UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química de São Carlos

**Desenvolvimento e Validação de Metodologia para Determinação Multirresíduo
de Glifosato e AMPA via CG-EM em Amostras Ambientais**

Fernanda Benetti

São Carlos

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química de São Carlos

**Desenvolvimento e Validação de Metodologia para Determinação Multirresíduo
de Glifosato e AMPA via CG-EM em Amostras Ambientais**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, Universidade
de São Paulo, para a obtenção do título
de mestre em Ciências – Química
Analítica.

Orientada: Fernanda Benetti

Orientadora: Profa. Dra. Maria Olímpia
de Oliveira Rezende

São Carlos

2011

“Viver é a coisa mais rara do mundo... a maioria
das pessoas apenas existe”.

(Oscar Wilde)

“Quero conhecer os pensamentos de Deus...
O resto é detalhe”.

(Albert Einstein)

“Todos os homens, por natureza, desejam saber”

(Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

- a Deus, pela coroa da vida eterna que Ele me dará nos céus se eu for uma filha firme e fiel até o fim;
- a meus pais, pelo amor incondicional;
- ao meu irmão Felipe, sempre companheiro;
- a minha família, pelo apoio e incentivo;
- à Profa. Maria Olímpia de Oliveira Rezende, pela orientação e confiança;
- à Dra Maria Diva Landgraf, pelo carinho, ensinamentos e ajuda;
- ao Prof. Dr. João Alberto da Silva Sé, pela disponibilidade e informações durante a coleta das amostras
- aos colegas do Laboratório de Química Ambiental: Daniely, Livia, Leandro, Rachide, Túlio, Régis, Isequiel, Livia e Bruno;
- ao Paulinho Roberto, pela disposição e pelos momentos hilários que passamos juntos;
- ao meu amigo “quase” são-carlense Josias;
- aos amigos araraquarenses e paulistanos;
- ao Oscar, do Laboratório de Geotecnia da EESC, pela ajuda nos ensaios ali realizados;
- ao pessoal da Oficina de Vidros do IQSC, pela paciência e disposição em me atender;
- à Sílvia e a Andréia, da Seção de Pós Graduação, por sempre me ajudar;
- a Veroneide, por seu bom humor;
- ao IQSC, pelo apoio institucional.

Muito Obrigada!

RESUMO

O glifosato é o herbicida mais usado em todo o mundo. Sendo assim, é necessário que se tenham programas de monitoramento do seu uso, para garantir o bem estar da lavoura e da população. O seu metabólito principal é o ácido aminometilfosfônico (AMPA) que apesar de possuir baixa toxicidade, é mais persistente que o glifosato.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia de análise para o glifosato e o AMPA por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), a fim de avaliar possíveis contaminações em amostras ambientais nas imediações do Rio Monjolinho, em São Carlos. Para a faixa estudada ($1,0 \text{ ug L}^{-1}$ a 500 ug L^{-1}), os limites de detecção e quantificação para o AMPA foram de 0,15 e $0,45 \text{ ug L}^{-1}$ e para o glifosato, 0,67 e $2,02 \text{ ug L}^{-1}$. As recuperações em água variaram entre 96,2 e 121% e para solo 70,1 a 119%. O método proposto apresentou boa linearidade, exatidão, seletividade e sensibilidade. A robustez foi avaliada de acordo com o teste de Youden. O procedimento de extração foi baseado em reações ácido-base e realizou-se etapa de *clean-up* para água e sedimento. Para os pontos amostrados, houve resíduo de AMPA em dois pontos ($4,19$ e $6,22 \text{ ug L}^{-1}$). Os resultados encontrados para DBO foram altos, estando acima do limite estabelecido para um corpo d'água Classe 3, de acordo com a CONAMA 357. Isso pode ter ocorrido devido à grande quantidade de esgoto despejado no leito do rio. Os valores de nitrogênio e fósforo também estão elevados, o que indica uma alta eutrofização do leito do rio. Vale ressaltar a necessidade de se ter uma legislação que estabeleça um limite máximo permitido para o AMPA, visto que ele é mais persistente no ambiente do que o glifosato.

ABSTRACT

The glyphosate is the most widely used herbicide worldwide. Therefore, it is necessary to have programs for monitoring their use to ensure the welfare of the farming and population. Its main metabolite is the acid aminomethylphosphonic (AMPA) that despite having low toxicity, is more persistent than glyphosate. This study aimed to develop a methodology for analyzing glyphosate and AMPA by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) in order to assess possible contamination of samples environment in the vicinity of Monjolinho River in São Carlos. In the range studied (1.0 ug L^{-1} to 500 ug L^{-1} , limits of detection and quantification were 0.15 and 0.45 ug L^{-1} for AMPA and 0.67 and 2.02 ug L^{-1} for glyphosate. The recoveries in water varied between 96.2 and 121% and for soil from 70.1 to 119%. The proposed method showed good linearity, accuracy, selectivity and sensitivity. The robustness was evaluated according to the Youden test. The extraction procedure was based on acid-base reactions and included a clean-up step for water and sediment. For the sampling sites, it was determined residual AMPA at two points (4.19 and 6.22 ug L^{-1}). The results for BOD were high, being above the limit set for a waterbody Class 3, according to CONAMA 357. This may be due to large amount of sewage dumped into the river bed. The values of nitrogen and phosphorus are also high, which indicates a high eutrophication of the bed river. It is worth emphasizing the need of having a legislation that establishes a maximum allowed value for AMPA, whereas it is more persistent in environment than glyphosate.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO GLIFOSATO (COUTINHO; COUTINHO; MAZO, 2009).....	20
FIGURA 2 - MECANISMO DE AÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO (TONI; SANTANA; ZAIA, 2006)	23
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (COUTINHO; COUTINHO; MAZO, 2009)	24
FIGURA 4 – ROTAS DE DECOMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA DO GLIFOSATO (ADAPTADO DE AMARANTE JÚNIOR ET AL, 2002A).....	27
FIGURA 5 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DE CONVERSÃO DO GLIFOSATO E AMPA EM SEUS RESPECTIVOS DERIVADOS (ADAPTADO DE SOUZA ET AL, 2006).....	30
FIGURA 6 – ESQUEMA DE UM CROMATÓGRAFO TÍPICO A GÁS CAPILAR, ACOPLADO A UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (ADAPTADO DE SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006).....	31
FIGURA 7 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DE UMA FONTE DE ÍONS POR IMPACTO DE ELÉTRONS (ADAPTADO DE SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006).....	32
FIGURA 8 – FRAGMENTAÇÃO PROPOSTA PARA ANÁLISE DE GLIFOSATO E AMPA POR CG – EM	33
FIGURA 9 – ESQUEMA DAS REAÇÕES DE ABRANDAMENTO E DESMINERALIZAÇÃO POR RESINA DE TROCA CATIONICA.....	34
FIGURA 10 – ESQUEMA DA REAÇÃO OCORRIDA NA RESINA DE TROCA ANIÔNICA.....	34
FIGURA 11 – BACIA DO TIETÊ-JACARÉ EM DESTAQUE NO ESTADO DE SÃO PAULO (ADAPTADO DE CTPI, 2008)	49

