecanísticas levando à obtenção de diferentes produtos.

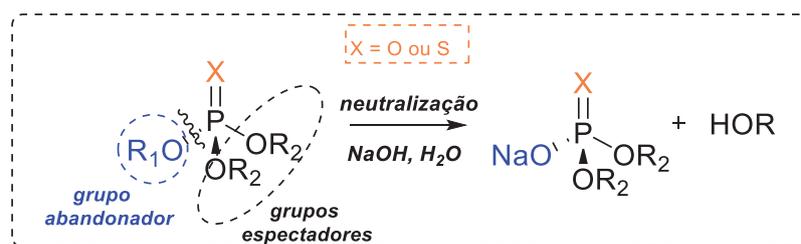
FIGURA 11- EFEITO TIO EM REAÇÕES COM OP's.



Fonte: O Autor (2025).

Outro estudo bastante interessante que avalia o efeito tio na reação de hidrólise alcalina de OF's, propôs uma nova relação do tipo Brønsted para a hidrólise alcalina (um dos caminhos para a neutralização) de uma série de triésteres de fosfato (P=O) e tiofosfato (P=S). O estudo correlacionou os próprios dados experimentais com um conjunto de dados obtidos da literatura (mais de 50 dados compilados), obtendo uma equação bilinear, que considera os efeitos dos grupos abandonadores (diretamente envolvidos na clivagem da ligação P–O) e dos grupos não abandonadores, ou grupos espectadores (permanecem ligados ao átomo de fósforo)⁴³, representados na Figura 12.

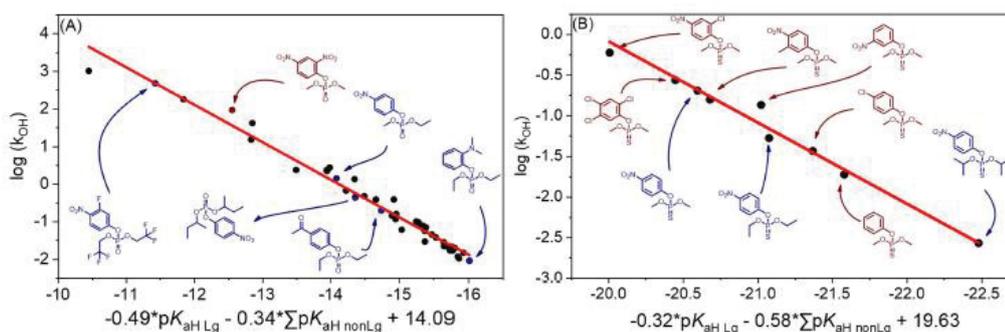
FIGURA 12- ESQUEMA DA REAÇÃO DE NEUTRALIZAÇÃO E A POSIÇÃO DE GRUPOS ABANDONADORES E GRUPOS ESPECTADORES NA ESTRUTURA QUÍMICA DE OF's.



Fonte: Adaptado de Silva e Orth (2023).⁴³

Essa diferença nas reatividades de organofosfatos (P=O) e organo(tio)fosfatos (P=S), decorrente do efeito tio, que envolve a magnitude da influência de grupos abandonadores e espectadores, pode ser observada na Figura 13, onde em (A) está o *plot* de Bronsted bilinear para os compostos P=O e em (B) o *plot* de Bronsted bilinear para os compostos P=S. Foi observado que o grupo abandonador contribui mais para a reatividade dos organofosfatos (P=O), enquanto os grupos espectadores afetam mais a reatividade dos organo(tio)fosfatos (P=S). E, ainda, esse estudo também evidenciou que triésteres de tiofosfato são menos reativos em comparação aos respectivos ésteres de fosfato.⁴³

FIGURA 13- PLOT DE BRONSTED BILINEAR PARA COMPOSTOS (A) P=O E (B) P=S.



Fonte: Adaptado de Silva e Orth (2023).⁴³

São diversas as particularidades em relação às características decorrentes da estrutura química dos OF's, e, como observado anteriormente (exposto na Figura 7), são bastante variadas as possibilidades de átomos/grupos substituintes nessas moléculas OF's. Nesse trabalho nosso foco foi o estudo com dois organofosforados: acefato, que pertence à classe dos fosforoamidotioatos e o

glifosato, pertencente à classe dos fosfonatos. Essas moléculas são análogas aos fosfatos, especialmente os fosfonatos, que possuem um grupo CH_2 substituindo um oxigênio na molécula. Apesar dessa substituição, a estrutura global da molécula permanece praticamente inalterada, pois os dois grupos ocupam espaços semelhantes no ambiente molecular (são isostéricos).²⁹ Assim, é particularmente importante esclarecer brevemente um pouco sobre a reatividade química e as singularidades desses dois OF's, a fim de facilitar a compreensão dos resultados obtidos nesse trabalho.

1.2.1 ACEFATO

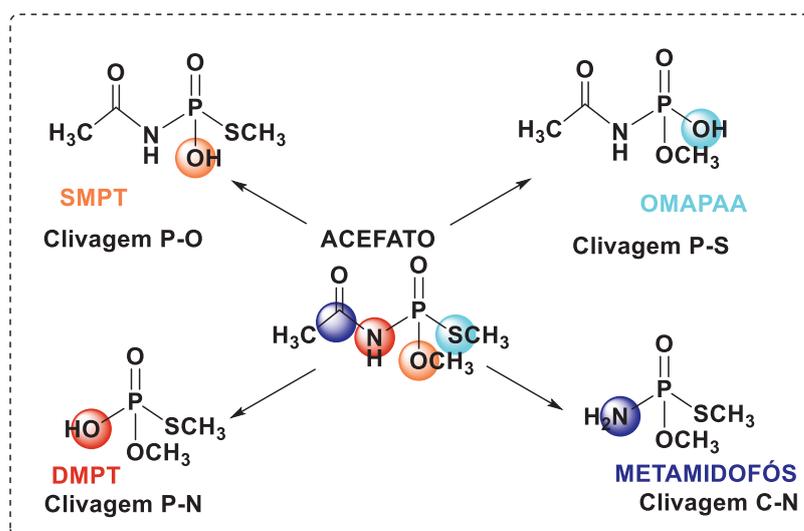
O acefato pesticida foi introduzido pela Chevron Química em 1971, e somente em 1973 foi registrado na Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA).^{20,44,45} O acefato (O,S-dimetil-acetil-fosforoamidotioato) se apresenta como um sólido branco, com odor característico e fórmula química $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_3\text{PS}$. Ainda, apresenta uma solubilidade de 790 g/L em água a 20 °C, além de ser solúvel também em etanol e acetona, e está registrado (CAS Registry N° 30560–19-1) sob o nome comercial Orthene®. Trata-se de um agroquímico da classe dos inseticidas da família dos OF's, e, de forma geral, esses inseticidas OF's são da classe dos fosfortioatos (possuem um átomo de enxofre ligado ao fósforo, $\text{P}=\text{S}$ no lugar de $\text{P}=\text{O}$ ou $\text{P}-\text{S}$).²⁹

O acefato apresenta em sua estrutura química grupos $-\text{CH}_3$ ligados a oxigênio e enxofre (que podem ser observados na Figura 8), e, de acordo com Metcalf e Horowitz⁴⁶, a presença desses grupos, assim como grupos etil ou amino, são bastante desejáveis para o design de um inseticida, pois equilibram sua solubilidade. Pois sem a presença desses grupos, o grupo hidroxila ou tiol livre estaria ionizado em condições fisiológicas, o que impediria uma boa biodisponibilidade do inseticida, pois moléculas carregadas atravessam com mais dificuldade membranas biológicas. Além disso, esses substituintes também são determinantes na velocidade na qual o resíduo de serina da acetilcolinesterase fosforilada retorna ao seu estado ativo: indo de horas para ésteres metílicos a dias com ésteres etílicos. A explicação se dá em razão do alvo do acefato, AChE, que fica inativada por fosforilação de um resíduo de serina. Esses substituintes (metil ou etil) determinam quanto tempo a enzima permanece inativada, pois ésteres

metílicos são mais fáceis de serem removidos, assim a enzima pode se reativar em horas. Enquanto ésteres etílicos são mais estáveis, e nesse caso a reativação leva dias.⁴⁶ Inseticidas OF's são absorvidos pelas raízes e transportados sistemicamente para as folhas e caule das plantas, onde se acumulam, em seguida os insetos absorvem o inseticida e conseguem rapidamente metabolizar o acefato a metamidofós.⁴⁴ Assim, a eletrofilicidade do fósforo também é fundamental para a bioatividade, e como o fósforo nos compostos P=S e P-S é menos eletrofílico em relação a compostos P=O, esses tióis são menos reativos em relação à acetilcolinesterase. Assim, são necessárias várias horas para a oxidase *in vivo* converter tióis em compostos óxons P=O ativos. Esse atraso permite menor toxicidade em mamíferos, pois parte do inseticida pode ser eliminada durante esse processo, enquanto ainda é ativo contra insetos de metabolização mais rápida.⁴⁶

A toxicidade do acefato é atribuída à bioativação por meio da conversão metabólica em metamidofós, que é mais tóxico do que o próprio acefato.^{44,47} Essa conversão ocorre rapidamente em solos e meios aquáticos. Os valores de referência para a toxicidade do acefato em mamíferos é de 900 mg/Kg, considerada toxicidade moderada, enquanto para o metamidofós esses valores de referência são de 13 mg/Kg²⁰, evidenciando sua alta toxicidade, de forma que se torna importante encontrar métodos de detecção e detoxificação para ambos.⁴⁸ Tanto o acefato como o metamidofós apresentam um átomo de fósforo estereogênico e no caso do acefato a quebra das ligações P-S, P-O, P-N e C-N são os quatro caminhos reacionais possíveis, conforme apresentado na Figura 14. O metamidofós (*O,S*-dimetilfosforamidoditioato) é o produto da clivagem da ligação C-N via hidrólise em condições ácidas ou enzimáticas, observada em solos, plantas e nos insetos. Já as ligações P-S e P-O, que clivam mais facilmente, levam aos produtos *O*-metil-*N*-acetilfosforamidato (OMAPAA) e *S*-metil-*N*-acetilfosforamidotioato (SMPT), respectivamente. E, se a quebra ocorrer na ligação P-N, o produto obtido é o *O,S*-dimetil-*O*-fosforotioato (DMPT).⁴⁹

FIGURA 14- REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO ACEFATO E OS PRODUTOS RESULTANTES DAS 4 POSSÍVEIS CLIVAGENS DE LIGAÇÕES (P–O, P–S, P–N E C–N).



Fonte: O Autor (2025).

A ligação P–N do acefato é altamente estável devido à presença do grupo CH_3CO , que não está presente no metamidofós, tornando-o mais reativo quando comparado ao acefato.²⁰ Tal fato pode ser explicado pela possibilidade de conjugação entre o par de elétrons livres do nitrogênio do grupo amida do acefato e os elétrons da ligação π do grupo carbonila. Essa deslocalização também confere maior densidade de elétrons ao oxigênio em relação ao nitrogênio, tornando o oxigênio o alvo do ataque eletrofílico, e não o nitrogênio. Da mesma forma, a ligação C–N é difícil de ser clivada, pois faz parte do grupo amida do acefato, que é menos reativa em relação às aminas pelo mesmo motivo, a deslocalização entre os elétrons π da carbonila e o par de elétrons livres do nitrogênio.⁵⁰ Ao contrário, a ligação P–S é considerada a mais susceptível ao ataque dos íons hidróxido da água, ou seja, a que apresenta a menor barreira energética em comparação aos demais caminhos possíveis, das quebras de ligação P–O, P–N e C–N, de acordo com estudos teóricos onde foi intensamente avaliada a reação de hidrólise do acefato.^{51,52} Ainda, a hidrólise desse pesticida é mais favorecida com aumento de temperatura, sendo mais difícil a ocorrência da reação em temperatura próxima à ambiente. Estudos apontam que a 20 °C em uma faixa de pH 4,0-6,9 menos de 20% do acefato foi hidrolisado em cerca de 20 dias, e um aumento na temperatura não altera de forma significativa esses resultados. Na mesma temperatura, em pH mais elevado (8,9) também cerca de 22% do acefato sofreu hidrólise, ao passo que a 30 °C, no mesmo pH 8,9, em 20 dias restavam somente 17,8% do acefato,

evidenciando que a temperatura tem um papel significativo na degradação do acefato. Já estudos sobre a degradação do acefato frequentemente envolvem a degradação no meio ambiente através da via bacteriana, observando uma maior taxa de degradação do acefato em solos mais alcalinos e com menor teor de ferro e alta atividade microbiana.²⁰

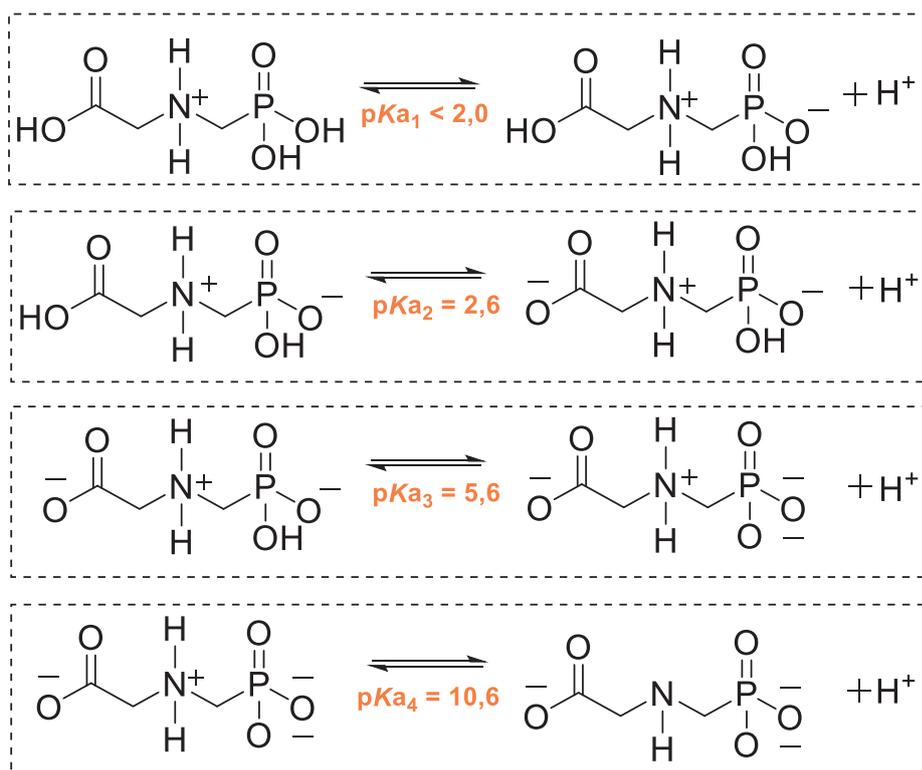
Frente a tantos detalhes e possibilidades de caminhos reacionais fica evidente a importância de se compreender mais sobre esses caminhos, tanto quando se busca detoxificar, como quando se busca detectar essas moléculas, e nesse campo o acefato ainda carece de estudos. Em levantamento recente acerca de estudos que envolvem o acefato constatou-se que a maioria das pesquisas sobre esse agroquímico, envolvem avaliar sua eficiência como inseticida, seguidos por estudos que avaliam sua toxicidade e em terceiro lugar, estudos que buscam métodos eficientes para sua detecção, e o Brasil está entre os países que apresentaram o maior número de publicações sobre o acefato.⁴⁴ Além disso, somente no ano de 2021 foram comercializadas 36 mil toneladas desse inseticida no país, ano em que o acefato ocupou a 6^o posição no ranking dos mais vendidos, lembrando que esse pesticida é liberado no Brasil, mas proibido na União Européia. Além do acefato, temos interesse também na pesquisa com o glifosato, e, assim, compreender um pouco mais sobre a química desse herbicida também é relevante.

1.2.2 GLIFOSATO

O glifosato (*N*-(fosfonometil)glicina, de fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$, CAS Number:1071-83-6) é um herbicida de amplo espectro, sistêmico e pós-emergente, que está presente em diferentes formulações e é o mais vendido no mundo.^{53,54} Foi sintetizado e comercializado na Suíça em 1950, mas seu efeito herbicida foi descoberto em 1970 por John Franz, e registrado em 1974 pela Monsanto com o nome comercial Roundup®.⁵⁵ O glifosato se apresenta como um sólido branco cristalino, inodoro, muito solúvel em água (12 g/L a 25 °C), e praticamente insolúvel em solventes orgânicos comuns, como por exemplo, acetona e etanol. O grau de dissociação do glifosato é fortemente dependente do pH, sendo que os grupos fosfato e carboxílicos presentes em sua estrutura são os que possuem maior caráter ácido, e, dessa forma, o último hidrogênio a ionizar é o que está ligado ao nitrogênio.⁵⁶ A Figura 15 apresenta a estrutura química do glifosato e a sequência

de equilíbrios que descreve o pH no qual ocorrem essas dissociações e qual hidrogênio se dissocia, com os respectivos valores de pK_a : $pK_{a1} < 2,0$, $pK_{a2} = 2,6$, $pK_{a3} = 5,6$ e $pK_{a4} = 10,6$.⁵⁷ Abaixo de pK_a 2,0 (~0,8) cerca de 50% do glifosato apresenta o nitrogênio protonado, enquanto que uma fração das moléculas restantes já começa a apresentar também a protonação em um dos hidrogênios do grupo fosfato. Em pH 2,6 50% das moléculas já apresentam essas duas dissociações, e, quanto mais próximo do pH 5,6 maior a fração de moléculas com três dissociações. Após esse pH 5,6 essa fração aumenta, até atingir o pH 10,6, quando estarão presentes moléculas do glifosato com três e quatro dissociações. Assim, somente acima do pH ~11 o glifosato se apresentará totalmente dissociado.^{56,57}

FIGURA 15- REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO GLIFOSATO E A SEQUÊNCIA DE DISSOCIAÇÕES COM SEUS RESPECTIVOS VALORES DE pK_a .



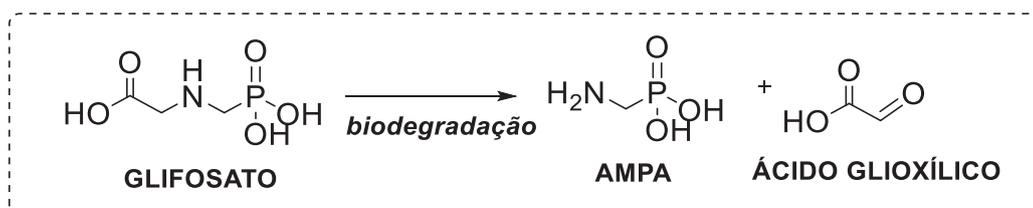
Fonte: Adaptado de Coutinho e Mazo (2005).⁵⁷

O glifosato foi classificado como “provavelmente carcinogênico” pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer em 2015, associando-o ao linfoma não-Hodgkin, problemas reprodutivos e danos aos órgãos.^{53,58} Entretanto, esse pesticida foi objeto de debates contínuos devido a preocupações relacionadas

à saúde e ao meio ambiente. A questão envolve considerações sobre sua eficácia agrícola, possíveis impactos na saúde humana e efeitos ambientais. Recentemente, a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (*International Agency for Research on Cancer* (IARC)), classificou o glifosato como “Grupo 2A - provavelmente carcinogênico para humanos”, enquanto agências reguladoras européias e internacionais consideraram o herbicida seguro quando utilizado conforme as diretrizes estabelecidas. Isso se dá devido ao uso de diferentes conjuntos de dados e diferentes abordagens metodológicas sobre como os dados de toxicidade foram ponderados e avaliados.^{59,60} Recentemente, em novembro de 2023 a *European Chemicals Agency* (ECHA) adotou o Regulamento de Implementação para renovar, por 10 anos, a aprovação do glifosato.⁶¹ No Brasil, em 2020, a Anvisa reavaliou o glifosato e também teve seu registro mantido com restrições após a reanálise, conforme disposto na RDC nº 441, de 2 de dezembro de 2020.¹²

O principal produto da biodegradação do glifosato é o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (Figura 16), que apresenta menor toxicidade aguda em relação ao glifosato, mas é mais persistente no ambiente, o que faz com que seu uso intensivo e acumulação levem a danos ao ambiente e à saúde humana.⁶²

FIGURA 16- REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO GLIFOSATO E SEU PRINCIPAL PRODUTO DE DEGRADAÇÃO – AMPA.



FONTE: O Autor (2025).

Em plantas, o mecanismo de ação do fosfonato (como o glifosato) se dá pela inibição da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que faz parte da via biossintética de aminoácidos da glicose. Vale ressaltar que essa enzima é específica para plantas e não existe em mamíferos, e é a interrupção eficiente dessa via de síntese de aminoácidos que causa a morte de muitas plantas sem seletividade, o que faz do glifosato um potente herbicida de amplo espectro.

Ainda, dentre cerca de 120 milhares de compostos que já foram testados para inibir EPSPS, apenas o glifosato foi comercializado até agora.²⁹

Além da toxicidade do próprio glifosato, a maioria das formulações desse herbicida que estão disponíveis no mercado contém um surfactante para dificultar a formação de gotas e garantir que o alcance se restrinja à área de pulverização.^{56,63} A eficácia biológica do glifosato, talvez mais do que qualquer outro herbicida, está diretamente ligada à presença desse surfactante na solução de pulverização.⁶³ Entretanto, essas moléculas de surfactantes utilizadas nas formulações dos herbicidas baseados em glifosato são do grupo das etilaminas, e são mais tóxicas do que o próprio princípio ativo.⁵⁶ Devido às questões de toxicidade e níveis de contaminação, tanto do meio ambiente como de alimentos, fica clara a necessidade de tecnologias para detectar resíduos de pesticidas, pois como mencionado anteriormente, o glifosato é o agrotóxico mais utilizado no Brasil e no mundo, e até hoje pouco detectado.

1.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE OF's.

A problemática que envolve a questão dos agrotóxicos é bastante complexa e abrange desde os casos de intoxicação já mencionados, que são um problema de saúde pública mundial, até a questão do monitoramento e da rastreabilidade desses pesticidas. É preciso lembrar que além de produtos legalizados para uso no Brasil, existe também um comércio intenso de agrotóxicos não legalizados, que estão irregulares no país e que podem ser oriundos de comercialização proibida e contrabando. Ainda, há dificuldade no monitoramento e fiscalização dessas substâncias, pois as normas ambientais e relacionadas à saúde humana são frequentemente atualizadas — as substâncias podem ser reavaliadas e, conseqüentemente, a listagem de substâncias proibidas também precisa ser frequentemente revista. Assim, é fundamental o desenvolvimento de metodologias eficientes de monitoramento, possibilitando também a rastreabilidade dessas substâncias. Além disso, no que diz respeito a grandes desastres envolvendo substâncias perigosas como os OF's, reconhecer a substância responsável por um incidente e avaliar sua extensão, proporciona a capacidade de gerenciar de maneira estratégica as conseqüências e elaborar um plano de ação eficaz, evidenciando a importância da detecção e do monitoramento dessas substâncias. Ainda, a detecção possibilita a rastreabilidade desses agrotóxicos, o que viabiliza

a identificação de sua origem geopolítica, bem como, pode gerar a formação de um banco de dados sobre esse tipo de substâncias, o que resolveria um grande problema da criminalística nacional.

Frente ao exposto, é evidente a necessidade de monitorar a presença de OF's na alimentação humana e no ambiente como um todo, e, para isso, a detecção tem papel fundamental. O desafio de detectar resíduos de glifosato usando um método analítico simples se dá pelas suas características químicas, como seu caráter iônico, alta polaridade e solubilidade em água, difícil evaporação, baixa solubilidade em solventes orgânicos comuns, baixa volatilidade, e comportamento de complexação favorecido, o que favorece sua absorção em solos.⁶⁴ Já o acefato apresenta alta solubilidade em água, sofre hidrólise em meio alcalino, tem elevada polaridade e baixa sorção em solos.⁴⁵ Todas essas características decorrentes da estrutura química, e também a ausência de grupos cromóforos nas moléculas de glifosato e também do acefato, justificam a dificuldade de detectar e monitorar a presença dessas espécies em solos, águas e alimentos. Portanto, metodologias mais específicas são necessárias, como representado na Tabela 1, e, nesse sentido, diversos estudos têm sido descritos na literatura utilizando diferentes técnicas para buscar a detecção desses OF's, em alguns casos através de reações de derivatização. Nessa Tabela 1 estão presentes alguns exemplos desses diferentes métodos de detecção utilizados, como métodos espectroscópicos, eletroquímicos, cromatográficos, colorimétricos (via inibição enzimática) e colorimétricos associados a outras técnicas de detecção. Essas técnicas apresentam vantagens e desvantagens inerentes a cada uma delas, mas, apesar de algumas desvantagens, essas técnicas são bem consolidadas para uma ampla gama de analitos. O glifosato e o acefato, devido às suas características físico-químicas já citadas acima, se mostram um pouco mais desafiadores, pois necessitam de métodos de pré-tratamento devido à sua elevada solubilidade em água e alta polaridade.⁴⁵

As técnicas espectroscópicas⁶⁵⁻⁷⁴ são baseadas em fenômenos como absorção, emissão, espalhamento Raman de superfície aprimorada (SERS), ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância de plasmon de superfície. Essas técnicas são relativamente simples de ser realizadas, são precisas e requerem quantidade mínima de reagentes para as análises. No entanto, dependem de equipamentos que vão de custos moderados a altos e, ainda,

algumas dessas técnicas requerem que as moléculas a serem analisadas apresentem grupos cromóforos em sua estrutura química.⁷⁵ Um estudo interessante foi conduzido por Jan e colaboradores⁷⁶, no qual o método foi aplicado com sucesso para determinação de resíduo de glifosato em grãos de trigo. O estudo consistiu em reagir o herbicida glifosato com *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) em um meio alcalino, e um produto amarelo foi formado após acidificar o meio com ácido clorídrico. A absorvância do produto foi medida a 405 nm, usando a técnica *Flow Injection Analysis* (FIA) aliada a medidas espectrofotométricas. A molécula de glifosato é rica em elétrons no átomo de nitrogênio, que ataca a molécula de DMAB em um grupo carboxílico e forma intermediários instáveis por meio da reação de Cannizzaro. A limitação deste método é que o AMPA, um metabólito do glifosato, afetará a determinação de glifosato em amostras ambientais reais, especialmente se estiver presente em alta concentração.^{75,76} Outro estudo reporta a utilização da técnica de Espectroscopia Raman de Superfície Aprimorada (SERS) aplicada à detecção de acefato, cujos resultados mostraram a detecção desse inseticida em níveis muito baixos, na faixa de partes por bilhão (ppb), tanto em amostras de vapor como em urina. Entretanto, o estudo também destaca a necessidade de buscar formas de melhorar a estabilidade dos sensores e também a sua capacidade de diferenciar o acefato de outros pesticidas e de seu metabólito, o metamidofós.⁶⁵

Também são muito utilizadas técnicas de detecção eletroquímica⁷⁷⁻⁸⁰, que são altamente seletivas, entretanto o preparo de eletrodos é considerado complexo e, ainda, precisam de pré ou pós-derivatização, ou pré-tratamento de amostras. Além disso, há limitações quanto à reprodutibilidade e realização das análises em campo, devido à necessidade de equipamentos de ponta para sua aplicação.⁶² Diversos tipos de sensores e biossensores eletroquímicos tem sido estudados para detecção de glifosato, como por exemplo, um biossensor baseado na enzima peroxidase de raiz-forte (HRP), preparado com um filme composto de poli(2,5-dimetoxianilina), dopado com poli(ácido 4-estireno sulfônico) em um eletrodo de ouro. A enzima HRP foi imobilizada no filme, e sua atividade foi inibida pelo glifosato, permitindo a detecção do herbicida.⁸¹

Outros métodos amplamente estudados se baseiam nas técnicas cromatográficas⁸²⁻⁸⁷ acopladas ou não a espectrometria de massas. Esse tipo de técnica analítica é usada para a separação física de solutos, e depende de

características como polaridade, tamanho, massa molecular, entre outras.⁷⁵ São métodos seletivos e de alta sensibilidade, mas que dependem da vida útil das colunas cromatográficas e também da complexidade das matrizes a serem analisadas, do alto custo de reagentes e necessidade de pré-tratamento de amostras, o que pode dificultar e aumentar o tempo de análise e, conseqüentemente, o custo do processo.^{75,88} Entre os métodos cromatográficos, o mais sensível para detecção de glifosato é a cromatografia líquida usando extração em fase sólida acoplada à espectrometria de massa com ionização por eletrospray (LC-SPE-ESI/MS/MS).⁶² A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução foi utilizada para a detecção de acefato em amostras de água e os resultados indicaram que a técnica é sensível e apropriada para análises de exposição ao pesticida.⁸⁹

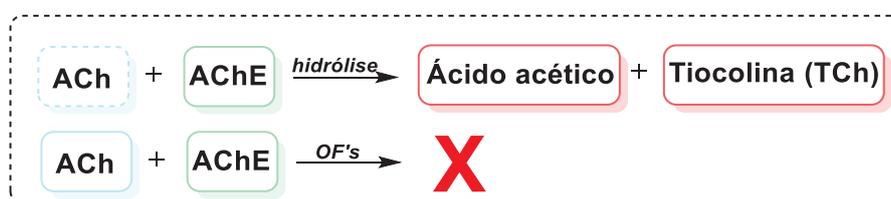
TABELA 1- MÉTODOS DE DETECÇÃO DE OF'S.

	Método detecção	OF	Vantagem	Desvantagem	Ref
Espectroscópicas	Espectroscopia Raman (sensor SERS prata) - detecção em fase vapor	acefato	Detecção em ppt, adsorção seletiva, análise fase vapor, reprodutibilidade	Alto custo, complexidade da técnica, requer laboratórios com equipamentos específicos, detecção somente em água ultrapura	65
	Espectroscopia Raman (sensor SERS (AgNPs))	dimetoato			
	Espectroscopia Raman (sensor SERS) e polímeros impressos molecularmente (MIPs) e AgNPs	2,4-D			
	Ressonância de plasma de superfície localizada (LSPR) e AuNPs	dimetoato			
	NTC modificados com AgNPs e detecção por fluorescência	dimetoato			
	Kit portátil (hidrogel de sacarose + nanopartículas de Cu) e detecção por fluorescência	dimetoato			
	AuNPs funcionalizadas com Rodamina B e detecção por fluorescência	dimetoato			
	71				
Eletroquímicas	Microdispositivo coulométrico: H ₂ O ₂ - inibição atividade enzimática	diazinon, acefato	Alta sensibilidade, resposta rápida, para aplicação <i>in situ</i>	Utiliza duas enzimas - alto custo, depende de um eletrodo versátil e com menos etapas de pré-tratamento e imobilização de enzima que não bloqueie os sítios de ligação	77
	Sensor eletroquímico (eletrodo Au modificado com ZnNPs)	paraoxon, metilparation, fenitroton			78
Cromatográficas	Cromatografia líquida/espectrometria de massa (MS/MS)	p- nitrofenol (resíduo)	Método rápido, sensível e seletivo	Requer processos de derivatização, equipamento considera vida útil da coluna, matrizes complexas	82
	Cromatografia líquida/espectrometria de massa (MS/MS)	acefato, metamidofós			83
	Cromatografia gasosa	glifosato			84
	Cromatografia gasosa	acefato			85
	Cromatografia gasosa	acefato			86
	AuNPs em H ₂ O ₂	dimetoato			92
Colorimétricas (inibição da atividade enzimática)	Nanopartículas magnéticas Fe ₃ O ₄ , H ₂ O ₂ e substrato cromogênico TMB	acefato, metilparaoxon	Detecção rápida e simples, possibilita leitura visual e sem equipamentos	Uso de multi enzimas- alto custo, dificuldade de armazenamento e manutenção de células, purificação de AChE (alto custo), condições específicas de reação, uso do Reagente de Ellman pode levar a falsos negativos (devido à presença de grupos tiol e oximas nos compostos e à	93
	AuNPs revestidas com citrato como sonda colorimétrica	metamidofós			94
	Derivatização com Reagente de Ellman (DTNB)	metamidofós			95,96
	NWs MnOOH e substrato cromogênico TMB- detecção por sensor colorimétrico de papel	ometoato, diclorvós			97
	Nanozimas de GeO ₂ e substrato cromogênico TMB	paraoxon			98

				sensibilidade do reagente à luz	
Colorimétricas (associadas a outras técnicas de detecção)	Derivatização com BNP-Cl e CNP-Cl	glifosato		Algunas técnicas de detección associadas podem ser mais complexas e de alto custo (ou necessitam equipamentos específicos e estruturas laboratoriais, nem sempre podem ser utilizados <i>in situ</i>).	105
	Derivatização com CNFB+ detector UV	glifosato			100
	Derivatização com ninidrina e Na ₂ MoO ₄ associado a detector UV	glifosato			101
	Derivatização com FMOC + detector UV e derivatização com FMOC + HPLC	glifosato			102, 103
	Derivatização com CS ₂ e Cu ²⁺ associado a detector UV	glifosato			104
			Processos simples, geralmente possibilitam mudança de cor e detecção rápida		

Buscando simplificar essas análises, outras técnicas que têm despertado interesse são as colorimétricas, baseadas em mudança de cor. Esse tipo de detecção ocorre quando o analito (OF, nesse caso) interage com um reagente específico (uma molécula derivatizante) e forma um produto colorido. Essa técnica é fundamentada no princípio da Lei de Lambert-Beer, que é baseada na absorvância de espécies absorventes (átomos, moléculas ou íons) e relaciona linearmente a intensidade da cor da amostra com a concentração de analito presente no meio.⁹⁰ O uso dessa técnica colorimétrica pode ser de forma qualitativa (apenas observando a mudança de cor) e/ou quantitativa (na qual a concentração de OF pode ser obtida pela quantificação através da absorção de luz em comprimentos de onda específicos, medida em espectrofotômetros ou colorímetros).⁹¹ Essas técnicas baseadas em mudança de cor do meio reacional podem ser associadas ou não a inibição da AChE^{64,92-110}. Quando associados à utilização de enzimas, entram na categoria de biosensores e quando não enzimáticos, pertencem à categoria dos quimiosensores. Os biosensores colorimétricos envolvem o mecanismo de inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) que é responsável por catalisar a hidrólise de substratos baseados em colina. O princípio básico do método de inibição baseado em enzimas é a redução ou prevenção da formação de tiocolina (TCh, Figura 17), na presença de OF. A ligação entre o OF e a AChE leva ao enfraquecimento dos sinais ou à mudança na cor que pode ser analisada, pois não há formação de tiocolina. Assim, a técnica aponta a presença do pesticida através da interação com a enzima.

FIGURA 17- REPRESENTAÇÃO DA INIBIÇÃO DE TCh NA PRESENÇA DE OF's.



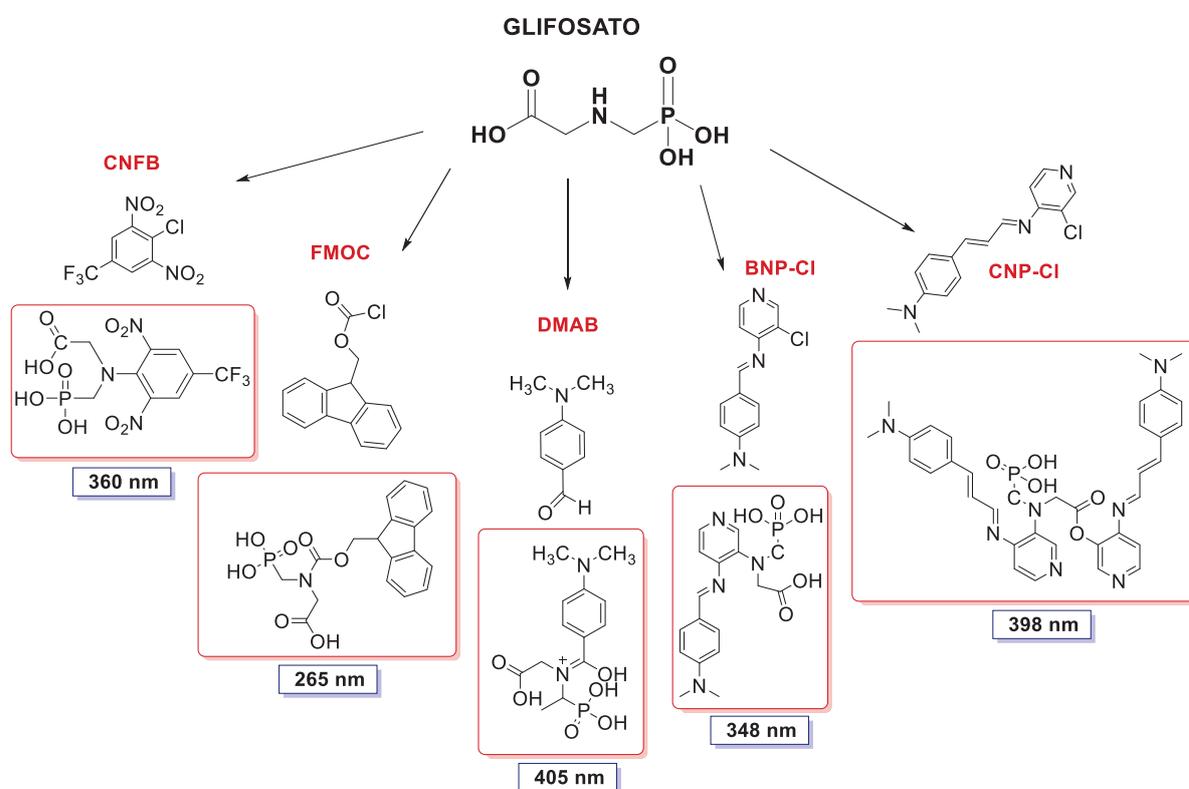
Fonte: Adaptado de BHATTU (2021).⁹¹

De fato, elas permitem uma detecção rápida, de forma visual e, muitas vezes, sem a utilização de equipamentos. No entanto, em alguns casos, há a utilização de biosensores que se baseiam no uso de uma ou mais enzimas, o que

eleva o custo da técnica e dificulta o processo, pois requer condições específicas de reação.¹¹¹ Essas técnicas colorimétricas tem também algumas outras limitações associadas aos sensores colorimétricos baseados em nanopartículas e enzimas. Ele destaca problemas como agregação não controlada de nanopartículas e a necessidade de condições específicas de pH, temperatura e força iônica para sensores enzimáticos.¹⁰⁵

Já os quimiossensores possibilitam a detecção colorimétrica através de reações de derivatização, ou seja, reações com moléculas que, através de reações químicas, levam a produtos que possuem grupos cromóforos ou fluoróforos em sua estrutura. Isso permite que a molécula, antes não detectável, seja então detectada através de métodos espectrofotométricos, como por exemplo UV-Visível ou fluorescência. Esses ensaios são preferíveis, pois são mais diretos, simples e baratos, e nesse contexto já foram descritos estudos utilizando ninidrina¹⁰¹, 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto (CNFB)¹⁰⁰, cloroformato de 9-fluorenilmetil (FMOC)¹¹⁰, *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB)⁷⁶, 4-(((3-cloropiridin-4-il)imino)metil)-*N,N*-dimetilanilina (BNP-Cl) e 4-((3-((3-cloropiridin-4-il)imino)propenil)-*N,N*-dimetilanilina (CNP-Cl)¹⁰⁵ e, ainda, o Reagente de Ellman (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB)) (Figura 18). Esse último, no entanto, requer algumas condições mais específicas, pois é fotossensível e é conhecido por levar a resultados falso-positivos¹¹², pois a reação com grupos tiol e oximas também leva a mudança de cor.¹¹³

FIGURA 18- EXEMPLOS DE MOLÉCULAS DERIVATIZANTES E OS RESPECTIVOS PRODUTOS FORMADOS COM GLIFOSATO PARA DERIVATIZAÇÃO E DETECÇÃO COLORIMÉTRICA (NA COR AZUL O COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO DE ABSORÇÃO PARA CADA PRODUTO).



FONTE: O Autor (2025).