FIGURA 12 – CIDADES PERTENCENTES À BACIA DO TIETÊ-JACARÉ (ADAPTADO DE CPTI, 2008).....	49
FIGURA 13 – FOTO REAL E IMAGEM DE SATÉLITE – RIO MONJOLINHO (PONTO 1).....	51
FIGURA 14 – FOTO REAL E IMAGEM DE SATÉLITE – RIBEIRÃO ÁGUA QUENTE (PONTO 2).....	51
FIGURA 15 – FOTO REAL E IMAGEM DE SATÉLITE – RIBEIRÃO ÁGUA FRIA (PONTO 3).....	51
FIGURA 16 – FOTO REAL E IMAGEM DE SATÉLITE – RIO MONJOLINHO (PONTO 4).....	52
FIGURA 17 – FOTO REAL E IMAGEM DE SATÉLITE – RIO MONJOLINHO (PONTO 5).....	52
FIGURA 18 – BACIA DO RIO MONJOLINHO COM SEUS AFLUENTES E LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS AMOSTRADOS (ADAPTADO DE DORNELLES, 2006).....	53
FIGURA 19 – FLUXOGRAMA DE DERIVATIZAÇÃO DE AMOSTRAS	67
FIGURA 20 – FLUXOGRAMA PARA PREPARO DE AMOSTRAS AQUOSAS	69
FIGURA 21 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE AMOSTRAS SÓLIDAS.....	71
FIGURA 22 - GRÁFICO DE DADOS DE CARACTERIZAÇÃO VERSUS PONTOS DE COLETA (SEDIMENTO)	75
FIGURA 23 – CURVAS ANALÍTICAS USADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE CARBONO TOTAL EM ÁGUA (ESQUERDA) E SEDIMENTO (DIREITA).....	75
FIGURA 24 – CURVA DE DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA (PONTO 1)	77
FIGURA 25 – CURVA DE DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA (PONTO 2)	77

FIGURA 26 – CURVA DE DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA (PONTO 3)	78
FIGURA 27 – CURVA DE DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA (PONTO 4)	78
FIGURA 28 – CURVA DE DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA (PONTO 5)	79
FIGURA 29 – GRÁFICO DE DADOS DE CARACTERIZAÇÃO VERSUS PARÂMETROS AVALIADOS (ÁGUA).	82
FIGURA 30 - COMPARAÇÃO COM VALORES DA CONAMA 357	84
FIGURA 31 – CROMATOGRAMA DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (1 A 75 UG L ⁻¹) DE GLIFSOSATO E AMPA PARA A CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA.....	88
FIGURA 32 – CROMATOGRAMA DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (100 A 500 UG L ⁻¹) DE GLIFOSATO E AMPA PARA A CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA.....	89
FIGURA 33 – SOPREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA SOLUÇÃO PADRÃO DE GLIFOSATO E AMPA	90
FIGURA 34 – CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PARA O AMPA E O GLIFOSATO.	91
FIGURA 35 – CROMATOGRAMA BRANCO PARA ÁGUA.	93
FIGURA 36 – CROMATOGRAMA BRANCO PARA SOLO ARENOSO.....	93
FIGURA 37 – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DE UMA AMOSTRA DE ÁGUA ISENTA DE CONTAMINAÇÃO E DE OUTRA DOPADA COM 500 µG L ⁻¹ DE AMPA E GLIFOSATO.	94
FIGURA 38 – SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DE UMA AMOSTRA DE SOLO ISENTA DE CONTAMINAÇÃO E DE OUTRA DOPADA COM 500 µG L ⁻¹ DE AMPA DE GLIFOSATO.....	94
FIGURA 39 – INFLUÊNCIA DE CADA FATOR MODIFICADO NO TESTE DE ROBUSTEZ PARA ANÁLISE DE GLIFOSATO E AMPA.	104

FIGURA 40 – CROMATOGRAMA PONTO 02 (ÁGUA) COM 4,19 $\mu\text{G L}^{-1}$ DE AMPA.	
.....	106
FIGURA 41 – CROMATOGRAMA PONTO 03 (ÁGUA) COM 6,22 $\mu\text{G L}^{-1}$ DE AMPA.	
.....	107
FIGURA 42 – CROMATOGRAMA PONTO 03 (SEDIMENTO).	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO CONFORME O TIPO DE ENSAIO (INMETRO, 2010)	37
TABELA 2 - AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE (INMETRO, 2010).....	38
TABELA 3 – FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO (BRASIL, 2003).....	46
TABELA 4 – MATRIZ DOS FATORES PARA A DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ (INMETRO, 2003)	47
TABELA 5 – PONTOS DE COLETA E LOCALIZAÇÃO DO MATERIAL AMOSTRADO	50
TABELA 6 – PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUA DE ACORDO COM A CETESB (CETESB, 2001)	54
TABELA 7 – PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE SOLO DE ACORDO COM A CETESB (CETESB, 2001)	54
TABELA 8 – LISTA DE PADRÕES E REAGENTES UTILIZADOS.....	55
TABELA 9 – DETERMINAÇÃO DE PH, TEOR DE MATÉRIA ORGÂNICA, UMIDADE E CTC EM SEDIMENTO.....	74
TABELA 10 – DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO, FÓSFORO TOTAL, NITROGÊNIO KJEDAHN, NITROGÊNIO AMONIACAL E RAZÃO C/N EM SEDIMENTO.....	74
TABELA 11 – CARACTERIZAÇÃO GRANULOMÉTRICA DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO.....	76
TABELA 12 – DETERMINAÇÃO DE PH, TEMPERATURA, CONDUTIVIDADE E CARBONO ORGÂNICO EM ÁGUA.....	80

TABELA 13 – DETERMINAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA, COR, TURBIDEZ, DQO, DBO, SÓLIDOS TOTAIS EM ÁGUA.....	81
TABELA 14 – DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS DISSOLVIDOS, NITROGÊNIO KJEDAHN, NITROGÊNIO AMONÍACAL E FÓSFORO TOTAL EM ÁGUA.....	81
TABELA 15 – CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS PARA DETERMINAÇÃO DO GLIFOSATO E DO AMPA.....	86
TABELA 16 – RECUPERAÇÃO DO AMPA EM ÁGUA.....	95
TABELA 17 – RECUPERAÇÃO DO GLIFOSATO EM ÁGUA.....	96
TABELA 18 – RECUPERAÇÃO DO AMPA EM SOLO ARENOSO	96
TABELA 19 – RECUPERAÇÃO DO GLIFOSATO EM SOLO ARENOSO	97
TABELA 20 – RECUPERAÇÃO DO AMPA EM LATOSSOLO VERMELHO	97
TABELA 21 – RECUPERAÇÃO DO GLIFOSATO EM LATOSSOLO VERMELHO ..	98
TABELA 22 – TESTE HIPÓTESE PARA AMPA EM ÁGUA.....	99
TABELA 23 – TESTE HIPÓTESE PARA GLIFOSATO EM ÁGUA	99
TABELA 24 – TESTE HIPÓTESE PARA AMPA EM SOLO ARENOSO	100
TABELA 25 – TESTE HIPÓTESE PARA GLIFOSATO EM SOLO ARENOSO.....	100
TABELA 26 – TESTE HIPÓTESE PARA AMPA EM LATOSSOLO VERMELHO ...	100
TABELA 27 – TESTE HIPÓTESE PARA GLIFOSATO EM LATOSSOLO VERMELHO	101
TABELA 28 – CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS A SEREM VARIADAS NO TESTE DE ROBUSTEZ	102
TABELA 29 – VARIAÇÃO DA ÁREA E DO TEMPO DE RETENÇÃO DE ACORDO COM OS ENSAIOS REALIZADOS PARA A AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ	102

TABELA 30 – CONCENTRAÇÃO OBTIDA PARA GLIFOSATO E AMPA DE ACORDO COM AS MODIFICAÇÕES REALIZADAS NO TESTE DE ROBUSTEZ	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AMPA – Ácido aminometilfosfônico

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CG – Cromatografia gasosa

CG/EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CL – Cromatografia líquida

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CMD – concentração média determinada

COT – Carbono orgânico total

CTC – Capacidade de troca catiônica

CV – coeficiente de variação

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

DVB – Divinilbenzeno

DL – Dose letal

DP – desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

DQO – Demanda Química de Oxigênio

DTPMP – Dietilenotriamina penta-metileno-ácido-fosfônico

EC – Eletroforese capilar

EDTMP – Etileno fosfonato tetrametileno diamina

EFS – Extração em fase sólida

ELL – Extração líquido-líquido

EPA – Environmental Protection Agency

EPSPS – Enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintetase

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

NBR – Norma Brasileira

NMDA – N-metil-d-aspartase

NKT – nitrogênio Kjeldahl total

NPK – fertilizante nitrogênio – fósforo – potássio

NTU – Nephelometric Turbidity Unit

POEA – Polietoxietileno amina

SIM – Singular Ion Monitoring

TFAA – Anidrido trifluoroacético

TFE – Trifluoroetanol

UE – União Européia

uH – Unidade Hazen

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Glifosato.....	19
1.2. Degradação	25
1.3. Métodos de extração e determinação de glifosato e AMPA	28
1.4. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas	30
1.5. Resinas de Troca Iônica	33
2. OBJETIVOS	35
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	36
3.1. Validação	36
3.2. Seletividade	37
3.3. Sensibilidade	38
3.4. Recuperação	39
3.5. Limites de detecção e quantificação	40
3.6. Linearidade	41
3.7. Precisão	42
3.8. Exatidão.....	43
3.9. Robustez.....	45
4. EXPERIMENTAL.....	48

4.1. Amostragem	48
4.2. Materiais	55
4.2.1. Lista de reagentes.....	55
4.2.2. Lista de Equipamentos.....	55
4.2.3. Outros Materiais	56
4.3. Caracterização físico-química das amostras	56
4.3.1. Determinação da acidez.....	57
4.3.1.1. Água	57
4.3.1.2. Sedimento	57
4.3.2. Condutividade elétrica.....	58
4.3.2.1. Água	58
4.3.2.2. Sedimento	58
4.3.3. Determinação da taxa de umidade e matéria orgânica (MO)	58
4.3.3.1. Água	58
4.3.3.2. Sedimento	58
4.3.4. Determinação da capacidade de troca catiônica (CTC)	59
4.3.4.1. Água	59
4.3.4.2. Sedimento	59
4.3.4.2.1. Cátions metálicos totais trocáveis	60
4.3.4.2.2. Acidez trocável.....	60
4.3.5. Determinação de carbono orgânico total.....	61
4.3.5.1. Água	61
4.3.5.2. Sedimento	62
4.3.6. Sólidos totais e sólidos totais dissolvidos	62
4.3.6.1. Água	62

4.3.6.1.1. Sólidos Totais.....	62
4.3.6.1.2. Sólidos Totais Dissolvidos.....	63
4.3.6.2. Sedimento	63
4.3.7. Determinação de Nitrogênio Kjeldahl e Fósforo Total.....	63
4.3.7.1. Água	63
4.3.7.2. Sedimento	64
4.3.8. Análise granulométrica do sedimento	65
4.4. Validação da metodologia.....	66
4.4.1. Preparação das amostras padrão (real e fortificada)	66
4.5. Preparo das amostras para análise em CG-EM	67
4.5.1. Água.....	67
4.5.2. Sedimento	69
4.5.3. Recuperação.....	71
4.5.4. Robustez	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
5.1. Caracterização das amostras de sedimento.....	73
5.2. Caracterização das amostras de água	80
5.3. Validação da Análise Química do Glifosato e AMPA.....	85
5.3.1. Linearidade	90
5.3.2. Limites de detecção e quantificação	91
5.3.3. Branco.....	92
5.3.4. Seletividade.....	94
5.3.5. Sensibilidade.....	95
5.3.6. Recuperação.....	95
5.3.7. Exatidão	98

5.3.8. Robustez	101
5.3.9. Amostras reais	105
6. CONCLUSÕES E CONTINUIDADE.....	109
REFERÊNCIAS.....	110

1. INTRODUÇÃO

1.1. Glifosato

Os herbicidas são usados nas lavouras com o intuito de controlar as plantas invasoras e aumentar a eficiência na produção agrícola. Neste contexto, a produção agrícola moderna depende consideravelmente de seu uso, seja na pré ou pós emergência das culturas (TONI; SANTANA; ZAIA, 2006).

A produção e o uso de inseticidas têm permanecido estáticos nos últimos anos, mas, com relação aos herbicidas, tem ocorrido um aumento do uso na agricultura, sendo que hoje, estes constituem a principal porção de vendas de todos os pesticidas no sistema de produção agrícola no mundo industrializado (TADEO et al 2000; PROCÓPIO et al, 2005).

Os herbicidas podem ser agrupados por atividade, uso, modo de ação, grupo químico ou tipo de vegetação controlada. Seu modo de ação pode ser através do xilema da planta, após absorção pela raiz (herbicidas sistêmicos) ou por absorção pelas folhas (herbicidas de contato). Quanto ao uso, os herbicidas podem ser pré-emergentes (aplicados antes do plantio) ou pós-emergentes (aplicados após a germinação) (MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008).

Um dos herbicidas mais empregados na atualidade, representando 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos é o glifosato (SOUZA et al, 2006).

O glifosato, N-(fosfonometil)-glicina, é pertencente ao grupo das glicinas substituídas, é um herbicida pós emergente, classificado como não seletivo e de ação sistêmica, com grande eficiência na eliminação de plantas invasoras, apresentando baixa toxicidade aos que o manipulam (AMARANTE JÚNIOR et al

2002a, GALLI; MONTEZUMA, 2005). É o ingrediente ativo do herbicida comercial Roundup®, comercializado pela Monsanto, e Touchdown, comercializado pela Zeneca Produtos Ag (KHROLENKO; WIECZOREK, 2005). Sua estrutura química é mostrada na Figura 1.

Figura 1 – Fórmula estrutural do glifosato (COUTINHO; COUTINHO; MAZO, 2009)

O glifosato possui caráter polar, com grande tendência em formar espécies iônicas, tem fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ ($mm = 169,1 \text{ g mol}^{-1}$) e, na forma de sal de isopropilamônio, apresenta-se com a adição do grupo $(CH_3)_2CHNH_3^+$ ($mm = 228,2 \text{ g mol}^{-1}$) (RODRIGUES et al, 2009). Possui comportamento zwitteriônico (é eletricamente neutro, mas tem cargas opostas em diferentes átomos) e seus p_{ka}s são de 0.78, 2.29, 5.96 e 10.98 respectivamente (LLASERA et al, 2005).

O herbicida é muito sensível ao escoamento superficial, que é devido à sua alta solubilidade em água ($10,1 \text{ g L}^{-1}$ a 20°C) e sorção elevada ($> 1.000 \text{ L kg}^{-1}$) para as partículas do solo. As chuvas de alta intensidade aumentam a transferência de glifosato por enxurrada em superfícies duras (BOTTA et al, 2009).

Sua pressão de vapor a 45°C é de $1,87 \times 10^{-7} \text{ mmHg}$ e é estável a altas temperaturas (60°C) (CASTRO JÚNIOR, 2006).

É comercializado desde 1974 e sua utilização é suscetível a aumentar ainda mais, pois é um dos herbicidas mais usados em culturas de plantas geneticamente modificadas. A soja Roundup Ready (RR) da Monsanto foi a primeira planta

transgênica a ser aprovada para alimentação humana e animal e para cultivo no Brasil. A soja RR foi modificada por técnicas de DNA recombinante (DNAr) pela inserção de um gene da bactéria *Agrobacterium sp.*, que a torna resistente ao herbicida glifosato (ABREU; MATTA; MONTAGNER, 2008). Atualmente também tem sido usado para o controle das plantações ilícitas de coca e papoula (ANADÓN et al, 2009).

Nos últimos anos muitos estudos têm mostrado o impacto no uso urbano, o que é importante em escala local, devido à aplicação em superfícies impermeáveis, como ruas, calçadas e gramados (BOTTA et al, 2009).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) fixou um nível máximo de glifosato em água potável a $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$. O nível máximo de resíduos de glifosato na maioria das culturas é fixado em $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ pela União Europeia (UE). Em Taiwan, esse nível de resíduos foi fixado para água e culturas em $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,1 - 1,0 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (HSU; WHANG, 2009). A UE estabelece que glifosato e AMPA (ácido aminometil fosfônico, seu principal metabólito) sejam monitorizados não só em água e solos, mas também em outras matrizes, tais como frutas, legumes e produtos de origem animal, devido à sua presença na cadeia alimentar (CORBERA et al, 2005).