Aydin *et al.*¹⁰⁵ avaliaram um sistema de reação simples para detectar glifosato no qual prepararam dois sensores novos, 4-(((3-cloropiridin-4-il)imino)metil)-*N,N*-dimetilanilina (BNP-Cl) e 4-(((3-((3-cloropiridin-4-il)imino)propenil)-*N,N*-dimetilanilina (CNP-Cl), representados na Figura 18. A fração piridina dessa estrutura contém um átomo de cloro, e esse átomo de cloro é substituído pelo nitrogênio ou oxigênio do glifosato. Os produtos formados por essas reações com o glifosato levam a mudança de cor, de incolor para amarelo no caso do BNP-Cl, e no caso do CNP-Cl a cor da reação vai de amarelo a laranja, evidenciando a detecção colorimétrica com o uso desses sensores. Vale ressaltar que esses sensores se mostraram estáveis à hidrólise na faixa de pH 5,2 a 10,0, e reagiram facilmente com o glifosato em pH 8,14. Os sensores BNP-Cl e CNP-Cl mostraram uma excelente e rápida seletividade para glifosato, exibindo baixos limites de detecção (1,78 μM para BNP-Cl e 1,60 μM para CNP-Cl), e, ainda, foram

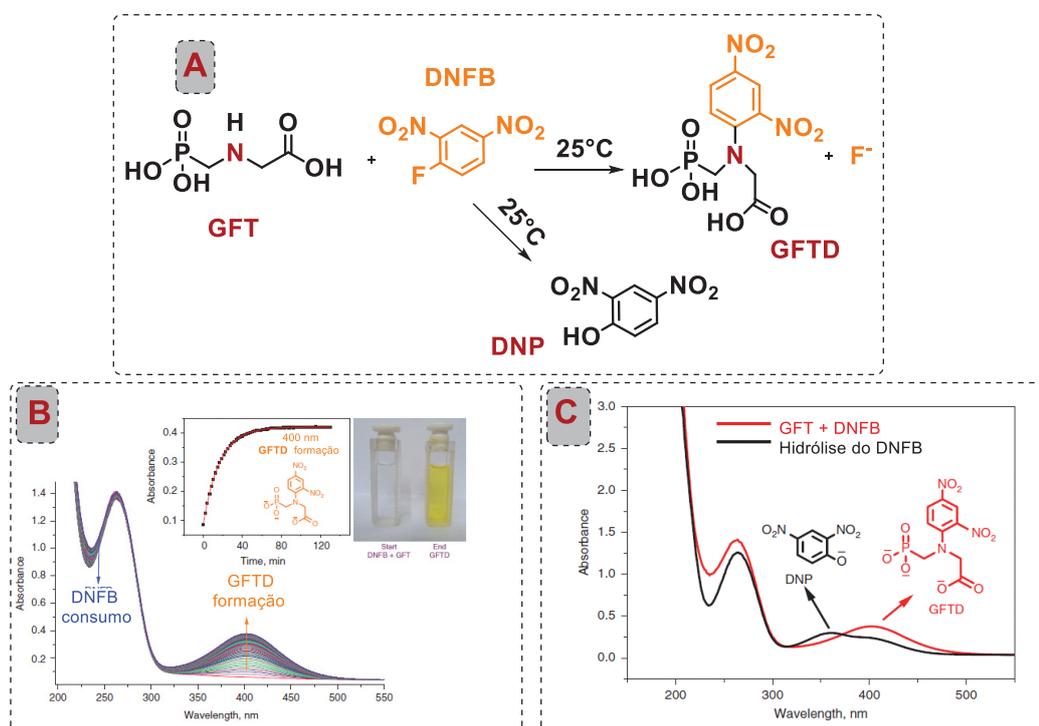
aplicados com sucesso para detecção de glifosato em amostras reais, como solo, água da torneira e batatas.¹⁰⁵

De forma geral apenas 17% do total de publicações sobre o acefato se concentra na sua detecção⁴⁴, a maioria envolve o uso de nanopartículas metálicas ou métodos cromatográficos.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Liang, *et al.* estudaram um método de detecção colorimétrica para pesticidas OF's, dentre elas o acefato. Esse método é baseado em nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ com atividade mimética da peroxidase. As enzimas acetilcolinesterase (AChE) e colina oxidase (CHO) catalisam a formação de H₂O₂, que ativa as nanopartículas magnéticas para a oxidação de substratos colorimétricos, produzindo uma reação colorida. O método se mostrou sensível para a detecção de acefato e mais prático quando comparado a outros métodos como os cromatográficos e métodos baseados em atividade enzimática.⁹³

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa envolveram a detecção colorimétrica do glifosato através de uma reação de derivatização. Como agente derivatizante foi utilizado o 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB), também chamado reagente de Sanger, que é utilizado como aminoácido *N*-terminal de polipeptídeos para sequenciamento de proteínas^{107,117}. Trata-se de uma reação simples (Figura 19 (A)) e sob condições brandas que possibilita a detecção colorimétrica do glifosato, pois ocorre a formação de um produto colorido (Figura 19 (B)), o *N*-(2,4-dinitrofenil)-*N*-(fosfometil) glicina (GFTD), que foi confirmado por RMN de ¹H e ³¹P. Os estudos cinéticos para as reações de GFT com DNFB evidenciaram a dependência da reatividade com o pH, evidenciando que as espécies totalmente desprotonadas e monoprotionadas são mais reativas para essa reação. Os estudos também mostraram que na reação com excesso de GFT, a hidrólise do DNFB não ocorre significativamente, mas em condições com excesso de DNFB, a hidrólise de fato ocorre em maior extensão. A comparação entre os perfis da hidrólise do DNFB (Figura 19 (C) linha preta) e da reação do DNFB com o glifosato (Figura 19 (C) linha vermelha), mostra claramente a diferença entre os perfis, apontando que a formação do produto colorido nessa condição de excesso de glifosato se deve unicamente à reação de interesse. Ainda, essa reação do glifosato com DNFB foi acompanhada por 10 minutos utilizando o colorímetro artesanal, desenvolvido a partir de materiais de baixo custo e de fácil aquisição. Foi possível detectar e quantificar o glifosato presente na amostra, com erro de menos de 7% em relação à concentração.¹⁰⁷ É importante mencionar que nas condições avaliadas pelo

estudo, não foi observada a formação do AMPA, metabólito do glifosato por biodegradação. Esse trabalho no qual foi utilizado o DNFB serviu de base para esse estudo, no qual buscamos promover a formação de um produto único, diminuindo a contribuição da reação de hidrólise para a formação desse produto.

FIGURA 19- EM (A) ESQUEMA DOS POSSÍVEIS CAMINHOS PARA A REAÇÃO ENTRE DNFB E GLIFOSATO: FORMAÇÃO DE UM NOVO PRODUTO OU HIDRÓLISE DO DNFB EM MEIO AQUOSO; (B) FORMAÇÃO DO PRODUTO COLORIDO, CONJUNTO DE TODOS OS ESPECTROS E PERFIL CINÉTICO PARA A REAÇÃO DO DNFB COM GLIFOSATO EM CONDIÇÃO DE EXCESSO DE GLIFOSATO E (C) COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DNFB (LINHA PRETA) E REAÇÃO DO DNFB COM GLIFOSATO (LINHA VERMELHA).



Fonte: Adaptado de SILVA, et al. (2020).¹⁰⁷

2 JUSTIFICATIVA

A questão do controle de pragas e doenças na agricultura, a fim de garantir a alta demanda e a segurança alimentar da população, sempre foi justificativa para o uso intenso dos agrotóxicos. De fato, o uso dessas substâncias desempenha um papel fundamental na garantia da produção alimentar em larga escala. Atender à crescente demanda por alimentos se torna um desafio cada vez maior, e, nesse contexto, os agrotóxicos representam uma ferramenta essencial e eficiente para a manutenção da produtividade agrícola. Nesse sentido, monitorar a presença dessas substâncias no ambiente e nos alimentos é uma forma de garantir segurança química e saúde à sociedade. Essas substâncias são largamente utilizadas, seja formal ou ilegalmente, e a maioria delas exige metodologias mais específicas para sua detecção. Haja visto o caso do glifosato, que é o herbicida mais utilizado, uma molécula simples e, no entanto, difícil de ser detectada. Exige, em razão das suas características químicas, uma metodologia *single*, que analise somente ele e seu metabólito, o AMPA, diferente da metodologia “multiresíduos” comumente utilizada, que analisa diferentes pesticidas ao mesmo tempo. O mesmo se aplica ao acefato, outro agroquímico que está entre os mais utilizados no mundo, e que devido às suas características químicas, como polaridade e solubilidade, também carece de métodos de detecção mais simples e rápidos, pois a maioria dos estudos envolvendo a detecção do acefato são baseados em cromatografia ou nanopartículas metálicas. As dificuldades na detecção dessas moléculas impedem a elaboração de políticas de saúde pública com relação a esses compostos, e sem a definição do LMR para cada pesticida o monitoramento se torna inviável. Em razão dessa problemática diversas técnicas têm sido desenvolvidas buscando a detecção de OF's, porém, apesar de seletivas e eficientes, são técnicas mais complexas, algumas de custo bastante elevado e que dependem de equipamentos de ponta. Além disso, em muitos casos as matrizes onde se encontram esses pesticidas apresentam muitos possíveis interferentes e o preparo de amostras para a utilização dessas técnicas é bastante trabalhoso e pode envolver muitas etapas. Até o momento há poucos relatos de um monitoramento com potencial para aplicação em campo, o que é essencial quando se busca um monitoramento eficiente dessas substâncias no ambiente.

Considerando essas informações, é importante explorar técnicas mais simples para a detecção de OF's, tais como a colorimetria, dado já possuímos a tecnologia

do sensor colorimétrico desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa. Assim, é foco desse estudo buscar por metodologias de baixo custo, através de moléculas orgânicas simples que possibilitem a detecção de moléculas de modo rápido, reprodutível e eficiente, e, ainda, em campo. Agrotóxicos apreendidos em situação de irregularidade também podem ser detectados e mais eficientemente monitorados através do uso de técnicas mais simples. A apreensão dessas substâncias que não tem registro no país cresceu 180% no ano de 2023, em relação ao que foi apreendido em 2022. Lembrando que essas substâncias ilegais não passam por avaliações de eficácia e dos impactos ambientais e à saúde humana, e por esse motivo seus impactos são incertos e o risco à sociedade é bastante grande. Ainda, quando comparado a outros países do mundo, o Brasil é bastante flexível com relação aos limites residuais permitidos desses pesticidas em alimentos e águas de abastecimento. Vale ressaltar que muitos países desenvolvidos estão tentando banir o uso do glifosato e no Brasil esse herbicida é liberado e largamente utilizado, e até bem pouco tempo atrás era pouco detectado. O acefato era proibido até o ano de 2020, quando foi reavaliado e teve seu uso liberado com restrições. Entretanto, mesmo proibido o acefato é encontrado no Brasil desde 2013. Como o acefato e o glifosato, outros pesticidas OF's poderão ter seu monitoramento beneficiado por essa técnica colorimétrica, que pode ser aplicada para diferentes substâncias, de forma mais específica, evitando os falsos positivos/negativos comuns nos testes com substâncias que são apreendidas.

Os OF's apresentam variações estruturais que influenciam seus mecanismos de reação, podendo seguir diferentes vias e levar a diferentes produtos, influenciando as vias de hidrólise ou substituição nucleofílica. Assim, estratégias de detecção devem ser adaptadas às propriedades específicas de cada substância. Nossa pesquisa está baseada no trabalho que empregou o DNFB¹⁰⁷, visando impulsionar a criação exclusiva do produto colorido nesta reação. Para alcançar esse objetivo, estamos explorando a derivatização de OF's selecionados (glifosato e acefato) com outras moléculas que demonstram potencial para a formação desse produto colorido específico. A pesquisa nessa área contribui para o desenvolvimento de estratégias mais seguras e sustentáveis no controle de resíduos de pesticidas, auxiliando na regulamentação e no uso responsável desses compostos.

3 OBJETIVOS

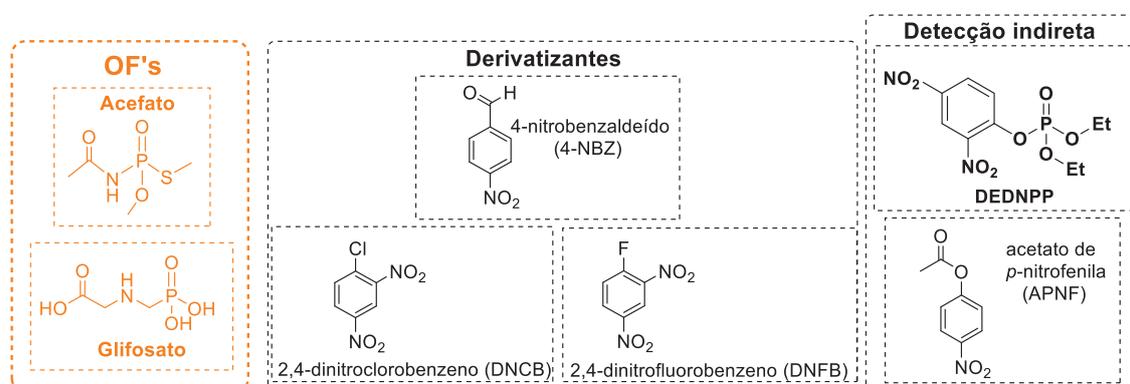
3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho é estudar reações de derivatizações com os pesticidas OF's glifosato e acefato, possibilitando a detecção colorimétrica dessas substâncias, promovendo segurança química.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificação a partir de extratos comerciais, dos OF's glifosato (Roundup WG®), acefato (Orthene®), e outras substâncias análogas;
- Caracterização das amostras pelas técnicas de: Ressonância Magnética Nuclear – RMN de ^1H , ^{13}C e ^{31}P ; Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis); Espectrometria de Massas (ESI/MS);
- Estudo cinético das reações de hidrólise dos OF's e das moléculas derivatizantes (representadas na Figura 20), bem como, das reações de derivatização do glifosato e acefato, buscando compreender os mecanismos pelos quais eles reagem;
- Desenvolver método colorimétrico para detecção de OF's.

FIGURA 20- REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DAS MOLÉCULAS UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO QUE FORAM AVALIADAS NESSE ESTUDO (OF'S: ACEFATO E GLIFOSATO; DERIVATIZANTES: 4-NBZ, DNFB E DNCB; MOLÉCULAS PARA DETECÇÃO INDIRETA: DEDNPP E APNF).



Fonte: O Autor (2025).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Abordaremos aqui a metodologia referente aos estudos de detecção colorimétrica que foi realizada, caracterização de reagentes purificados, estudos cinéticos através da técnica de UV-Vis das reações de hidrólise das moléculas envolvidas, estudos cinéticos através das técnicas de UV-Vis e espectroscopia de RMN das reações dos OF's e as moléculas derivatizantes.

4.1 MATERIAIS

Os reagentes necessários para as sínteses e reações de purificação dos OF's, como solventes, tampões, sais, ácidos, bases foram adquiridos comercialmente e purificados quando necessário. Da mesma forma os arenos substituídos (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (DNCB), 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (DNFB) e 4-nitrobenzaldeído (4-NBZ), que foram utilizados para as reações de derivatização (e detecção) dos OF's também foram obtidos comercialmente e purificados. O acetato de *p*-nitrofenila (APNF)¹¹⁸ e também o dietil-2,4-dinitrofenilfosfato (DEDNPP) foram previamente sintetizados pelo grupo.

4.2 PURIFICAÇÃO DO ACEFATO

O pesticida Orthene® é composto pelo princípio ativo acefato e espécies inorgânicas presentes na formulação para manter o produto estável, miscível ou aplicável. O acefato apresenta alta solubilidade em solventes orgânicos, portanto um procedimento bastante simples de purificação pôde ser utilizado. Em um béquer de 100 mL foram adicionados 1,0 g da amostra comercial Orthene® em 50 mL de etanol. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 30 minutos, e, em seguida, passou por uma filtração simples na qual foi separado o acefato das demais espécies contidas na amostra comercial. Posteriormente o filtrado foi levado ao evaporador rotativo, no qual foram obtidos 660 mg de um sólido branco, com rendimento de 88%. Após a purificação esses compostos foram continuamente mantidos sob refrigeração.

4.3 PURIFICAÇÃO DO GLIFOSATO

O glifosato foi obtido de uma amostra comercial (Roundup WG®). Essa amostra continha glifosato ($720,0 \text{ g kg}^{-1}$), isopropilamina ($72,5 \text{ g kg}^{-1}$) e outros componentes inertes em relação à atividade herbicida, adicionados para conferir estabilidade e facilitar a aplicação ($207,5 \text{ g kg}^{-1}$). Em um béquer de 50 mL foram misturados 2,0 g dessa amostra à 15 mL de água, essa mistura foi mantida sob agitação magnética até a dissolução da amostra. Após, 15 mL de solução de hidróxido de sódio ($4,0 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados gota a gota à temperatura ambiente à essa mistura. Em seguida, ainda sob agitação a solução foi então aquecida a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ até cessar o vapor de isopropilamina. Em seguida, após resfriamento, à temperatura ambiente, 5,60 mL de ácido clorídrico (HCl, 37%) foram adicionados gota a gota sob agitação. Posteriormente a solução foi evaporada, e o sólido obtido foi então recristalizado em etanol a quente. O produto dessa recristalização foi solubilizado com uma quantidade mínima de água fervente, descolorado com carvão ativado, filtrado e evaporado até a metade do volume de água. O precipitado foi filtrado, lavado com acetona e seco em bomba de baixa pressão, tendo obtido um produto sólido de cor branca, com rendimento próximo a 66%.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS

O acefato e o glifosato foram inicialmente caracterizados por RMN de ^1H e ^{31}P em espectrômetro Bruker AVANCE 200, operando em 200 e 81 MHz, respectivamente. Para a aquisição dos espectros foram adicionados 10 mg de acefato/glifosato puro em tubos de RMN contendo 550 μL de D_2O como solvente. Os deslocamentos químicos de ^1H são apresentados em relação ao padrão ácido trimetilsililpropanóico (TMSP- d_4 ; 0 ppm) e os de ^{31}P em relação ao padrão H_3PO_4 (85% m/m) em D_2O (0 ppm). Também foram obtidos espectros de UV-Vis ([acefato]= $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, em água, pH 8,0) na região entre 190 e 800 nm a fim de observar possíveis bandas de absorção desses reagentes na região do UV-Vis.

4.5 ESTUDOS CINÉTICOS

Os estudos cinéticos foram realizados utilizando a técnica da espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), em um equipamento Agilent Cary 60, com acessório multicubetas, acoplado a banho termostatizado, utilizando cubetas de quartzo. Inicialmente o comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) dos produtos foi determinado através de varreduras entre 190 e 800 nm, e em seguida as reações também foram acompanhadas por UV-Vis em banho termostatizado.

A cinética acompanhada através do UV-vis considera as absorbâncias no início e no final da reação, para reagentes e produtos. Assim, utilizando a Lei de Lambert-Beer, pode-se relacionar as absorbâncias com as concentrações de produtos e reagentes. Dessa forma se obtém a equação final para o ajuste da formação de produtos, que está apresentada na Equação 1 e, de forma análoga, para o consumo dos reagentes na Equação 2:

$$\text{Eq. 1} \quad A_{\text{prod}} = A_0 + (1 - e^{-k_{\text{obs}}t})(A_0 - A_i)$$

$$\text{Eq. 2} \quad A_{\text{reag}} = A_i + (e^{-k_{\text{obs}}t})(A_0 - A_i)$$

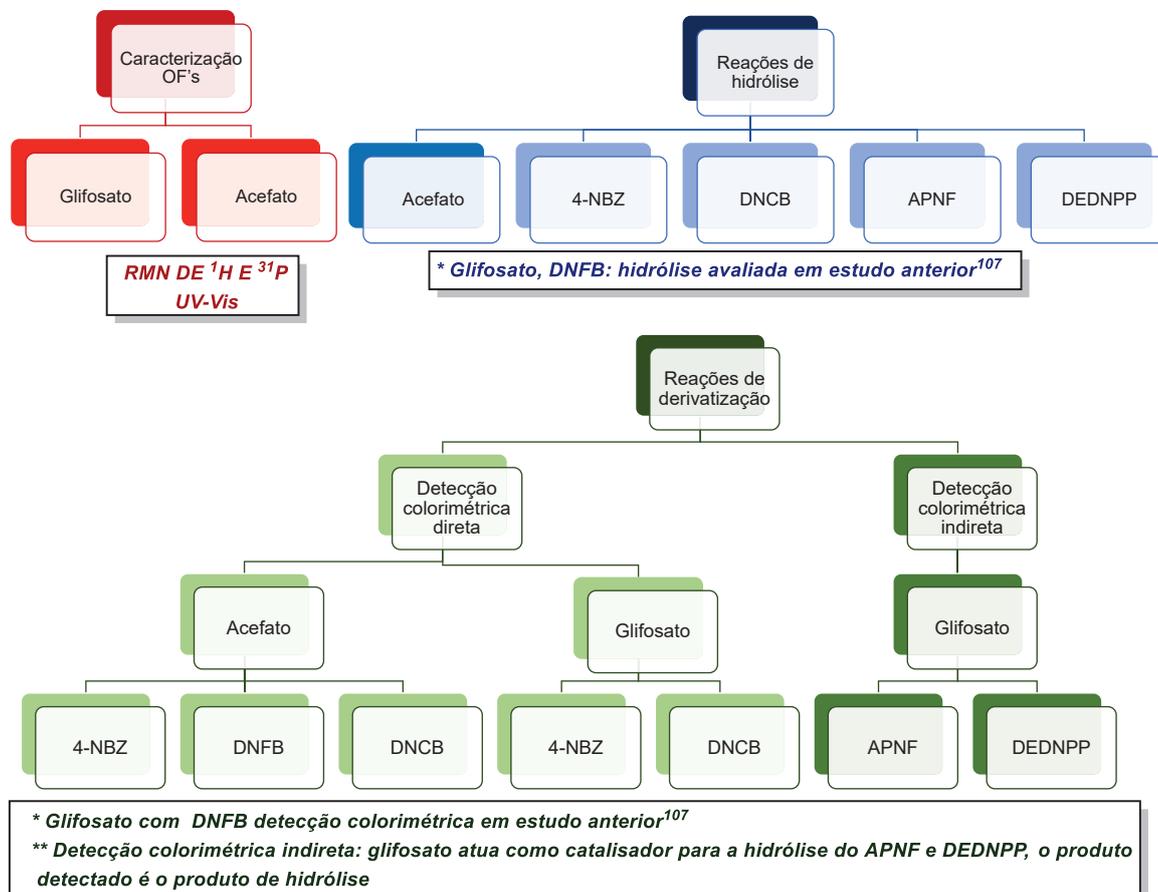
Em que A_{prod} = absorbância do produto em um determinado “tempo t”, A_{reag} = absorbância do reagente em um determinado “tempo t”, A_i = Absorbância em tempo “infinito”, A_0 = Absorbância inicial e k_{obs} = constante de velocidade observada.

A reação (em que acefato/glifosato estão em excesso) tem início com a adição de uma alíquota de 20 μL de solução do derivatizante ($1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila), em uma cubeta (1,0 cm de caminho ótico) contendo 3,00 mL de solução aquosa de acefato/glifosato e bicarbonato de sódio (NaHCO_3 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). O pH de cada solução foi previamente ajustado com adição de alíquotas de soluções de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. As reações foram mantidas a 25°C e foram realizadas em diferentes condições buscando a otimização dessas condições reacionais e a detecção colorimétrica do produto da reação. Os ajustes para o monitoramento da formação do produto seguem uma cinética de pseudo-primeira ordem e foram obtidos utilizando a mesma equação descrita anteriormente, a equação 1 para ajuste de produto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esse trabalho busca explorar formas simples de detectar colorimetricamente pesticidas que são conhecidos por serem mais difíceis de analisar, especificamente o acefato e o glifosato. Ambas as moléculas não possuem grupos cromóforos em sua estrutura, o que impossibilita sua detecção através de técnicas simples, como o UV-Vis, por exemplo, técnica que poderia ser usada para monitorar sua degradação. Para que seja possível a detecção dos OF's através dessa técnica de UV-Vis, foi realizado um estudo sistemático, representado na Figura 21, a fim de conhecer mais acerca das reatividades dessas moléculas. É preciso conhecer quais produtos podem ser formados através dessas reações de derivatização, se esses produtos podem ser detectados colorimetricamente e quais as condições ótimas em que elas ocorrem.

FIGURA 21- ESQUEMA DA SEQUÊNCIA DOS ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS OF's, REAÇÕES DE HIDRÓLISE QUE FORAM REALIZADAS E REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO PARA A DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DIRETA E INDIRETA DESSES PESTICIDAS.



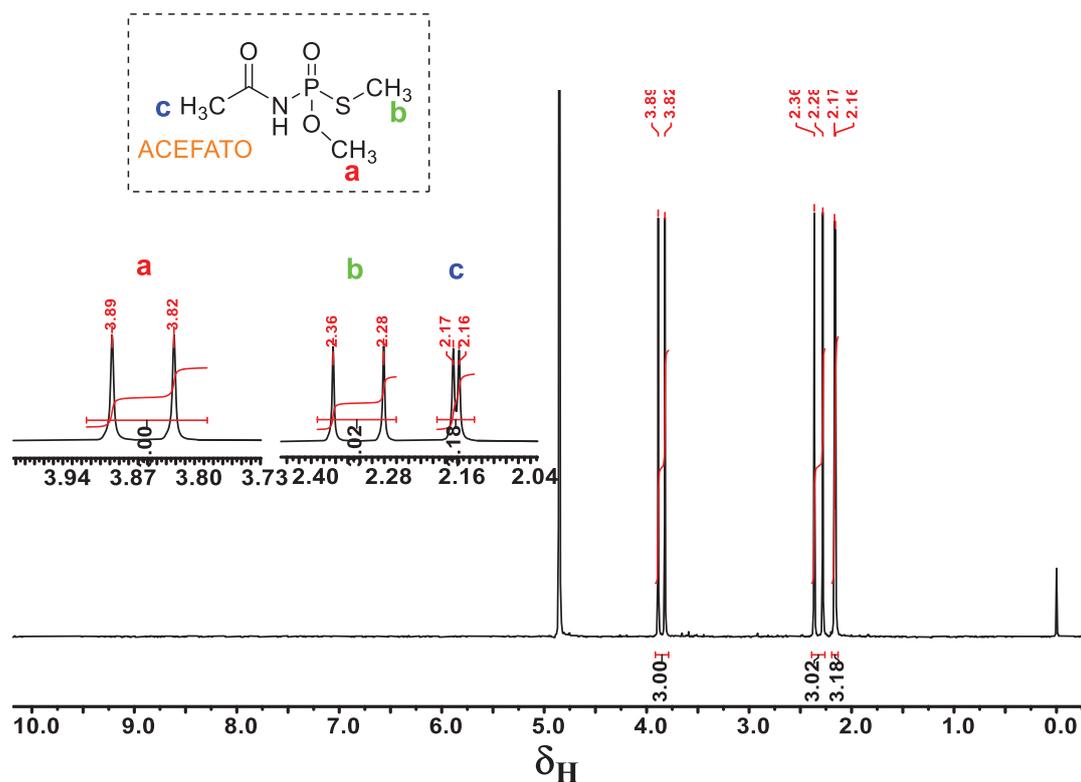
Essa avaliação foi realizada através do estudo cinético das reações de hidrólise desses compostos e também do estudo cinético das reações entre esses OF's (glifosato e acefato) e as moléculas selecionadas: DNFB, DNFB, 4-NBZ, APNF e DEDNPP.

Primeiramente serão apresentadas as caracterizações dos OF's acefato e glifosato, seguidas das reações de hidrólise das moléculas envolvidas, acompanhadas através da técnica de UV-Vis. Após o estudo acerca das reações de hidrólise, serão apresentados os estudos cinéticos e mecanísticos, primeiramente do acefato frente ao 4-NBZ, DNFB e DNFB e, em seguida, do glifosato, frente ao 4-NBZ, e DNFB, além das moléculas para detectar de forma indireta o glifosato, APNF e DEDNPP. A detecção do glifosato com DNFB realizada anteriormente¹⁰⁷ serviu como base e inspiração para esse trabalho. Ressaltando que se busca através desse estudo, compreender a reatividade dessas moléculas e encontrar uma reação simples que possibilite a detecção colorimétrica do acefato e do glifosato.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS OF's ACEFATO E GLIFOSATO

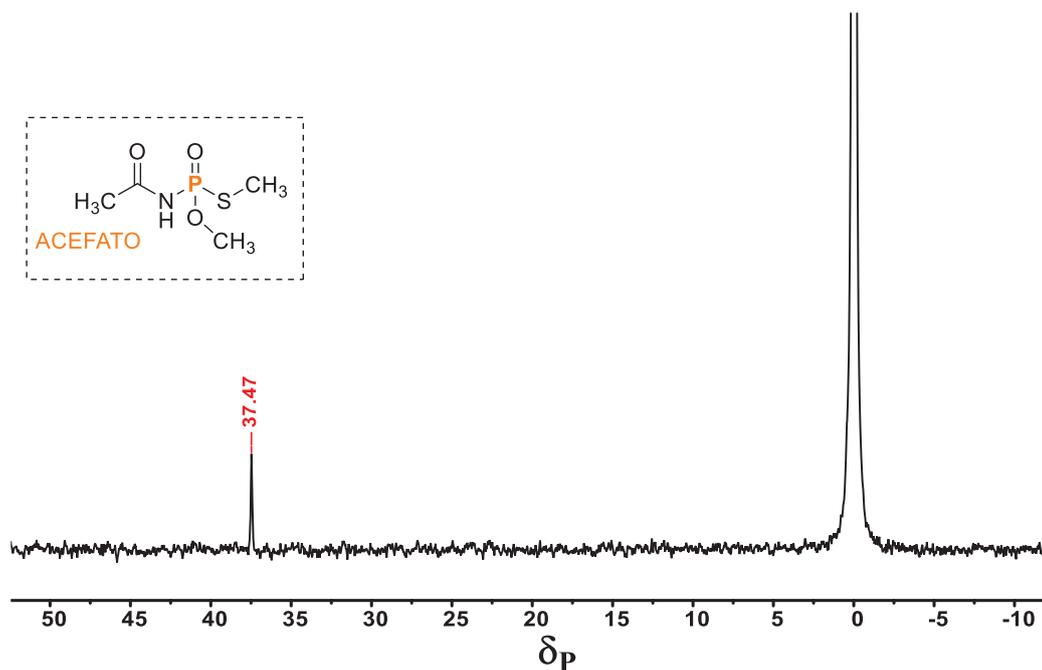
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO DO ACEFATO

O acefato foi purificado utilizando-se a metodologia descrita na seção 4.2 e caracterizado RMN de ^1H e ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ e ^{31}P acoplado. Analisando-se o espectro de RMN de ^1H (Figura 22) foi possível observar o sinal em δH 2,16 (d, 3H) referente aos hidrogênios da metila ligada ao carbono carbonílico. Além disso, os sinais dos hidrogênios da metila ligada ao enxofre foram observados em δH 2,32 (d, 3H) e em δH 3,86 (d, 3H) os sinais dos hidrogênios da metila ligada ao oxigênio. Os deslocamentos observados estão de acordo com os dados encontrados na literatura.¹¹⁹

FIGURA 22- ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ACEFATO, 200 MHz, D_2O .

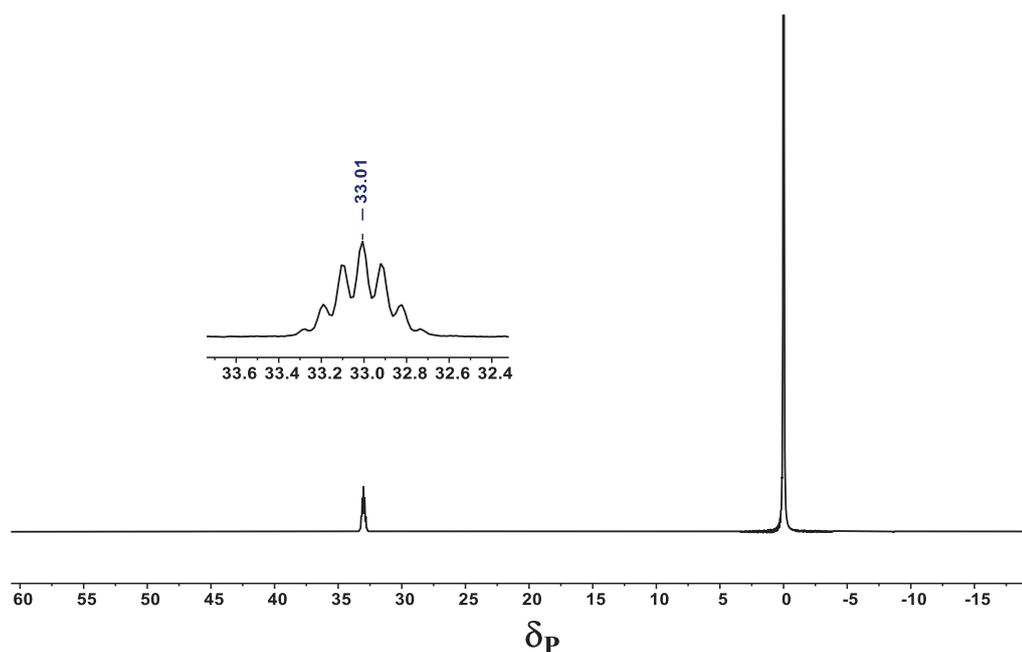
Fonte: O Autor (2025).

E em relação ao espectro de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (Figura 23) do acefato foi observado um sinal em δ_{P} 37,47 (s, 1P) referente ao átomo de fósforo, que está de acordo com os dados reportados na literatura.¹²⁰

FIGURA 23- ESPECTRO DE RMN DE ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ DO ACEFATO, 81 MHz, D_2O .

Fonte: O Autor (2025).

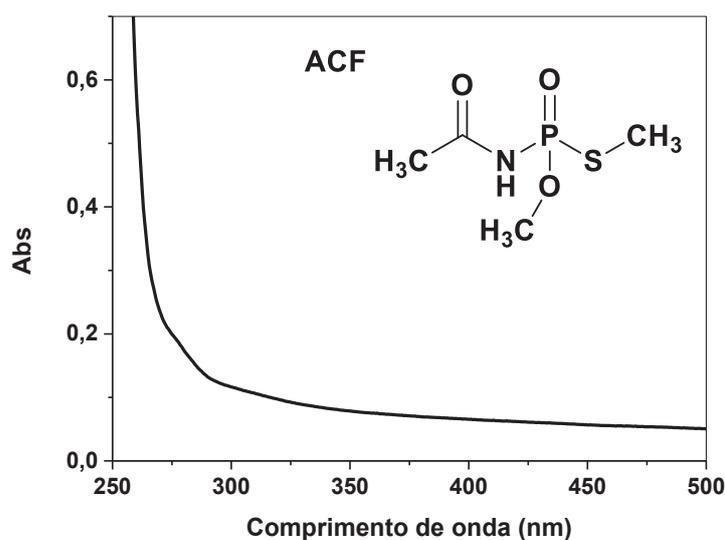
A atribuição desse sinal em δ_{P} 37,47 no espectro de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ do acefato é confirmada pelo RMN de ^{31}P acoplado (Figura 24), onde o sinal em δ_{P} 33,01 evidencia os acoplamentos entre os hidrogênios das metilas ligadas a três ligações de distância com o átomo de fósforo.

FIGURA 24- ESPECTRO DE RMN DE ^{31}P ACOPLADO DO ACEFATO, 81 MHz, D_2O .

Fonte: O Autor (2025).

Além disso, o acefato foi também caracterizado por UV-Vis, a fim de se observar bandas de absorção em alguma região do espectro. Na Figura 25 pode-se observar que não há banda intensa que represente absorção dessa substância no UV-Vis, o que corrobora a estrutura química dessa molécula que não apresenta grupo cromóforos capazes de serem detectados.

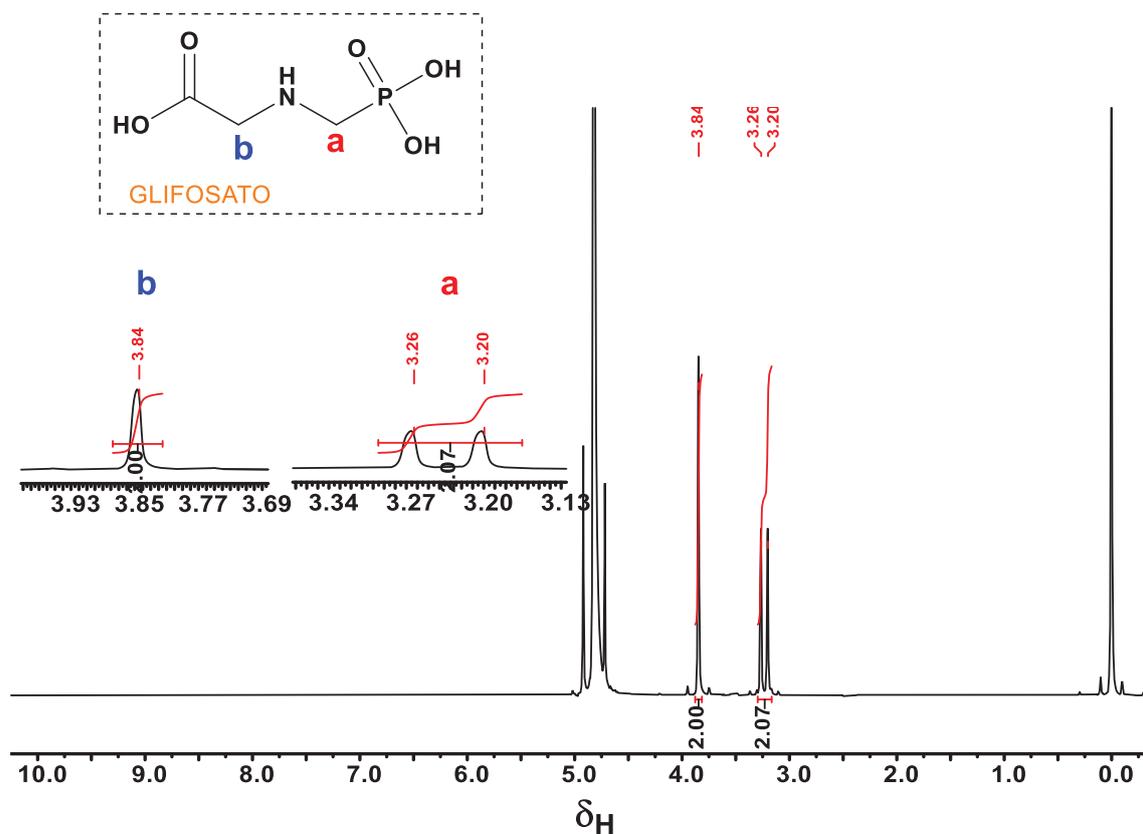
FIGURA 25- ESPECTRO DE UV-Vis DO ACEFATO PURO EM ÁGUA, pH 8,0 e [ACF]=0,05 mol L⁻¹.



Fonte: O Autor (2025).

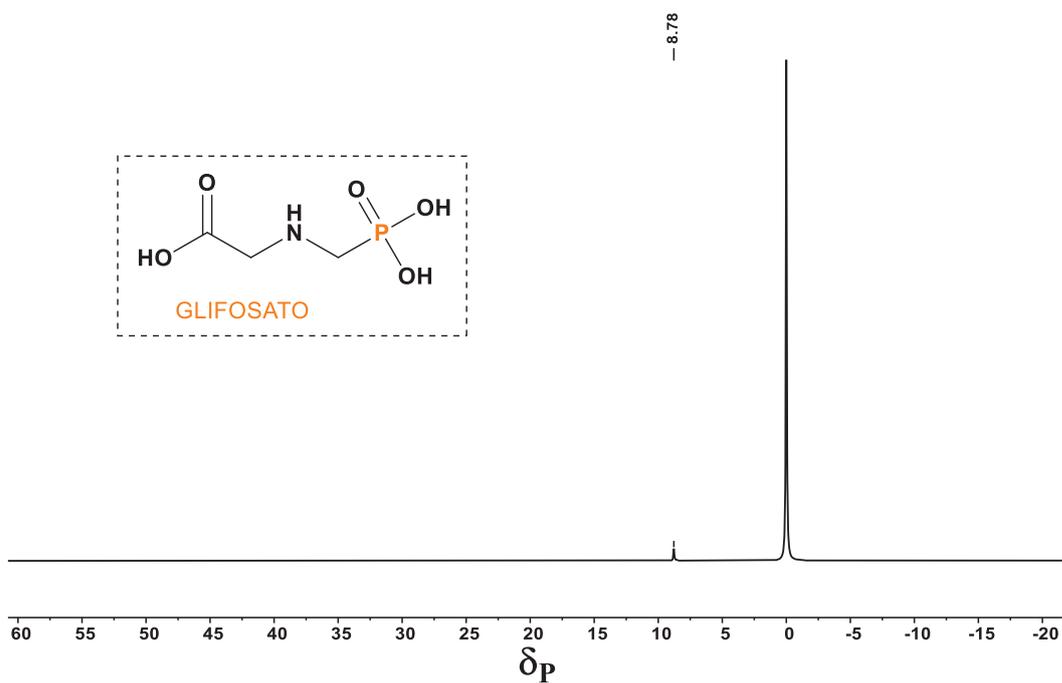
5.1.2 CARACTERIZAÇÃO DO GLIFOSATO

O sólido isolado nos processos de purificação do glifosato a partir da amostra comercial foi submetido à caracterização por RMN de ¹H e ³¹P. Analisando o espectro de RMN de ¹H (Figura 26) foi possível observar a presença dos sinais em δH 3,23 (d, 2H) referentes aos hidrogênios metilênicos do carbono ligado ao nitrogênio e ao fósforo (a), em δH 3,84 (s, 2H), os sinais dos hidrogênios do carbono (b) ligado ao carbono carbonílico e ao nitrogênio. Os deslocamentos observados estão de acordo com os dados encontrados na literatura^{107,121}.

FIGURA 26- ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO GLIFOSATO, 200 MHz, D_2O .

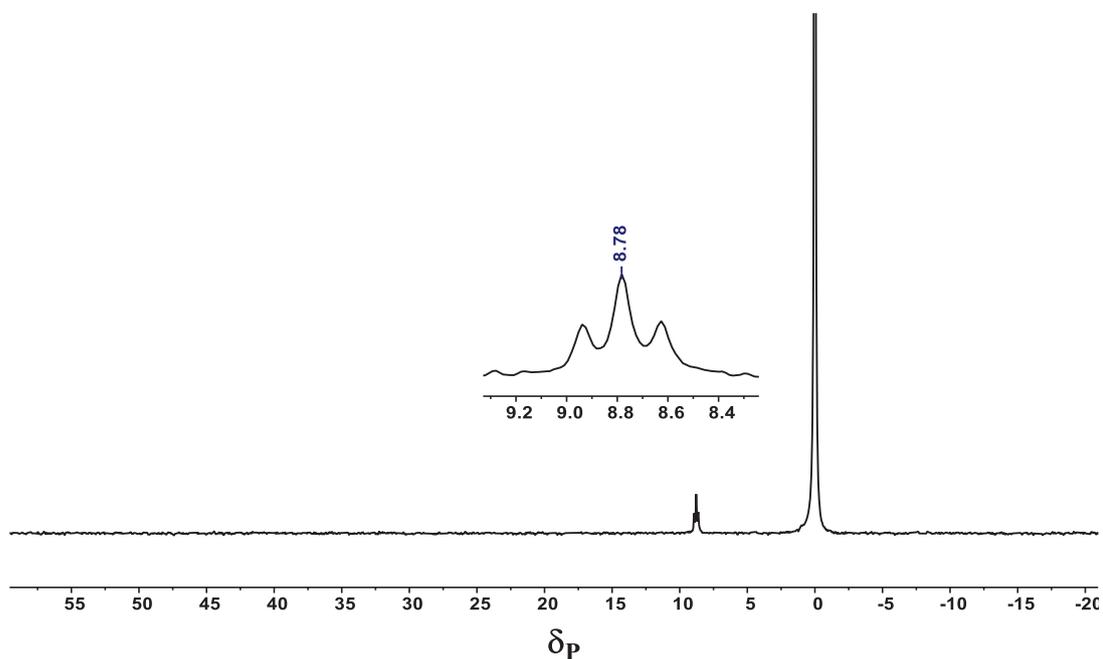
Fonte: O Autor (2025).