No Japão, foi usado como pesticida nos anos 80. Depois disso, muitos casos de intoxicação acidental e suicida foram relatados devido à sua ingestão (MOTOJYUKU et al, 2008). Em Paris, o programa de monitoramento de pesticidas (Phyt'Eaux Propres) observou um aumento significativo das concentrações de glifosato e AMPA em águas superficiais (BOTTA et al, 2009).

Nas condições ambientais, tanto o glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos muito solúveis em água e quase insolúveis em solventes orgânicos

(AMARANTE JÚNIOR et al, 2002b). O glifosato também pode ser classificado como um herbicida organofosforado, sem, no entanto, afetar o sistema nervoso do mesmo modo que outros pesticidas organofosforados.

As aplicações do produto devem ser dirigidas sobre as plantas invasoras seguindo as recomendações técnicas das boas práticas agrícolas. Se for utilizado dessa forma, não causará qualquer interferência no desenvolvimento e produtividade das culturas para as quais é recomendado (GALLI; MONTEZUMA, 2005).

O glifosato é absorvido basicamente pela região clorofilada das plantas (folhas e tecidos verdes) e transferido, preferencialmente, pelo floema, para os tecidos meristemáticos (GALLI; MONTEZUMA, 2005).

O modo primário de ação do herbicida se dá através da interferência na produção de aminoácidos aromáticos e outros compostos aromáticos em plantas, que é possível devido à inibição competitiva da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), que é responsável pela síntese de um intermediário na biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano. Com isso, as plantas não conseguem produzir os aminoácidos essenciais para sua sobrevivência, o que provoca diminuição do crescimento, ruptura e morte celular (SOUZA, et al, 2006; REDDY et al, 2008; ANADÓN et al, 2009). A Figura 2 mostra o mecanismo de ação do glifosato.

Figura 2 - Mecanismo de ação do herbicida glifosato (TONI; SANTANA; ZAIA, 2006)

O glifosato apresenta custo relativamente baixo e excelente eficiência agrônômica, o que se reflete na sua grande aplicação. Assim, os cuidados relacionados à possibilidade de contaminação do ambiente com esta molécula devem ser estudados cautelosamente porque há evidências de efeitos deletérios no ambiente após seu uso prolongado. É importante preparar-se para outro risco, visto que a formulação mais comercializada no país contém um surfactante com ação irritativa dermatológica, conhecido como POEA (polietoxietileno amina) (SOUZA, et al, 2006).

A exposição cutânea ao glifosato tem sido analisada como agente de contribuição para o Mal de Parkinson. Pesquisadores propõem que o glifosato pode contribuir nessa patologia neurológica em virtude da sua semelhança química com a glicina, um co-fator necessário para a ativação do N-metil-D-aspartase (NMDA), que controla ações excitatórias no sistema nervoso central e também está envolvida na memória e aprendizado (ANADÓN et al, 2009).

O ácido aminometilfosfônico (AMPA) é o metabólito principal do glifosato. Sua solubilidade em água (20°C) é maior que 10^5 mg L^{-1} (SANCHO et al, 1996), conforme descrito na Figura 3.

Figura 3 – Estrutura química do ácido aminometilfosfônico (COUTINHO; COUTINHO; MAZO, 2009)

Também apresenta comportamento zwitteriônico e seus p_{ka}s são de 0,9, 5,6 e 10,2 respectivamente (LLASERA et al, 2005).

Embora tenha toxicidade baixa (DL₅₀ é de 8300 mg kg⁻¹), o AMPA é mais persistente que o glifosato. Estudos estimam que a meia-vida do glifosato pode ser inferior a 3 dias, enquanto a meia-vida do AMPA varia entre 119 e 958 dias (TONI; SANTANA; ZAIA, 2006). No ambiente, as concentrações mais altas de glifosato e AMPA são encontradas no solo. A aplicação direta de glifosato como herbicida em águas superficiais pode ser responsável pela contaminação em água potável (AMARANTE JÚNIOR, et al, 2002b).

O AMPA também é produto de degradação de alguns detergentes. Os detergentes derivados do ácido fosfórico, como o ácido etileno diamina tetrametileno

fosfônico (EDTMP) ou o ácido dietilenotriamina pentametileno fosfônico (DTPMP) podem ser degradados em AMPA e encontrados no meio ambiente (BOTTA et al, 2009).

Apesar do glifosato não ser persistente, o conhecimento detalhado sobre a sua biodegradação em solos brasileiros é relativamente pequeno. Além disso, o aparecimento da soja transgênica, resistente ao glifosato, tem aumentado a preocupação ambiental devido, principalmente, à maior dosagem na aplicação do herbicida nos campos cultivados (ARAÚJO, 2002).

Mesmo possuindo grande eficiência, o glifosato não tem ação sobre as sementes das plantas invasoras no solo e, portanto deve ser aplicado quando as espécies a serem eliminadas estão em desenvolvimento, preferencialmente em solo seco. Entretanto, esse herbicida pode ter várias aplicações, tais como no controle de plantas invasoras, nas culturas de ameixa, banana, cacau, pêra, pêssego, seringueira, entre outras. O glifosato pode ainda ser aplicado em corpos hídricos para o controle de plantas aquáticas (ABREU; MATTA; MONTAGNER, 2008).

Para o aumento da eficiência do glifosato pode-se utilizá-lo misturado com outros herbicidas, tais como formulados à base de 2,4D, terbutilazina, simazina, alaclor e diuron (AMARANTE JÚNIOR et al, 2002a).

1.2. Degradação

De maneira geral, os solos são compostos de três fases: sólida (mineral e orgânica); líquida e gasosa. Exibem conseqüentemente, propriedades resultantes destas três fases e do equilíbrio físico e químico entre as mesmas. Além disto, não apenas a composição química dos componentes sólidos do solo, mas também sua

estrutura mineral e o estado de dispersão são fatores que influenciam as propriedades do solo (WOLT, 1994).

De todos os componentes do solo, a matéria orgânica é um dos principais constituintes e é definida nos seguintes termos: “a fração orgânica do solo incluindo resíduos vegetais e animais em diferentes estados de decomposição, tecidos e células de organismos e substâncias produzidas por habitantes do solo”, segundo “SOIL SOCIETY OF AMERICA” (KABATA-PENDIAS, 2001).

A degradação de uma substância química no solo pode ser realizada de diversas formas e por diversos agentes. Podem ocorrer por reações químicas por meio de fotólise, ou por meio de catálise bioquímica, por microorganismos presentes no meio. Este último caso, chamado de biodegradação, é a principal forma de se degradar um composto orgânico, em especial os herbicidas, no solo e em águas naturais (ARAÚJO, 2002; CASTRO, 2005).

A degradação do glifosato no solo é muito rápida e realizada por uma grande variedade de microorganismos, que usam o produto como fonte de energia e fósforo, por meio de duas rotas catabólicas, produzindo sarcosina como metabólito intermediário na rota alternativa e o ácido aminometilfosfônico (AMPA) como o principal metabólito (DICK; QUINN, 1995, AMARANTE JÚNIOR et al, 2002a).

Existem duas vias principais de degradação microbiana do glifosato; a primeira envolve a clivagem da ligação C-N da molécula produzindo o AMPA. A segunda é pela clivagem da ligação C-P do composto, produzindo sarcosina, conforme mostra a Figura 4. Os microorganismos possuem a capacidade de metabolizar esses compostos e transformá-los em energia e nutrientes para sua sobrevivência (AMARANTE JÚNIOR et al, 2002a; ANADÓN et al, 2009).

Figura 4 – Rotas de decomposição microbiológica do glifosato (adaptado de AMARANTE JÚNIOR et al, 2002a)

Os herbicidas em geral, quando aplicados por vários anos, podem ter sua degradação mais acelerada em relação ao produto aplicado pela primeira vez, pois os microorganismos estão mais adaptados ao composto e possuem enzimas específicas para metabolizar o composto (ARAÚJO, 2002).

1.3. Métodos de extração e determinação de glifosato e AMPA

Devido ao grande uso do herbicida glifosato, faz-se necessário o emprego de métodos confiáveis para o acompanhamento deste herbicida em lavouras, frutas e legumes (KHROLENKO; WIECZOREK, 2005).