O espectro de RMN de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ do glifosato, apresentado na Figura 27, apresenta um sinal em $\delta_{\text{P}} 8,78$ (s, 1P) referente ao átomo de fósforo, que está de acordo com os dados reportados na literatura^{107,121}

FIGURA 27- ESPECTRO DE RMN DE ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ DO GLIFOSATO, 81 MHz, D_2O .

Fonte: O Autor (2025).

A atribuição desse sinal em δ_{P} 8,78 no espectro de ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ do glifosato é confirmada pelo RMN de ^{31}P acoplado (Figura 28) onde o sinal em δ_{P} 8,78 evidencia os acoplamentos entre os hidrogênios das metilas ligadas a três ligações de distância com o átomo de fósforo.

FIGURA 28- ESPECTRO DE RMN DE ^{31}P ACOPLADO DO GLIFOSATO, 81 MHz, D_2O .

Fonte: O Autor (2025).

A Tabela 2 mostra de forma resumida todos os deslocamentos químicos dos sinais obtidos com essas caracterizações.

TABELA 2- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS SINAIS DOS OF's ACEFATO E GLIFOSATO.

Composto	δ_{H}	δ_{P}
Acefato	2,16 (d,3H), 2,32 (d,3H),3,86 (d,3H)	37,47 (s,1P)
Glifosato	3,23 (d,2H), 3,84 (s,2H)	8,78 (s, 1P)

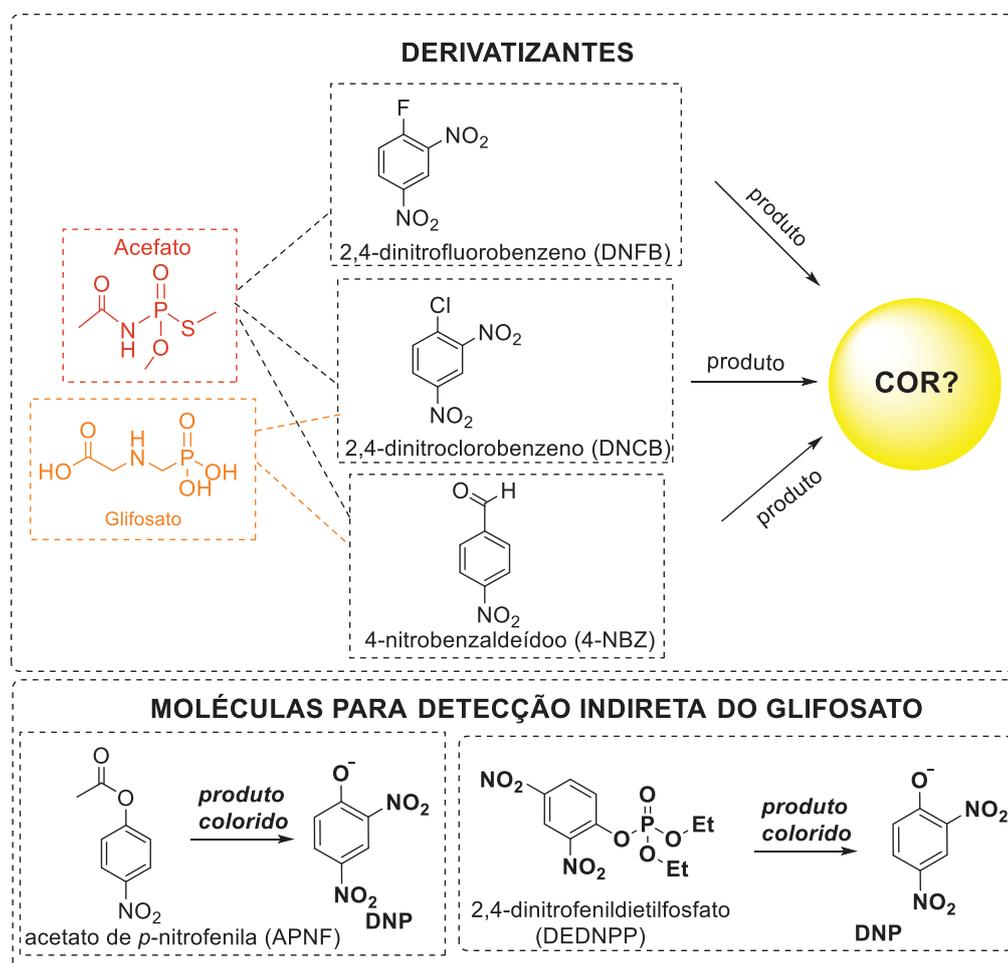
Fonte: O Autor (2025).

5.2 ESTUDOS DAS REAÇÕES DE HIDRÓLISE E DERIVATIZAÇÃO COM ACEFATO E GLIFOSATO: DETECÇÃO COLORIMÉTRICA

Serão apresentados aqui os resultados e discussões relacionados aos estudos de hidrólise e reatividade do acefato e glifosato frente a diferentes moléculas derivatizantes selecionadas, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (DNCB), 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (DNFB), 4-nitrobenzaldeído (4-NBZ), além de duas

moléculas utilizadas como um método de detecção indireta, o APNF e o DEDNPP, que estão representadas na Figura 29.

FIGURA 29 - ESQUEMA DAS REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO QUE ESTÃO SENDO AVALIADAS NESSE ESTUDO.



Fonte: O Autor (2025).

A escolha dessas moléculas derivatizantes se deu pelas suas características estruturais, pois podem reagir com os OF's e levar à obtenção dos produtos desejados, permitindo a detecção colorimétrica desses OF's. A ideia de utilizar o DNCB vem de estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, que avaliou a derivatização do glifosato com o DNFB¹⁰⁷. Com o sucesso do trabalho anterior, buscamos uma abordagem similar através da reação de derivatização, utilizando DNCB frente ao glifosato e o acefato a fim de formar um produto que permita sua detecção colorimétrica. No entanto, nesse estudo anterior foi observado que para essa reação, como o DNFB é bastante reativo, sua reação de hidrólise contribui para o processo. Assim, mesmo otimizando as condições de reação além da reação

de derivatização, foi observada a ocorrência da reação de hidrólise. Dessa forma, buscamos diminuir a contribuição da reação de hidrólise do DNFB com glifosato, e por isso, a utilização do DNFB, que possui o átomo de cloro no lugar do átomo de flúor. O cloro é levemente menos reativo do que o flúor, podendo assim melhorar a performance dessa reação, pois levará a uma contribuição menor da reação de hidrólise na formação do produto de interesse.

Ainda, a escolha da utilização do 4-NBZ para as reações de derivatização se deu porque essa molécula é bastante utilizada para a detecção de grupo funcional amina.^{122,123} No caso dessas reações com o glifosato e acefato esperamos que o nitrogênio presente nesses OF's aja como nucleófilo, atacando através de uma reação de adição à carbonila, o carbono carbonílico do 4-NBZ, levando à formação do produto colorimétrico que vai possibilitar a detecção do glifosato e acefato através da técnica de UV-Vis. Da mesma forma, o APNF tem sua hidrólise catalisada pelo imidazol, reação que leva à formação do acetato e do nitrofenol como produtos¹²⁴. Esperamos então que assim como ocorre com o par de elétrons livres do imidazol, também o par de elétrons livres do glifosato consiga promover a clivagem do APNF nos mesmos produtos, possibilitando a detecção indireta do glifosato. Vale ressaltar que ainda muito pouco se sabe acerca das reatividades desses OF's e que se trata de reações totalmente novas entre esses compostos, e ainda não reportadas.

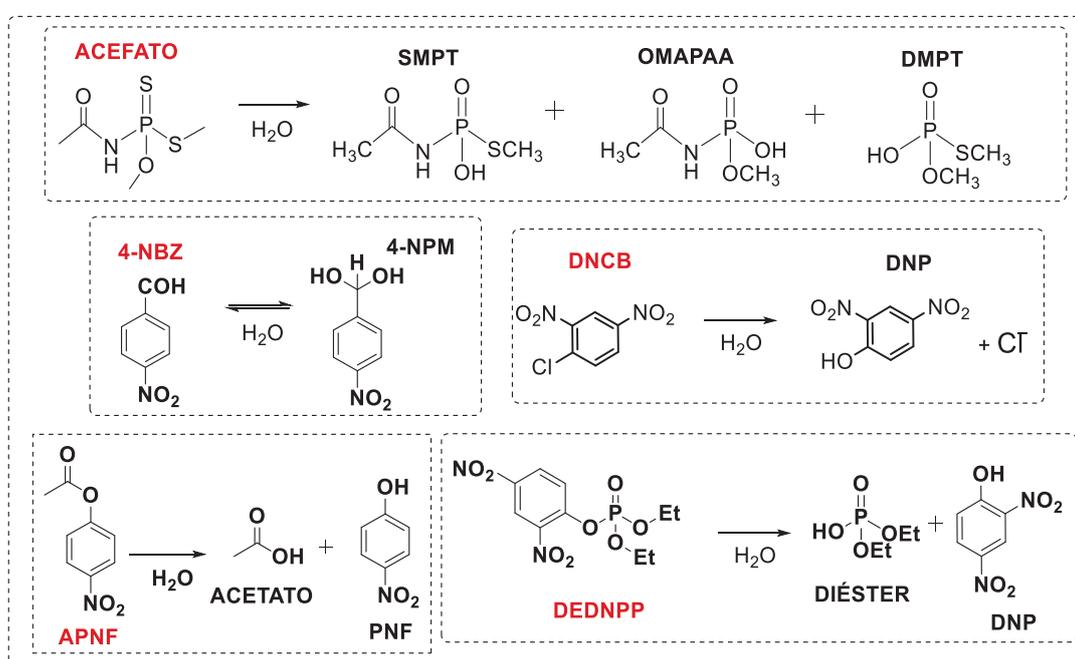
5.2.1 REAÇÕES DE HIDRÓLISE

Avaliar as reações de hidrólise é importante porque nos permite inferir sobre os produtos dessas reações e também em qual pH elas são mais reativas. Entre os derivatizantes, somente a hidrólise do DNFB já havia sido avaliada anteriormente através da técnica de UV-Vis¹⁰⁷. Já entre os OF's, o glifosato também teve sua cinética de hidrólise acompanhada em estudo anterior¹⁰⁷. Esses estudos das reações de hidrólise são fundamentais para compreender melhor a sua contribuição no método de detecção colorimétrica. Ou seja, idealmente, espera-se acompanhar apenas as reações de derivatização que levam aos produtos coloridos. Mas sabe-se que sob as condições estudadas (meio levemente alcalino), alguns reagentes também podem sofrer reações paralelas de hidrólise e levar a produtos coloridos

interferindo na análise. Portanto, é necessário distinguir todas as reações que ocorrem: derivatização e hidrólise.

Assim, cada uma das moléculas envolvidas (acefato, DNCB, 4-NBZ e DEDNPP) teve suas reações de hidrólise em meio aquoso acompanhadas à temperatura ambiente (25 °C) por 17 horas, em diferentes valores de pH que vão de 7,0 - 9,5 (variando-se de 0,5 em 0,5; Figura 30). Condições similares foram utilizadas nas reações de derivatização.

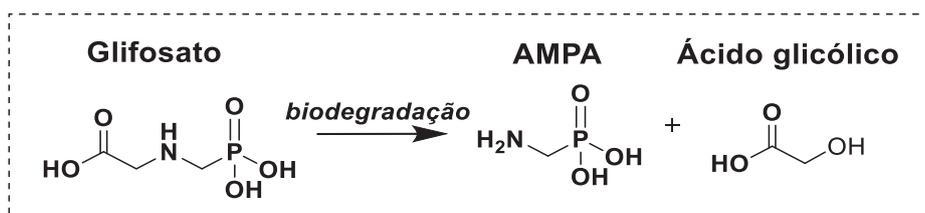
FIGURA 30- ESQUEMA DAS REAÇÕES DE HIDRÓLISE DAS MOLÉCULAS QUE FORAM AVALIADAS NESSE ESTUDO.



Fonte: O Autor (2025).

Vale ressaltar que o DNFB e o glifosato já vêm sendo estudados pelo nosso grupo de pesquisa, e, em estudo anterior¹⁰⁷, foi evidenciado que nas condições em que são conduzidas esses estudos, nenhuma reação ocorre com o glifosato. Lembrando o que já foi mencionado anteriormente, que o AMPA, principal metabólito do glifosato se forma somente através da biodegração (Figura 31).⁶²

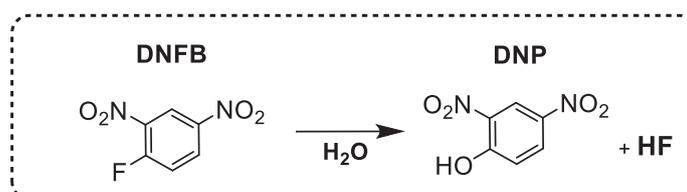
FIGURA 31- ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO GLIFOSATO.



Fonte: Adaptado de Silerio-Vásquez, *et al.*(2024).⁵³

Ainda, de acordo com esse mesmo estudo, o DNFB pode hidrolisar em meio aquoso, formando o DNP (Figura 32), contudo, sua hidrólise espontânea é lenta ($k_{H_2O} = 1,82 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1} \text{ L mol}^{-1}$). A hidrólise alcalina do DNFB foi avaliada e ficou evidente o perfil característico da formação do DNP, com comprimentos de onda máximos de 340 e 400 nm e $k_{OH} = 7,05 \text{ min}^{-1} \text{ L mol}^{-1}$, bastante superior em relação à hidrólise espontânea do DNFB.

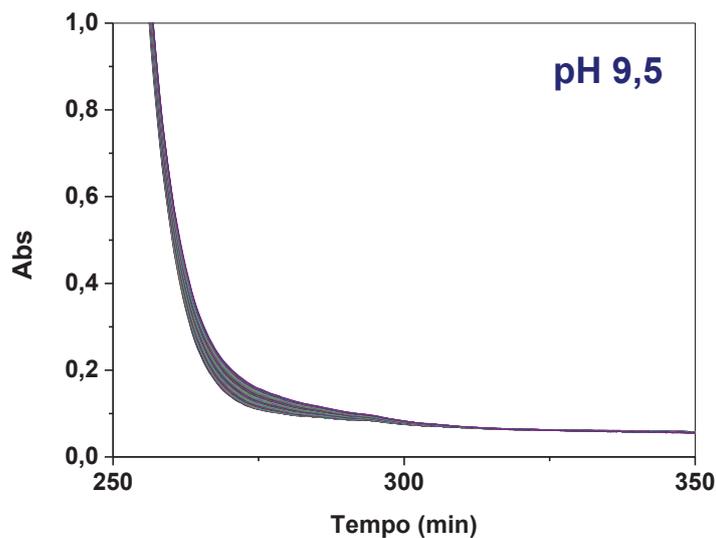
FIGURA 32- ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DNFB.



FONTE: O Autor (2025).

O acefato teve sua hidrólise acompanhada em diferentes pH's (7,0, 9,0 e 9,5) e não se mostrou reativo nas condições avaliadas. Na Figura 33, é apresentado o conjunto de espectros obtidos para a reação de hidrólise do acefato em pH 9,5 (demais espectros estão apresentados no Anexo A1), onde é possível observar uma pequena variação de absorvância na região próxima a 270 nm. Essa variação pode ser devida somente ao reagente, indicando que a reação é muito lenta e praticamente nada aconteceu até esse momento, o que evidencia que, de fato, o acefato é muito pouco reativo, o que de certa forma é esperado e bom para a detecção colorimétrica, porém, por outro lado dificulta encontrar moléculas que reajam com o acefato e levem à mudança de cor.

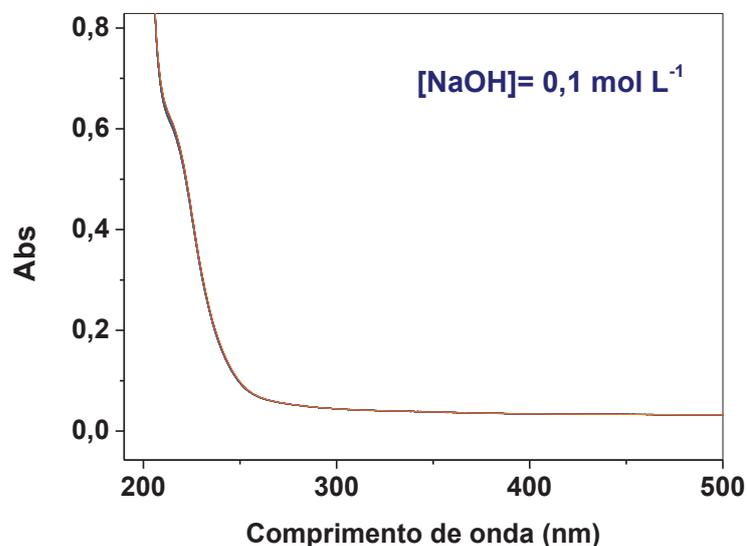
FIGURA 33- REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ACEFATO ACOMPANHADA POR 17 h, EM pH 9,5, T= 25 °C, [ACF]= 0,05 mol L⁻¹.



Fonte: O Autor (2025).

Nos valores avaliados de pH não se observou a formação de produto de hidrólise que absorva na região do espectro do UV-Visível, a hidrólise alcalina do acefato também foi estudada em NaOH de 0,1 mol L⁻¹ (pH 13,0), e está apresentada na Figura 34. Novamente, os dados obtidos evidenciam que nenhuma banda de absorção foi observada também nessa condição. Este resultado é bastante favorável à proposta do trabalho, pois as condições utilizadas nas reações de derivatização são mais brandas se comparadas a essa condição testada para a reação de hidrólise.

FIGURA 34- REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ACEFATO ACOMPANHADA POR 17 h, EM $[\text{NaOH}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 13,0), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{ACF}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

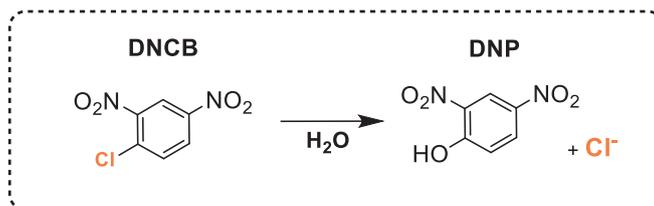


Fonte: O Autor (2025).

Como nenhum produto foi observado através da técnica de UV-Vis, a hidrólise do acefato em pH 10,0 foi acompanhada também através da espectroscopia de RMN e será apresentada junto aos estudos mecanísticos da reação do acefato com as moléculas derivatizantes.

Como o glifosato foi avaliado em outro trabalho anterior, e já se sabe que não hidrolisa nas condições das reações de derivatização¹⁰⁷, foram realizados os estudos cinéticos das reações de hidrólise dos derivatizantes (acompanhadas por UV-Vis e espectroscopia de RMN). O DNFB, assim como o DNFB, pode hidrolisar formando o DNP (FIGURA 35), que apresenta comprimentos de onda máximos na região próxima a 340 e 400 nm.

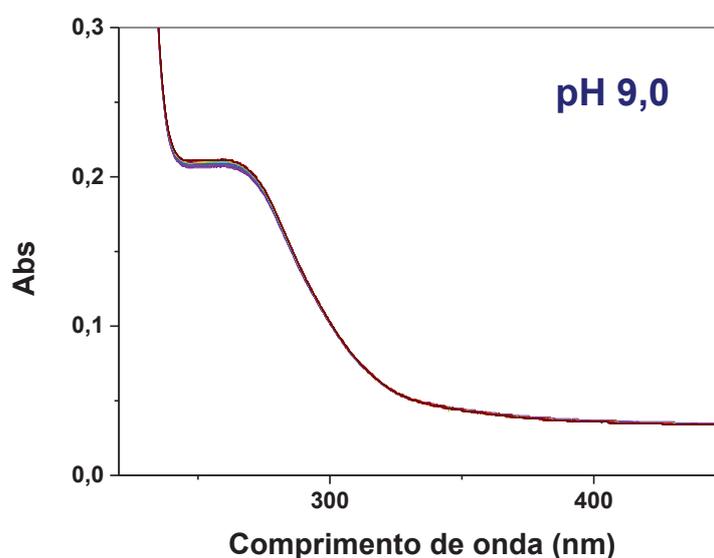
FIGURA 35- ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DNCB.



Fonte: O Autor (2025).

As reações de hidrólise do DNCB foram acompanhadas na faixa de pH 7,0 – 10,0, sendo que em nenhuma condição avaliada houve variação na absorbância, indicando que a hidrólise do DNCB não leva a produtos que absorvem nessa região do espectro. Isso pode ser observado na Figura 36, que apresenta o conjunto de espectros obtidos para essa reação em pH 9,0 (demais espectros estão apresentados no Anexo A2). A ausência da banda em 340 nm referente ao DNP (produto que seria esperado de sua hidrólise) pode indicar que mesmo em condições mais alcalinas a hidrólise do DNCB é muito lenta e não foi observada durante o tempo em que a reação de hidrólise foi acompanhada.

FIGURA 36- REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DNCB ACOMPANHADA POR 17 h, EM pH 9,0, T= 25 °C, [DNCB]= 10⁻⁵ mol L⁻¹.

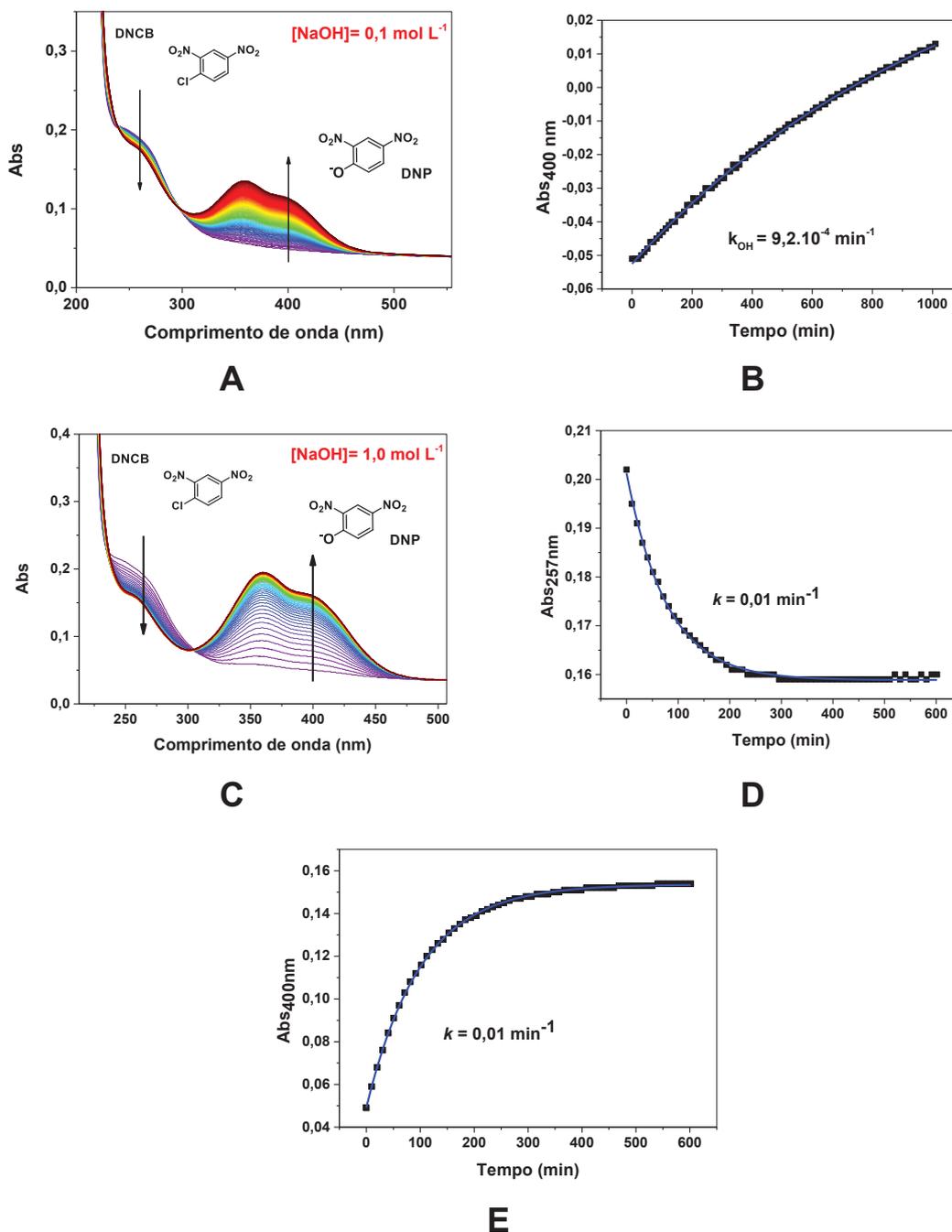


Fonte: O Autor (2025).

Como o DNFB não apresentou reatividade para a hidrólise nesses valores de pH, o estudo envolvendo a hidrólise alcalina dessa molécula também é importante. Através da hidrólise alcalina é possível saber qual será o produto formado (ou produtos formados) e se diferem em relação àqueles formados através das reações entre o glifosato e acefato e essas moléculas derivatizantes. Além disso, possibilita saber também qual a contribuição dessa hidrólise alcalina na formação do(s) produto(s). Assim, foi realizada a hidrólise alcalina do DNFB, em duas diferentes concentrações de NaOH (0,1 e 1,0 mol L⁻¹). Essas reações foram acompanhadas por 17 horas e à temperatura ambiente utilizando a técnica de UV-Vis. Na Figura 37 estão apresentados os espectros consecutivos e também dos ajustes cinéticos obtidos para a hidrólise alcalina do DNFB, cujo produto formado é o DNP.

Na reação de hidrólise do DNFB em meio aquoso (pH 9,0) não se observava a banda de absorvância referente a formação desse produto, diferentemente da reação de hidrólise alcalina do DNFB. Nas reações sob condições mais alcalinas (acima do pH 13,0) se pode ver claramente (Figuras 37 **(A)** e 37 **(C)**) a formação da banda em aproximadamente 340-400 nm referente à formação do produto fenólico DNP, bem como do consumo do reagente próximo à 250 nm. O ajuste cinético dos dados para a reação com [NaOH] igual à 0,1 mol L⁻¹ está apresentado na Figura 37 **(B)**. É possível verificar na figura que alguns valores de absorvância estão na região negativa, o que não faria sentido experimental. Entretanto, os mesmos correspondem à correção dos valores em relação à absorvância do ponto isobéptico ($Abs_{iso} - Abs_{400\text{ nm}}$). O ajuste para essa reação foi possível somente para a formação do produto, o qual evidencia que a hidrólise alcalina do DNFB ($9,2 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$) é bastante lenta nessa concentração de íons hidróxido. Já em relação à reação onde a [NaOH] é de 1,0 mol L⁻¹ foi possível obter os ajustes referentes à formação do produto (Figura 37 **(E)**) e também do consumo do reagente (Figura 37 **(D)**). A constante de velocidade obtida ($0,01 \text{ min}^{-1} \text{ L mol}^{-1}$) evidencia a contribuição dos íons hidróxido na formação do produto fenólico, e a menor reatividade para a hidrólise, em comparação ao DNFB, que apresenta uma taxa de $7,05 \text{ min}^{-1} \text{ L mol}^{-1}$. Ou seja, o DNFB contribui menos para a formação do produto colorimétrico do que o DNFB.

FIGURA 37- REAÇÃO DE HIDRÓLISE ALCALINA DO DNCB ACOMPANHADA POR 17 h, T= 25 °C, [DNCB]= 10^{-5} mol L⁻¹. (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS DA HIDRÓLISE ALCALINA COM [NaOH]= 0,1 mol L⁻¹, (B) AJUSTE CINÉTICO PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE COM [NaOH]= 0,1 mol L⁻¹ OBTIDO UTILIZANDO A EQUAÇÃO 1, (C) ESPECTROS CONSECUTIVOS DA HIDRÓLISE ALCALINA COM [NaOH]= 1,0 mol L⁻¹, (D) AJUSTE CINÉTICO PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE COM [NaOH]= 1,0 mol L⁻¹ OBTIDO UTILIZANDO A EQUAÇÃO 2 E (E) AJUSTE CINÉTICO PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE COM [NaOH]= 1,0 mol L⁻¹ OBTIDO UTILIZANDO A EQUAÇÃO 1.

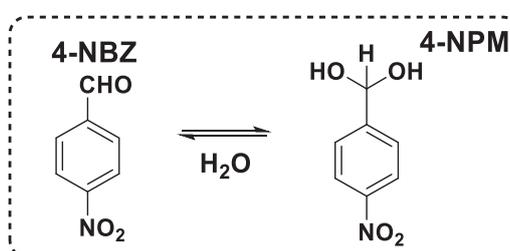


Fonte: O Autor (2025).

Assim, para o DNCB, de forma geral, pode-se afirmar que em condição de pH levemente alcalino (pH 7,0 – 10,0) sua hidrólise não contribui, o que pode indicar que nesses valores de pH a possível formação de um produto colorido se dará em maior parte através da reação de derivatização de interesse.

Assim também ocorre com o 4-NBZ, cuja reação de hidrólise pode levar à obtenção de um diol, o 4-(nitrofenil)metanodiol (4-NPM), conforme representado na Figura 38. Esse produto é formado pelo ataque nucleofílico da água ao carbono da carbonila, levando a um possível equilíbrio entre as espécies, diol \rightleftharpoons aldeído.

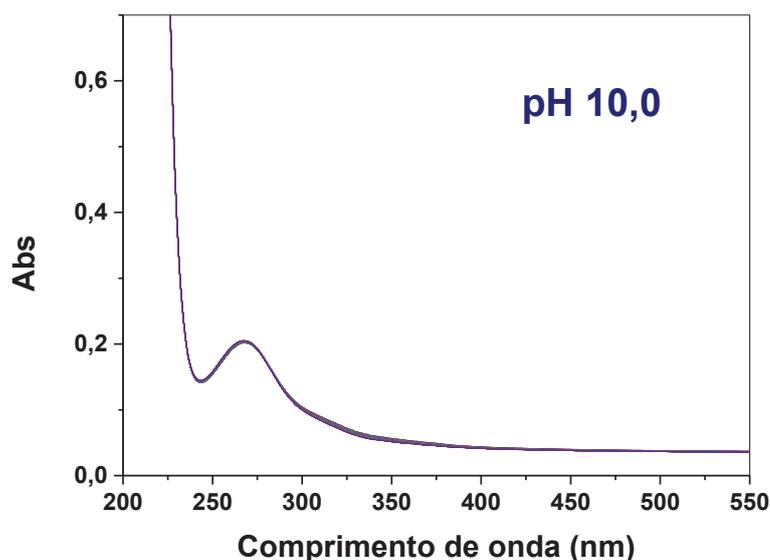
FIGURA 38- ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO 4-NBZ.



Fonte: O Autor (2025).

A hidrólise desse derivatizante foi avaliada em pH 7,0-10,0 e em diferentes concentrações. Em soluções de pH 7,0 a 10,0 nenhuma variação de absorbância foi observada. O conjunto de espectros relativos à essa reação de hidrólise do 4-NBZ em 10,0 está apresentado na Figura 39 (demais espectros estão apresentados no Anexo A3). Esses resultados são interessantes porque mostram que a hidrólise do 4-NBZ não ocorre nessas condições de reação, e dessa forma ela pouco influenciará na formação de produto que absorva nessa região do espectro.

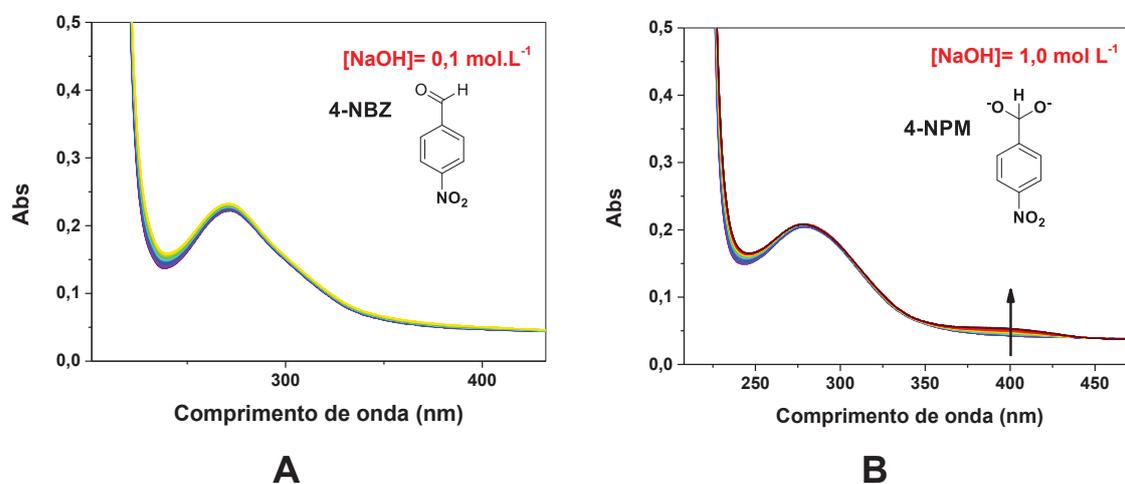
FIGURA 39- REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO 4-NBZ ACOMPANHADA POR 17 h, EM pH 10,0, T= 25 °C, [4-NBZ] = 10⁻⁵ mol L⁻¹.



Fonte: O Autor (2025).

A cinética da reação de hidrólise do 4-NBZ também foi avaliada em duas diferentes concentrações de NaOH, sendo 0,1 e 1,0 mol L⁻¹. Essas reações foram acompanhadas por 17 horas e à temperatura ambiente e os conjuntos de todos os espectros obtidos estão apresentados na Figura 40. Em **(A)** é possível observar que para a [NaOH]= 0,1 mol L⁻¹ nem mesmo fica evidente a diferenciação entre as possíveis bandas formadas, ou seja, o conjunto de espectros se assemelha a uma linha contínua. Para a reação com [NaOH]= 1,0 mol L⁻¹ (Figura 40 **(B)**) a formação da banda em 400 nm é perceptível, porém tão pequena que não possibilita um ajuste seguro dos dados. Essa banda em 400 nm possivelmente se deve à desprotonação do 4-NPM, uma vez que a concentração de hidróxido nesse meio é bem elevada, e nessa forma possivelmente ele estaria absorvendo próximo a essa região. São transições $\pi - \pi^*$ devido ao sistema aromático do anel benzênico e transições $n - \pi^*$, relativas às transições eletrônicas do grupo nitro (-NO₂) e pares de elétrons livres no oxigênio e nitrogênio.

FIGURA 40- REAÇÃO DE HIDRÓLISE ALCALINA DO 4-NBZ ACOMPANHADA POR 17 h, T= 25 °C, [4-NBZ] = 10^{-5} mol L⁻¹. (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS DA HIDRÓLISE ALCALINA COM [NaOH]= 0,1 mol L⁻¹, (B) ESPECTROS CONSECUTIVOS DA HIDRÓLISE ALCALINA COM [NaOH]= 1,0 mol L⁻¹.

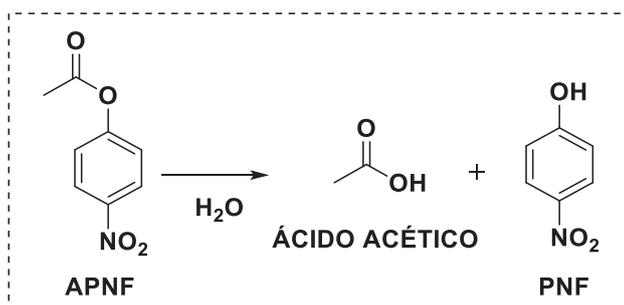


Fonte: O Autor (2025).

Esses dados evidenciam que nas condições em que foram realizadas as reações de derivatização (ver a seguir), a reação de hidrólise dos derivatizantes analisados não contribui significativamente para formação do produto de interesse e essas moléculas se mostram interessantes para as reações frente ao ACF.

O APNF é outra molécula estudada para a detecção do glifosato e teve seu estudo de hidrólise avaliado nas mesmas condições da reação com o OF. Nesse caso ele foi usado para detecção indireta de glifosato pela reação nucleofílica e dessa forma é importante avaliar qual a contribuição da reação de hidrólise para a formação do produto que permite identificar a presença de glifosato. A hidrólise do APNF leva à formação do acetato e do p-nitrofenol (PNP) (Figura 41), e a cinética dessa reação foi acompanhada em diferentes condições de pH (9,0-10,5), à temperatura de 25 °C, mas por um tempo menor em relação aos demais derivatizantes, visto que sua hidrólise é conhecida mais rápida em relação às outras moléculas avaliadas.

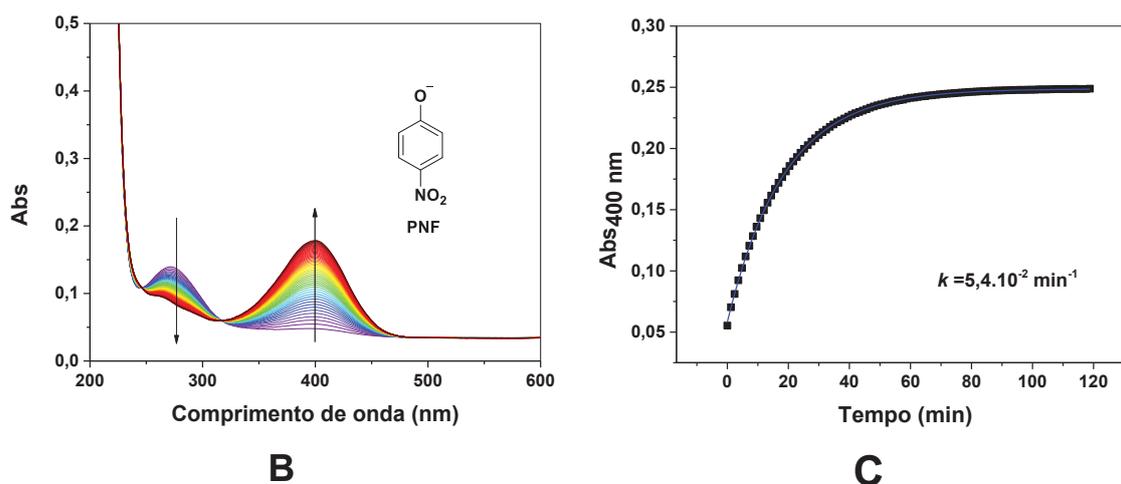
FIGURA 41- ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO APNF FORMANDO O PNF, PRODUTO QUE POSSIBILITA A DETECÇÃO INDIRETA DO GLIFOSATO.



Fonte: O Autor (2025).

A formação do PNF foi observada nas reações acompanhadas em pH 9,0, 9,5, 10,0 e 10,5, com a formação de uma banda de absorção bastante intensa na região próxima à 400 nm (Figura 42 **(A)**). Essa reação de hidrólise do APNF é mais lenta próximo ao pH 7,0, podendo ser considerada desfavorável¹²⁴, mas acima de pH 9,0 se mostrou mais rápida, obtendo-se uma constante de velocidade de $5,4 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ em pH 10,0, por exemplo (Figura 42 **(B)**).

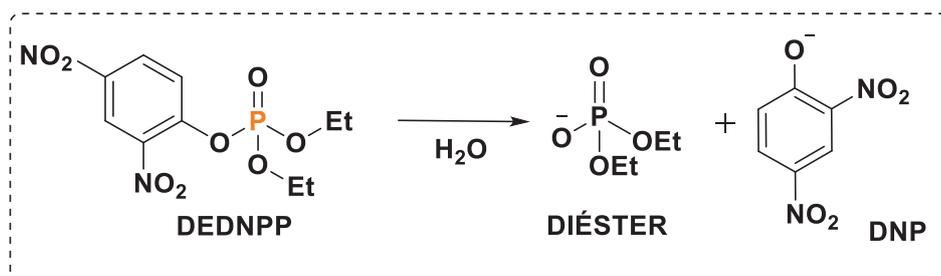
FIGURA 42- REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO APNF ACOMPANHADA POR 2 h, EM pH 10,0, T= 25 °C, [APNF]= $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. **(A)** ESPECTROS CONSECUTIVOS DA HIDRÓLISE EM MEIO AQUOSO DO APNF, **(B)** AJUSTE CINÉTICO OBTIDO UTILIZANDO A EQUAÇÃO 1 (PARA PRODUTO).



Fonte: O Autor (2025).

Outra molécula para detecção indireta de glifosato foi avaliada nesse estudo, o 2,4-dinitrofenilfosfato (DEDNPP), que, assim como o APNF sofre hidrólise (Figura 43) e um dos produtos formados, o DNP, é colorido (cor amarela) e pode indicar a presença de glifosato no meio reacional.

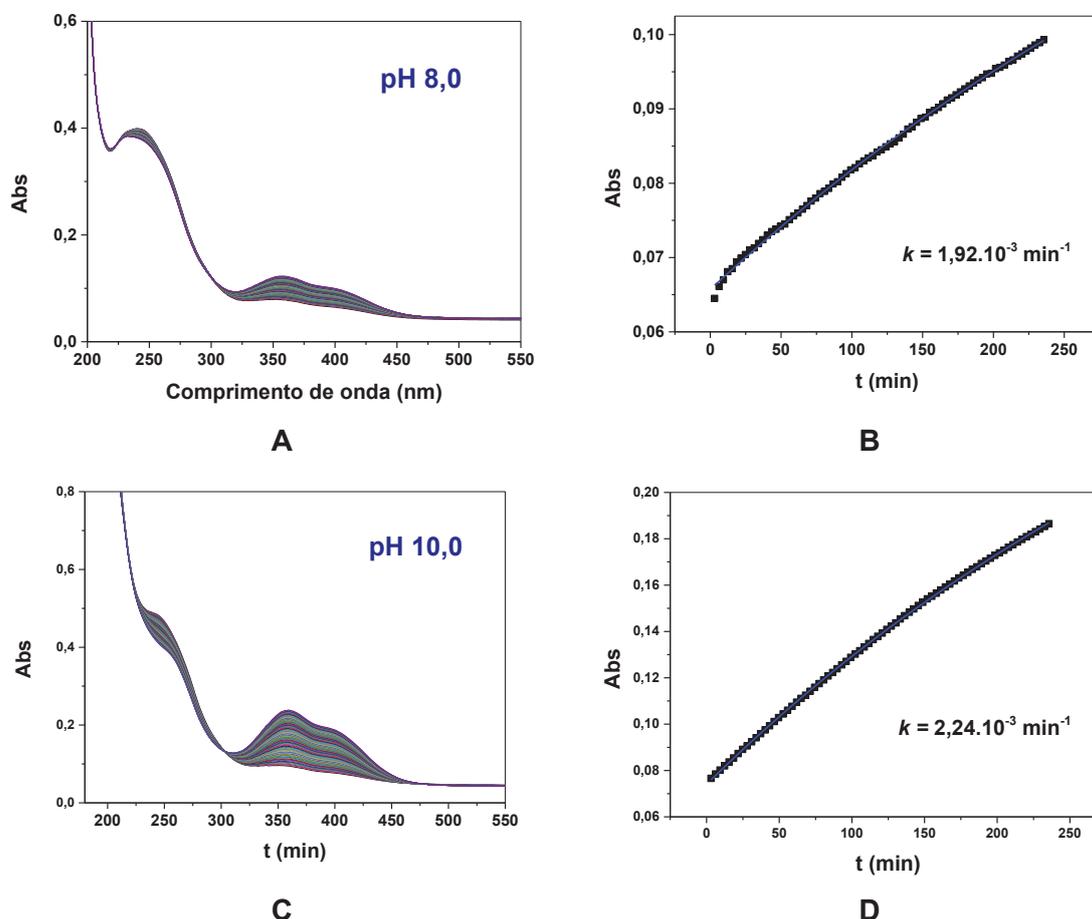
FIGURA 43-ESQUEMA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DEDNPP FORMANDO O DNP, PRODUTO QUE POSSIBILITA A DETECÇÃO INDIRETA DO GLIFOSATO.



Fonte: O Autor (2025).

A fim de possibilitar uma avaliação mais precisa sobre essas reações, a hidrólise do DEDNPP também foi acompanhada por espectroscopia de UV-Vis. As reações foram acompanhadas por espectroscopia de UV-Vis a T = 25 °C pelo tempo de 3 horas, na faixa de pH 8,0 - 10,0, e os resultados obtidos para a condição de menor e de maior pH estão apresentados na Figura 44.

FIGURA 44- (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DEDNPP EM pH 8,0 e T=25 °C, [DEDNPP]= 10^{-5} mol L⁻¹, (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 400 nm, pH 8,0, (C) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO DEDNPP EM pH 10,0 e T = 25 °C; [DEDNPP]= 10^{-5} mol L⁻¹, e (D) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO PNP EM 400 nm, pH 10,0.



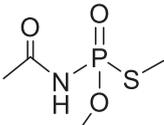
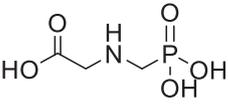
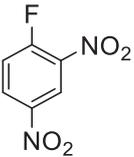
Fonte: O Autor (2025).

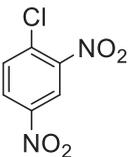
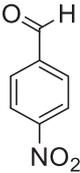
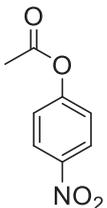
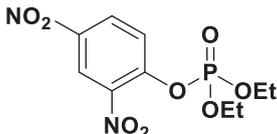
Os conjuntos de todos os espectros obtidos para as reações de hidrólise do DEDNPP em ambos os valores de pH evidenciam o perfil típico para a hidrólise desse OF (Figura 44 (A) e (C)), com maior intensidade da banda de absorção em 400 nm para a reação em pH 10,0. Observando-se as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem obtidas para essas reações fica evidente que a hidrólise é uma via competitiva à reação do DEDNPP com o glifosato. Ainda, a hidrólise do DEDNPP ($k = 2,24 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$), ocorre com uma constante mais lenta do que a hidrólise do APNF, que tem uma constante de velocidade observada de $5,4 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ para as mesmas condições de reação.

A Tabela 3 resume de forma mais simplificada todos os resultados obtidos através das reações de hidrólise dessas moléculas, os OF's, os derivatizantes e as moléculas para detecção indireta de OF's. O acefato e glifosato não hidrolisam nas

condições em que o estudo foi conduzido. Já as moléculas derivatizantes hidrolisam muito lentamente nas condições das reações de detecção colorimétrica, apresentando constantes de velocidade de reação somente em condições mais alcalinas ($[\text{NaOH}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), com concentração de íons hidróxido superior àquelas em que as reações foram realizadas, ou seja, essas hidrólises não contribuem para a formação dos produtos de interesse (ACFD e GFTD), que é bastante interessante para as reações de detecção colorimétrica. Já as moléculas para detecção indireta dos OF's, tanto APNF quanto DEDNPP apresentam constantes de velocidade para a hidrólise nas condições das reações de derivatização, podendo influenciar na formação do produto PNF. Contudo, os ajustes obtidos para o consumo do reagente, no caso do DNCB e APNF, são muito próximos, quando não iguais, às constantes de velocidade de formação dos produtos, o que aponta a formação de um único produto de hidrólise dessa molécula que absorve nessa região do espectro próxima a 400 nm.

TABELA 3- RESUMO DOS DADOS DAS REAÇÕES DE HIDRÓLISE DOS OF's E DERIVATIZANTES E DAS MOLÉCULAS PARA DETECÇÃO INDIRETA DE GLIFOSATO A T=25 °C.

COMPOSTO		HIDRÓLISE		Constante
		Condição avaliada	Evidência de produto	
OF's		pH 7,0-9,0	Não	—
	[ACEFATO]= $0,05 \text{ mol L}^{-1}$	[NaOH]= $0,1 \text{ mol L}^{-1}$		—
		[GLIFOSATO]= $0,05 \text{ mol L}^{-1}$	*Ocorre somente via biodegradação	Não
Derivati- zantes		Até [NaOH]= $0,04 \text{ mol L}^{-1}$	Sim	* $k = 7,05 \text{ min.L.mol}^{-1}$

Moléculas para detecção indireta	 <p>[DNCB]= 10^{-5} mol L⁻¹</p>	<p>pH 7,0-10,0 [NaOH]= 0,1 mol L⁻¹ [NaOH]= 1,0 mol L⁻¹</p>	Sim	<p>[NaOH]=0,1 mol L⁻¹ $k_{prod}= 9.10^{-4} min^{-1}$</p> <hr/> <p>[NaOH]=1,0 mol L⁻¹ $k_{prod}= 0,01 min^{-1}$ $k_{reag}= 0,01 min^{-1}$</p>
	 <p>[4-NBZ]= 10^{-5} mol L⁻¹</p>	<p>pH 7,0-9,0</p>	Sim	—
		<p>[NaOH]=0,1 mol L⁻¹</p>	Sim	Não ajusta
	 <p>[APNF]= 10^{-5} mol L⁻¹</p>	<p>pH 9,0-10,5</p>	Sim	<p>pH 9,0 $k_{prod}= 3,5.10^{-2} min^{-1}$ $k_{reag}= 3,7.10^{-2} min^{-1}$</p> <p>pH 9,5 $k_{prod}= 3,2.10^{-2} min^{-1}$ $k_{reag}= 3,0.10^{-2} min^{-1}$</p> <p>pH 10,0 $k_{prod}= 5,4.10^{-2} min^{-1}$ $k_{reag}= 5,5.10^{-2} min^{-1}$</p> <p>pH 10,5 $k_{prod}= 1,4.10^{-1} min^{-1}$ $k_{reag}= 1,4.10^{-1} min^{-1}$</p>
	 <p>DEDNPP</p>	<p>pH 8,0-10,0</p>	Sim	<p>pH 8,0 $k_{prod}= 1,9.10^{-3} min^{-1}$</p> <p>pH 9,0 não ajusta</p> <p>pH 9,5 não ajusta</p> <p>pH 10,0</p>

				$k_{prod} = 2,2 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$
--	--	--	--	---

*Hellinger, R., et al., 2020¹⁰⁷.

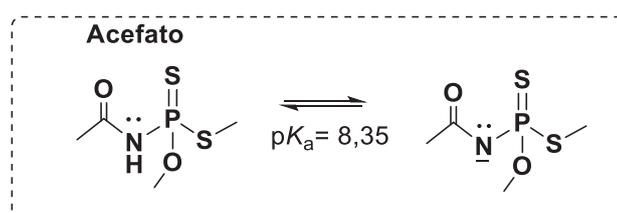
*Silerio-Vásquez, et l., 2024⁵³

Fonte: O Autor (2025).

5.2.2 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES COM O ACEFATO

Estamos buscando a detecção colorimétrica do acefato, e assim, é muito importante conhecer sobre a sua reatividade, quais fatores influenciam sua reatividade e quais produtos podem ser formados. O pK_a do hidrogênio ligado ao nitrogênio do acefato é próximo a 8,35 (Figura 45) e isso é importante porque as reações que propomos aqui envolvem o ataque nucleofílico desse átomo de nitrogênio a centros eletrofílicos presentes na estrutura química dos derivatizantes. Considerando os resultados obtidos até então com as reações de hidrólise foram realizados os estudos cinéticos do acefato com os derivatizantes propostos: 4-NBZ, DNCB e DNFB.

FIGURA 45- ESQUEMA DO EQUILÍBRIO DE DISSOCIAÇÃO DO ACEFATO EM pK_a 8,35.



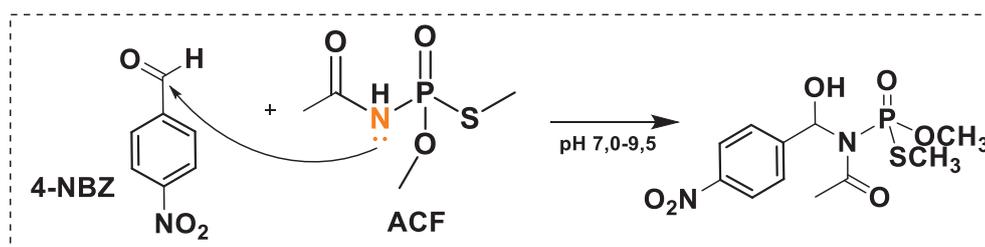
Fonte: O Autor (2025).

5.2.2.1 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO ACEFATO COM 4-NITROBENZALDEÍDO (4-NBZ)

Como já mencionado anteriormente, existem poucos estudos acerca de detecção do acefato, lembrando que ainda muito pouco se sabe acerca da sua reatividade e que as reações entre esse OF com as moléculas derivatizantes escolhidas são inéditas na literatura. Diferentemente do glifosato, que possui um

grupo funcional amina em sua estrutura, o acefato apresenta um nitrogênio amídico, que, apesar de menos reativo quando comparado ao nitrogênio de aminas, também se espera que possa atacar o carbono carbonílico da porção aldeído do 4-NBZ, conforme esquematizado na Figura 46, levando à formação de um produto colorido que possa ser detectado colorimetricamente.

FIGURA 46- POSSÍVEL REAÇÃO ENTRE ACEFATO E 4-NBZ.



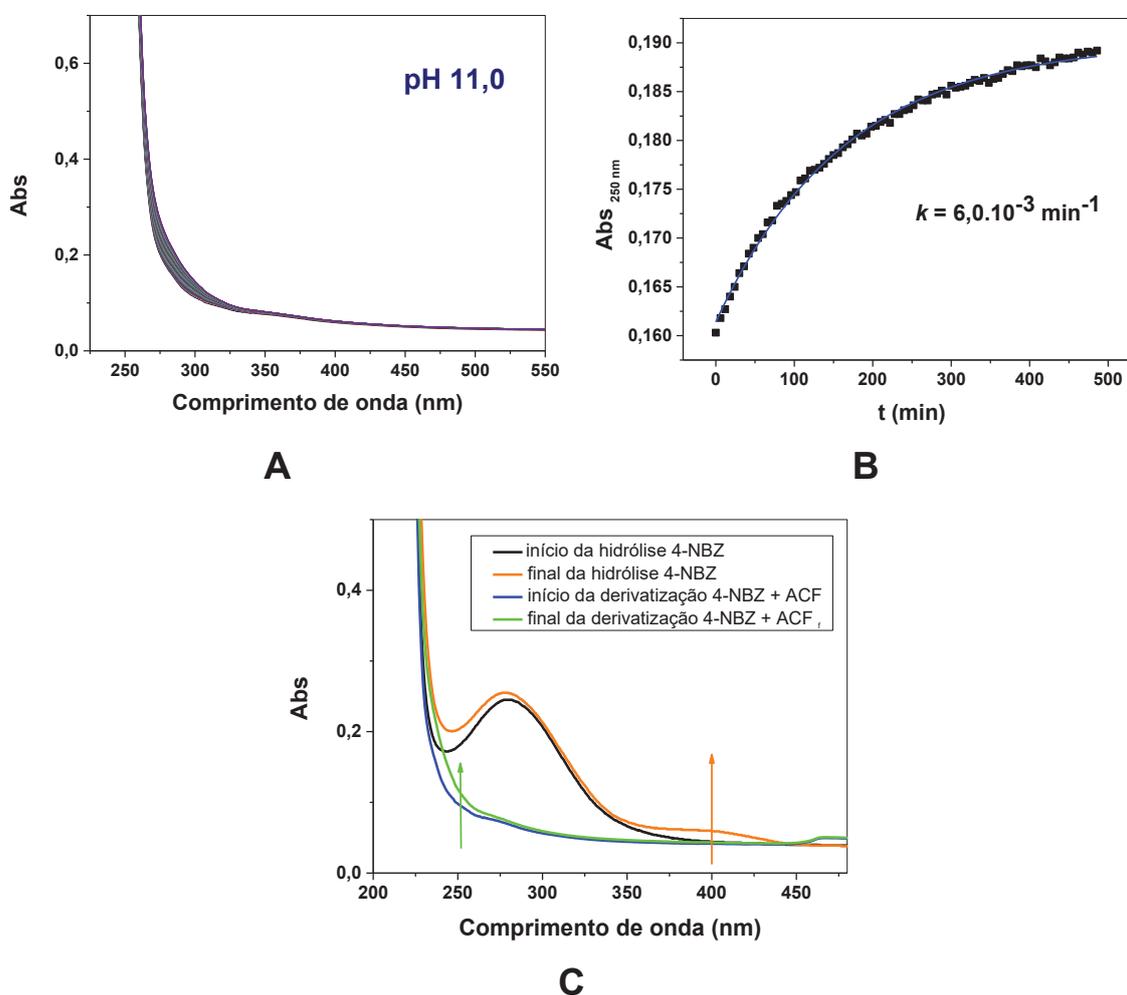
Fonte: O autor (2025).

A fim de verificar se ocorre a formação de produto, a reação entre acefato e 4-NBZ foi acompanhada no UV-Vis por 17 horas, na faixa de pH de 8,5-11,0, à temperatura ambiente. Foi observado que essa reação ocorre nessas condições de pH, e acima do pH 9,0 é possível observar a pequena variação na absorção na região próxima a 250 nm. O conjunto de espectros obtido com essa reação em pH 11,0, bem como a variação de absorbância em relação ao tempo estão apresentados na Figura 47.

Ao observar a Figura 47 **(A)** pode-se afirmar que há a formação de uma banda na região próxima a 250 nm, cuja variação na absorbância é pequena, mas que possivelmente corresponde a um produto novo. Esse produto, que pode ser detectado através do UV-Vis, teve seus dados experimentais ajustados à equação de uma cinética de pseudo-primeira ordem (Figura 47 **(B)**) e tem uma $k = 6,0 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Na Figura 47 **(C)** estão apresentados os espectros no início da reação de hidrólise alcalina do 4-NBZ (linha laranja) e no final dessa reação (linha verde). A diferença entre elas é importante porque evidencia se tratar de substâncias diferentes, que absorvem em regiões diferentes do espectro. Assim, olhando a Figura 47 **(C)** fica mais clara a diferença entre esses perfis e o comprimento de onda no qual absorvem: ~400 nm para a banda do produto de hidrólise do 4-NBZ e ~250 nm para a banda de absorção do produto formado através da reação do 4-NBZ e do acefato. Ressaltando que a formação desse produto de hidrólise do 4-

NBZ foi obtido sob uma concentração de NaOH de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, uma concentração alta de íons OH^- em relação à utilizada nessas reações (pH 7,0-9,5), o que mostra que realmente o produto da reação do 4-NBZ com acefato em 250 nm se deve à reação entre acefato e 4-NBZ. E que a hidrólise não contribui para esse processo, visto que em pH 11, 4-NBZ não evidencia nenhuma reação apenas em água.

FIGURA 47- (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO ACEFATO COM O 4-NBZ, COM $[\text{ACEFATO}] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{4-NBZ}] = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; pH 11,0 e $T = 25^\circ \text{C}$, (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO, EM 250 nm e (C) COMPARATIVO ENTRE OS PERFIS DE HIDRÓLISE DO 4-NBZ EM $[\text{NaOH}] = 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ COM OS PERFIS DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DO 4-NBZ COM O ACEFATO EM pH 11,0.

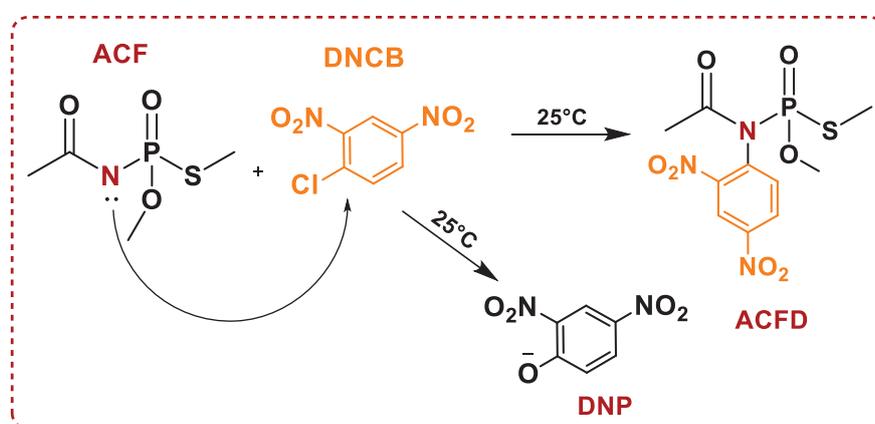


Fonte: O Autor (2025).

5.2.2.2 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO ACEFATO COM DNCB.

O DNCB pode reagir com o acefato formando o produto colorido ACFD, o que possibilita sua identificação e indica a formação de um composto novo. Essa reação pode ocorrer com o ataque nucleofílico do nitrogênio do acefato ao átomo de carbono aromático do DNFB. Porém, o DNCB pode também sofrer hidrólise em meio aquoso levando ao DNP, também amarelo, mas com diferente $\lambda_{\text{máx}}$. A Figura 48 apresenta o esquema dos possíveis caminhos da reação entre o acefato e o DNCB.

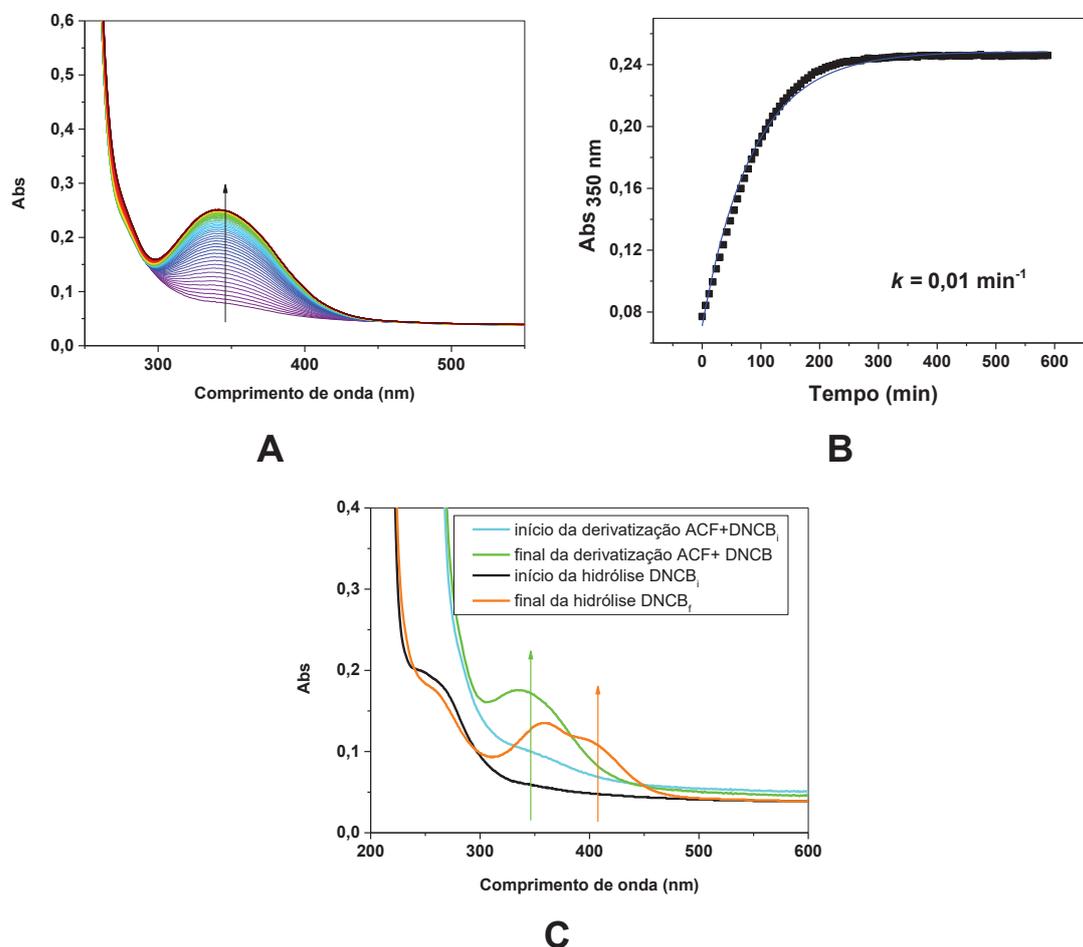
FIGURA 48- POSSIBILIDADES REACIONAIS ENTRE ACEFATO E DNCB: FORMAÇÃO DE UM NOVO PRODUTO OU HIDRÓLISE DO DNCB EM MEIO AQUOSO.



FONTE: O autor (2025).

Com o objetivo de conhecer o que de fato ocorre entre o acefato e DNCB e buscar otimizar as condições para essa reação foram realizados estudos iniciais, colocando duas condições diferentes, (i) com acefato em excesso e (ii) com DNCB em excesso. Os espectros consecutivos obtidos com acefato em excesso em pH 11,0 estão apresentados na Figura 49 (A), bem como o perfil cinético para essa reação na Figura 49 (B). Essa reação foi também realizada em pH 7,0 e 8,0, porém nessas condições de pH a reação não ocorreu (esses dados estão apresentados no Anexo A7). Já em condições um pouco mais alcalinas, pH 9,5, 10,0 e 10,5 (dados estão apresentados no Anexo 7), houve variação nas absorvâncias na região de formação do ACFD, entretanto não foi possível obter os ajustes cinéticos para esses dados, devido a reação ser lenta.

FIGURA 49- **(A)** ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO ACEFATO COM O DNCB, COM ACEFATO EM EXCESSO. $[ACF]=0,05 \text{ mol L}^{-1}$; $[DNCB]= 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; pH 11,0 e $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$. **(B)** PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 340 nm COM ACEFATO EM EXCESSO e **(C)** COMPARATIVO ENTRE OS PERFIS DE HIDRÓLISE DO DNCB EM $[NaOH]=1,0 \text{ mol L}^{-1}$ E DA REAÇÃO DO DNCB COM ACEFATO EM pH 11,0.



Fonte: O Autor (2025).

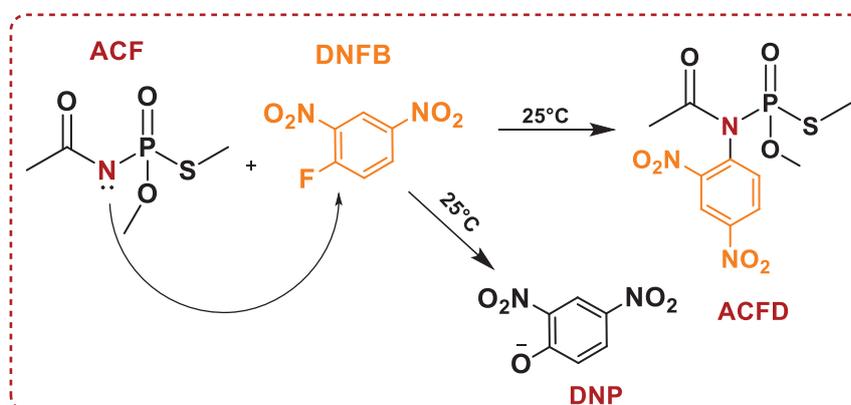
Analisando a Figura 49 **(A)** é possível observar o aparecimento de uma banda intensa em aproximadamente 345 nm, que corresponde à formação de um produto novo. Ainda, na Figura 49 **(B)** nota-se um ajuste satisfatório dos dados a um perfil de pseudo-primeira ordem, indicando que a reação nessas condições deve seguir esse perfil, e apresenta uma constante de velocidade de $0,01 \text{ min}^{-1}$. Ao compararmos os perfis da hidrólise alcalina do DNCB (em $[NaOH]= 1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e da reação do DNCB com o acefato em pH 11,0, Figura 49 **(C)**, percebemos que de fato trata-se de um produto diferente daquele formado pela hidrólise alcalina do DNCB. Ressalta-se que, assim como com o 4-NBZ, também nesse caso a

formação do produto de hidrólise do DNFB foi obtido somente sob uma concentração de NaOH de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ($k = 9,0 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$). Isso mostra que realmente o produto em 345 nm se deve à reação entre acefato e DNFB, pois em pH 11,0 a hidrólise praticamente não contribui. A condição com DNFB em excesso também foi estudada, mas foi observada sobreposição das bandas, tornando mais difícil o estudo dos sinais e impossibilitando a obtenção de um ajuste para essa cinética.

5.2.2.3 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO ACEFATO COM DNFB

O DNFB pode reagir com o nitrogênio presente na estrutura química do acefato, levando à formação do ACFD (produto que pode apresentar cor). De acordo com o estudo que avaliou a derivatização do glifosato com o DNFB, a reação de hidrólise do derivatizante é competitiva à reação de derivatização, e leva à formação do produto fenólico DNP que absorve na região $\sim 400 \text{ nm}$.¹⁰⁷ Da mesma forma pode ocorrer na reação do acefato com DNFB (Figura 50).

FIGURA 50- POSSIBILIDADES REACIONAIS ENTRE ACEFATO E DNFB: FORMAÇÃO DE UM NOVO PRODUTO E HIDRÓLISE DO DNFB EM MEIO AQUOSO.

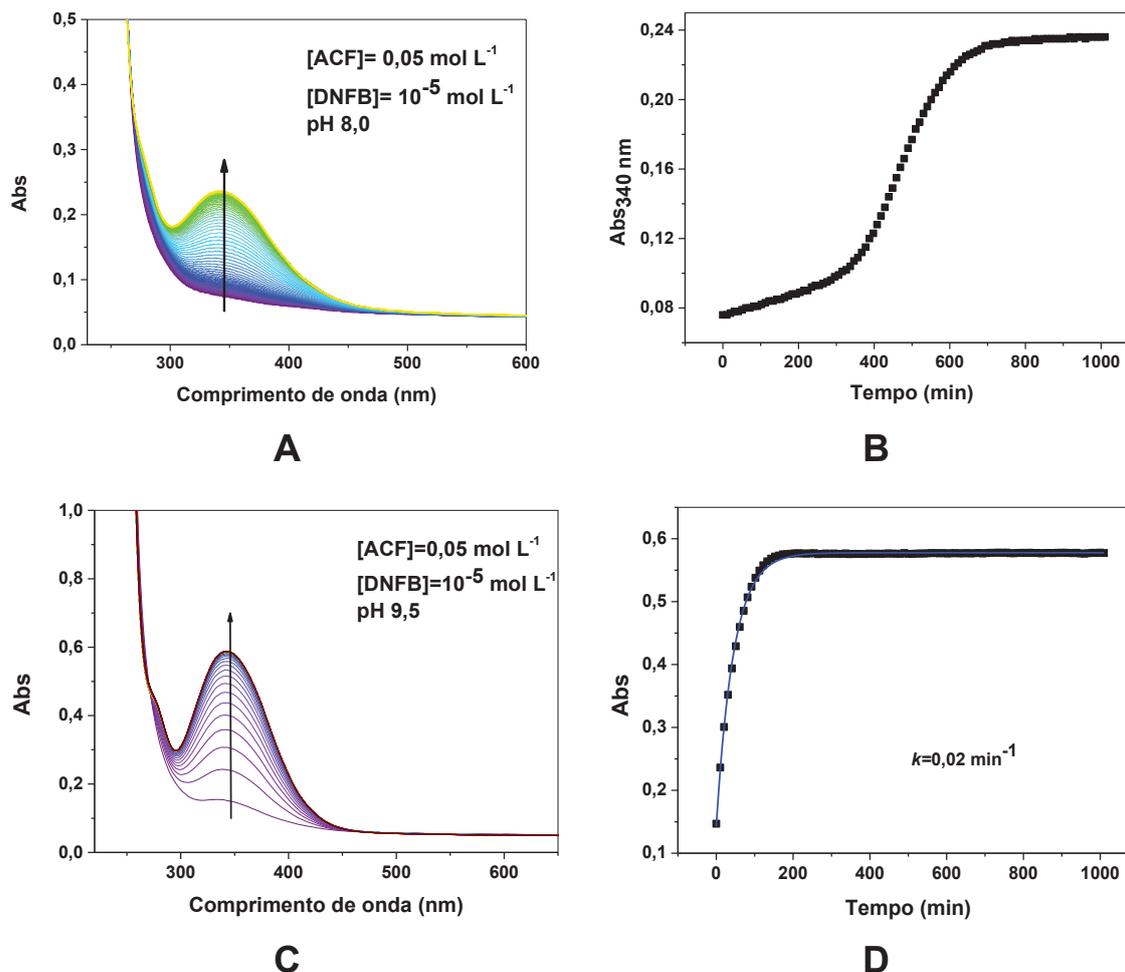


Fonte: O autor (2025).

Essa reação de derivatização, assim como as demais, foi acompanhada por UV-Vis por 17 horas, à temperatura ambiente, variando-se o pH, nesse caso, de 8,0-11,0 e em diferentes concentrações de acefato. A formação da banda em aproximadamente 340 nm foi observada em todas as condições de pH, evidenciando que com esse derivatizante o acefato foi bem reativo e conseguiu levar a reações com formação de produtos coloridos em todos os pH's avaliados, porém, somente em pH 9,5 foi obtido um bom ajuste dos dados à equação de

pseudo-primeira ordem. Os espectros consecutivos obtidos para essas reações estão apresentados na Figura 51, onde as Figuras 51 (A) e (B) se referem aos dados em pH 8,0 e as Figuras 51 (C) e (D) aos espectros obtidos em pH 9,5.

FIGURA 51- (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO ACEFATO COM O DNFB, COM ACEFATO EM EXCESSO. $[ACEFATO]=0,05 \text{ mol L}^{-1}$; $[DNFB]=10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; pH 8,0 e $T=25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 340 nm COM ACEFATO EM EXCESSO EM pH 8,0, (C) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO ACEFATO COM O DNFB, COM ACEFATO EM EXCESSO $[ACEFATO]=0,05 \text{ mol L}^{-1}$; $[DNFB]=10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; pH 9,5 e $T=25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e (D) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 340 nm COM ACEFATO EM EXCESSO EM pH 9,5.

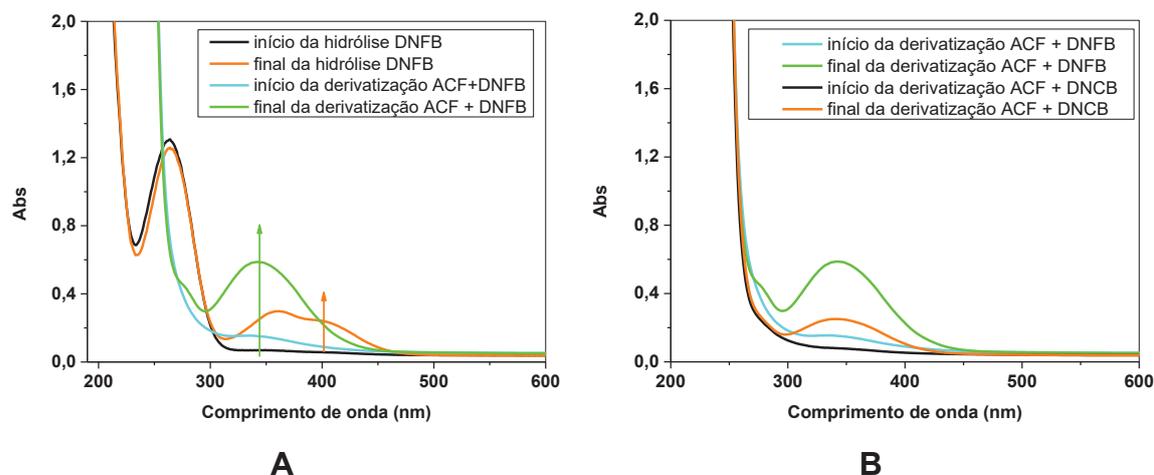


Fonte: O autor (2025).

Observando-se as Figuras 51 (A) e (C), fica evidente que a reação ocorre, visto que há o surgimento de uma banda que não existia no conjunto de espectros obtidos para o acefato. Ainda, essa banda de absorção em $\sim 340 \text{ nm}$, é claramente diferente daquela obtida para a hidrólise do DNFB, onde a banda de absorção referente ao produto DNP ocorre na região próxima a 400 nm . Assim, pode-se

afirmar que essa reação ocorre e o produto formado apresenta absorção nessa região do espectro e pode, portanto, ser detectado colorimetricamente. Porém, os dados experimentais referentes ao pH 8,0 (Figura 51 **(B)**) não se ajustam a uma equação de cinética de pseudo-primeira ordem, enquanto em pH maior, como no pH 9,5 (Figura 51 **(D)**), os dados experimentais seguem o modelo de pseudo-primeira ordem. Pode ser observada também a diferença entre os dois conjuntos de espectros obtidos para essas reações: em pH 8,0 (Figura 51 **(B)**) a reação se mostra mais lenta, e com um início de reação bastante diferente do que ocorre em pH 9,5 (Figura 51 **(D)**). Nessa condição de pH 9,5 a reação se mostra mais rápida ($k = 0,02 \text{ min}^{-1}$) e o perfil aumenta até a formação de um platô, que evidencia o final dessa reação logo após os 100 minutos. Apesar dos diferentes perfis cinéticos, em ambos os casos houve a formação de uma banda de absorção na região próxima à 340 nm, que possivelmente se deve ao produto colorimétrico de interesse. Quando comparamos os espectros consecutivos obtidos para a hidrólise alcalina do DNFB ($k=7,05 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$) e os espectros consecutivos obtidos para a reação do acefato com DNFB em pH 11,0 ($k = 0,02 \text{ min}^{-1}$) apresentados na Figura 52 **(A)**, pode-se perceber que a banda intensa na região próxima a 340 nm é claramente diferente da banda já conhecida da reação de hidrólise do DNFB em meio alcalino. Ainda, essa Figura 52 **(B)** exibe um comparativo entre os perfis obtidos para as reações do acefato com DNFB (laranja) e com DNFB (verde), onde fica evidente a formação do mesmo produto, uma substância que absorve em comprimento de onda máximo de aproximadamente 340 nm, e que já era esperado, de acordo com o que foi representado nos esquemas das Figuras 48 e 50. Ainda, vale ressaltar que a reação com DNFB se mostrou mais rápida e apresenta maior contribuição da hidrólise do derivatizante.

FIGURA 52- COMPARATIVO ENTRE (A) OS PERFIS DE HIDRÓLISE DO DNFB E DA REAÇÃO DO DNFB COM ACEFATO E EM (B) OS PERFIS DAS REAÇÕES ENTRE O DNFB E O DNCB COM O ACEFATO. T=25 °C, [ACF]=0,05 mol L⁻¹, [DNFB]= 10⁻⁵ mol L⁻¹, [DNCB]= 10⁻⁵ mol L⁻¹.



Fonte: O autor (2025).

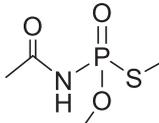
5.2.2.3 RESUMO DAS REAÇÕES DO ACEFATO COM 4-NBZ, DNCB E DNFB.

Um breve resumo relativo às reações de hidrólise dos derivatizantes e suas reações com acefato está apresentado na Tabela 4. Pode-se dizer que no caso das três moléculas derivatizantes avaliadas frente ao acefato, houve a formação da banda de absorção referente à formação de um produto, mas, em algumas condições sem ajuste dos dados experimentais ao modelo de pseudo-primeira ordem. A condição ótima para cada derivatizante corresponde ao pH do meio no qual a reação ocorreu e foi possível o ajuste dos dados a esse modelo cinético.

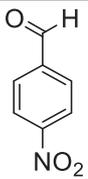
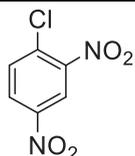
Observando os dados obtidos e mostrados nessa Tabela 4, podemos concluir que a formação do ACFD para a reação do acefato com o DNCB ($k=0,01 \text{ min}^{-1}$) é mais rápida do que o valor da constante obtido para a reação de hidrólise alcalina do DNCB ($k= 9,0 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$). Lembrando que nessas condições de pH em que foi realizada a reação de derivatização, a hidrólise não ocorre, não contribuindo para a formação do produto colorido. E, quando olhamos para os dados da reação do acefato com o DNFB a situação se repete, pois a reação tem uma constante de velocidade de $0,02 \text{ min}^{-1}$, enquanto a hidrólise alcalina do DNFB ocorre a uma taxa de $7,05 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$. Ou seja, a hidrólise do DNFB mesmo em condições mais alcalinas ocorre mais lentamente do que a reação de formação do ACFD, o que pode ser observado nessa Tabela 4, que apresenta o tempo de meia-vida para

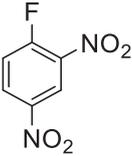
essas reações (~236 horas para a hidrólise e ~35 minutos para a reação com o acefato nesse pH 9,5). Quanto à reação do acefato com 4-NBZ, houve também uma pequena variação na absorbância na região próxima a 250 nm, indicando a formação de um produto novo, que apesar de incolor a olho nu, apresenta um perfil diferente daquele obtido para a hidrólise desse derivatizante e pode ser detectado através dessa técnica. Assim, ao olharmos os dados obtidos para essas reações podemos dizer que todas as moléculas avaliadas atingiram o objetivo de levar à formação do produto que possibilita a detecção do acefato através desse método. Dentre esses derivatizantes o DNFB é a molécula que se mostrou mais promissora, apresentando uma significativa variação na absorbância na região ~340 nm. Essa banda de absorção observada indica a formação do produto colorido ACFD em todos os pH's avaliados, e evidencia o potencial do DNFB para a derivatização de OF's, como já observado no estudo que inspirou esse trabalho.¹⁰⁷

TABELA 4- RESUMO DOS DADOS DAS REAÇÕES DOS OF's E DERIVATIZANTES A T=25 °C.



[ACEFATO]= 0,05 mol L⁻¹

Derivatizante	Faixa estudada (pH)	Condição ótima (pH)	Constante e t _{1/2}	t _{1/2} (hidrólise)
 [4-NBZ]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	8,5 – 11,0	11,0	k=0,006 min ⁻¹ t _{1/2} = 116 min	Não reage
 [DNCB]= 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	7,0 – 11,0	11,0	k=0,01 min ⁻¹ t _{1/2} = 70 min	Não reage

 [DNFB]=10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	8,0 – 11,0	9,5	<i>k</i> =0,02 min ⁻¹ <i>t</i> _{1/2} = 35 min	<i>t</i> _{1/2} = 236 h
--	------------	-----	--	---------------------------------

Fonte: O autor (2025)

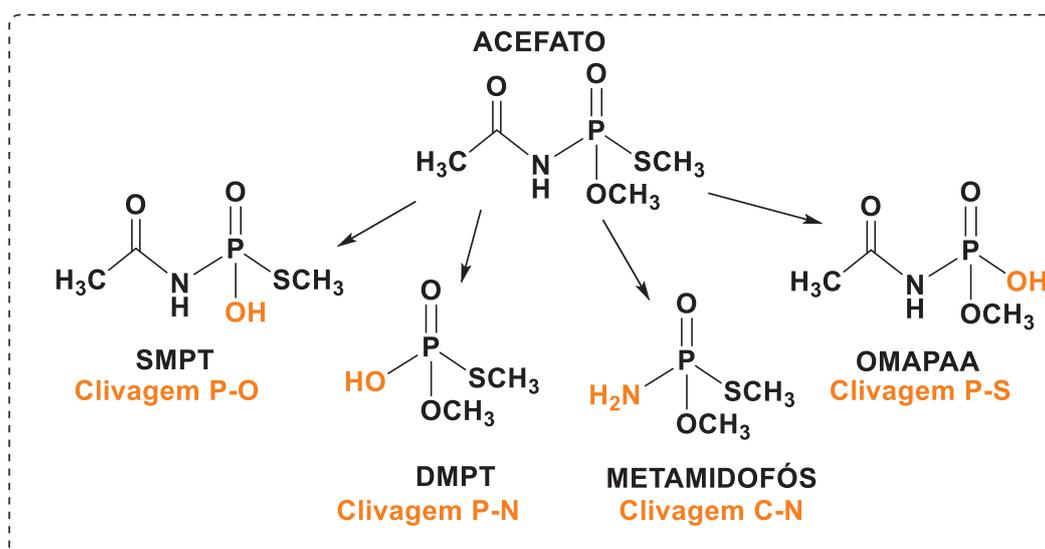
A fim de elucidar de forma completa o que ocorre em cada caso, qual o comportamento do acefato em solução e qual(is) o(s) produto(s) formados, foram realizadas análises através da técnica de RMN de ¹H e ³¹P para a reação de hidrólise do acefato e para essa reação entre o acefato e o DNFB.

5.2.3 ESTUDO MECANÍSTICO DAS REAÇÕES DO ACEFATO

5.2.3.1 REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ACEFATO

A cinética da reação de hidrólise do acefato foi acompanhada através da técnica de RMN a fim de compreender quais produtos poderiam estar sendo formados. Para que se possa verificar quais dessas moléculas, podemos, de fato, estar observando nos espectros de RMN consideramos o esquema na Figura 50, que mostra todas as possibilidades de produtos a partir das possíveis fragmentações da molécula do acefato (Figura 53).

FIGURA 53- PROVÁVEIS PRODUTOS QUE PODEM SER OBTIDOS A PARTIR DA HIDRÓLISE DA MOLÉCULA DO ACEFATO.