A determinação de glifosato e AMPA representa um desafio analítico, devido às altas solubilidades, insolubilidade em solventes orgânicos e baixa volatilidade (HSU; WHANG, 2009).

A extração de glifosato e AMPA do solo vem sendo cada vez mais estudada visando ao aprimoramento de metodologias que apresentem boa recuperação do herbicida. Devido a suas altas polaridade e solubilidade em água, a extração destes compostos a partir de matrizes aquosas torna a recuperação de glifosato e seu metabólito a principal dificuldade na sua análise (CORBERA et al, 2005).

A maioria dos procedimentos de extração do herbicida baseia-se em reações ácido-base, em que o composto, inicialmente ligado a espécies iônicas do solo via grupo fosfato, passa, então, a interagir com os íons da solução. Assim, são geralmente utilizadas soluções de bases fortes, sais de bases fortes, bases fracas, ou ácidos fracos para extração (SOUZA et al, 2006).

Para analisar amostras ambientais a baixas concentrações, o enriquecimento e purificação dos analitos são obrigatórios. Eles incluem as técnicas bem estabelecidas como: extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EFS) ou cromatografia de troca iônica (KHROLENKO; WIECZOREK, 2005; HSU; WHANG, 2009).

Uma grande variedade de métodos de análise têm sido aplicados para a determinação de glifosato. As cromatografias gasosa (GC) e líquida (CL) são as

mais aplicadas, mas nos últimos anos a eletroforese capilar (EC) também se tornou uma opção (KHROLENKO; WIECZOREK, 2005).

A determinação de glifosato por cromatografia necessita de adaptações que permitam sua detecção. Tais adaptações incluem basicamente reações de derivatização ou alteração de alguma propriedade física que possa ser relacionada à quantidade de glifosato na amostra (SEE et al, 2010).

A EPA recomenda para a análise de glifosato a técnica de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) com detector de fluorescência, seguida de derivatização pós-coluna. A técnica de cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas também pode ser empregada, porém, faz-se necessária uma prévia derivatização para tornar os compostos voláteis e aumentar sua polaridade (SOUZA et al, 2006, HSE; WHANG, 2009).

Quanto à derivatização, o glifosato é considerado um caso especial, visto que devido à sua natureza polar e alta solubilidade em água limita a possibilidade de uso de técnicas padrão de derivatização, empregadas nas análises via cromatografia gasosa (SOUZA et al, 2006).

Geralmente, o processo envolve o uso de anidrido trifluoroacético (TFAA) e trifluoroetanol (TFE) em excesso, devido ao fato de que as etapas de formação dos compostos derivados são de equilíbrio e, com este excesso, a reação deslocar-se-á no sentido de formar compostos derivados, conforme mostra a Figura 5 (SOUZA et al, 2006).

Figura 5 – Esquema simplificado de conversão do glifosato e AMPA em seus respectivos derivados (adaptado de SOUZA et al, 2006)

1.4. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é muito utilizada como detector cromatográfico, pois permite a obtenção de informações tanto qualitativas como quantitativas. O espectrômetro pode ser altamente seletivo ao analito de interesse (HARRIS, 2005).

A espectrometria de massas necessita de alto vácuo para evitar colisões moleculares durante a separação dos íons; já a cromatografia é intrinsecamente uma técnica de alta pressão. O problema ao acoplar as duas técnicas é a remoção da grande quantidade de matéria presente entre o cromatógrafo e o espectrômetro (HARRIS, 2005). A Figura 6 mostra um esquema típico de um cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas.

Figura 6 – Esquema de um cromatógrafo típico a gás capilar, acoplado a um espectrômetro de massas (adaptado de SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006)

A análise/separação consiste no bombardeamento de cada pico eluído da coluna cromatográfica por uma fonte energizante (geralmente impacto de elétrons), em que o composto é fragmentado em uma grande diversidade de íons. Os íons são separados em um analisador (quadrupólo submetido a um campo elétrico). A interação dos fragmentos iônicos com o campo elétrico faz com que apenas íons de determinada relação massa/carga (m/z) passem intactos, sem colidirem com o quadrupolo (LANÇAS, 1993).

A fonte de íons por impacto de elétrons funciona da seguinte maneira: a temperatura da amostra é elevada a valor suficiente para promover sua evaporação, sendo, em seguida, bombardeada por feixes de elétrons energéticos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006). A Figura 7 apresenta um esquema de uma fonte de íons por impacto de elétrons.

Figura 7 – Esquema ilustrativo de uma fonte de íons por impacto de elétrons (adaptado de SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006)

As fontes por impacto de elétrons geram correntes iônicas grandes, o que dá uma boa sensibilidade. A grande fragmentação também é vantajosa, pois facilita a identificação de picos não-ambíguos. Porém, às vezes o fragmento do íon molecular pode desaparecer, o que impossibilita a determinação da massa molecular dos analitos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006).

Neste trabalho, utilizou-se a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para a determinação de glifosato e seu metabólito em amostras ambientais.

Através da técnica, as moléculas derivatizadas de glifosato e AMPA foram submetidas ao impacto de elétrons, originando os fragmentos mostrados na Figura 8 (m/z 238, 260 e 411 para o glifosato e m/z 246 e 302 para o AMPA).

Figura 8 – Fragmentação proposta para análise de glifosato e AMPA por CG – EM

1.5. Resinas de Troca Iônica

As resinas de troca iônica são produtos sintéticos que, em contato com água, podem liberar íons sódio ou hidrogênio (resinas catiônicas) ou hidroxila (resinas aniônicas) e captar desta mesma água, respectivamente, cátions e ânions responsáveis pela dureza e teor de sólidos dissolvidos, eliminando assim, algumas impurezas da amostra (RIANI, 2008).

As resinas de troca iônica sintéticas são constituídas, na sua maioria, de copolímeros de estireno, com divinilbenzeno (DVB), na forma de partículas esféricas de diâmetro 300 a 1.180 μm . São muito utilizadas no tratamento de águas, resíduos nucleares e nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (HUNG, 1994).

Após a copolimerização, grupamentos ácidos (geralmente ácido sulfônico) ou básicos (quaternários de amônio) poderão ser inseridos nos núcleos de benzeno dos monômeros utilizados, dando uma funcionalidade às resinas (RIANI, 2008).

As resinas com grupamentos ácidos ou básicos, ao contrário das soluções aquosas de ácidos e bases, não se dissociam em duas espécies iônicas. Somente uma espécie é dissociada nas resinas catiônicas (Na^+ ou H^+) e aniônicas (OH^-). As demais ficam ligadas às cadeias de estireno e divinilbenzeno (RIANI, 2008).

As resinas catiônicas podem estar na forma de sal de sódio, quando são utilizadas para abrandamento da água ou na forma de hidrogênio, quando são utilizadas para descarbonatação ou desmineralização da água, conforme exemplificadas na Figura 9.

Reação de abrandamento

Reação de descarbonatação/desmineralização

Figura 9 – Esquema das reações de abrandamento e desmineralização por resina de troca catiônica

Já as resinas aniônicas removem ânions fortes e fracos, tais como cloretos, sulfatos, nitratos, bicarbonatos e silicatos. A Figura 10 apresenta um esquema da reação ocorrida nesta resina.

Figura 10 – Esquema da reação ocorrida na resina de troca aniônica

2. OBJETIVOS

- determinar os parâmetros físico-químicos das amostras de água e sedimento;
- validar metodologia para determinação de glifosato e AMPA em amostras de água, e sedimento via CG-EM;
- verificar a presença de glifosato e AMPA em amostras de água e sedimento em matrizes ambientais.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. Validação

Validar, em Análise Química, é estar voltado para a confiabilidade analítica do laboratório e do método escolhido ou desenvolvido para se obter o resultado (LEITE, 2008).

O INMETRO recomenda que no planejamento/execução da validação seja seguida a seguinte sequência de trabalho (INMETRO, 2010):

- definir a aplicação, objetivo e escopo do método;
- definir os parâmetros de validação e critérios de aceitação;
- verificar se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo;
- qualificar os materiais, por exemplo, padrões e reagentes;
- planejar os experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico, e
- fazer os experimentos de validação.