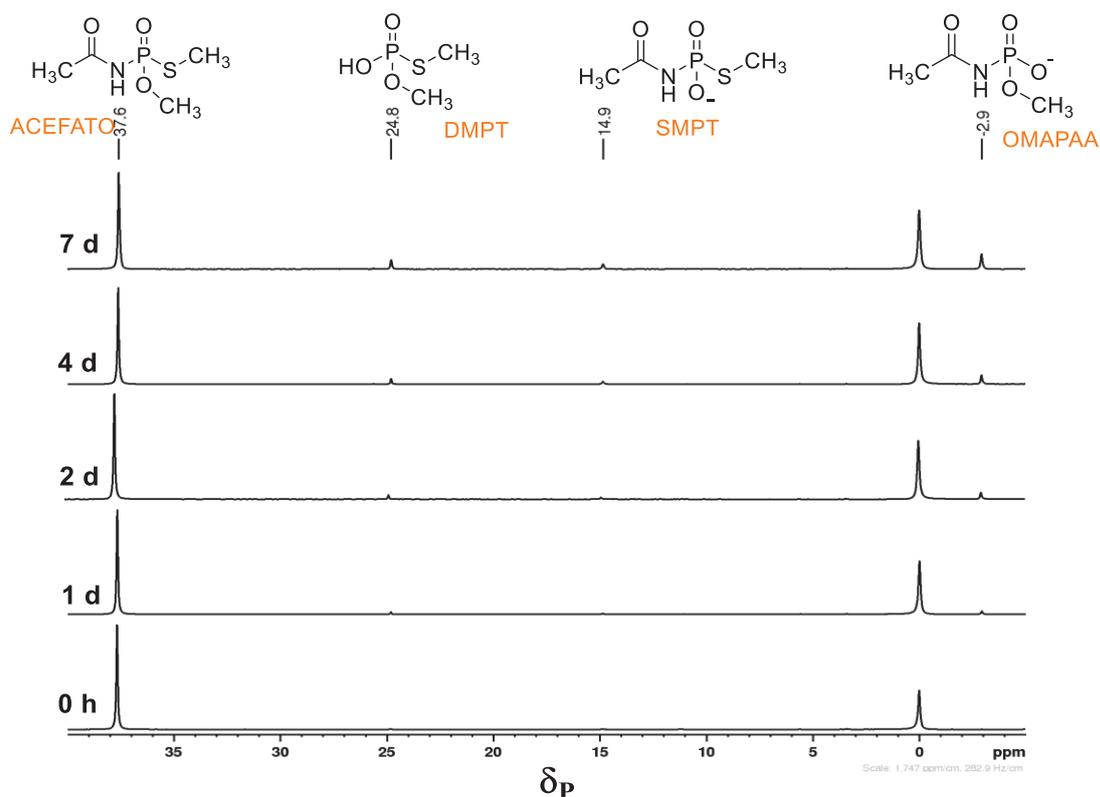


Fonte: O autor (2025).

O acefato é uma molécula quiral devido aos quatro ligantes diferentes no fósforo, além disso, apresenta quatro possíveis produtos resultantes das clivagens das ligações P-O, P-N, P-S e C-N (Figura 53). Através da quebra da ligação P-O se obtém o produto SMPT; se a quebra for na ligação P-S o produto será OMAPAA, enquanto que, se a ligação a quebrar for P-N o produto será o DMPT¹²⁰. Já o principal produto de hidrólise do acefato⁴⁸, o metamidofós, é formado a partir da quebra da ligação C-N. Com isso se torna mais clara a investigação sobre qual ou quais produtos podem ser formados através da reação do acefato com DNFB e com as outras moléculas derivatizantes.

Foi dada sequência, então, a um estudo acerca da hidrólise do acefato, através da técnica de RMN. Vale ressaltar que os estudos da hidrólise do acefato através da técnica de UV-Vis não apresentaram variação significativa na absorbância em toda a faixa de pH avaliada, o que apontava no sentido de não ocorrer reação nessas condições. Dessa forma, foram obtidos os espectros consecutivos através da técnica de RMN para a hidrólise básica, pH 10,0 (Figura 54), em temperatura ambiente.

FIGURA 54- ESPECTROS SUCESSIVOS ^{31}P {H} NMR (50 MHz, D_2O) PARA A REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ACEFATO ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pD 10,4, 25°C .



Fonte: O Autor (2025).

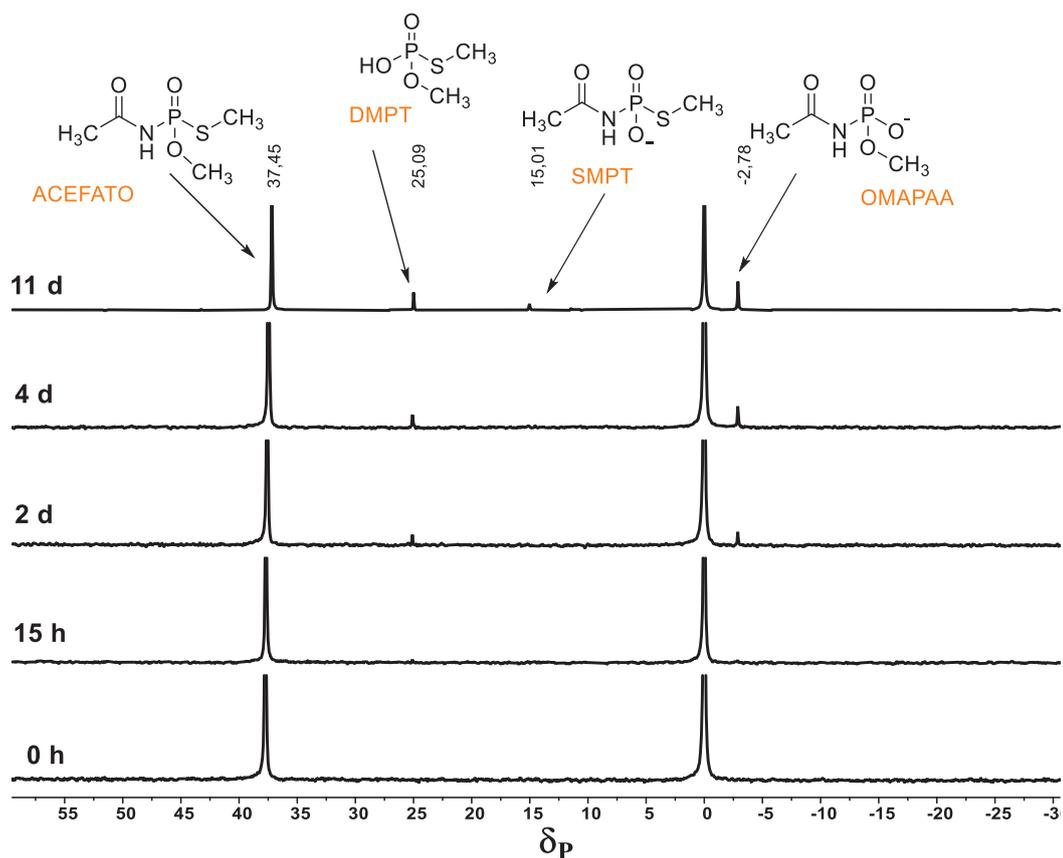
Os espectros sucessivos de RMN de ^{31}P para essa reação de hidrólise apresentados nessa Figura 54 evidenciam que há a formação dos três possíveis produtos de hidrólise¹²⁰: O sinal em 37,60 ppm referente ao acefato, o sinal observado em 14,90 ppm é atribuído ao SMPT, o sinal do DMPT em 24,80 ppm e em -2,90 ppm o sinal que indica também a formação do OMAPAA. Todos esses sinais foram observados em uma proporção bastante pequena em relação ao sinal do acefato, e, o início do surgimento dos sinais se dá somente após o primeiro dia de reação, não influenciando na formação de produtos da reação de derivatização do acefato, pois a mesma ocorre em um tempo inferior a 300 minutos.

5.2.3.2 ESTUDO MECANÍSTICO DA REAÇÃO DO ACEFATO COM DNFB.

A cinética da reação do acefato com DNFB também foi acompanhada através da técnica de RMN de ^{31}P nas mesmas condições da reação de hidrólise, e os espectros obtidos são apresentados a seguir (Figura 55). Com esses dados é

possível compreender qual ou quais produtos podem ser formados a partir dessa reação do acefato com DNFB e quais podem ser relativos à reação de hidrólise do DNFB.

FIGURA 55- ESPECTROS SUCESSIVOS ^{31}P NMR (50 MHz, D_2O) PARA A REAÇÃO DO DNFB ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) COM ACEFATO ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pD 10,4, 25°C .



Fonte: O Autor (2025).

Ao analisar a Figura 55, observando o final da reação, pode-se notar o surgimento de alguns sinais que apontam alguns produtos formados. Pode-se perceber a presença dos sinais referentes ao OMAPAA (produto da quebra da ligação P-S) próximo a $-2,78 \text{ ppm}$ e em $15,01 \text{ ppm}$ o sinal referente ao SMPT (da quebra da ligação P-O). Também é visto nesse espectro, sinal em $25,09 \text{ ppm}$ referente ao DMPT (da quebra P-N do acefato), além do sinal do próprio acefato na região de $37,45 \text{ ppm}$. Esses sinais observados são os mesmos que já foram observados nos espectros da hidrólise (pH 10,0) do acefato, e reportados na literatura como sinais dos possíveis produtos de hidrólise do acefato¹²⁰. Em ambos os experimentos realizados, da hidrólise e também da reação com DNFB, esses sinais são formados a partir do segundo dia de reação, e os espectros obtidos são

muito similares aos espectros obtidos através da reação de hidrólise do acefato, o que pode evidenciar que nessas condições nas quais temos realizado os experimentos de RMN a reação com DNFB provavelmente não está ocorrendo. Ou ainda que nas condições avaliadas, o produto formado está em pequena quantidade, não podendo ser detectado.

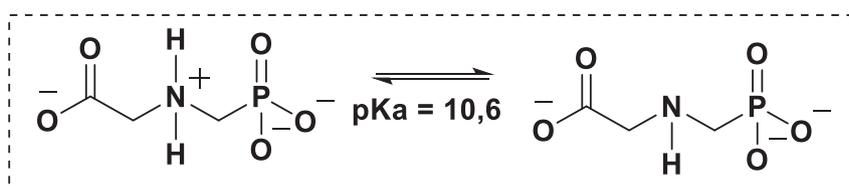
Vale lembrar que nos experimentos em que a cinética dessa reação do acefato com DNFB foi acompanhada através da técnica de UV-Vis, foi observada a formação de uma banda de absorção na região próxima a 340 nm, e que é diferente ao produto de hidrólise do DNFB. E que a hidrólise do acefato não leva à formação de produtos que absorvem na região do UV-visível. Então, através do UV-Vis mostramos que essa reação está ocorrendo, inclusive de forma relativamente rápida, visto que em pH 9,0, por exemplo, a partir de 100 minutos a reação atinge um platô, que estaria indicando o final dessa reação, com uma constante de $0,018 \text{ min}^{-1}$.

Em resumo, mesmo que ainda se tenha que confirmar o mecanismo e os produtos obtidos, nota-se que é uma reação promissora, que ocorre com a formação de um produto colorido que pode ser acompanhado através do detector colorimétrico, que é um dos objetivos desse trabalho, e, mais uma vez evidenciado, que a hidrólise não contribui significativamente para a formação desse produto,

5.2.4 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES COM O GLIFOSATO

Para que se possa avaliar a reação entre o glifosato e os derivatizantes é necessário observar o equilíbrio (Figura 56) entre as espécies do glifosato presentes no meio, nas condições de pH em que avaliamos essas reações de derivatização. Isso é importante porque é a espécie que possui os oxigênios desprotonados (acima de pH 10,6) a que apresenta maior reatividade para atuar como nucleófilo em reações de substituição nucleofílica.

FIGURA 56- EQUILÍBRIO ENTRE AS ESPÉCIES DO GLIFOSATO.

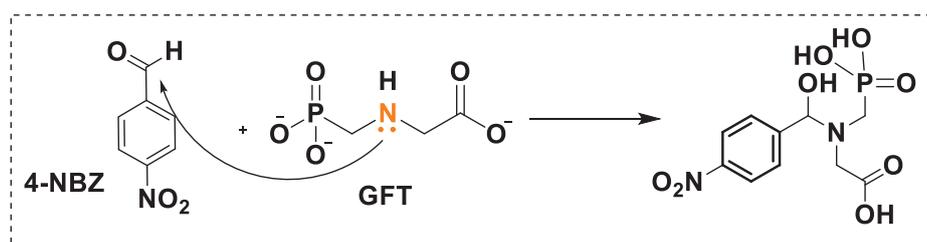


Fonte: O autor (2025).

5.2.4.1 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO GLIFOSATO COM 4-NBZ.

O 4-NBZ foi uma das moléculas escolhidas devido à sua capacidade de reagir com o nitrogênio do glifosato (Figura 57), assim como ocorreu com o acefato. Espera-se que o par de elétrons livres do nitrogênio ataque o átomo de carbono da carbonila do grupo funcional aldeído, levando à formação de um produto colorido, capaz de ser detectado colorimetricamente.

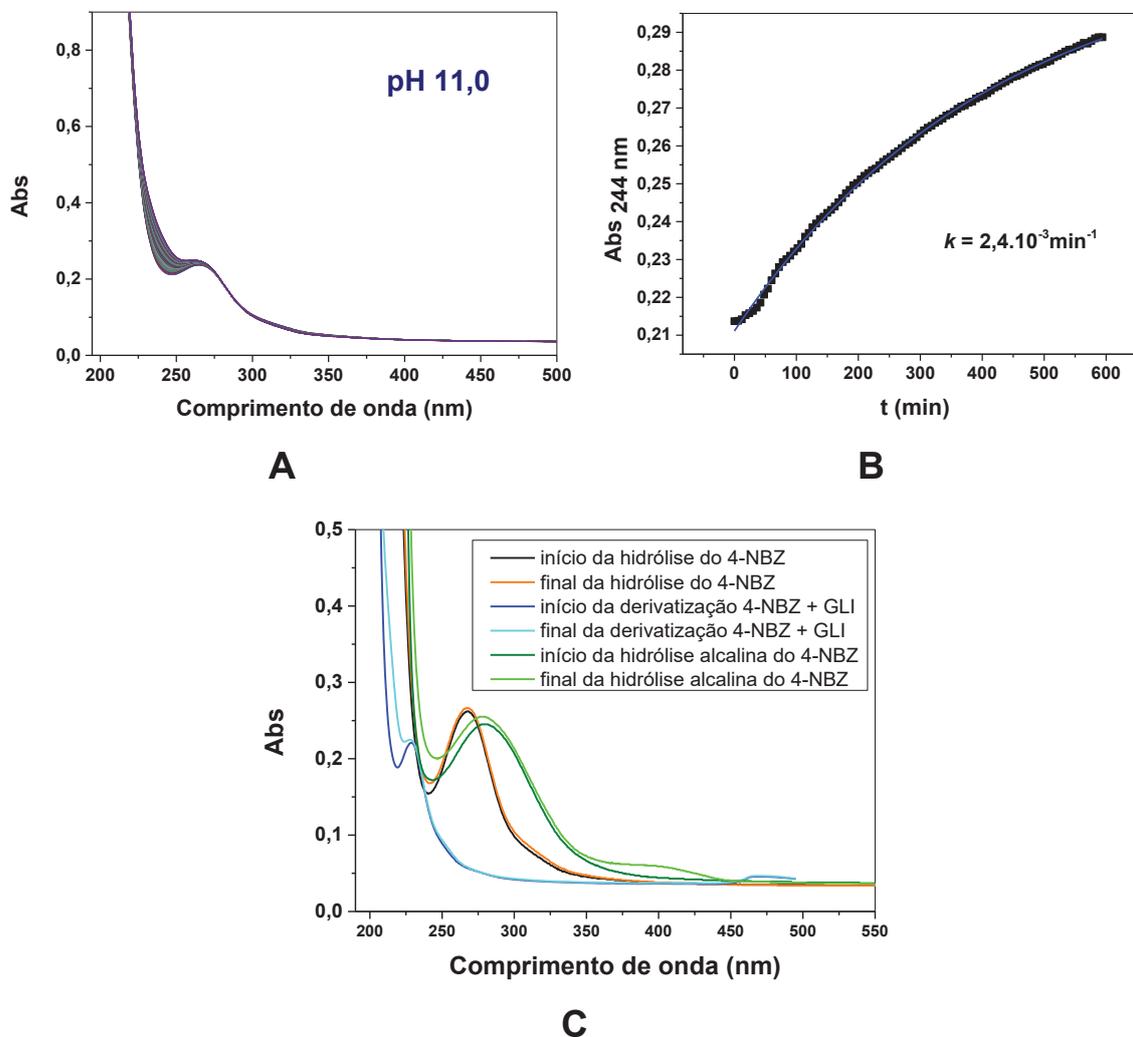
FIGURA 57- POSSIBILIDADE DE REAÇÃO ENTRE GLIFOSATO E 4-NBZ.



Fonte: O autor (2025).

As reações entre glifosato e 4-NBZ foram realizadas em diferentes pH's (8,0, 9,0 e 11,0), à temperatura ambiente e seguidas por espectroscopia de UV-Vis por cerca de 17 horas. O conjunto de espectros obtido para essa reação em pH 11,0 está apresentado na Figura 58.

FIGURA 58- (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM O 4-NBZ, COM GLIFOSATO EM EXCESSO. [GLIFOSATO]= $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; [4-NBZ]= $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; e $T=25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em pH 11,0 e (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 244 nm E (C) COMPARATIVO ENTRE OS PERFIS DE HIDRÓLISE DO 4-NBZ EM Ph 10,0, HIDRÓLISE ALCALINA DO 4-NBZ ([NaOH= $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ E DA REAÇÃO DO 4-NBZ COM GLIFOSATO pH 11,0.



Fonte: O autor (2025).

Os dados obtidos evidenciam que essa reação de derivatização utilizando o 4-NBZ acontece em pH acima de 9,0 (dados apresentados no anexo), e, apesar de pequena, existe uma variação de absorvância na região $\sim 244 \text{ nm}$ (Figura 58 (A)), o que indica haver formação de produto nessas condições. Porém trata-se de um produto incolor, visto que absorve na região do ultravioleta do espectro. Ainda, pode ser constatado também um ajuste satisfatório dos dados a um perfil de pseudo-primeira ordem, o que indica que a reação nessas condições deve seguir esse perfil, e apresenta uma constante de velocidade de $2,4 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ em pH 11,0 (Figura 58 (B)). Quando comparamos os perfis da hidrólise do 4-NBZ e da hidrólise

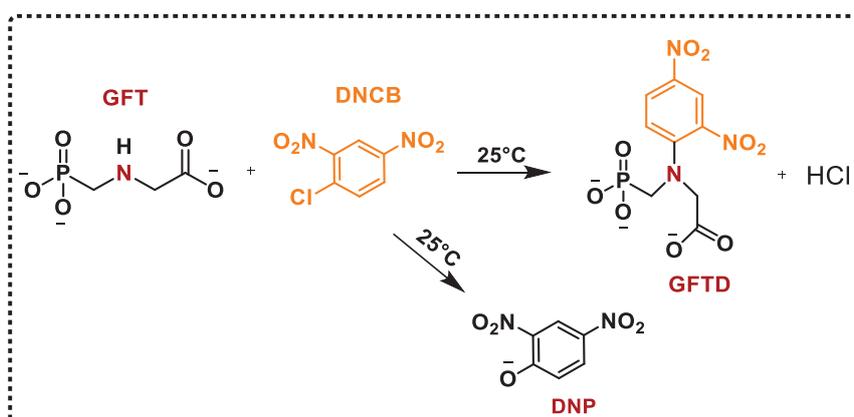
alcalina 4-NBZ, Figura 58 (C), fica claro que somente há uma pequena formação de produto de hidrólise do 4-NBZ em condições de pH superiores ao utilizado nas reações de derivatização com glifosato, $[\text{NaOH}] = 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e, ainda assim, com pouca variação na absorbância. Lembrando que essa concentração de íons OH^- é maior do que aquelas utilizadas nas reações em pH 8,0-11,0. Isso mostra que realmente o produto formado nessa reação se deve à reação entre glifosato e 4-NBZ, pois em pH 11,0 a hidrólise praticamente não contribui.

Além do 4-NBZ, o estudo com o glifosato seguiu com o derivatizante DNCB, similar em estrutura química ao DNFB¹⁰⁷, que baseou a ideia desse trabalho.

5.2.4.2 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO GLIFOSATO COM DNCB.

Os estudos com o glifosato frente ao DNCB procederam da mesma forma dos estudos utilizando o acefato. Também aqui foram variadas as condições de (i) excesso de glifosato e (ii) excesso de DNCB. Como se tratam de reações bastante similares as possibilidades reacionais são as mesmas, com o DNCB (assim como o DNFB) podendo hidrolisar e levar à formação do DNP e/ou reagir com o glifosato formando o produto colorimétrico de interesse GFTD. A Figura 59 apresenta um esquema do possível caminho da reação entre o glifosato e o DNCB.

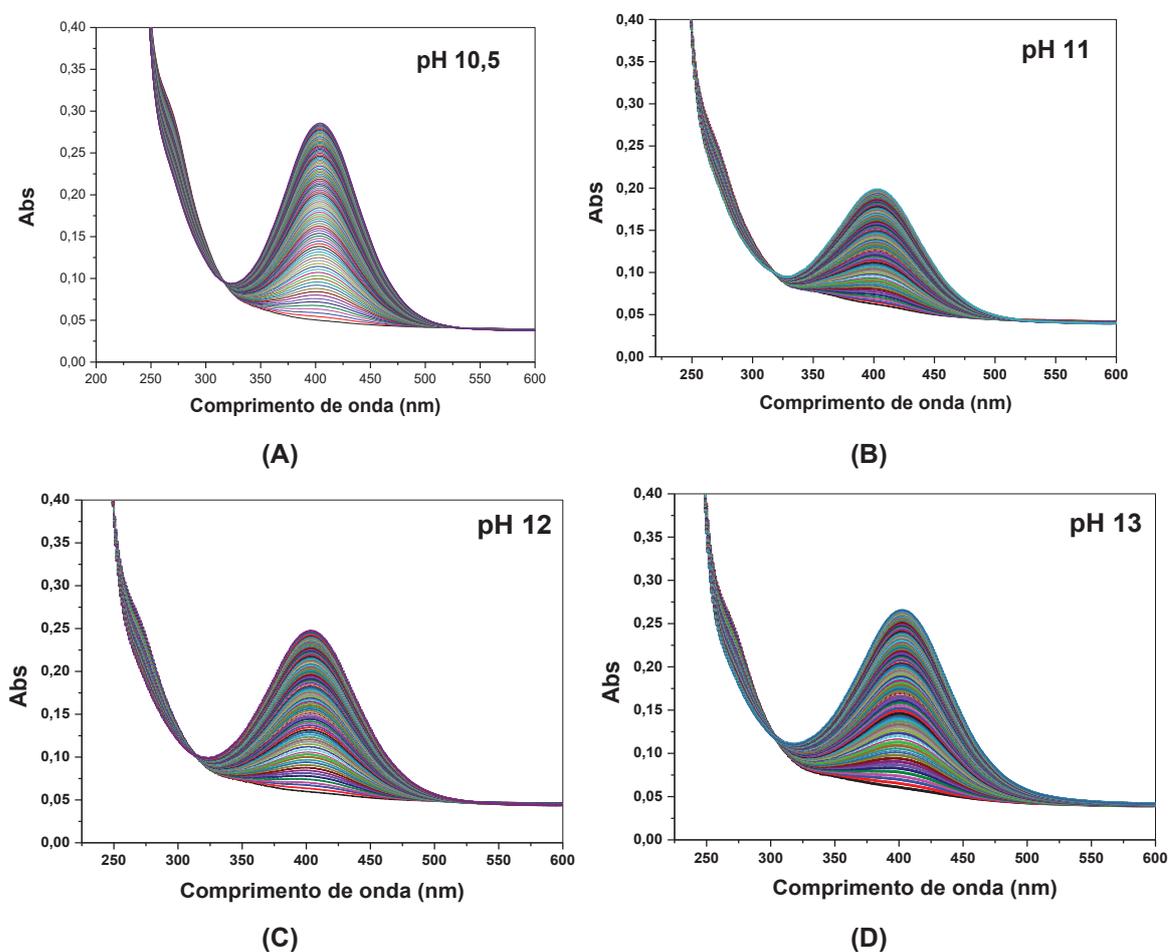
FIGURA 59- POSSIBILIDADES REACIONAIS ENTRE GLIFOSATO E DNCB: FORMAÇÃO DE UM NOVO PRODUTO OU HIDRÓLISE DO DNCB EM MEIO AQUOSO.



Fonte: O autor (2025).

Assim como ocorreu com o acefato, o DNCB reagiu com o glifosato em algumas condições de pH formando o produto colorido que pode ser detectado, mas também pode sofrer hidrólise produzindo DNP. Foram conduzidos experimentos varrendo uma ampla faixa de pH (7,0-13,0), e nas condições de pH 9,5 foi possível observar a banda na região do espectro próxima a 400 nm. Mas foi no pH 10,5 que ela se mostrou mais intensa, evidenciando que essa é a condição ótima para essa reação. Vale ressaltar que consideramos o pH 10,5 como o pH ótimo para a reação, porque na faixa de pH 10,5 – 13,0 (que podem ser observadas na Figura 60) a variação nas constantes de velocidade para essas reações não é tão significativa. Assim, é mais coerente a escolha de uma condição reacional mais branda. Ainda, pode-se afirmar que acima de pH 9,5 a reação ocorreu, mas em pH 9,5 e 10,0 não foi possível ajustar os dados experimentais ao modelo de pseudo-primeira ordem. Os conjuntos de todos os espectros para as reações em pH superior a 10,5 estão apresentados na Figura 60, onde é possível observar a pequena diferença na variação de absorvância entre os perfis apresentados. Pode ser observada através da Figura 60 **(A)** a presença da banda em aproximadamente 268 nm que corresponde ao consumo do reagente (DNCB). E é evidente também, nessa mesma Figura 60 **(A)**, o aparecimento da banda em 400 nm relativa à formação do produto de interesse, o GFTD, uma vez que esse perfil se mostra diferente daquele obtido para a hidrólise do DNCB.

FIGURA 60- ESPECTROS CONSECUTIVOS E PERFIS CINÉTICOS OBTIDOS ATRAVÉS DA REAÇÃO ENTRE GLIFOSATO ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) E DNCB ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) EM $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, ACOMPANHADA POR 10 h. Em (A), pH= 10,5; (B), pH = 11; (C) pH = 12 e (D) pH = 13.



Fonte: O autor (2025).

Através dos ajustes dos dados experimentais dessas reações à equação de pseudo-primeira ordem (Equação 1, para produto, dados apresentados no anexo) foram obtidas as constantes de velocidade para essas reações e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5- CONSTANTES DE VELOCIDADE OBTIDAS COM A VARIAÇÃO DO pH NA REAÇÃO DE PSEUDO-PRIMEIRA ORDEM ENTRE GLIFOSATO ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) E DNCB ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) EM $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, ACOMPANHADA POR 10 h.

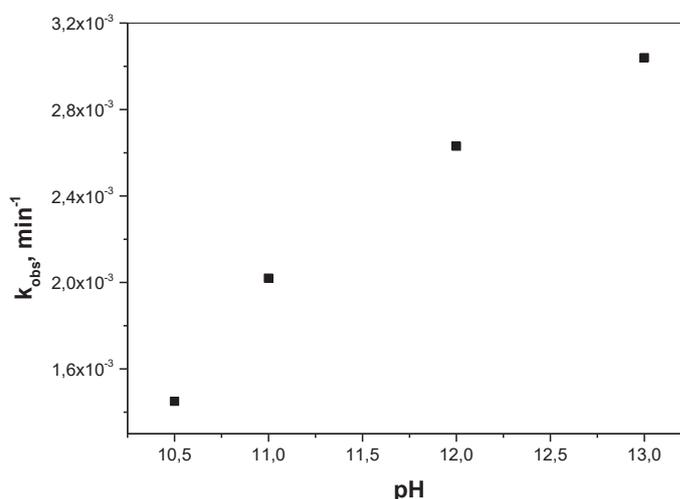
pH	k_{obs} (reagente)	k_{obs} (produto)	$t_{1/2}$
10,5	$1,41 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$1,57 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	441 min
11,0	$2,37 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$2,02 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	343 min
12,0	$3,18 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$2,63 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	263 min
13,0	$2,96 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$3,04 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	228 min

Fonte: O autor (2025).

Observando-se esses dados, podemos concluir que os ajustes obtidos para consumo do reagente evidenciam se tratar, de fato, da formação de apenas um produto através da reação entre esses reagentes, ou seja, foi encontrada também uma reação que é seletiva. Ainda, comparando-se os valores de tempos de meia vida obtidos para essas reações com o tempo de meia vida para a reação do DNFB com glifosato¹⁰⁷ (~0,8 min) fica evidente a maior reatividade desse derivatizante em relação ao DNFB, cujo tempo de meia vida para a reação mais rápida apresentada nessa tabela (~228 min) é muito maior do que o obtido no estudo de Hellinger, *et al.*¹⁰⁷

A partir desses dados foi construído um gráfico, apresentado na Figura 61, que correlaciona os diferentes pH's nos quais as reações foram acompanhadas com as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem obtidas para cada experimento. O que se observa nessa Figura 60 é que a reação se torna mais rápida à medida que o pH aumenta, pois aumentam as espécies reativas no meio. Por isso mesmo era esperado esse comportamento não linear para a relação entre dados.

FIGURA 61- PERIL DE pH PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM DNFB.

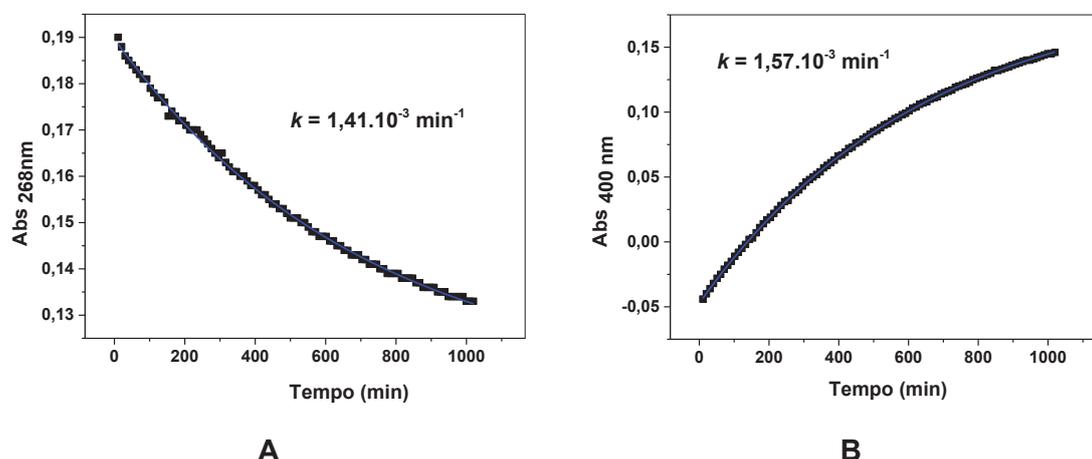


Fonte: O autor (2025).

Foi em pH 10,5 que a reação se mostrou mais eficiente, dentre as avaliadas, para a formação do produto colorimétrico, pois é uma condição mais branda em que a contribuição da hidrólise do DNFB é menor, ou praticamente não ocorre. Assim, a Figura 62 apresenta os ajustes obtidos para o consumo do

reagente e a formação do produto dessa reação na Figura 61 (A) e (B).

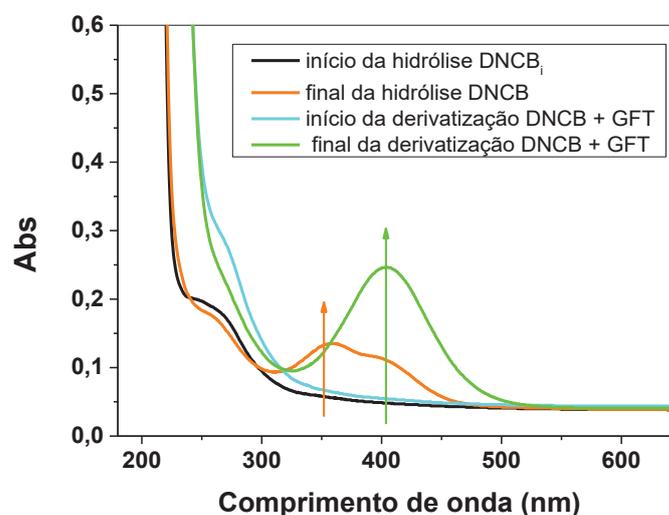
FIGURA 62- (A) PERFIL CINÉTICO PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM O DNCB. [GLIFOSATO]=0,05 mol L⁻¹; [DNCB]= 10⁻⁵ mol L⁻¹; pH 10,5 e T=25 °C. OBTIDO PARA O REAGENTE EM 268 nm. A LINHA SÓLIDA EM AZUL CORRESPONDE AO AJUSTE DOS DADOS UTILIZANDO A EQUAÇÃO 2. (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 400 nm. A LINHA SÓLIDA EM AZUL CORRESPONDE AO AJUSTE DOS DADOS UTILIZANDO A EQUAÇÃO 1.



Fonte: O autor (2025).

Essas constantes de velocidade obtidas para o consumo do reagente e a formação do produto, ($k= 1,41 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) e formação do produto ($k= 1,57 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) evidenciam que, de fato, temos um único produto nessa reação entre glifosato e DNCB, o que é bastante desejável para a detecção colorimétrica. É importante mencionar que esse produto foi obtido em meio aquoso básico e temperatura ambiente, de forma que essa reação se mostrou bastante promissora. A Figura 63 a seguir apresenta um comparativo entre o início e o final da reação de hidrólise do DNCB e também o início e o final da reação do DNCB com o glifosato, ambas a $T=25 \text{ °C}$ e acompanhadas por 17 h), onde se pode ver de forma clara a diferença entre ambos. O produto da reação de hidrólise alcalina do DNCB apresenta banda de absorção na região próxima a 400 nm, enquanto o produto da reação de derivatização absorve na região de 350 nm. Essa diferença nos perfis obtidos evidencia que não se trata dos mesmos produtos, pois são substâncias que absorvem em regiões até próximas, mas diferentes do espectro do UV-Visível.

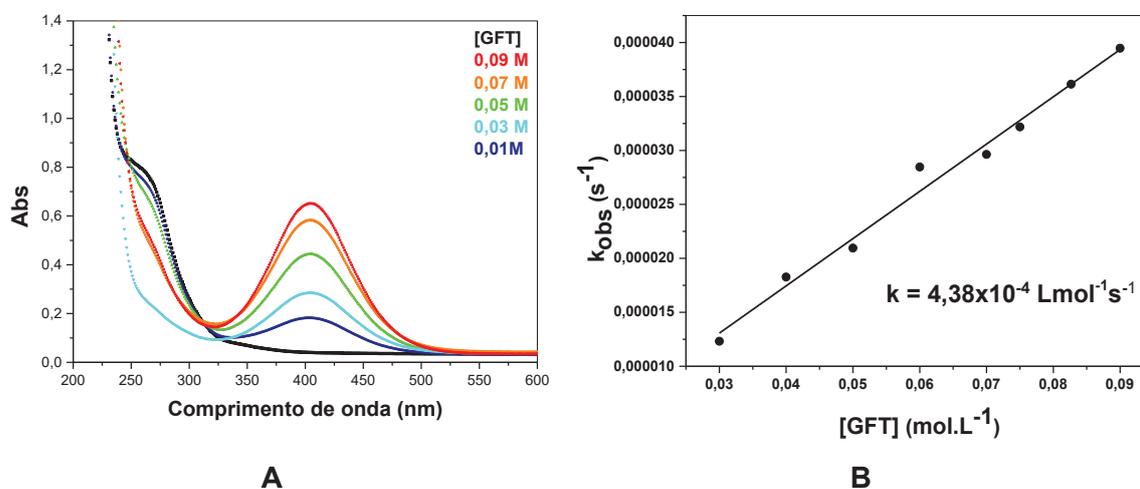
FIGURA 63- COMPARATIVO ENTRE OS PERFIS DOS ESPECTROS INICIAIS E FINAIS DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ALCALINA DO DNCB ($[\text{NaOH}] = 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ E DA REAÇÃO DO DNCB COM GLIFOSATO EM $\text{pH } 10,5$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 17 h .



Fonte: O autor (2025).

A cinética da reação do glifosato com DNCB foi também realizada e acompanhada variando-se a concentração do glifosato, a fim de se obter a constante de velocidade de segunda ordem para essa reação em $\text{pH } 10,5$ (Figura 64 (B)), e compreender como a velocidade da reação é afetada pela concentração do pesticida. Isso também auxilia para criar metodologia para detecção colorimétrica.

FIGURA 64- (A) ESPECTRO FINAL PARA CADA REAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLIFOSATO ($0,01$, $0,03$, $0,05$, $0,07$ E $0,09 \text{ mol L}^{-1}$) FRENTE AO DNCB E (B) GRÁFICO DAS CONSTANTES DE VELOCIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO GLIFOSATO, OBTIDAS ATRAVÉS DOS AJUSTES CINÉTICOS PARA PRODUTO (EQUAÇÃO 7). $[\text{DNCB}] = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH } 10,5$ E $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.



Fonte: O autor (2025).

A Figura 64 **(A)** apresenta os espectros finais de cada reação do glifosato com DNCB, para cada concentração avaliada (0,01 – 0,09 mol L⁻¹; dados apresentados nos anexos). É possível observar a relação do aumento da absorvância com o aumento da concentração de glifosato em cada amostra. Para cada concentração de glifosato foi obtido um valor da constante de pseudo-primeira ordem, respectivamente, e assim, se obteve uma relação linear entre essas constantes de velocidade e a variação na concentração do glifosato (Figura 64 **(B)**). Essa relação é particularmente importante, porque permite que se obtenha a concentração desse herbicida em uma amostra, a partir da cinética acompanhada pela técnica de UV-Vis. De posse do valor de k_{obs} é possível obter essa concentração através da equação da reta obtida para esse conjunto de dados.

Além disso, o coeficiente angular obtido através desse ajuste linear dos dados fornece a constante de segunda ordem para essa reação de $2,26 \cdot 10^{-2} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. A linearidade obtida para esses dados foi de $R^2 = 0,980$, o que aponta a boa correlação. Então, de forma resumida, os estudos cinéticos evidenciaram a formação do produto colorimétrico, sua velocidade de formação e sua reatividade frente à concentração de glifosato e também o pH do meio reacional.

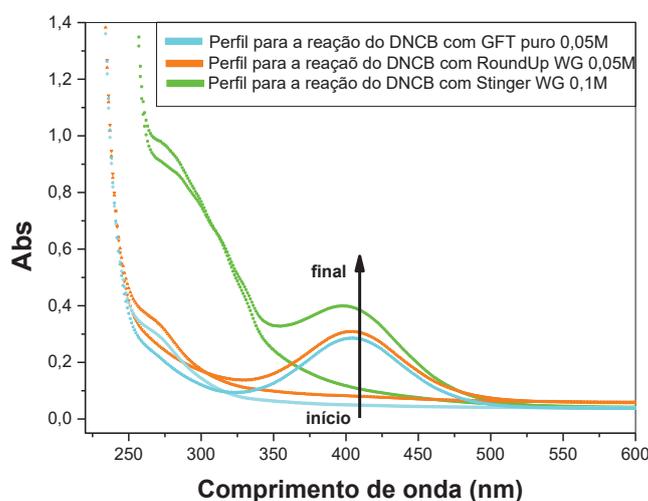
5.2.4.3 DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DO GLIFOSATO EM AMOSTRAS COMERCIAIS

Após se obter a melhor condição para essa reação de detecção colorimétrica, as amostras comerciais de agrotóxicos contendo glifosato como princípio ativo em sua composição foram testadas sem qualquer tratamento prévio, apenas considerando as condições reacionais utilizadas no estudo. Ou seja, até o momento foi analisado glifosato puro mas as amostras comerciais possuem vários insipientes (estabilizantes, veículos, entre outros; cerca de 50-80% da composição total), que poderiam interferir na reação de detecção que estamos avaliando. Além disso, a quantidade de ingrediente ativo frequentemente é baixa, o que também poderia dificultar a aplicação dessa metodologia em amostras comerciais sem tratamento prévio. Foram utilizadas as amostras comerciais Roundup Original Mais® (líquida, 577g L⁻¹) e Stinger WG® (sólida, 79,25% (m/m)). A partir dos dados fornecidos pelo fabricante nos rótulos das amostras, fizeram-se os cálculos de forma a manter a mesma condição de concentração do princípio ativo glifosato utilizada nos estudos. A reação foi

acompanhada por 17 horas a 25 °C e em pH 10,5.

A formação do produto colorido é confirmada quando olhamos o primeiro e último espectro (apresentados na Figura 65), obtidos através do conjunto de espectros dessas reações entre as amostras reais e o DNCB.

FIGURA 65- ESPECTROS INICIAIS E FINAIS PARA CADA REAÇÃO (DNCB COM GLIFOSATO PURO E DNCB COM AS DUAS AMOSTRAS COMERCIAIS. A LINHA AZUL MOSTRA O PERFIL DA REAÇÃO DO DNCB COM GLIFOSATO PURO, A LINHA LARANJA SE REFERE A REAÇÃO DO DNCB COM A AMOSTRA COMERCIAL ROUNDUP WG® E A LINHA VERDE É REFERENTE A REAÇÃO DO DNCB COM A AMOSTRA COMERCIAL SINGER WG®. (T= 25 °C, pH 10,5, ACOMPANHADA POR 17 h).



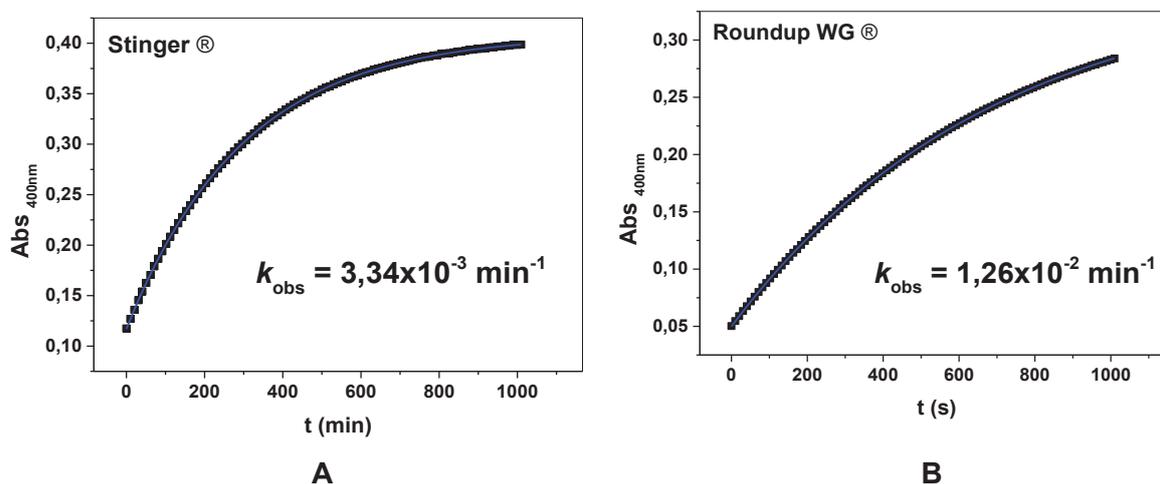
Fonte: O autor (2025).

Para as duas amostras analisadas foi possível observar a formação da banda na região próxima a 400 nm referente a formação do produto da reação entre o glifosato presente nessas amostras e o DNCB. Por serem utilizados os dados de concentração presentes no rótulo dessas amostras comerciais, no caso da amostra Stinger WG® foi necessária uma concentração maior para que a cinética pudesse ser acompanhada, talvez por uma diferença entre a concentração indicada no rótulo e a concentração real de glifosato que estava presente na amostra comercial. Já a amostra comercial Roundup Original Mais® pôde ser utilizada na mesma concentração dos estudos aqui realizados com o princípio ativo. O ajuste dos dados experimentais referente a essas duas reações está apresentado na Figura 65. Esses resultados obtidos provam que a ideia na qual é baseada esse estudo é realmente interessante e a técnica poderá ainda ser aplicada diretamente para a detecção de diferentes

moléculas de pesticidas. Ressaltando que se trata de uma técnica de baixo custo e mais simples em relação às técnicas comumente utilizadas para a detecção desse tipo de substâncias, possibilitando o seu monitoramento.

A Figura 66 apresenta o resultado do acompanhamento cinético dessas reações, onde a Figura 65 **(A)** traz os dados dos ajustes dos dados experimentais relativos a amostra Stinger WG® e a Figura 65 **(B)** traz os dados dos ajustes dos dados experimentais relativos a amostra Roundup Original Mais®.

Figura 66- PERFIL CINÉTICO DA FORMAÇÃO DE GFTD, A PARTIR DA REAÇÃO ENTRE GLIFOSATO (PRESENTE NAS AMOSTRAS REAIS) E O DERIVATIZANTE DNCB: $[DNCB] = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, pH 10,5, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 17 h. O AJUSTE DOS DADOS FOI OBTIDO UTILIZANDO A EQUAÇÃO 1. EM **(A)**, A AMOSTRA COMERCIAL UTILIZADA FOI STINGER WG®, $[GFT] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; EM **(B)**, A AMOSTRA É DA MARCA ROUNDUP ORIGINAL MAIS®, $[GFT] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: O autor (2025).

A amostra Stinger WG® (Figura 66 **(A)**), apresentou uma constante de velocidade similar em relação ao que foi obtido com o glifosato puro, enquanto para a amostra Roundup Original Mais® (Figura 66 **(B)**), a constante de velocidade foi maior em relação àquela obtida com o princípio ativo puro. Lembrando que estamos comparando a mesma concentração utilizada nos estudos com o princípio ativo puro, usando dados do rótulo para se obter as mesmas concentrações. Assim, tal resultado pode indicar que a amostra comercial líquida (Roundup®) possivelmente contém uma concentração real maior em relação à indicada no rótulo da amostra, pois sua constante de velocidade foi maior àquela obtida para o glifosato puro. Ao

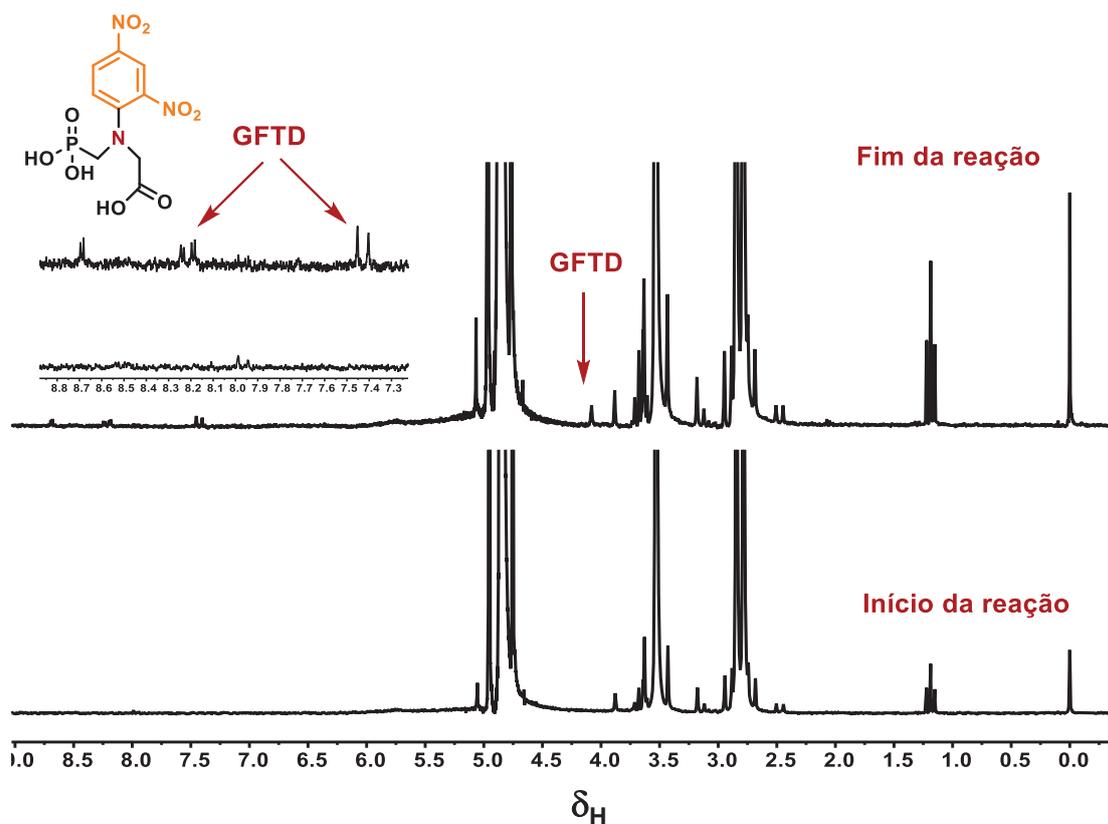
contrário, na amostra sólida a concentração no rótulo pode ser superior à concentração real de glifosato nessa amostra, pois usando a mesma concentração usada nos estudos com glifosato puro, essa amostra apresentou uma taxa de velocidade menor. Ainda, podemos afirmar que essa reação se mostrou eficiente para a detecção colorimétrica do glifosato, inclusive em amostras comerciais sem qualquer tratamento prévio. O que evidencia que os interferentes que fazem parte das formulações comerciais não influenciam no método de detecção de glifosato usando o DNCB como derivatizante. Esse derivatizante se mostrou potencial para a detecção do glifosato, apesar de apresentar uma reatividade menor quando comparado ao DNFB, o DNCB se mostrou eficiente e seletivo para essa reação de detecção colorimétrica.

Mas ainda é preciso mostrar qual, de fato, é o produto formado. Para isso foram realizados experimentos onde a cinética dessa reação foi seguida pelas análises de RMN de ^1H e ^{31}P , e os dados obtidos estão apresentados a seguir.

5.2.4.4 ESTUDO DO MECANISMO DA REAÇÃO DO GLIFOSATO COM DNCB ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RMN.

Considerando as reações já realizadas, sabemos que o DNCB pode reagir com o glifosato formando o produto colorido que pode ser detectado, mas também pode sofrer hidrólise produzindo DNP (Figura 58). Observando-se essas possibilidades e os resultados obtidos com o acompanhamento cinético da reação por UV-vis, foram obtidos espectros consecutivos dessa reação utilizando a técnica de espectroscopia de RMN a fim de confirmar o produto obtido. A Figura 67 apresenta os espectros do acompanhamento cinético da reação do glifosato com DNCB. Vale ressaltar que esse produto GFTD já foi relatado anteriormente, mas sua estrutura química foi confirmada através da técnica de RMN no estudo realizado com glifosato e DNFB¹⁰⁷.

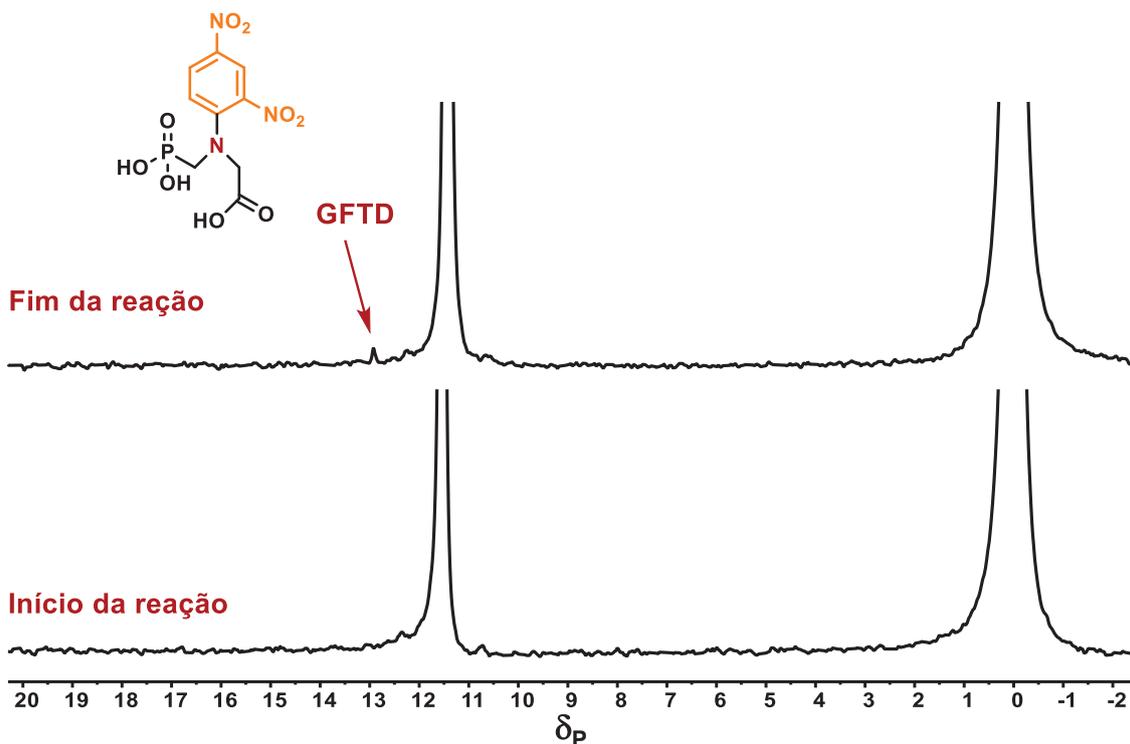
FIGURA 67- ESPECTROS SUCESSIVOS ^1H NMR (200 MHz, D_2O), PARA A REAÇÃO DO DNCB ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) COM GLIFOSATO ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pD 10,4, 25 °C.



Fonte: O autor (2025).

Antes de analisar essa Figura 67 é preciso ressaltar que a solubilidade do DNCB é muito baixa, o que dificultou a otimização das condições para essas análises. Ainda, como sua concentração nessa amostra é muito pequena, fica muito difícil visualizar no espectro inicial os sinais correspondentes aos seus hidrogênios, que seriam em torno de 7,94, 8,38 e 8,75 ppm. Pelo mesmo motivo fica difícil perceber o consumo dos reagentes de partida nesses espectros, entretanto, o surgimento dos novos sinais referentes à formação do produto GFTD são facilmente observados, na região alifática um simpleto em 4,08 ppm, e na região aromática um duplete em 7,42 ppm, e um duplete de dupletos em 8,21 ppm). Esses sinais estão de acordo com aqueles já descritos na literatura para o GFTD¹⁰⁷. É importante ressaltar que os sinais referentes ao DNP (produto da hidrólise do DNCB) são praticamente imperceptíveis, evidenciando a pequena contribuição desta via de reação. Os espectros de RMN de ^{31}P obtidos para essa reação corroboram esses resultados (Figura 68).

FIGURA 68- ESPECTROS SUCESSIVOS ^{31}P RMN (50 MHz, D_2O) PARA A REAÇÃO DO DNCB ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) COM GLIFOSATO ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pD 10,4, 25 °C.



Fonte: O autor (2025).

Observando-se a Figura 68 é possível notar o sinal em 12,92 ppm que evidencia a formação do GFTD já descrito anteriormente na literatura¹⁰⁷. O que vem a reforçar os resultados já obtidos nos espectros de ^1H RMN e também aqueles apontados pela técnica de espectroscopia de UV-Vis, sustentando a reação proposta entre DNCB e glifosato.

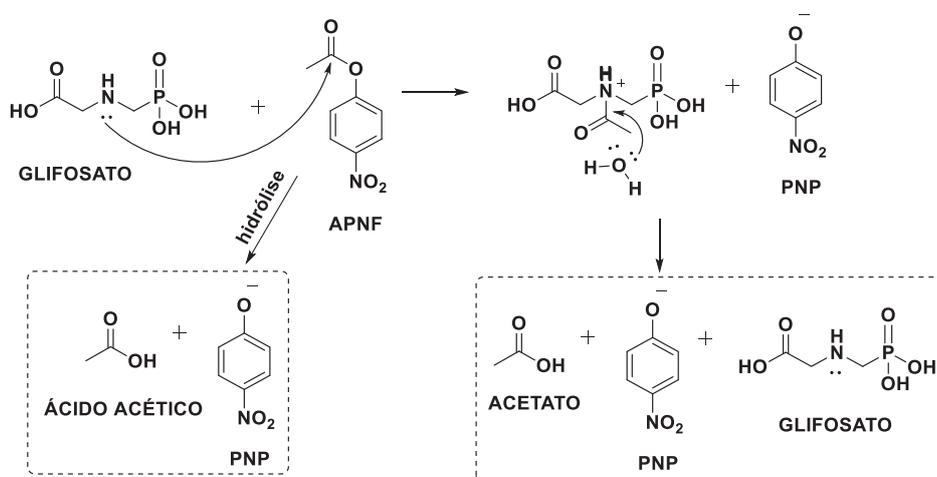
O APNF e o DEDNPP não podem ser considerados derivatizantes, a detecção através dessas moléculas é indireta, uma vez que se acompanha a formação de um produto colorido que não possui o glifosato envolvido em sua estrutura química, mas sim um produto da hidrólise dessas moléculas (APNF e DEDNPP).

5.2.4.5 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO GLIFOSATO COM APNF

O APNF tem sua hidrólise facilmente catalisada pelo imidazol, que ataca o carbono da carbonila e leva à formação de um intermediário acilado, que após

sofrer hidrólise regenera o imidazol, produzindo nitrofenol e acetato^{118,124}. Assim como o imidazol possui o par de elétrons livres capaz de promover esse ataque ao carbono carbonílico, também o glifosato apresenta um par de elétrons livres que pode vir a promover a clivagem desse éster. Dois caminhos são possíveis para essa reação, a hidrólise ou a reação via átomo de nitrogênio, embora ambos levem aos mesmos produtos, o PNP e o acetato. A Figura 69 apresenta aos caminhos de reação possíveis para essa reação entre o glifosato e o APNF.

FIGURA 69- CAMINHOS POSSÍVEIS PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM APNF.



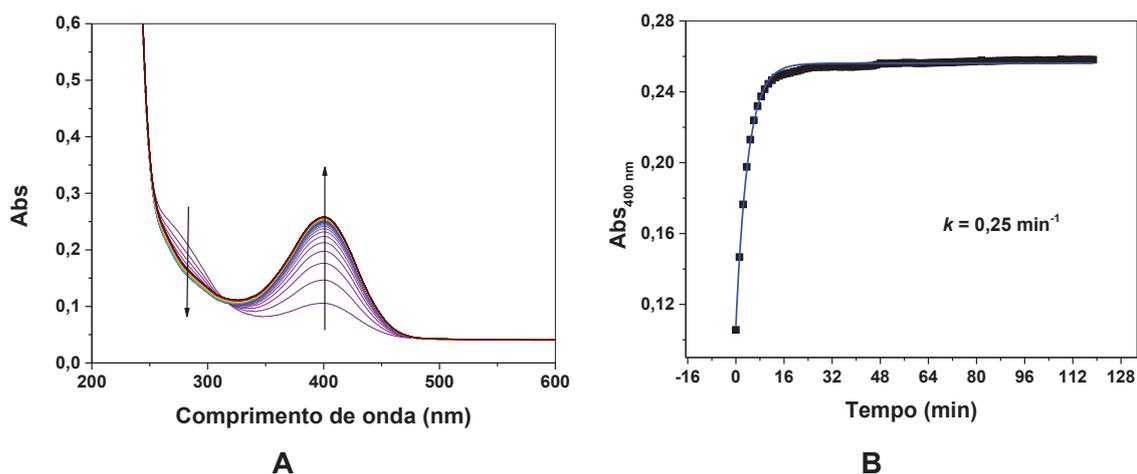
Fonte: O Autor (2025).

A ideia aqui, então, é promover essa reação de clivagem do APNF que leva à formação do acetato e do nitrofenol, uma vez que o nitrofenol pode ter sua formação acompanhada pela técnica de UV-Vis possibilitando a detecção colorimétrica do glifosato de forma indireta. O glifosato pode atuar como um agente promotor ou até mesmo catalítico, auxiliando a formação do PNP, que é amarelo e pode ser facilmente detectado. O desafio nesse caso é encontrar uma condição reacional onde a hidrólise do APNF contribua pouco, pois, caso contrário, a formação do produto não seria através da reação com glifosato, e, sim, produto apenas da hidrólise do éster.

As reações entre o glifosato e o APNF foram conduzidas em diferentes concentrações (0,05, 0,1 e 0,15 mol L⁻¹) e diferentes condições de pH (9,0, 9,5, 10,0 e 10,5). Esses experimentos foram acompanhados por espectroscopia de UV-Vis, por 2 horas, a T = 25 °C. Na Figura 70 apresentamos os conjuntos de todos os

espectros e também os perfis cinéticos obtidos para a reação do APNF com o glifosato em pH 10,0, a $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

FIGURA 70- (A) ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM O APNF, COM GLIFOSATO EM EXCESSO $[\text{GLIFOSATO}] = 0,15\text{ mol L}^{-1}$; $[\text{APNF}] = 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$; pH 10,0 e $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e (B) PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO PNP EM 400 nm COM GLIFOSATO EM EXCESSO EM pH 10,0.



Fonte: O Autor (2025).

Essa reação em pH 10,0, nessas concentrações dos reagentes ($[\text{APNF}] = 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{Glifosato}] = 0,15\text{ mol L}^{-1}$) foi a que apresentou uma diferença maior entre as duas constantes, de hidrólise do APNF ($5,4 \cdot 10^{-2}\text{ min}^{-1}$) e da reação do APNF com glifosato ($0,25\text{ min}^{-1}$). Essa foi, das condições avaliadas até agora, a condição em que a reação de hidrólise contribuiu menos em relação à reação com glifosato. A Tabela 6 traz todas as constantes de velocidade obtidas até aqui, para as reações de hidrólise e para as reações com o glifosato.

TABELA 6- CONSTANTES DE VELOCIDADE DE HIDRÓLISE DO APNF E CONSTANTES DE VELOCIDADE DAS REAÇÕES DO GLIFOSATO COM APNF.

Reação	pH	k_{obs} (min ⁻¹)
Hidrólise APNF	9,0	$3,5 \cdot 10^{-2}$
Hidrólise APNF	10,0	$5,4 \cdot 10^{-2}$
Hidrólise APNF	10,5	$1,4 \cdot 10^{-1}$
Glifosato 0,1 mol. L ⁻¹ + APNF	9,0	$3,9 \cdot 10^{-2}$
Glifosato 0,15 mol. L ⁻¹ + APNF	9,0	$5,3 \cdot 10^{-2}$
Glifosato 0,05 mol. L ⁻¹ + APNF	9,5	$2,6 \cdot 10^{-2}$
Glifosato 0,1 mol. L ⁻¹ + APNF	9,5	$3,2 \cdot 10^{-2}$
Glifosato 0,15 mol. L ⁻¹ + APNF	9,5	$4,3 \cdot 10^{-2}$
Glifosato 0,05 mol. L ⁻¹ + APNF	10,0	$6,0 \cdot 10^{-2}$
Glifosato 0,1 mol. L ⁻¹ + APNF	10,0	$2,2 \cdot 10^{-1}$
Glifosato 0,15 mol. L ⁻¹ + APNF	10,0	$2,5 \cdot 10^{-1}$
Glifosato 0,05 mol. L ⁻¹ + APNF	10,5	$1,3 \cdot 10^{-1}$

Fonte: O Autor (2025).

Observando esses dados podemos afirmar que nesse pH 10,0 a reação já se torna interessante, pois há uma diferença entre as constantes, existe a contribuição de hidrólise do APNF, mas a reação com glifosato também está acontecendo. Ou seja, o APNF poderá ser sim utilizado como um método de detecção indireta para a detecção colorimétrica do glifosato, pois sua hidrólise resultante da reação nucleofílica entre o APNF e o glifosato leva à formação do produto PNP, que torna o meio reacional amarelo e indica a presença de glifosato.

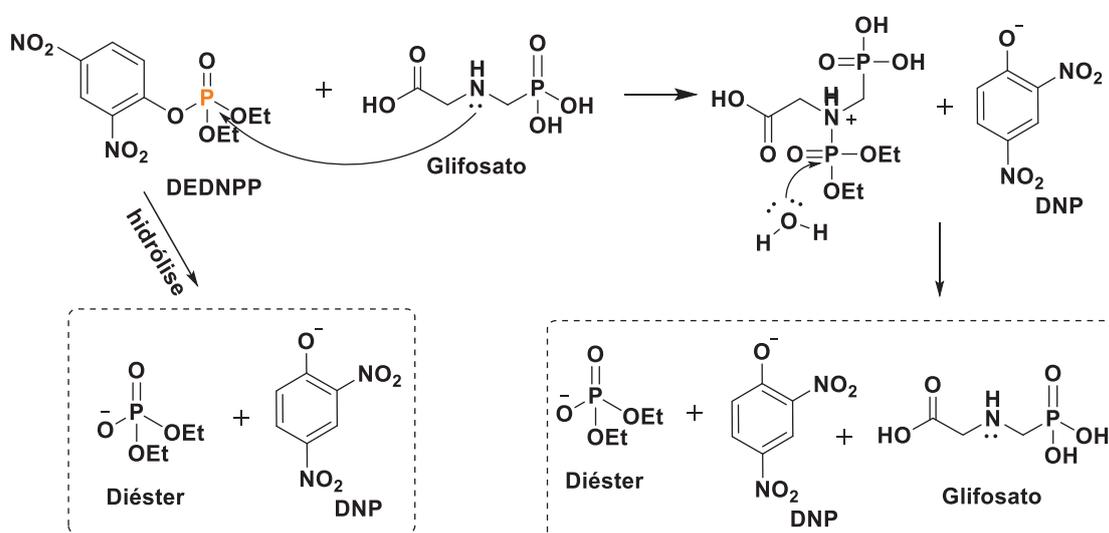
Partindo dessa mesma ideia, baseada nesse comportamento diferente do glifosato em relação aos outros OF's, onde o glifosato é que se comporta como um nucleófilo, uma vez que possui o par de elétrons livres, buscamos uma nova abordagem para essas reações de derivatização. Iniciamos alguns estudos utilizando agora uma outra molécula que possui centros eletrofílicos capazes de sofrerem ataques nucleofílicos, o DEDNPP.

5.2.4.6 ESTUDOS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DO GLIFOSATO COM DEDNPP.

O estudo com APNF mostrou que a hidrólise dessa molécula ocorre muito facilmente, e, baseados nesses estudos e buscando uma molécula que seja menos reativa para a reação de hidrólise, utilizamos também o DEDNPP frente ao glifosato. O DEDNPP (2,4-dinitrofenilfosfato) sofre hidrólise mediada pelo imidazol,

que ataca seu centro de fósforo liberando o dinitrofenol entre os produtos dessa reação^{33,35,41}. Similar à ideia em relação a utilização do APNF, nesse caso também, como o glifosato possui um par de elétrons livres no átomo de nitrogênio (como o imidazol), esperamos que o par de elétrons livres do glifosato consiga atacar o centro de fósforo, hidrolisando o DEDNPP, liberando o dinitrofenol, possibilitando sua detecção colorimétrica através da formação desse produto colorido, o que está apresentado na Figura 71, que mostra as possibilidades de reação para o DEDNPP: sua hidrólise ou a reação com o glifosato, ambas levando aos mesmos produtos.

FIGURA 71- CAMINHOS POSSÍVEIS PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM APNF.

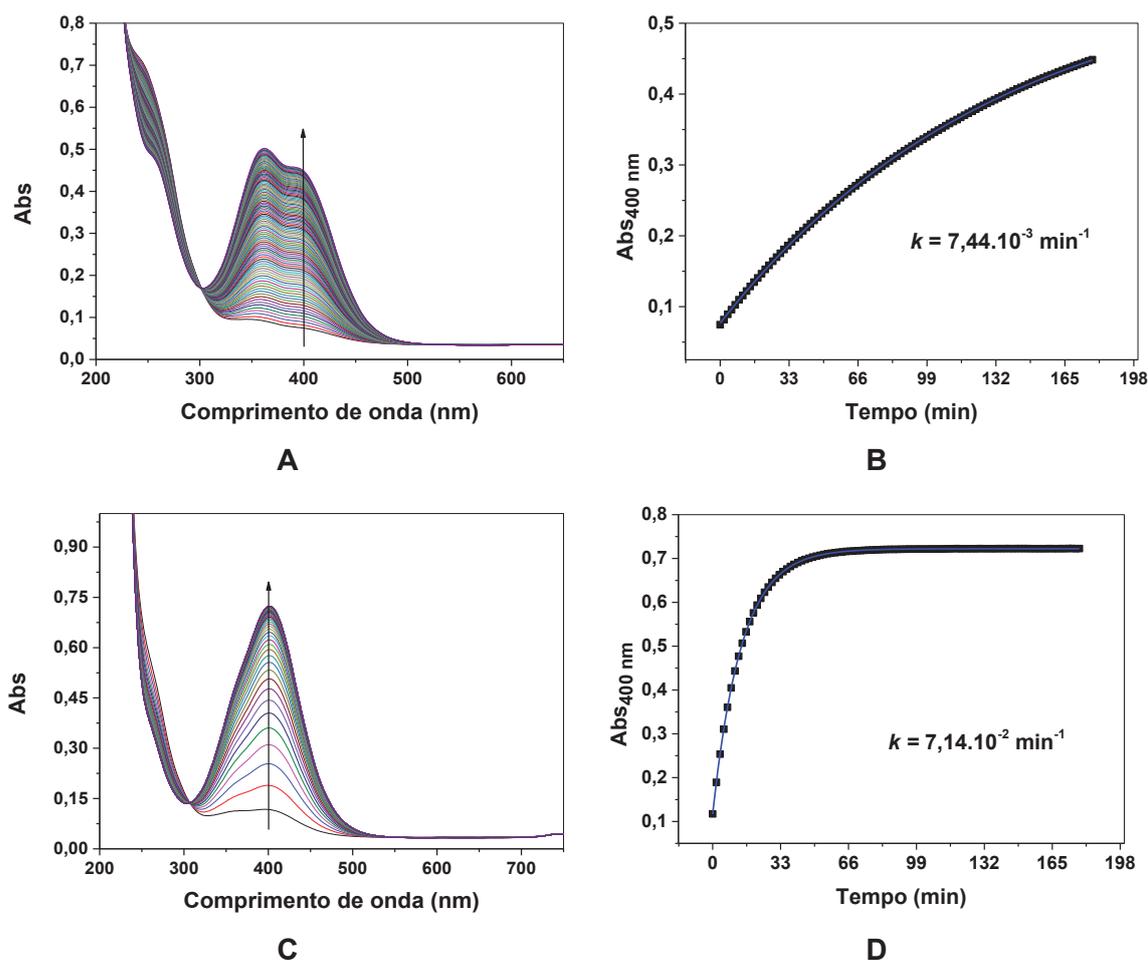


Fonte: O Autor (2025).

Essa reação do DEDNPP com o glifosato também foi acompanhada cineticamente em diferentes valores de pH, 8,0 - 10,0 por espectroscopia de UV-Vis nas mesmas condições das reações de hidrólise e os dados obtidos estão apresentados na Figura 72. A diferença observada entre os perfis apresentados na Figura 6 para a reação conduzida sob pH 8,0 (Figura 72 **(A)**) e sob pH 10,0 (Figura 72 **(C)**), pode ser justificada pela estrutura química do glifosato em cada pH. Quando em pH 8,0 o nitrogênio do glifosato ainda está ligado ao hidrogênio, e não está disponível para o ataque ao átomo de fósforo do DEDNPP, ocorrendo em grande extensão nesse pH a hidrólise desse OF. Isso pode ser constatado observando-se o perfil para a reação com glifosato em comparação ao perfil obtido para a hidrólise no mesmo pH. Ainda assim, observando a Figura 72 **(B)** e **(D)** fica

mais clara a comparação entre as velocidades dessas reações, em **(D)** o platô é atingido, evidenciando a velocidade maior e o fim dessa reação de hidrólise do DEDNPP via reação nucleofílica com glifosato.

FIGURA 72- **(A)** ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO DEDNPP E DO GLIFOSATO EM pH 8,0 e $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{DEDNPP}]= 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$, $[\text{GLIFOSATO}]= 0,05\text{ mol L}^{-1}$, **(B)** PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO EM 400 nm, pH 8,0, **(C)** ESPECTROS CONSECUTIVOS OBTIDOS PARA A REAÇÃO DO GLIFOSATO COM O DEDNPP EM pH 10,0 e $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{GLIFOSATO}]=0,05\text{ mol L}^{-1}$; $[\text{DEDNPP}]= 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$; e **(D)** PERFIL CINÉTICO OBTIDO PARA O PRODUTO DNP EM 400 nm, pH 10,0.



Fonte: O Autor (2025).

Assim, a reação se mostra bastante promissora para detectar colorimetricamente o glifosato, além de ocorrer de forma rápida, a uma constante de $0,071\text{ min}^{-1}$ (Figura 72 **(D)**), o que é uma vantagem quando se pensa em detecção em campo para esses pesticidas. Além disso, é clara a diferença entre os perfis apresentados na Figura 72 **(A)** e 72 **(C)**, o que evidencia que em pH 8,0 a hidrólise contribui muito, o perfil é mais semelhante ao perfil obtido para a hidrólise desse derivatizante, enquanto em pH 10,0, a formação de produto colorimétrico

ocorre em maior quantidade. Isso é confirmado quando observamos as constantes de velocidade para essa reação do glifosato com DEDNPP em pH 10,0 ($0,071 \text{ min}^{-1}$) e para a hidrólise do DEDNPP nesse mesmo pH ($0,0022 \text{ min}^{-1}$).

Ademais, estudos ainda serão realizados, cinéticos e mecanísticos, para que possamos afirmar se além de detecção a reação entre essas moléculas pode ainda levar a produtos menos tóxicos, o que caracterizaria uma possibilidade de detoxificação para o DEDNPP, uma vez que leva ao diéster que é menos tóxico do que esse triéster de partida.

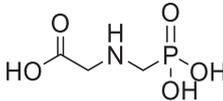
5.2.4.7 RESUMO DAS REAÇÕES DO GLIFOSATO COM OS DERIVATIZANTES (4-NBZ E DNCB) E COM AS MOLÉCULAS PARA DETECÇÃO INDIRETA (APNF E DEDNPP).

Pode-se dizer que no caso das quatro moléculas avaliadas frente ao glifosato, todas elas levaram à formação de um produto detectável, evidenciando a ocorrência dessas reações e a possibilidade de aplicação do método. Quanto ao estudo com o 4-NBZ, houve a formação da banda de absorção, que evidencia a formação de produto, inclusive com perfil diferente da hidrólise desse derivatizante. Já com o DNCB, esse estudo foi bem detalhado e possibilitou encontrar a melhor condição para essa reação, em temperatura ambiente (25°C) e pH 10,5. Avaliou-se o efeito do pH do meio reacional e da concentração de glifosato sobre a velocidade da formação do produto colorido. Além disso e bastante interessante é que foi possível avaliar essa metodologia de detecção para amostras reais contendo o princípio ativo glifosato e ficou evidente a sua aplicabilidade, pois o método mostrou a possibilidade de encontrar a concentração de glifosato em uma amostra real a partir de uma relação linear entre a concentração de glifosato na amostra e as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem da reação para cada respectiva concentração. O tempo de meia-vida dessa reação ($\sim 441 \text{ min}$) indica que a detecção seria possível, evidenciando o potencial do DNCB para a detecção colorimétrica de glifosato, assim como foi constatado com o DNFB em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa. Ressaltando que o DNFB continua sendo mais rápido para essa reação de detecção de glifosato ($t_{1/2} \sim 0,8 \text{ minutos}$).

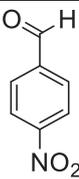
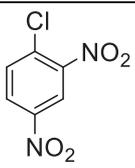
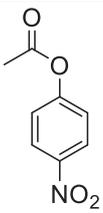
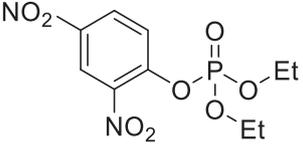
Em relação ao APNF e DEDNPP, nesses dois casos as reações se mostraram promissoras, são rápidas ($t_{1/2} \sim 3$ e 10 minutos , respectivamente) e o glifosato promove a formação dos produtos da clivagem do APNF e do DEDNPP,

entretanto, apesar de mais lentas do que a reação com o glifosato, ainda há uma significativa contribuição da reação de hidrólise dessas moléculas.

TABELA 7- RESUMO DOS DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DAS REAÇÕES AVALIADAS NESTA PARTE DO TRABALHO, REFERENTE AO GLIFOSATO FRENTE AO 4-NBZ, DNCB, APNF E DEDNPP.



[GLIFOSATO] = 0,05 mol L⁻¹

Derivatizante	Faixa estudada (pH)	Condição ótima (pH)	Constante e t _{1/2}	t _{1/2} (hidrólise)
 [4-NBZ] = 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	8,0 – 11,0	11,0	$k = 0,0024 \text{ min}^{-1}$ $t_{1/2} = 289 \text{ min}$	Não reage
 [DNCB] = 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	7,0 – 13,0	10,5	$k = 0,00157 \text{ min}^{-1}$ $t_{1/2} = 441 \text{ min}$	Não reage
 [APNF] = 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	9,0 – 10,5	10,0	$k = 0,25 \text{ min}^{-1}$ $t_{1/2} = 3 \text{ min}$	$k = 0,054 \text{ min}^{-1}$ $t_{1/2} = 13 \text{ min}$
 [DEDNPP] = 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	8,0 e 10,0	10,0	$k = 0,071 \text{ min}^{-1}$ $t_{1/2} = 10 \text{ min}$	$k = 0,00037 \text{ min}^{-1}$ $t_{1/2} = 1900 \text{ min}$

Fonte: O Autor (2025).

6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho buscou-se um método para detecção colorimétrica dos pesticidas acefato e glifosato. Na fase inicial desse estudo esses OP's foram purificados e caracterizados, de acordo com o que está descrito na literatura. Foi realizado um estudo bastante detalhado sobre a reatividade dessas moléculas, pois, possibilitar o monitoramento eficiente desses organofosforados é fundamental quando se pensa na segurança em relação aos alimentos, à saúde e também ao meio ambiente.

As moléculas avaliadas se mostraram promissoras, pois levaram à formação de um produto colorido ou possibilitaram a detecção dos OF's de forma indireta. A hidrólise do acefato foi investigada através de RMN de ^{31}P , em que foram observados sinais de três produtos possíveis resultantes da clivagem do acefato, o DMPT, SMPT e OMAPAA. O acefato foi também avaliado frente ao 4-NBZ, DNCB e DNFB. Em todos os casos levou à formação de um produto colorimétrico, com o aparecimento de uma banda intensa próxima a 250 nm na reação com 4-NBZ e próxima a 340 nm para as reações com DNCB e DNFB, e, em todos os casos, essa banda referente ao produto foi diferente da banda de absorção do produto de hidrólise dessas moléculas. Em todos os casos os ajustes foram obtidos em condições de pH mais alcalinos e a reação do acefato com o DNFB teve sua cinética acompanhada também por espectroscopia de RMN de ^{31}P . Dentre as moléculas avaliadas com o acefato, o DNFB se mostrou potencial para a detecção desse inseticida, pois foi obtido o produto colorido para toda a faixa de pH avaliado, sendo que em pH 9,5 foi obtida uma condição ideal, onde a hidrólise ocorre a uma velocidade bastante inferior à velocidade da reação de derivatização.

No que diz respeito ao glifosato os estudos se mostraram bem conclusivos, e conseguimos também a detecção colorimétrica com todas as moléculas avaliadas, as derivatizantes e as moléculas escolhidas para a detecção indireta do glifosato. Com o 4-NBZ foi observada a formação de um produto novo, diferente do produto de hidrólise desse derivatizante. Porém melhores resultados foram obtidos com o DNCB, para o qual houve a formação do produto de interesse, o GFTD, que foi confirmada através do acompanhamento cinético dessa reação por RMN de ^1H e ^{31}P .

Esses resultados são evidências que o DNCB pode ser um potencial derivatizante para a detecção colorimétrica do glifosato, foi encontrada uma condição ideal para essa reação, e, a partir dela foi realizado um estudo de detecção de glifosato em amostras reais. Foram utilizadas amostras das maras Stinger® e Roundup®, ambas contendo o princípio ativo glifosato. O DNCB se mostrou eficiente para a detecção do herbicida em amostras reais, sem nenhum tratamento prévio, e os interferentes presentes nas formulações comerciais não influenciaram nessas reações, o que é uma grande vantagem em relação às demais técnicas comumente usadas para detectar essas moléculas. Além disso, o método possibilita a quantificação do glifosato em amostras reais a partir da obtenção da constante de velocidade dessa reação.

Ainda, buscando a molécula ideal para a detecção desses OF's, outras moléculas foram também avaliadas frente ao glifosato. Os resultados obtidos frente ao APNF, se mostraram bastante interessantes e o glifosato foi capaz de promover a sua reação de hidrólise. Uma nova abordagem foi utilizada para a detecção do glifosato, utilizando o DEDNPP, que é um substrato modelo já utilizado em diversos estudos pelo nosso grupo de pesquisa. De acordo com os resultados obtidos nessa fase inicial de estudo com essa reação do DEDNPP com glifosato, em pH 10,0 houve a formação do DNP em uma reação rápida e bastante promissora, que possibilitou a detecção indireta do glifosato. Assim, podemos afirmar que estamos no caminho de possibilitar a detecção e a degradação desses pesticidas organofosforados de forma barata, simples e rápida, colorimetricamente.

Trabalhos futuros com relação a esse estudo envolvem a realização do acompanhamento cinético dessas reações através da técnica de espectroscopia de RMN, buscando compreender e elucidar os mecanismos pelos quais elas ocorrem. Ainda, é bastante interessante realizar a validação desse método usando o colorímetro artesanal proposto, que foi desenvolvido pelo grupo e pode ser utilizado para detecção em campo, podendo-se estender esse método a outros pesticidas OF's.

REFERÊNCIAS

1. BOMBARDI, L. M.; GARVEY, B. In **Direitos humanos no Brasil 2016: relatório da Rede Social de Justiça e Direitos Humanos**; Outras Expressões: ISBN 978-85-9482-011-2. São Paulo, 2016, p 70.
2. ANP. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Ministério de Minas e Energia. **Anuário Estatístico 2022**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2022>>. Acesso em 15/02/2025.
3. CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5841-producao-de-cana-de-acucar-na-safra-2024-25-sofre-reducao-devido-a-condicoes-climaticas-adversas#:~:text=Mercado%20%E2%80%93%20Na%20safra%202024/25,3%C2%BA%20Levantamento%20%2D%202024/25>> Acesso em 18/02/2025.
4. CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5926-aviso-de-pauta-5-levantamento-da-safra-de-graos-2024-2025>> Acesso em 18/02/2025.
5. PAZ, J. V., REZENDE, V.T., GAMEIRO, A. **Agrotóxicos no Brasil: entre a produção e a segurança alimentar**. Jornal da USP. Disponível em <<https://jornal.usp.br/artigos/agrotoxicos-no-brasil-entre-a-producao-e-a-seguranca-alimentar/#:~:text=Em%202021%2C%20o%20consumo%20atingiu,mais%20do%20que%20em%202003>>. 2023. Acesso em 21/02/2025.
6. FREITAS, B. M. C.; BOMBARDI, L. M. A POLÍTICA NACIONAL DE IRRIGAÇÃO E O USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL: CONTAMINAÇÃO E INTOXICAÇÕES NO CEARÁ **GEOgraphia**, v.20, n.43, p.86. 2018.
7. FAO In **The future of food and agriculture-Trends and Challenges**. ISBN 978-92-5-109551-5. Rome, 2017.
8. MEDEIROS J.F., A. R. D., MONTAGNER C.C. In **Quim. Nova** A Química na Avaliação do Impacto à Saúde Humana Diante da Exposição aos Pesticidas, 2021; Vol. XY, p 200.
9. HEINRICH-BÖLL-STIFTUNG EUROPEAN UNION. **Atlas dos agrotóxicos 2023 - Fatos e dados do uso dessas substâncias na agricultura**. (2023). 68 p. Licença CC-BY 4.0.