Os parâmetros que necessitam ser calculados durante o processo de validação podem variar de acordo com o tipo de ensaio, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio (INMETRO, 2010)

Parâmetros	Tipo de ensaio			
	Qualitativo	Determinação do componente (ou analito) em maior teor	Análise de elementos menores e Traços	Propriedades Físicas
Precisão		X	X	X
Seletividade	X	X	X	X
Recuperação		X	X	X
Robustez	X	X	X	X
Sensibilidade		X	X	X
Linearidade		X	X	X
Limite de detecção	X		X	
Limite de quantificação			X	

No presente trabalho, o objetivo principal é determinar glifosato e AMPA em amostras ambientais. Sendo assim, a classificação mais adequada seria a análise de elementos menores e traços.

3.2. Seletividade

A seletividade, em Química, tem como objetivo garantir a identidade do ativo que se deseja determinar (LEITE, 2008).

Segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), a seletividade se refere à parte do método que pode ser aplicada para determinar uma espécie em particular, na mistura, ou matrizes, sem sofrer interferências de outras espécies de comportamento similar (LEITE, 2008).

De acordo com a ANVISA, em cromatografia, devem-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas, por exemplo) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (BRASIL, 2003).

Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a recuperação e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2010).

A Tabela 2 mostra como deve ser feita a avaliação da seletividade, de acordo com INMETRO.

Tabela 2 - Avaliação da seletividade (INMETRO, 2010)

Procedimento	Demonstrar	Comentários
a) Fazer a análise com a amostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos validados	Habilidade do método em estudo de identificar e dosar o analito na presença de interferentes	Evidências necessárias para dar suporte e gerar confiabilidade suficiente
b) Analisar amostras contendo vários interferentes suspeitos na presença do analito de interesse	Efeito de interferentes - a presença de interferente acentua ou inibe a detecção ou quantificação do analito de interesse	Se alteram resultados, aperfeiçoar o método ou selecionar outro mais adequado

3.3. Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva de

regressão linear de calibração, conforme a Equação 1 e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada (INMETRO, 2010).

$$S = \frac{dx}{dc}$$

Equação 1

Onde:

S = sensibilidade;

dx = variação da resposta;

dc = variação da concentração.

3.4. Recuperação

O ideal de um método analítico é analisar o analito de interesse diretamente sobre a amostra. Porém, essa operação é dificultada por fatores como o estado físico da amostra, a forma molecular do analito e os demais componentes da amostra, que podem influir não só na seletividade, mas também na resposta à quantificação (LEITE, 2008).

Toda amostra que recebe tratamento de análise indireta (diluição, extração, concentração, derivação etc) assim como direta (baixa solubilidade, possibilidade de cristalização etc), deve ter calculado o erro ou perda da espécie em análise, de acordo com a Equação 2. Ao número obtido, dá-se o nome de Fator de Recuperação (LEITE, 2008).

$$(Fator\ de\ recuperação)\ Fr = \frac{Quantidade\ Quantificada\ da\ espécie \times 100\%}{Quantidade\ adicionada\ da\ espécie}$$

Equação 2

3.5. Limites de detecção e quantificação

Toda técnica responde com um sinal analítico para uma determinada quantidade de amostra (LEITE, 2008).

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado (BRASIL, 2003).

Para métodos instrumentais, pode ser determinado com base na relação de três (3) vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela Equação 3

$$LD = (DPa \times 3) \div IC \quad \text{Equação 3}$$

em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC é a inclinação da curva analítica.

Por sua vez, o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003).

O limite pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (BRASIL, 2003). Também pode ser determinado pela Equação 4:

$$LQ = (DPa \times 10) \div IC \quad \text{Equação 4}$$

em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC é a inclinação da curva de calibração.

3.6. Linearidade

A linearidade está relacionada diretamente com o sistema de emissão analítica, ou seja, determina a região da curva de resposta onde há relação direta sinal/concentração (LEITE, 2008).

Segundo a Anvisa, recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco (5) concentrações distintas (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

A verificação da linearidade fica mais fácil quando se introduz o coeficiente de correlação (R), que expressa a relação de x e y na curva. Quanto mais próximo da unidade (1), maior a probabilidade de existir uma relação linear (LEITE, 2008; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002). O valor mínimo aceitável para este coeficiente, segundo a ANVISA, é de 0,99. Para matrizes complexas, o coeficiente pode chegar a 0,98 (BRASIL, 2003).

Outro coeficiente a ser analisado é o de determinação (R^2), que nada mais é do que uma medida da proporção da variabilidade em uma variável que é explicada pela variabilidade de outra (no caso, as variáveis x e y). O valor máximo de R^2 é a unidade (1), e só ocorrerá se toda a variação em torno da média for explicada por regressão. Quanto mais perto da unidade estiver o valor de R^2 , melhor terá sido o ajuste do método às respostas observadas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002).

3.7. Precisão

O primeiro passo para verificação da confiabilidade de uma análise é investigar se a mesma se repete quando operada seqüencialmente. A essa operação de repetição denomina-se precisão (LEITE, 2008).

Quando se trata da instrumentação atual, a precisão deve ser questionada, visto que os equipamentos atuais dispõem de sensores que acompanham as mudanças de umidade e temperatura. A chegada dos injetores automáticos, fez com que a verificação do processo de repetição de injeção do analista se tornar desnecessária. Todavia, enquanto houver equipamentos mais antigos ainda em uso, a verificação da precisão ainda será necessária (LEITE, 2008). Mas vale ressaltar que ainda assim é necessário avaliar a precisão da metodologia como um todo, desde a etapa de preparo de amostras até o momento da injeção.

Denomina-se precisão a concordância entre os vários valores experimentais obtidos. Quanto mais próximos entre si estiverem, menor será o grau de espalhamento das medidas (LEITE, 2008).

Para avaliar a precisão, é necessário entender dois conceitos importantes, a Repetibilidade e a Reprodutibilidade (LEITE, 2008).

A Repetibilidade é a máxima diferença aceitável entre duas repetições. Ocorre quando se tem em conjunto alguns fatores semelhantes como a mesma amostra, analista, equipamento, momento, ajuste e calibração (LEITE, 2008). Há dois tipos de precisão a serem analisadas; a precisão intra-corrida e a inter-corridas.

- a) Precisão intra-corrida: concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (BRASIL, 2003).

- b) Precisão inter-corridas: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

A Reprodutibilidade, por sua vez, é a máxima diferença aceitável entre dos resultados, cada um obtido em um laboratório distinto. Ocorre também quando uma amostra é analisada por equipamentos diferentes, obtendo-se desvio aceitável e compatível. Pode ser obtida através do conjunto de alguns fatores tais como diferentes analistas, equipamentos, momentos, técnicas, calibrações, ajustes e a amostra analisada ser diferente, porém de um mesmo ponto amostral (LEITE, 2008).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a Equação 5:

$$DPR = (DP \div CMD) \times 100\% \quad \text{Equação 5}$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

3.8. Exatidão

A exatidão traduz a concordância dos valores experimentais com o valor verdadeiro (LEITE, 2008).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança, de acordo com a Equação 6 (BRASIL, 2003).

$$Exatidão = \frac{Concentração\ média\ experimental}{Concentração\ teórica} \times 100\% \quad \text{Equação 6}$$

Para avaliar a exatidão também pode-se usar testes estatísticos. Calcula-se as médias dos diferentes níveis de fortificação e aplica-se o teste T de Student. O teste é conhecido como Teste de Hipótese (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002).

A filosofia do teste de hipótese é fácil de entender. O termo que aparece no denominador da Equação 7 é um exemplo de erro padrão. A estimativa t é o afastamento do valor amostral em relação ao valor populacional correspondente à hipótese nula, medido em unidades de erro padrão. Quanto maior for esse afastamento, menor a chance da hipótese nula ser verdadeira (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002).