10. MAPA. Ministério da Agricultura e da Pecuária. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br>>. Acesso em 18/02/2025.

11. BRASIL. Lei nº 14785, de 27 de dezembro de 2023. Dispõe sobre a pesquisa, produção, comercialização, transporte, armazenamento, rotulagem, embalagem, entre outros aspectos relacionados a agrotóxico, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2023-2026/2023/lei/l14785.htm>. Acesso em 23/02/2025.

12. ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2023 a 2025.** Brasília. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>>. 2023.

13. ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2018 a 2020.** Brasília. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>>. 2020.

14. ANVISA . **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2022.** Brasília. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>>. 2022.

15. ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2011 e 2012.** Brasília. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>>. 2012.

16. ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015.** Brasília. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>>. 2016.

17. INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Agrotóxico**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxico>>. Acesso em: 21/02/2025. 2023.

18. CHAWLA, P.; KAUSHIK, R.; SWARAJ, V. J. S.; KUMAR, N. Organophosphorus pesticides residues in food and their colorimetric detection. **Environmental nanotechnology, monitoring & management**, v.10, p.292. 2018.

19. CARNEIRO, F. F. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. EPSJV/Expressão Popular. 2015. p.
20. RAJ, R. S.; KRISHNAN, K. A. A comprehensive review on the impact of emerging organophosphorous pesticides and their remedial measures: Special focus on acephate. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v.20, p.100813. 2023.
21. BOMBARDI, L. M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Européia**. USP. São Paulo, 2017.
22. IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. **Projeto Piloto de Monitoramento Ambiental de Agrotóxicos em Água e Solo**. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/projeto-piloto-de-monitoramento-ambiental-de-agrotoxicos-em-agua-e-solo>>. Acesso em: 19/02/2025. 2024.
23. FERREIRA, A. M. de S. D., SILVA, R. B. L. e, & NETO, S. V. da C. (2025). O crescimento agrícola e comércio ilegal de agrotóxicos no Brasil. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, 23(2), e8894. <https://doi.org/10.55905/oelv23n2-022>.
24. MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária. Notícias. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/combate-a-agrotoxicos-ilegais-se-multiplica-com-acoes-integradas>> Acesso em 20/03/2025.
25. CARSON, R. **Silent Spring**. Orlando, Flórida,USA: Houghton Mifflin Harcourt. 1962. 400 p.
26. BARBOZA, H. T. G.; NASCIMENTO, X. P. R.; FREITAS-SILVA, O.; SOARES, A. G.; DACOSTA, J. B. N. Compostos organofosforados e seu papel na agricultura. **Ver Virtual Quim**, v.10, p.172. 2018.
27. CAVALCANTI, L. P. A. N.; DE AGUIAR, A. P.; LIMA, J. A.; LIMA, A. L. S. Intoxicação por organofosforados: tratamento e metodologias analíticas empregadas na avaliação da reativação e inibição da acetilcolinesterase. **Revista Virtual de Química**, v.8, n.3, p.739. 2016.
28. BUŠIĆ, V.; KATALINIĆ, M.; ŠINKO, G.; KOVARIK, Z.; GAŠO-SOKAČ, D. Pyridoxal oxime derivative potency to reactivate cholinesterases inhibited by organophosphorus compounds. **Toxicology letters**, v.262, p.114. 2016.

29. UNG, S. P. M.; LI, C.-J. From rocks to bioactive compounds: a journey through the global P (V) organophosphorus industry and its sustainability. **RSC Sustainability**, v.1, n.1, p.11. 2023.
30. GUPTA, R. C. **Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds**. Academic Press: Burlington. 2006. p.
31. KAMERLIN, S. C. L.; SHARMA, P. K.; PRASAD, R. B.; WARSHEL, A. Why nature really chose phosphate. **Quarterly reviews of biophysics**, v.46, n.1, p.1. 2013.
32. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, v.26, p.745. 2003.
33. ORTH, E. S. **Reações nucleofílicas de desfosforilação com imidazol e hidroxamato: modelagem em sistemas intra-e intermolecular, polimérico e micelar**. 2011.215 p. Tese (Doutorado em Química).Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
34. SCHROEDER, G. K.; LAD, C.; WYMAN, P.; WILLIAMS, N. H.; WOLFENDEN, R. The time required for water attack at the phosphorus atom of simple phosphodiester and of DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.11, p.4052. 2006.
35. SILVA, V. B.; CAMPOS, R. B.; PAVEZ, P.; MEDEIROS, M.; ORTH, E. S. Nucleophilic neutralization of organophosphates: lack of selectivity or plenty of versatility? **The Chemical Record**, v.21, n.10, p.2638. 2021.
36. FERREIRA, J. G. L. **Catalisadores sustentáveis para degradação de organofosforados: funcionalização de resíduos celulósicos**. Departamento de Química. Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2019. 130 p.
37. CAMPOS, R. B.; MENEZES, L. R. A.; BARISON, A.; TANTILLO, D. J.; ORTH, E. S. The importance of methyl positioning and tautomeric equilibria for imidazole nucleophilicity. **Chemistry–A European Journal**, v.22, n.43, p.15521. 2016.
38. KIRBY, A. J.; NOME, F. Fundamentals of phosphate transfer. **Accounts of chemical research**, v.48, n.7, p.1806. 2015.
39. ORTH, E. S.; ALMEIDA, T. G.; SILVA, V. B.; OLIVEIRA, A. R. M.; OCAMPOS, F. M. M.; BARISON, A. Mechanistic insight on the catalytic detoxification of Paraoxon mediated by imidazole: Furnishing optimum scaffolds for

scavenging organophosphorus agents. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.403, p.93. 2015.

40. SILVA, V. B.; NASCIMENTO, L. L. Q.; NUNES, M. C.; CAMPOS, R. B.; OLIVEIRA, A. R. M.; ORTH, E. S. Puzzling reaction of imidazole with methyl parathion: P= S versus P= O mechanistic shift dilemma in organophosphates. **Chemistry–A European Journal**, v.25, n.3, p.817. 2019.

41. SILVA, V.; ORTH, E. Are Imidazoles Versatile or Promiscuous in Reactions With Organophosphates? Insights From the Case of Parathion. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 2019.

42. TEIXEIRA, A. R. **A versatilidade do imidazol em reações com organofosforados: o caso peculiar do pesticida diazinon**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2020. p.

43. SILVA, V. B.; ORTH, E. S. Structure-reactivity insights on the alkaline hydrolysis of organophosphates: Non-Leaving and leaving group effects in a bilinear brønsted-like relationship. **ChemPhysChem**, v.24, n.6, p.e202200612. 2023.

44. MOTA, T. F. M.; OLIVEIRA, W. L.; GONÇALVES, S.; VASCONCELOS, M. W.; MIGLIORANZA, K. S. B.; GHISI, N. C. Are the issues involving acephate already resolved? A scientometric review. **Environmental research**, v.237, p.117034. 2023.

45. KUMAR, V.; UPADHYAY, N.; KUMAR, V.; SHARMA, S. A review on sample preparation and chromatographic determination of acephate and methamidophos in different samples. **Arabian Journal of Chemistry**, v.8, n.5, p.624. 2015.

46. METCALF, R.L. (*in memoriam*) e HOROWITZ, A.R. INSECT CONTROL, 2. **INDIVIDUAL INSECTICIDES**, em Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, American Cancer Society, 2014, pp.1–94.

47. YAO, J.; ZHU, Y. C.; ADAMCZYK, J.; LUTTRELL, R. Influences of acephate and mixtures with other commonly used pesticides on honey bee (*Apis mellifera*) survival and detoxification enzyme activities. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.209, p.9. 2018.

48. LIN, Z.; PANG, S.; ZHANG, W.; MISHRA, S.; BHATT, P.; CHEN, S. Degradation of Acephate and Its Intermediate Methamidophos: Mechanisms and Biochemical Pathways. **Frontiers in Microbiology**, v.11, p.2045. 2020.

49. CHEN, R.; ZHANG, L.; LUO, X.; LIANG, G. Hydrolysis of an organophosphorus pesticide: a theoretical investigation of the reaction mechanism for acephate. **Theoretical Chemistry Accounts**, v.137, n.8, p.1. 2018.
50. CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic chemistry**. Oxford university press. 2012. p.
51. CHEN, R.; ZHANG, L.; LUO, X.; LIANG, G. Hydrolysis of an organophosphorus pesticide: a theoretical investigation of the reaction mechanism for acephate. **Theoretical Chemistry Accounts**, v.137, n.8, p.119. 2018.
52. DYGUDA-KAZIMIEROWICZ, E.; SOKALSKI, W. A.; LESZCZYNSKI, J. Gas-Phase Mechanisms of Degradation of Hazardous Organophosphorus Compounds: Do They Follow a Common Pattern of Alkaline Hydrolysis Reaction As in Phosphotriesterase? **The Journal of Physical Chemistry B**, v.112, n.32, p.9982. 2008.
53. SILERIO-VÁZQUEZ, F. D. J.; GARCÍA-ROIG, M.; GONZÁLEZ-BURCIAGA, L. A.; NÚÑEZ-NÚÑEZ, C. M.; PROAL-NÁJERA, J. B. Glyphosate photocatalytic degradation: Exploring trends, innovations and research gaps. **Journal of Water Process Engineering**, v.66, p.105948. 2024.
54. AMARANTE JÚNIOR, O. P. D.; SANTOS, T. C. R. D.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. **Química Nova**, v.25, p.420. 2002.
55. SINGH, S.; KUMAR, V.; DATTA, S.; WANI, A. B.; DHANJAL, D. S.; ROMERO, R.; SINGH, J. Glyphosate uptake, translocation, resistance emergence in crops, analytical monitoring, toxicity and degradation: a review. **Environmental chemistry letters**, v.18, n.3, p.663. 2020.
56. AMARANTE JUNIOR, O. P. D.; SANTOS, T. C. R. D.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química nova**, v.25, p.589. 2002.
57. COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Metallic complexes with glyphosate: a review. **Química Nova**, 2005, Vol. 28, No. 6, 1038-1045 ref. 412005.
58. TRESNAKOVA, N.; STARA, A.; VELISEK, J. Effects of glyphosate and its metabolite AMPA on aquatic organisms. **Applied Sciences**, v.11, n.19, p.9004. 2021.
59. CONNOLLY, A.; JONES, K.; BASINAS, I.; GALEA, K. S.; KENNY, L.; MCGOWAN, P.; COGGINS, M. A. Exploring the half-life of glyphosate in human

urine samples. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.222, n.2, p.205. 2019.

60. IARC, 2016. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans -Glyphosate, second ed. International Agency for Research on Cancer Lyon France 27/06/2016. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-10.pdf>. JMPR, 2016. In: Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues in: Joint Meeting Pesticide Residues. World Health Organisation (WHO), Geneva.

61. ECHA-European Chemicals Agency. Glyphosate. Disponível em: <https://echa.europa.eu/hot-topics/glyphosate>. Acesso em: 08/03/2025.

62. VALLE, A. L.; MELLO, F. C. C.; ALVES-BALVEDI, R. P.; RODRIGUES, L. P.; GOULART, L. R. Glyphosate detection: methods, needs and challenges. **Environmental Chemistry Letters**, v.17, n.1, p.291. 2019.

63. DILL, G. M.; SAMMONS, R. D.; FENG, P. C. C.; KOHN, F.; KRETZMER, K.; MEHRSHEIKH, A.; BLEEKE, M.; HONEGGER, J. L.; FARMER, D.; WRIGHT, D. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. **Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management**, p.1. 2010.

64. SUN, Y.; WANG, C.; WEN, Q.; WANG, G.; WANG, H.; QU, Q.; HU, X. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by LC using a new labeling reagent, 4-methoxybenzenesulfonyl fluoride. **Chromatographia**, v.72, n.7, p.679. 2010.

65. CLAUSON, S. L.; SYLVIA, J. M.; ARCURY, T. A.; SUMMERS, P.; SPENCER, K. M. Detection of pesticides and metabolites using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): acephate. **Applied Spectroscopy**, v.69, n.7, p.785. 2015.

66. TOGNACCINI, L.; RICCI, M.; GELLINI, C.; FEIS, A.; SMULEVICH, G.; BECUCCI, M. Surface enhanced Raman spectroscopy for in-field detection of pesticides: A test on dimethoate residues in water and on olive leaves. **Molecules**, v.24, n.2, p.292. 2019.

67. HUA, M. Z.; FENG, S.; WANG, S.; LU, X. Rapid detection and quantification of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in milk using molecularly imprinted polymers–surface-enhanced Raman spectroscopy. **Food chemistry**, v.258, p.254. 2018.

68. LI, D.; ZHANG, Y.; GUO, Q.; SUN, X.; ZHANG, H.; WANG, S.; BIRECH, Z.; HU, J. An efficient LSPR method to quantitatively detect dimethoate: Development, characterization and evaluation. **Plos one**, v.15, n.9, p.e0239632. 2020.

69. HSU, C.-W.; LIN, Z.-Y.; CHAN, T.-Y.; CHIU, T.-C.; HU, C.-C. Oxidized multiwalled carbon nanotubes decorated with silver nanoparticles for fluorometric detection of dimethoate. **Food chemistry**, v.224, p.353. 2017.
70. KONG, D.; JIN, R.; WANG, T.; LI, H.; YAN, X.; SU, D.; WANG, C.; LIU, F.; SUN, P.; LIU, X. Fluorescent hydrogel test kit coordination with smartphone: Robust performance for on-site dimethoate analysis. **Biosensors and Bioelectronics**, v.145, p.111706. 2019.
71. HUNG, S.-H.; LEE, J.-Y.; HU, C.-C.; CHIU, T.-C. Gold-nanoparticle-based fluorescent "turn-on" sensor for selective and sensitive detection of dimethoate. **Food chemistry**, v.260, p.61. 2018.
72. EMONDS-ALT, G.; MALHERBE, C.; KASEMIIRE, A.; AVOHOU, H. T.; HUBERT, P.; ZIEMONS, E.; MONBALIU, J.-C. M.; EPPE, G. Development and validation of an integrated microfluidic device with an in-line Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) detection of glyphosate in drinking water. **Talanta**, v.249, p.123640. 2022.
73. WANG, D.; LIN, B.; CAO, Y.; GUO, M.; YU, Y. A highly selective and sensitive fluorescence detection method of glyphosate based on an immune reaction strategy of carbon dot labeled antibody and antigen magnetic beads. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.64, n.30, p.6042. 2016.
74. WANG, L.; BI, Y.; HOU, J.; LI, H.; XU, Y.; WANG, B.; DING, H.; DING, L. Facile, green and clean one-step synthesis of carbon dots from wool: application as a sensor for glyphosate detection based on the inner filter effect. **Talanta**, v.160, p.268. 2016.
75. RAWAT, D.; BAINS, A.; CHAWLA, P.; KAUSHIK, R.; YADAV, R.; KUMAR, A.; SRIDHAR, K.; SHARMA, M. Hazardous impacts of glyphosate on human and environment health: Occurrence and detection in food. **Chemosphere**, v.329, p.138676. 2023.
76. JAN, M. R.; SHAH, J.; MUHAMMAD, M.; ARA, B. Flow injection spectrophotometric determination of glyphosate herbicide in wheat grains via condensation reaction with p-dimethylaminobenzaldehyde. **South African Journal of Chemistry**, v.71, n.1, p.39. 2018.
77. WANG, J.; SUZUKI, H.; SATAKE, T. Coulometric microdevice for organophosphate pesticide detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.204, p.297. 2014.

78. LIU, G.; LIN, Y. Electrochemical sensor for organophosphate pesticides and nerve agents using zirconia nanoparticles as selective sorbents. **Analytical chemistry**, v.77, n.18, p.5894. 2005.
79. GERBREDERS, V.; KRASOVSKA, M.; MIHAILOVA, I.; OGURCOVS, A.; SLEDEVSKIS, E.; GERBREDERS, A.; TAMANIS, E.; KOKINA, I.; PLAKSENKOVA, I. Nanostructure-based electrochemical sensor: Glyphosate detection and the analysis of genetic changes in rye DNA. **Surfaces and Interfaces**, v.26, p.101332. 2021.
80. GOKILA, N.; MUTHUMALAI, K.; HALDORAI, Y.; KUMAR, R. T. R. Electrochemical Non-enzymatic sensor based on Co-H2ABDC Metal Organic Framework for detection of glyphosate. **Chemical Physics Letters**, v.795, p.139481. 2022.
81. SONGA, E. A.; AROTIBA, O. A.; OWINO, J. H. O.; JAHED, N.; BAKER, P. G. L.; IWUOHA, E. I. Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. **Bioelectrochemistry**, v.75, n.2, p.117. 2009.
82. HERNANDEZ, F.; SANCHO, J. V.; POZO, O. J. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v.382, n.4, p.934. 2005.
83. BASTIDAS-BASTIDAS, P. D. J.; LEYVA-MORALES, J. B.; OLMEDA-RUBIO, C.; PINEDA-LANDEROS, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, I. E. Comparison of two methods for multi-residue analysis of organophosphorus pesticides in agricultural products with high and low moisture content. **Revista bio ciencias**, v.6, n.SPE. 2019.
84. DING, J.; GUO, H.; LIU, W.-W.; ZHANG, W.-W.; WANG, J.-W. Current progress on the detection of glyphosate in environmental samples. **J Sci Appl Biomed**, v.3, n.6, p.88. 2015.
85. OBANA, H.; KIKUCHI, K.; OKIHASHI, M.; HORI, S. Determination of Organophosphorus Pesticides in Foods Using an Accelerated Solvent Extraction System. **Analyst**, v.122, n.3, p.217. 1997.
86. OBANA, H.; OKIHASHI, M.; KAKIMOTO, S.; HORI, S. Determination of acephate and methamidophos in foods using super-absorbent polymer. **Analytical Communications**, v.34, n.9, p.253. 1997.
87. LIAO, Y.; BERTHION, J.-M.; COLET, I.; MERLO, M.; NOUGADÈRE, A.; HU, R. Validation and application of analytical method for glyphosate and glufosinate in

foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1549, p.31. 2018.

88. AGUAYO, R.; ARIAS, F.; CAÑETE, A.; ZUÑIGA, C.; CASTRO, E. A.; PAVEZ, P.; SANTOS, J. G. Dual Nucleophilic Substitution Reactions of O, O-Diethyl 2, 4-dinitrophenyl Phosphate and Thionophosphate Triesters. **International Journal of Chemical Kinetics**, v.45, n.3, p.202. 2013.

89. WANG, Y.; SHEN, L.; GONG, Z.; PAN, J.; ZHENG, X.; XUE, J. Analytical methods to analyze pesticides and herbicides. **Water Environment Research**, v.91, n.10, p.1009. 2019.

90. GOMES, M. S.; TREVIZAN, L. C.; NÓBREGA, J. A.; KAMOGAWA, M. Y. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**, v.31, p.1577. 2008.

91. BHATTU, M.; VERMA, M.; KATHURIA, D. Recent advancements in the detection of organophosphate pesticides: a review. **Analytical Methods**, v.13, n.38, p.4390. 2021.

92. HU, Y.; WANG, J.; WU, Y. A simple and rapid chemosensor for colorimetric detection of dimethoate pesticide based on the peroxidase-mimicking catalytic activity of gold nanoparticles. **Analytical Methods**, v.11, n.41, p.5337. 2019.

93. LIANG, M.; FAN, K.; PAN, Y.; JIANG, H.; WANG, F.; YANG, D.; LU, D.; FENG, J.; ZHAO, J.; YANG, L. Fe₃O₄ magnetic nanoparticle peroxidase mimetic-based colorimetric assay for the rapid detection of organophosphorus pesticide and nerve agent. **Analytical chemistry**, v.85, n.1, p.308. 2013.

94. LI, H.; GUO, J.; PING, H.; LIU, L.; ZHANG, M.; GUAN, F.; SUN, C.; ZHANG, Q. Visual detection of organophosphorus pesticides represented by mathamidophos using Au nanoparticles as colorimetric probe. **Talanta**, v.87, p.93. 2011.

95. SRINIVASAN, S.; LINGAPPA, S. Colorimetric determination of methamidophos by cholinesterase inhibition. **Science and Culture (India)**, v.50, n.1, p.30. 1984.

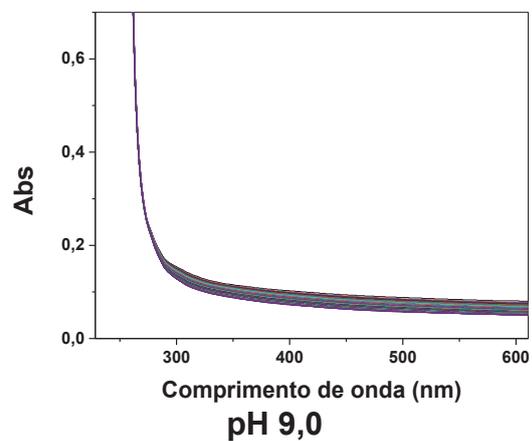
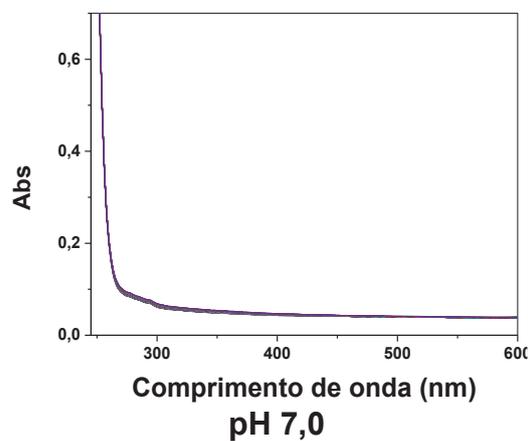
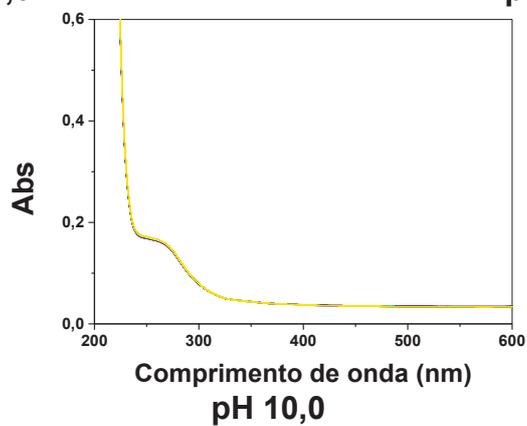
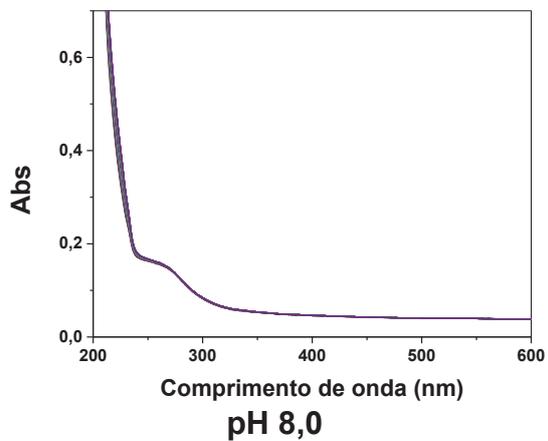
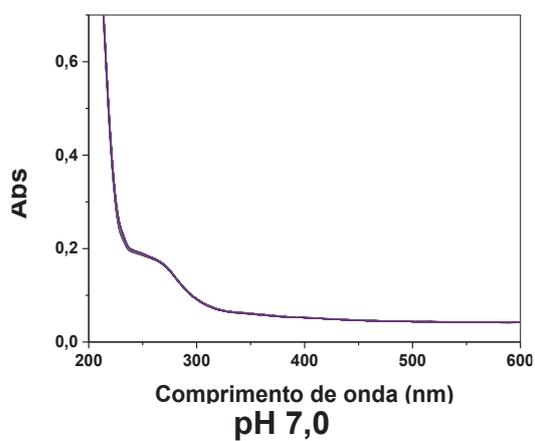
96. NUNES, G. S.; MONTESINOS, T.; MARQUES, P. B. O.; FOURNIER, D.; MARTY, J. L. Acetylcholine enzyme sensor for determining methamidophos insecticide: evaluation of some genetically modified acetylcholinesterases from *Drosophila melanogaster*. **Analytica Chimica Acta**, v.434, n.1, p.1. 2001.

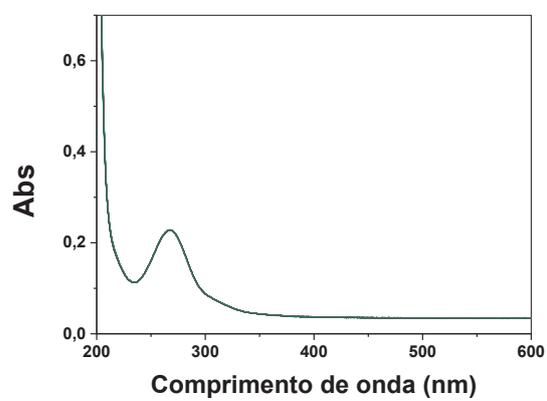
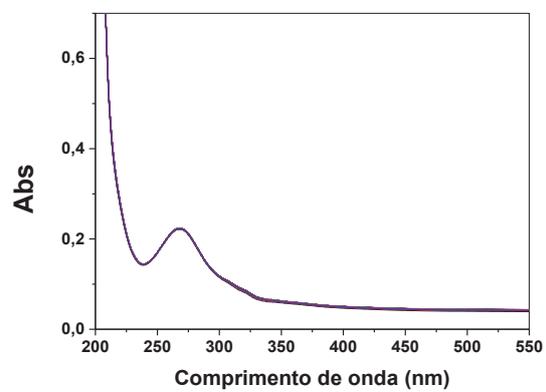
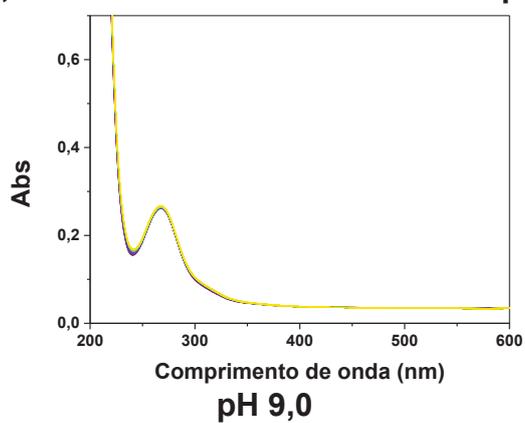
97. HUANG, L.; SUN, D.-W.; PU, H.; WEI, Q.; LUO, L.; WANG, J. A colorimetric paper sensor based on the domino reaction of acetylcholinesterase and degradable γ -MnOOH nanozyme for sensitive detection of organophosphorus pesticides. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.290, p.573. 2019.
98. LIANG, X.; HAN, L. White peroxidase-mimicking nanozymes: colorimetric pesticide assay without interferences of O₂ and color. **Advanced Functional Materials**, v.30, n.28, p.2001933. 2020.
99. MAEDA, H.; MATSUNO, H.; USHIDA, M.; KATAYAMA, K.; SAEKI, K.; ITOH, N. 2, 4-Dinitrobenzenesulfonyl fluoresceins as fluorescent alternatives to Ellman's reagent in thiol-quantification enzyme assays. **Angewandte Chemie International Edition**, v.44, n.19, p.2922. 2005.
100. QIAN, K.; TANG, T.; SHI, T.; WANG, F.; LI, J.; CAO, Y. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3, 5-dinitrobenzotrifluoride. **Analytica Chimica Acta**, v.635, n.2, p.222. 2009.
101. BHASKARA, B. L.; NAGARAJA, P. Direct sensitive spectrophotometric determination of glyphosate by using ninhydrin as a chromogenic reagent in formulations and environmental water samples. **Helvetica chimica acta**, v.89, n.11, p.2686. 2006.
102. CATRINCK, T. C. P. G.; DIAS, A.; AGUIAR, M. C. S.; SILVÉRIO, F. O.; FIDÊNCIO, P. H.; PINHO, G. P. A simple and efficient method for derivatization of glyphosate and AMPA using 9-fluorenylmethyl chloroformate and spectrophotometric analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.25, p.1194. 2014.
103. JAN, M. R.; SHAH, J.; MUHAMMAD, M.; ARA, B. Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method. **Journal of Hazardous materials**, v.169, n.1-3, p.742. 2009.
104. SHARMA, D. K.; GUPTA, A.; KASHYAP, R.; KUMAR, N. Spectrophotometric method for the determination of Glyphosate in relation to its environmental and toxicological analysis. **Archives of Environmental Science**, v.6, p.42. 2012.
105. AYDIN, Z.; AKIN, Ş.; ÇENET, E. N.; KESKİNATEŞ, M.; AKBULUT, A.; KELEŞ, H.; KELEŞ, M. Two novel enzyme-free colorimetric sensors for the detection of glyphosate in real samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.112, p.104674. 2022.

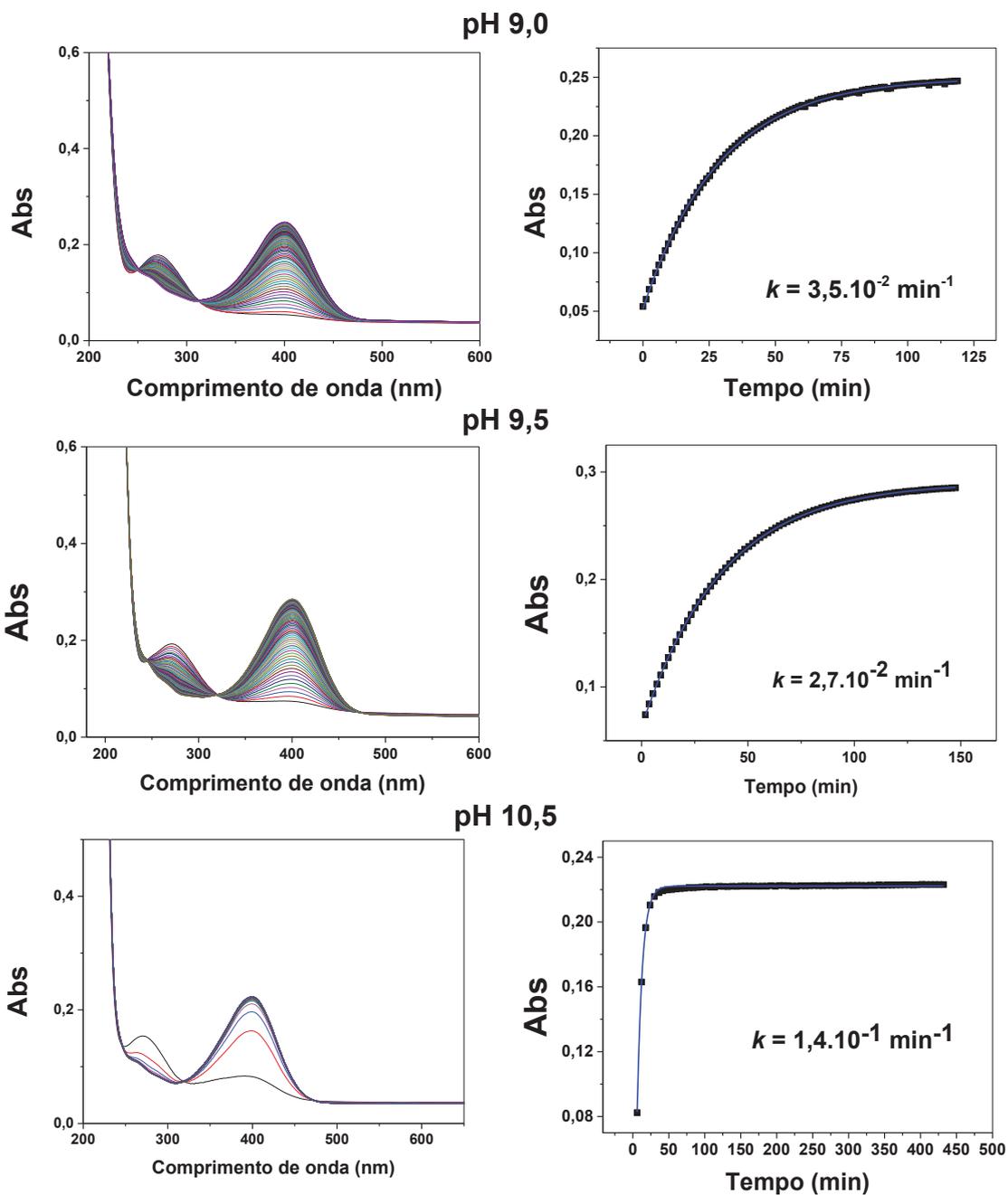
106. AYDIN, Z.; KELEŞ, M. A reaction-based system for the colorimetric detection of glyphosate in real samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.267, p.120501. 2022.
107. HELLINGER, R.; SILVA, V. B.; ORTH, E. S. Colorimetric detection of glyphosate: towards a handmade and portable analyzer. **Pure and Applied Chemistry**, v.92, n.4, p.601. 2020.
108. RAWAT, K. A.; MAJITHIYA, R. P.; ROHIT, J. V.; BASU, H.; SINGHAL, R. K.; KAILASA, S. K. Mg²⁺ ion as a tuner for colorimetric sensing of glyphosate with improved sensitivity via the aggregation of 2-mercapto-5-nitrobenzimidazole capped silver nanoparticles. **Rsc Advances**, v.6, n.53, p.47741. 2016.
109. CHANG, Y.; ZHANG, Z.; HAO, J.; YANG, W.; TANG, J. A simple label free colorimetric method for glyphosate detection based on the inhibition of peroxidase-like activity of Cu (II). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.228, p.410. 2016.
110. ABDULLAH, M. P.; DAUD, J.; HONG, K. S.; YEW, C. H. Improved method for the determination of glyphosate in water. **Journal of Chromatography A**, v.697, n.1-2, p.363. 1995.
111. COSTA, A. R. C.; RIBEIRO, E. B.; RIBEIRO, D. B.; BLASQUES, R. V.; MAQUES, P. R. B. O.; TARGA, M.; NUNESA, G. S. Biossensores à Base de Acetilcolinesterase para Detecção de Pesticidas organofosforados: Tendências e Perspectivas. **Rev. Virtual Quim.**, 2021.
112. RHEE, I. K.; VAN RIJN, R. M.; VERPOORTE, R. Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v.14, n.3, p.127. 2003.
113. ALEX, A. V.; MUKHERJEE, A. Review of recent developments (2018–2020) on acetylcholinesterase inhibition based biosensors for organophosphorus pesticides detection. **Microchemical Journal**, v.161, p.105779. 2021.
114. CHE SULAIMAN, I. S.; CHIENG, B. W.; OSMAN, M. J.; ONG, K. K.; RASHID, J. I. A.; WAN YUNUS, W. M. Z.; NOOR, S. A. M.; KASIM, N. A. M.; HALIM, N. A.; MOHAMAD, A. A review on colorimetric methods for determination of organophosphate pesticides using gold and silver nanoparticles. **Microchimica Acta**, v.187, p.1. 2020.
115. BAI, W.; ZHU, C.; LIU, J.; YAN, M.; YANG, S.; CHEN, A. Gold nanoparticle-based colorimetric aptasensor for rapid detection of six organophosphorous pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.34, n.10, p.2244. 2015.

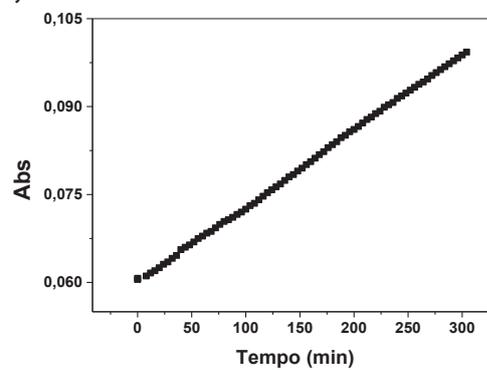
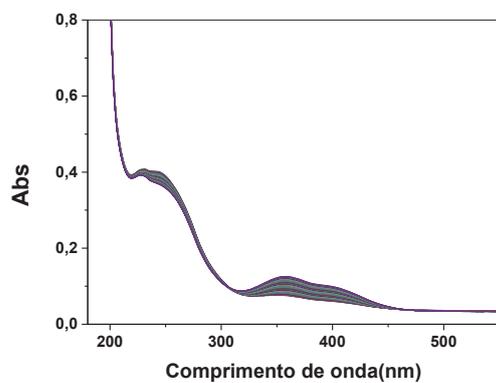
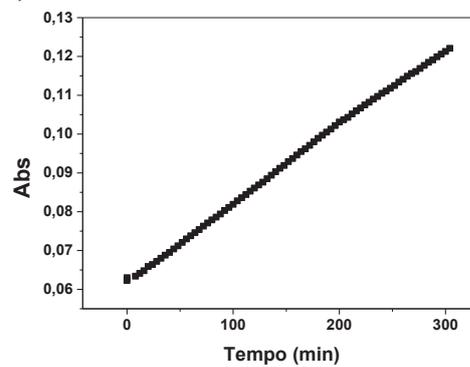
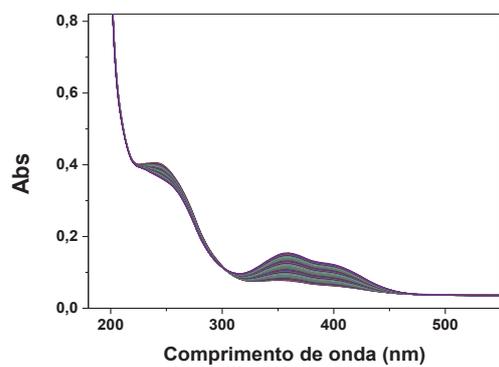
116. OSMAN, M. J.; RASHID, J. I. A.; KHIM, O. K.; YUNUS, W. M. Z. W.; NOOR, S. A. M.; KASIM, N. A. M.; KNIGHT, V. F.; CHUANG, T. C. Optimisation of a gold nanoparticle-based aptasensor integrated with image processing for the colorimetric detection of acephate using response surface methodology. **RSC advances**, v.11, n.42, p.25933. 2021.
117. LUNDGREN, L. N. A new method for the determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid residues in soils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.34, n.3, p.535. 1986.
118. SILVA, V. B.; ORTH, E. S. Introdução à físico-química orgânica utilizando um colorímetro artesanal-uma prática interdisciplinar. **Química Nova**, v.40, p.238. 2017.
119. KUMAR, V.; SINGH, S.; SINGH, R.; UPADHYAY, N.; SINGH, J.; PANT, P.; SINGH, R.; SRIVASTAVA, B.; SINGH, A.; SUBHOSE, V. Spectral, structural and energetic study of acephate, glyphosate, monocrotophos and phorate: an experimental and computational approach. **Journal of Taibah University for Science**, v.12, n.1, p.69. 2018.
120. MAHAJNA, M.; QUISTAD, G. B.; CASIDA, J. E. Acephate insecticide toxicity: safety conferred by inhibition of the bioactivating carboxamidase by the metabolite methamidophos. **Chemical research in toxicology**, v.10, n.1, p.64. 1997.
121. ZHOU, Y.; GUO, Y.; XU, S.; ZHANG, L.; AHMAD, W.; SHI, Z. Photoluminescent 3D Lanthanide–Organic Frameworks Based on 2, 5-Dioxo-1, 4-piperazinylbis (methylphosphonic) Acid Formed via in Situ Cyclodehydration of Glyphosates. **Inorg. Chem.**, v.52, n.11, p.6338. 2013.
122. SUN, Y.; KUNC, F.; BALHARA, V.; COLEMAN, B.; KODRA, O.; RAZA, M.; CHEN, M.; BRINKMANN, A.; LOPINSKI, G. P.; JOHNSTON, L. J. Quantification of amine functional groups on silica nanoparticles: a multi-method approach. **Nanoscale Advances**, v.1, n.4, p.1598. 2019.
123. KIM, J.; JUNG, D.; PARK, Y.; KIM, Y.; MOON, D. W.; LEE, T. G. Quantitative analysis of surface amine groups on plasma-polymerized ethylenediamine films using UV–visible spectroscopy compared to chemical derivatization with FT-IR spectroscopy, XPS and TOF-SIMS. **Applied Surface Science**, v.253, n.9, p.4112. 2007.
124. BENDER, M. L.; TURNQUEST, B. W. The Imidazole-catalyzed Hydrolysis of p-Nitrophenyl Acetate. **Journal of the American Chemical Society**, v.79, n.7, p.1652. 1957.