Os testes de hipóteses são sempre constituídos por duas hipóteses, a hipótese nula H_0 e a hipótese alternativa H_1 .

Hipótese nula (H_0): é uma hipótese (valor suposto) para um parâmetro (no caso, 100% de recuperação). Se o resultado não for diferente de H_0 , a hipótese não poderá ser rejeitada.

Hipótese alternativa (H_1): é a hipótese que contraria a hipótese nula (recuperação $\neq$ 100%). Só será aceita se os resultados forem diferentes de H_0 .

$$t_{\text{exp (95\%)}} = \frac{(x - \mu_0)}{\alpha / \sqrt{n}}$$

Equação 7

$t_{\text{exp(95\%)}}$ – constante T (teste T de Student) a 95% de confiança

α – desvio padrão das médias das recuperações

μ - hipótese esperada (100% de recuperação)

x – média das recuperações

n – tamanho da amostra

Se $t_{\text{exp}} \leq t_{\text{tab}}$, isso indica que a hipótese nula deve ser aceita, ou seja, não há diferenças significativas entre o valor esperado e o encontrado, mostrando assim que o método proposto é exato.

3.9. Robustez

A robustez pode ser conceituada como a variação da condição analítica. Deve ser considerada como um alerta da susceptibilidade do método às variações e não como parâmetro de aprovação/rejeição da condição analítica (LEITE, 2008).

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez (BRASIL, 2003).

A Tabela 3 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método (BRASIL, 2003).

Tabela 3 – Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico (BRASIL, 2003)

Método de Análise	Condição a ser variada
Preparo das Amostras	- Estabilidade das soluções analíticas - Tempo de extração
Espectrofotometria	- Variação do pH da solução - Temperatura - Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	- Variação do pH da fase móvel - Variação na composição da fase móvel - Diferentes lotes ou fabricantes de colunas - Temperatura - Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	- Diferentes lotes ou fabricantes de colunas - Temperatura - Velocidade do gás de arraste

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de *Youden*. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações (INMETRO, 2003).

Nesse método são realizados oito (8) ensaios, separados para determinar os efeitos da variação de sete (7) diferentes parâmetros, no procedimento analítico. Caso um número menor que sete parâmetros forem analisados, basta excluir uma linha da tabela. As oito medições podem ser realizadas numa ordem aleatória. A Tabela 4 mostra a matriz de fatores a serem avaliados (INMETRO, 2003). Os fatores nominais (sem variação) são representados por letras maiúsculas enquanto que os fatores variáveis são representados por letras minúsculas.

Tabela 4 – Matriz dos fatores para a determinação da robustez (INMETRO, 2003)

Valor do fator	Combinação Ensaída							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Se a combinação **1** for ensaiada, o resultado será **s**. Se a combinação **2** for ensaiada será **t** e assim sucessivamente até que todas as 8 combinações tenham sido ensaiadas. Para determinar a variação de um fator, encontrar os 4 valores correspondentes às letras maiúsculas e as 4 minúsculas e comparar as médias dos dois grupos. Por exemplo, ao calcular as alterações de C para c, usar os resultados:

$$Efeito C/c = \frac{(s+u+w+y)}{4} - \frac{(t+v+x+z)}{4} \quad \text{Equação 8}$$

Após crítica dos resultados obtidos, fazer um controle mais rigoroso dos fatores de maior influência. Se não houver diferença significativa, calcular a média e o desvio padrão dos oito (8) resultados, de s até z. O desvio padrão é uma estimativa realista da precisão do método (INMETRO, 2003).

4. EXPERIMENTAL

4.1. Amostragem

De acordo com a CETESB, diversos compartimentos ambientais podem ser amostrados, tais como solos, sedimentos, aterros, águas subterrâneas e águas superficiais, efluentes, dentre outros (CETESB, 2001).

Para o monitoramento da concentração de glifosato e AMPA, foi realizada amostragem na Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré, na sub-Bacia do rio Jacaré-Guaçu, na cidade de São Carlos.

A Bacia Hidrográfica do Tietê-Jacaré é situada na região central do estado de São Paulo. É composta por 34 municípios e abriga cerca de 3% da população do estado e de acordo com o IBGE/2008 possui 1.489.153 habitantes. Divide-se em seis (6) Sub-Bacias, sendo que a cidade de São Carlos encontra-se na Sub Bacia do Rio Jacaré-Guaçu. (TUNDISI et al, 2008, SigRH, 2010). As Figuras 11 e 12 mostram a localização da Bacia do Tietê Jacaré no estado de São Paulo, bem como as cidades pertencentes à Bacia.

O rio Jacaré-Guaçu possui 155 km de extensão, cujas nascentes estão nos municípios de Itirapina e São Carlos. Um de seus principais afluentes é o rio Monjolinho (ESPÍNDOLA et al, 2000).

O município de São Carlos está localizado na região central do estado de São Paulo, distante a 231 km da capital. Sua população estimada é de 221.936 habitantes (IBGE, 2010), distribuídos em uma área total de 1.141 km².

Figura 11 – Bacia do Tietê-Jacaré em destaque no estado de São Paulo (adaptado de CTPI, 2008)

Figura 12 – Cidades pertencentes à bacia do Tietê-Jacaré (adaptado de CPTI, 2008)

A amostragem foi realizada no início do mês de setembro de 2010, em cinco (5) pontos amostrais próximos à Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho, no município de São Carlos. As condições ambientais do dia foram: temperatura variando entre 15 e 29°C, 0 mm de precipitação, ventos de 19 km/h e umidade relativa do ar em 41%. A Tabela 5 apresenta os pontos amostrados, sua localização e o material amostrado em cada ponto. Já as Figuras 13 – 17 apresentam a foto digital e de satélite de cada ponto amostrado. A Figura 18 mostra a bacia do rio Monjolinho com a localização dos pontos amostrados.

Tabela 5 – Pontos de coleta e localização do material amostrado

Pontos de Coleta		Localização	Amostragem
Ribeirão Água Quente – Estrada Municipal do			Água e sedimento
Ponto 1		Matadouro, logo após a ETE Monjolinho (22°1'53.52"S, 47°55'48.68"O)	
Ribeirão Água Fria – Final da parte			Água e sedimento
Ponto 2		pavimentada da Estrada Municipal do Matadouro (22°2'4.56"S, 47°56'23.07"O)	
Ribeirão Água Fria – Final da parte			Água e sedimento
Ponto 3		pavimentada da Estrada Municipal do Matadouro (22°2'3.13"S, 47°56'23.35"O)	
Rio Monjolinho – Ponto 4		1ª bifurcação da Estrada Municipal do Matadouro, próximo a ponte (22°2'7.12"S, 47°57'27.03"O)	Água e sedimento
Sem denominação específica: Monjolinho – Ponto 5	Fazenda Santa Maria afluente	(22°2'22.30"S, 47°58'2.45"O)	Água e sedimento

Figura 13 – Foto real e imagem de satélite – Rio Monjolinho (Ponto 1)

Figura 14 – Foto real e imagem de satélite – Ribeirão Água Quente (Ponto 2)

Figura 15 – Foto real e imagem de satélite – Ribeirão Água Fria (Ponto 3)

Figura 16 – Foto real e imagem de satélite – Rio Monjolinho (Ponto 4)

Figura 17 – Foto real e imagem de satélite – Rio Monjolinho (Ponto 5)

Figura 18 – Bacia do Rio Monjolinho com seus afluentes e localização dos pontos amostrados (adaptado de DORNELLES, 2006).

Os frascos usados (tipo âmbar) para a coleta das amostras foram imersos em solução de detergente Extran por 24 horas. Em seguida, lavados seis vezes em água corrente, três em água destilada, uma em água isenta de orgânicos e uma vez com acetona. A vidraria foi seca em estufa (exceto material volumétrico).