ANEXOS

A1 – Hidrólise do ACF ($[ACF] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$)A2 – Hidrólise do DNCB ($[DNCB] = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)

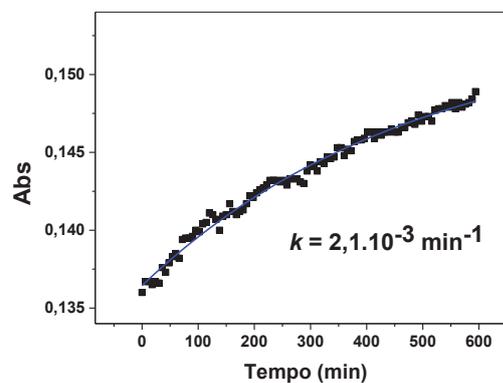
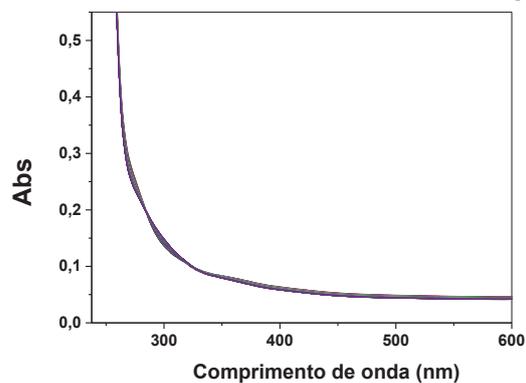
A3 – Hidrólise do 4-NBZ ([4-NBZ] = 10^{-5} mol L $^{-1}$)**pH 7,0****pH 8,0****pH 9,0**

A4 – Hidrólise do APNF ($[APNF] = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)

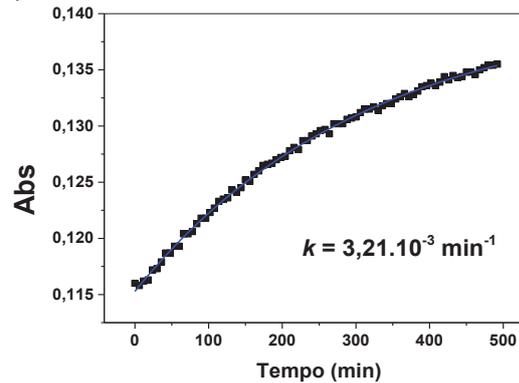
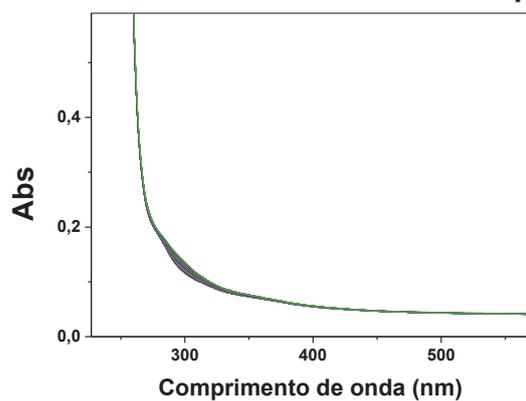
A5 – Hidrólise do DEDNPP ([DEDNPP] = 10^{-5} mol L $^{-1}$)**pH 9,0****pH 9,5**

A6 – REAÇÕES DO ACEFATO COM 4-NBZ ([ACF] = 0,05 mol L⁻¹; [4-NBZ]= 10⁻⁵ mol L⁻¹; T=25°C)

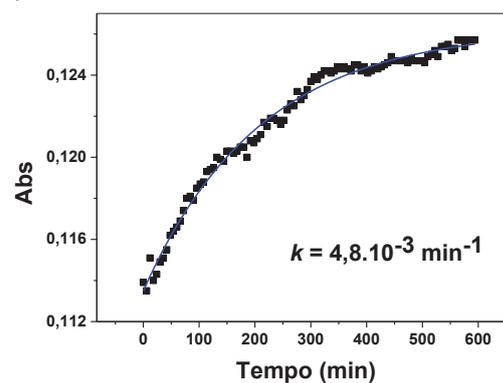
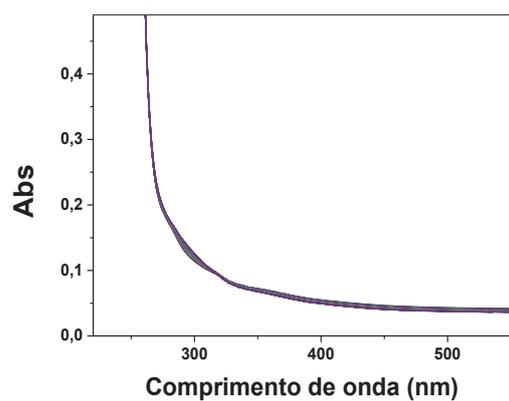
pH 8,5



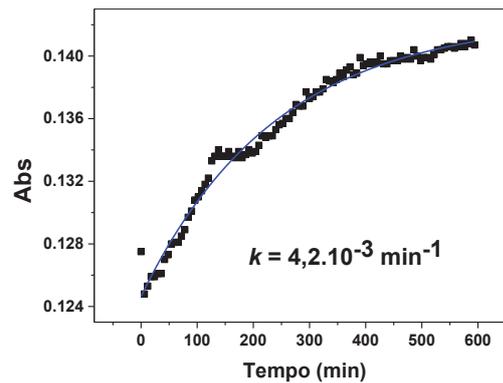
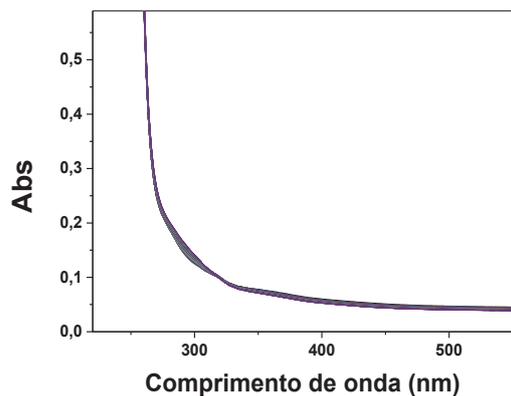
pH 9,0



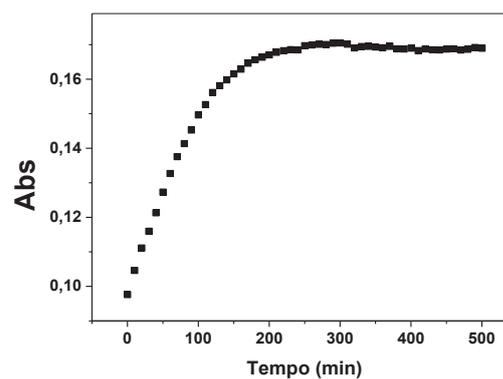
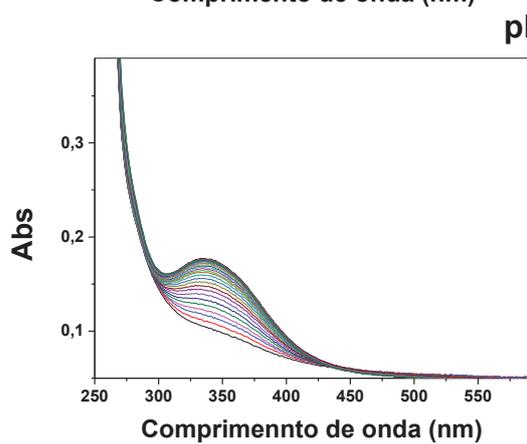
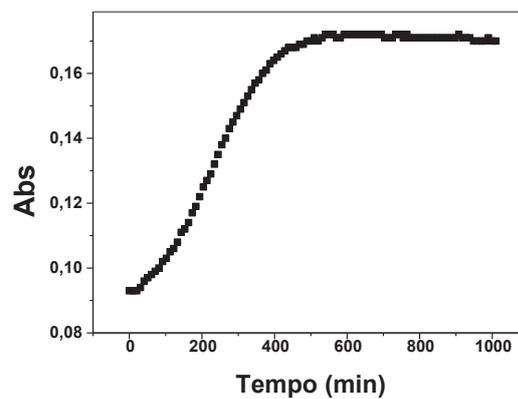
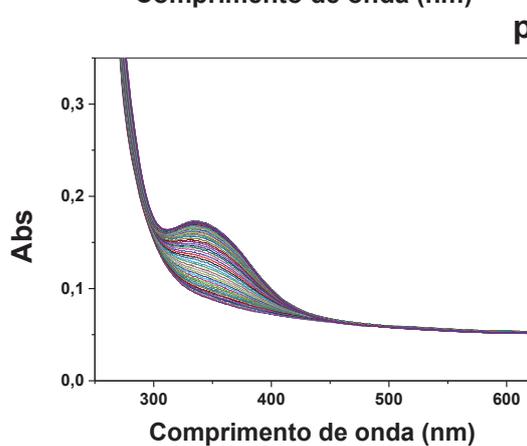
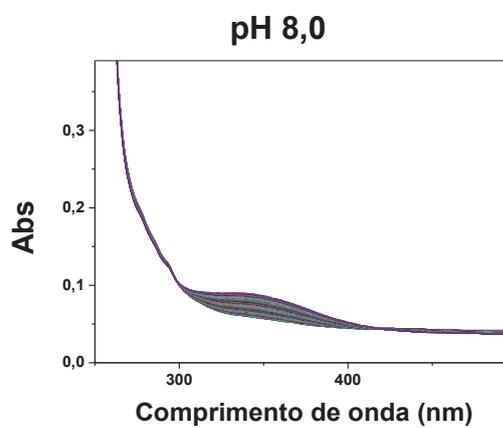
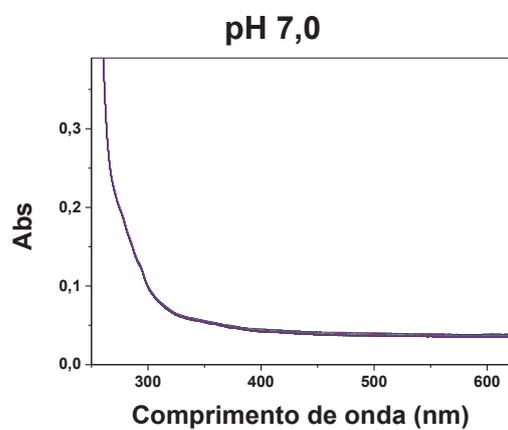
pH 9,5



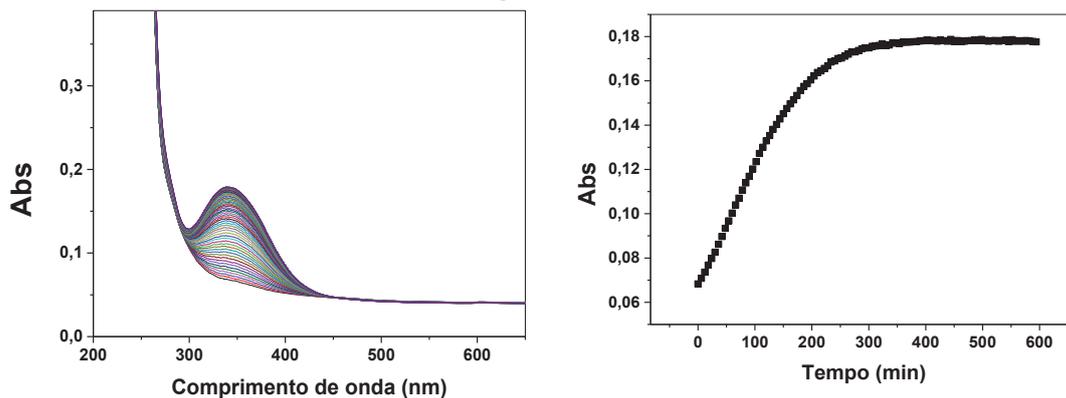
pH 10,0



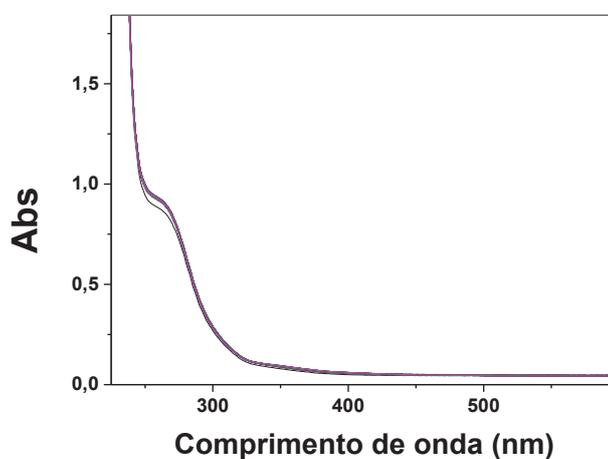
A7 – REAÇÕES DO ACEFATO COM DNCB ([ACF] = 0,05 mol L⁻¹; [DNCB] = 10⁻⁵ mol L⁻¹; T=25°C)



pH 10,5

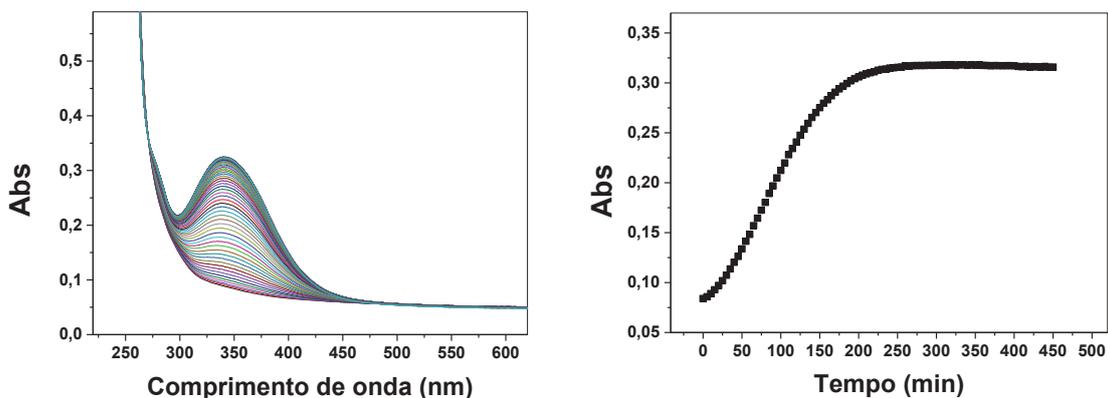


A8 – REAÇÃO DO DNCB COM ACETAMIDA ([ACETAMIDA] = 0,1 mol L⁻¹; [DNCB]= 10⁻⁵ mol L⁻¹; T=25°C)

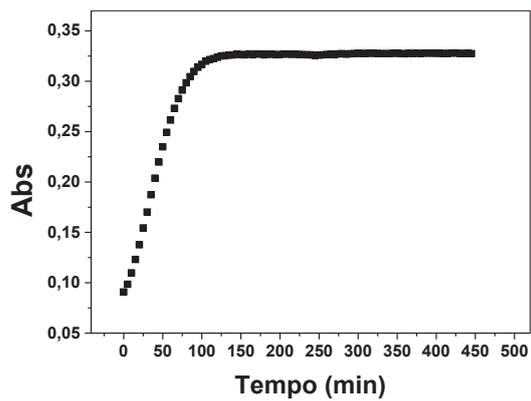
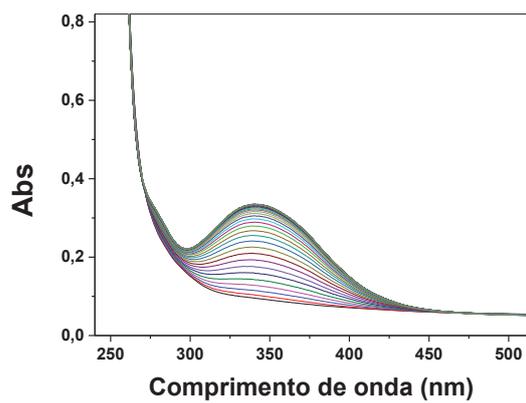


A9 – REAÇÃO DO ACEFATO COM DNFB ([ACF] = 0,05 mol L⁻¹; [DNFB]= 10⁻⁵ mol L⁻¹; T=25°C)

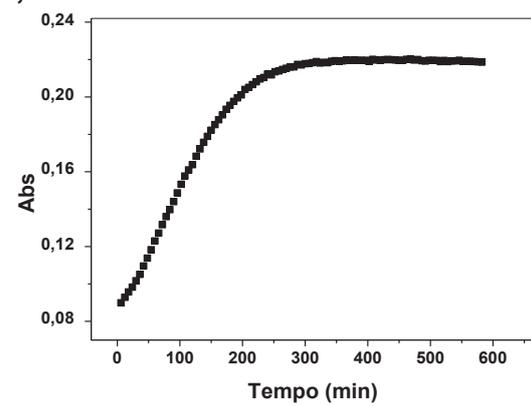
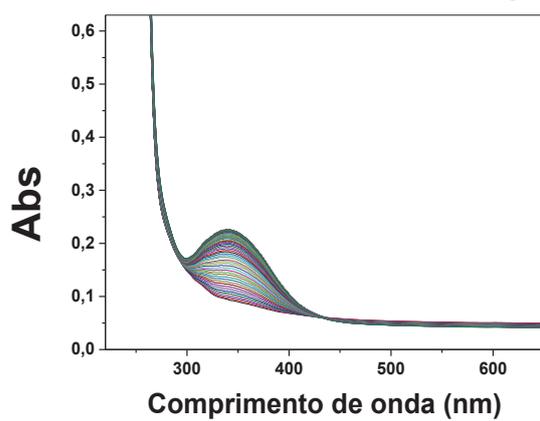
pH 8,5



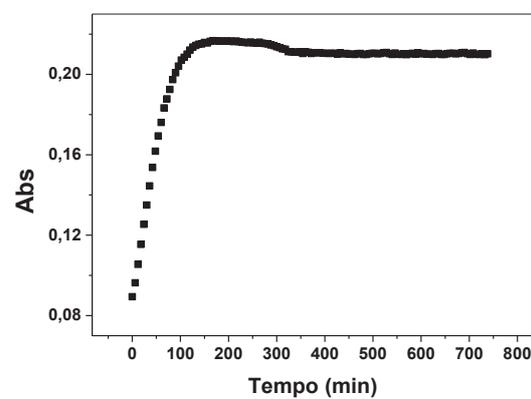
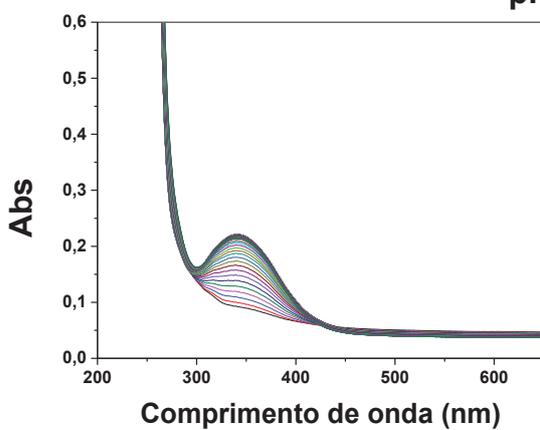
pH 9,0



pH 10,0

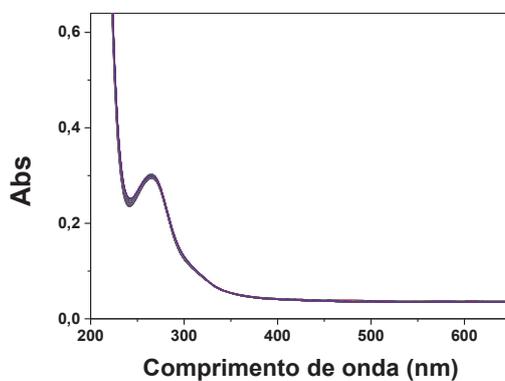


pH 11,0

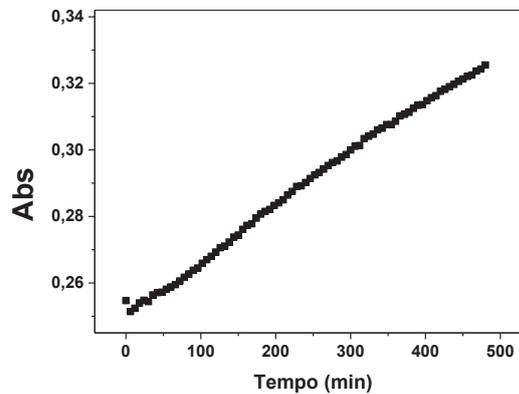
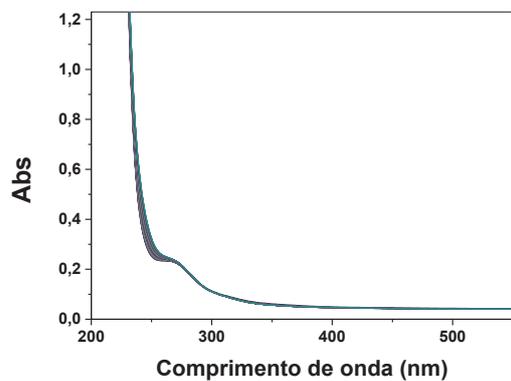


A10 – REAÇÃO DO GLIFOSATO COM 4-NBZ ([GLI] = 0,01 mol L⁻¹; [4-NBZ]= 10⁻⁵ mol L⁻¹; T=25°C)

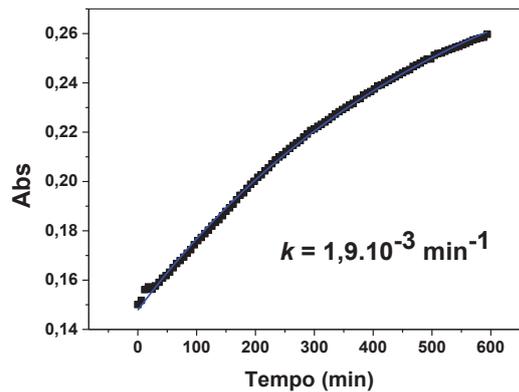
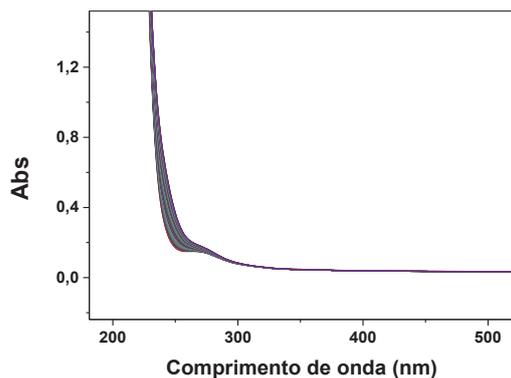
pH 8,0

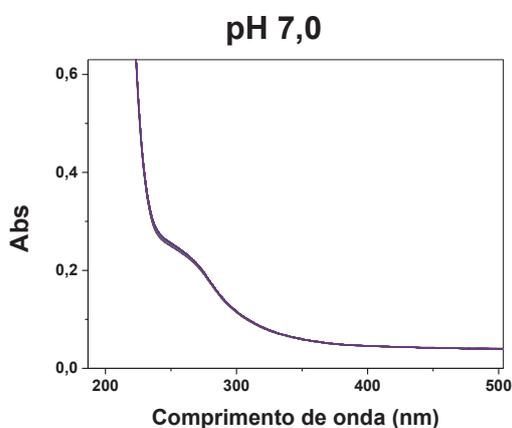
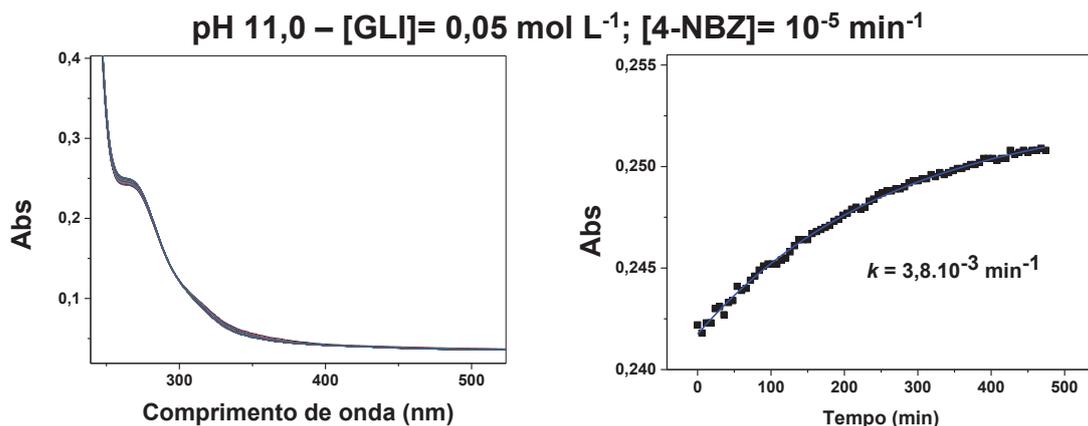


pH 9,0

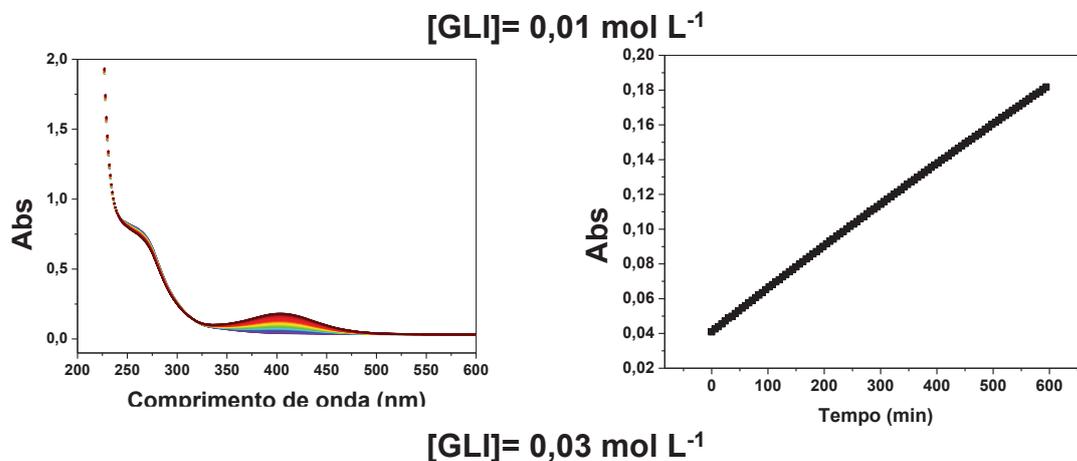


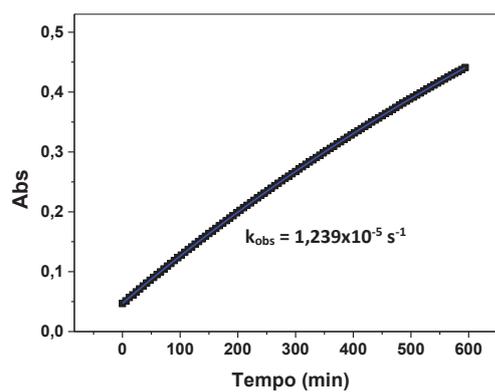
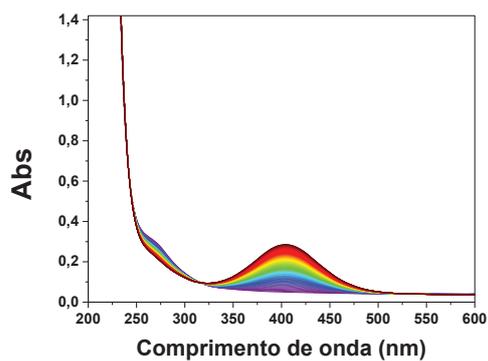
pH 11,0 – [GLI]= 0,01 mol L⁻¹; [4-NBZ]= 5.10⁻⁶ min⁻¹



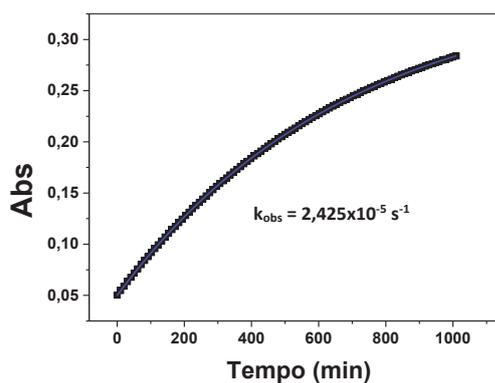
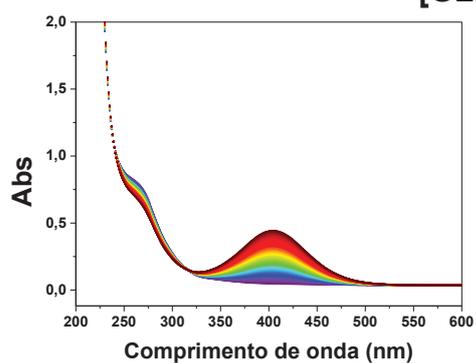


A12– REAÇÕES DO DNCB COM GLIFOSATO, VARIANDO A CONCENTRAÇÃO DE GLIFOSATO (0,01 – 0,09 mol L⁻¹; [DNCB]= 10⁻⁵ mol L⁻¹; T=25°C).

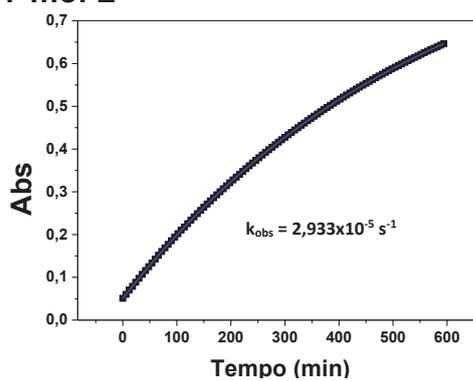
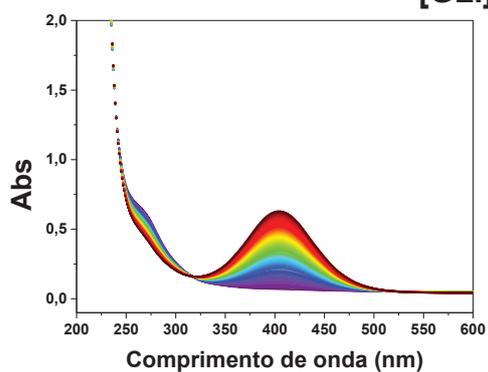




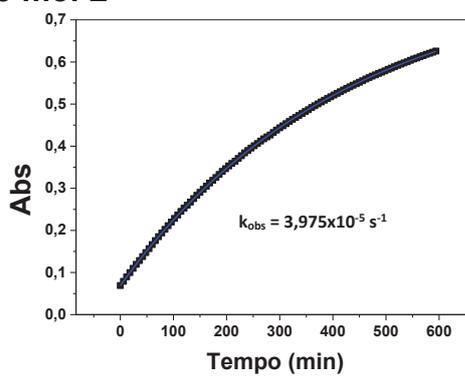
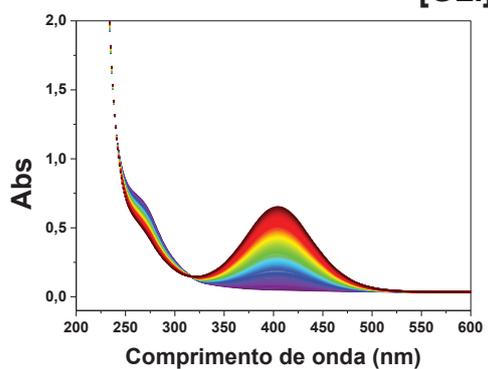
[GLI] = 0,05 mol L⁻¹

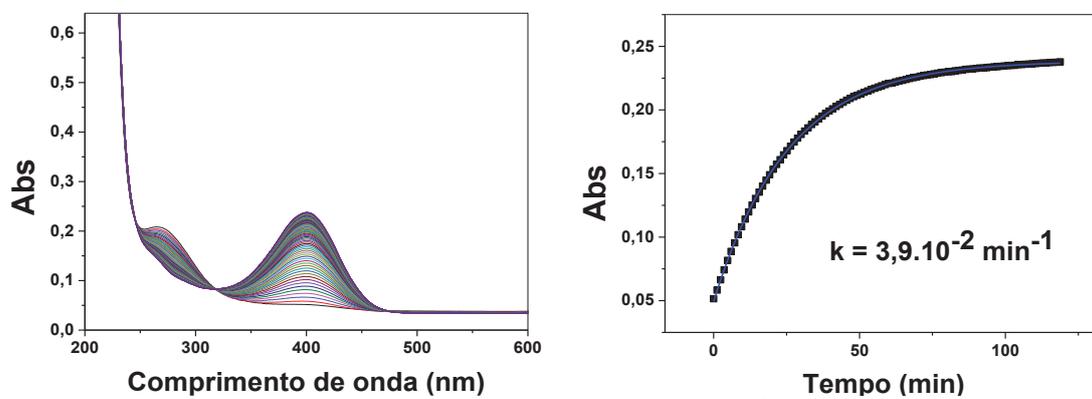
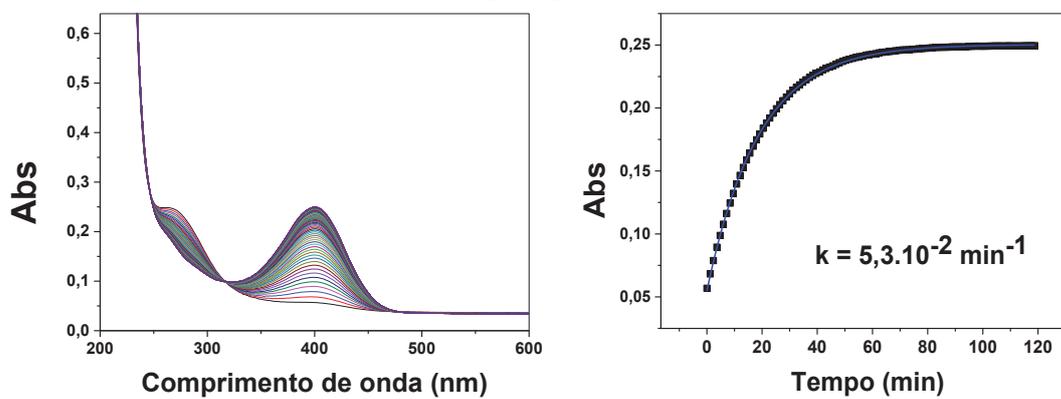
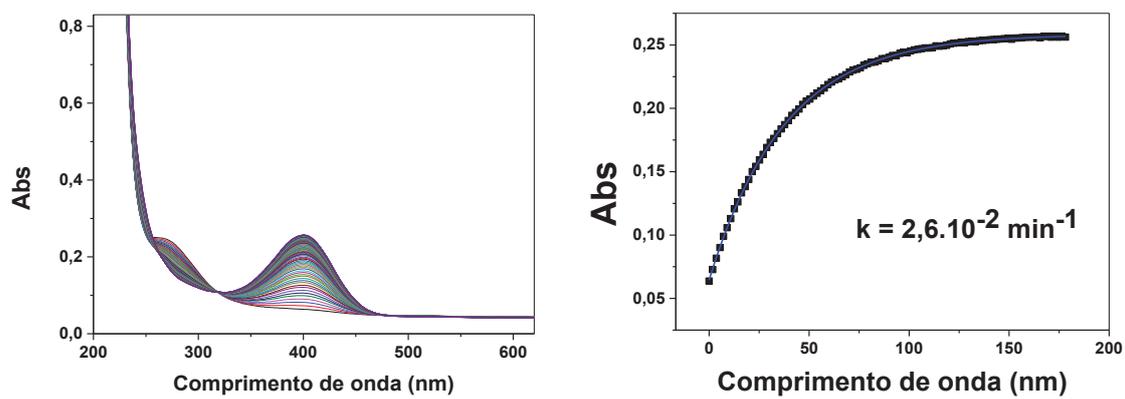


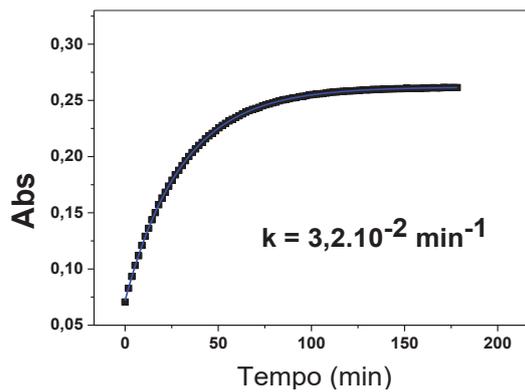
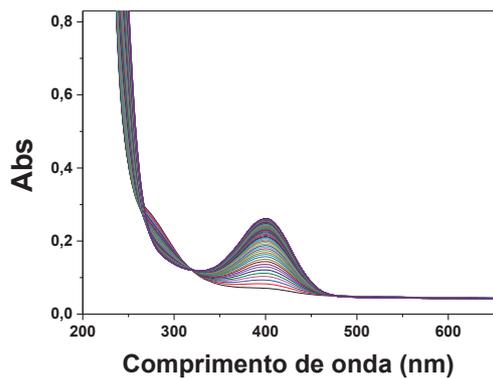
[GLI] = 0,07 mol L⁻¹



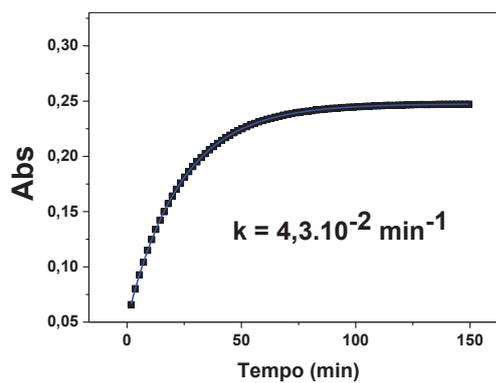
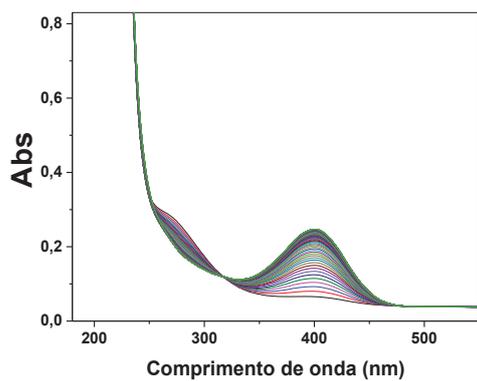
[GLI] = 0,09 mol L⁻¹



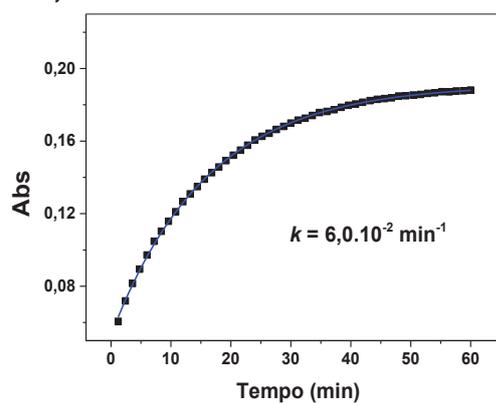
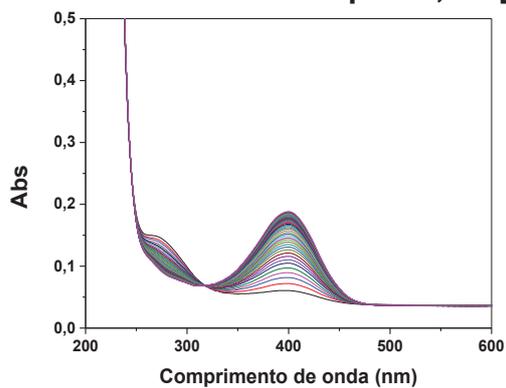
A13- REAÇÃO DO GLIFOSATO COM APNF ($[APNF] = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $T = 25^\circ\text{C}$)pH 9,0 – $[GLI] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0 – $[GLI] = 0,15 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,5 – $[GLI] = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,5 – $[GLI] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$



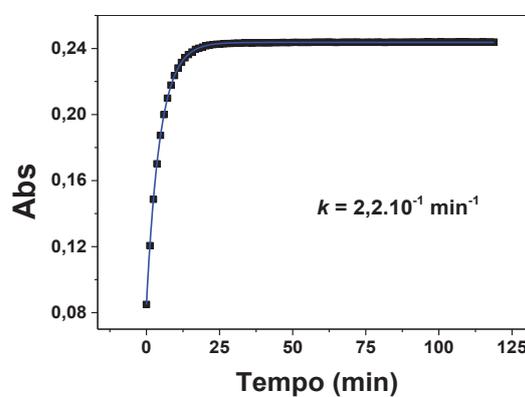
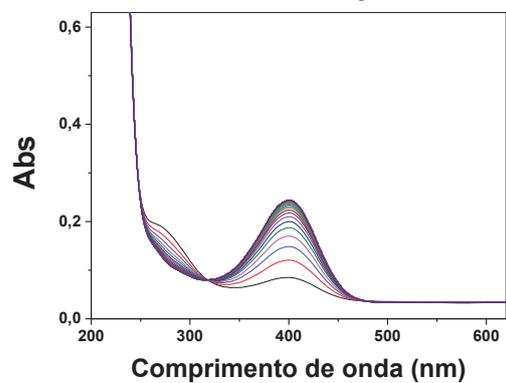
pH 9,5 – [GLI] = 0,15 mol L⁻¹



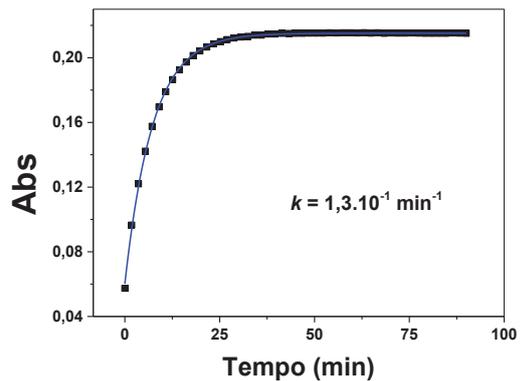
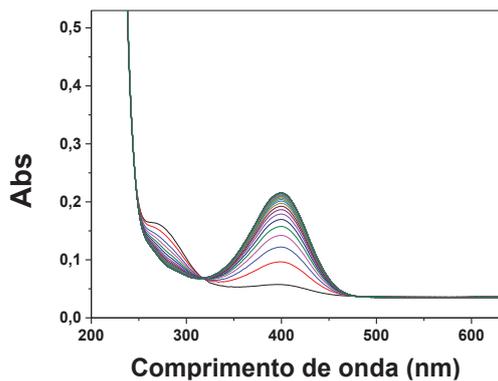
pH 10,0 – [GLI] = 0,05 mol L⁻¹



pH 10,0 – [GLI] = 0,1 mol L⁻¹

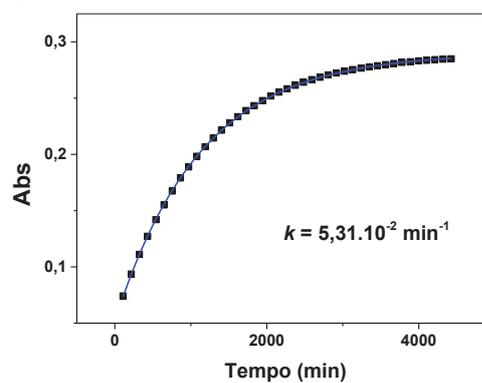
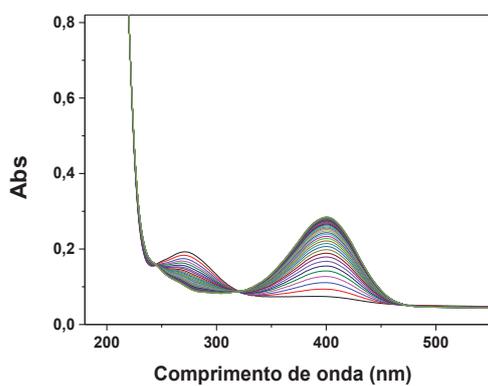


pH 10,5 – [GLI] = 0,05 mol L⁻¹



A14- REAÇÃO DO GLIFOSATO COM DEDNPP ([GLI]= 0,05 mol L⁻¹; [DEDNPP]= 10⁻⁵ mol L⁻¹; T=25°C)

pH 9,0



pH 9,5