As amostras de solo foram coletadas com auxílio de cavadeira. Após o procedimento de coleta, as amostras de água foram conservadas a 4°C em geladeira. As amostras de sedimento foram armazenadas em freezer a -10°C, conforme condições de preservação apresentadas nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Preservação de amostras de água de acordo com a CETESB (CETESB, 2001)

Parâmetro	Tipo de frasco	Preservação	Tempo de espera
Cor	Vidro	Não há	Não há
Turbidez	Vidro	Não há	Não há
pH	Vidro	Não há	24 horas
Condutividade	Vidro	Não há	Não há
Temperatura	Vidro	Não há	Análise imediata
DQO	Vidro, Polietileno	Não há	Análise imediata
DBO	Vidro, Polietileno	Não há	Não há
COT	Não há	Não há	Não há
Análise CG-EM	Vidro	Não há	48 horas

Tabela 7 – Preservação de amostras de solo de acordo com a CETESB (CETESB, 2001)

Parâmetro	Tipo de frasco	Preservação	Tempo de espera
Acidez	Polietileno, vidro	Resfriamento a 4°C	14 dias
Carbono orgânico	Polietileno, vidro	Resfriamento a 4°C	28 dias
Fósforo total	Polietileno, vidro	Resfriamento a 4°C	28 dias
Pesticidas	Vidro, tampa de Teflon	Resfriamento a 4°C	30 dias após a extração

Vale ressaltar que a amostragem realizada não representa a situação da Bacia do Rio Monjolinho como um todo, pois a amostragem não foi realizada em toda a extensão do rio, e sim em pontos muito específicos, com o objetivo de validar a metodologia proposta.

4.2. Materiais

4.2.1. Lista de reagentes

Tabela 8 – Lista de padrões e reagentes utilizados

Padrões	Solventes
Ácido aminometilfosfônico – AMPA (Sigma-Aldrich) (lote MRBC 7625; validade: 14/09/2015)	2,2,2-trifluoroetanol (Sigma-Aldrich) Anidrido trifluoroacético (Tedia) Acetato de Etila (Tedia)
Glifosato (Sigma-Aldrich) (lote 13023ME; validade: 30/05/2015)	Água Deionizada (Milli-Q – Sistema Millipore)

4.2.2. Lista de Equipamentos

Balança Analítica – BG 1000 Gehaka

Centrífuga Novatecnica NT 810

Chapa Aquecedora

Espectrofotômetro UV-Vis Jasco V-630

Estufa – Quimis

Mesa Agitadora – Tecnal

Mufla – Edgcon – 1P

pHmetro – pHMeter Tec 2 – Tecnal

Rotaevaporador Fisatom 802 D

Sistema GC/MS Shimadzu

TOC – V_{CPH} modelo 5000A Shimadzu

4.2.3. Outros Materiais

Ácido acético 1,0 mol L⁻¹

Ácido clorídrico PA (HCl)

Ácido sulfúrico PA (H₂SO₄)

Biftalato de potássio (C₈H₅KO₄)

Cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,01 mol L⁻¹

Cloreto de potássio (KCl) 1,0 mol L⁻¹

Dihidrogeno fosfato de potássio (KH₂PO₄)

Fenolfateína (solução 0,1% m/v)

Hidroxido de sódio (NaOH)

Metanol (MeOH)

Papel de filtro comum

Peróxido de hidrogênio PA (H₂O₂)

Resina de troca aniônica (Amberlite IRA 420)

Resina de troca catiônica (Amberlite IR 120)

4.3. Caracterização físico-química das amostras

As características físico-químicas determinadas nas amostras de água foram acidez, cor, turbidez, carbono orgânico total, condutividade, sólidos totais, sólidos

totais dissolvidos e demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Nas amostras de sedimento foram determinadas acidez, teor de umidade, matéria orgânica, CTC, acidez trocável e carbono orgânico total. Também foi realizada a caracterização granulométrica das mesmas.

Todos os resíduos gerados foram encaminhados ao Laboratório de Resíduos Químicos do Campus São Carlos, para descarte adequado (ALBERGUINI et al., 2003 e ALBERGUINI et al., 2005).

4.3.1. Determinação da acidez

4.3.1.1. Água

Para determinação da acidez em amostras aquosas, usa-se um pHmetro (após verificação com o uso de padrões – tampões 4,0 e 7,0 respectivamente). Transfere-se cerca de 20 mL da amostra em um béquer (50 mL), inseri-se o eletrodo de pH devidamente calibrado e aguarda-se a estabilização da leitura.

4.3.1.2. Sedimento

Para determinação da acidez em amostras de sedimento, pesou-se 5,00g de amostra (previamente seca em estufa a 40° por 24 horas) num béquer, que foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL. Logo após, adicionou-se 50 mL de CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ seguido de agitação eventual. Após 30 minutos, determinou-se o pH da suspensão, com o auxílio de um eletrodo de pH (após verificação com o uso de padrões) (BRASIL, 2007).

4.3.2. Condutividade elétrica

4.3.2.1. Água

A condutividade elétrica é medida pelo mesmo aparelho onde é medida acidez; troca-se somente a função (pH para mV). Coloca-se cerca de 20 mL da amostra em um béquer (50 mL) e em seguida, inserir o eletrodo e aguardar estabilização da leitura.

4.3.2.2. Sedimento

Não foi realizada determinação de condutividade elétrica em sedimento.

4.3.3. Determinação da taxa de umidade e matéria orgânica (MO)

4.3.3.1. Água

Ver item 4.3.6.1.1.

4.3.3.2. Sedimento

Para determinar a taxa de umidade e o teor de matéria orgânica em amostras de sedimento, foram pesados cerca de 5,00 g de amostra em cadinho de porcelana. O sistema em seguida é levado à estufa por 12 horas à temperatura de 100-110°C. O teor de umidade é calculado pela Equação 9:

$$\% \text{ Umidade} = 100 \frac{(\text{massa úmida} - \text{massa seca})}{(\text{massa úmida})} \quad \text{Equação 9}$$

Após medição da massa, o cadinho que continha a amostra (agora sem a umidade) é levado à mufla por 4 horas à 500°C para combustão da matéria orgânica. Logo após, o cadinho é novamente pesado e através das diferenças de massas, calcula-se o teor de matéria orgânica, de acordo com a Equação 10 (COTTA, 2008).

$$\% \text{ Matéria Orgânica} = 100 \frac{(\text{Massa inicial} - \text{massa final})}{(\text{massa inicial})} \quad \text{Equação 10}$$

4.3.4. Determinação da capacidade de troca catiônica (CTC)

4.3.4.1 Água

A determinação da capacidade de troca catiônica é um ensaio para solo/sedimento.

4.3.4.2. Sedimento

A capacidade de troca catiônica é dada pela soma dos cátions metálicos totais trocáveis e da acidez trocável.

4.3.4.2.1. Cátions metálicos totais trocáveis

A determinação dos cátions metálicos trocáveis envolve a pesagem de aproximadamente 2,50 g de amostra seca em um béquer e transferência para um erlenmeyer de 125 mL. Em seguida adiciona-se 25 mL de ácido acético 1 mol L⁻¹. A mistura é levada à agitação orbital constante por 1 hora. Após agitação, mede-se a acidez da solução em suspensão e realizam-se os cálculos abaixo (Equação 11) para calcular os cátions metálicos trocáveis da amostra (BRASIL, 2007):

$$\text{Cátions metálicos trocáveis (cmolc kg}^{-1}\text{)} = (pH_1 - pH_2) \times 22 \quad \text{Equação 11}$$

Onde;

pH₁ = pH da suspensão

pH₂ = pH da solução de ácido acético

22 = constante logarítmica

4.3.4.2.2. Acidez trocável

A determinação da acidez trocável envolve a pesagem de aproximadamente 5,00 g de amostra seca (50°C por 24 h) em um béquer e transferência para um erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, adiciona-se 50 mL de KCl 1 mol L⁻¹, agita-se manualmente por alguns instantes e deixa-se em repouso por 30 min. Filtrar em papel de filtro com duas (2) porções de KCl 1 mol L⁻¹. Adicionar ao filtrado seis (6) gotas de fenolftaleína 0,1% m/v e titular com NaOH 0,01 mol L⁻¹ (BRASIL, 2007).

A acidez trocável é determinada pela Equação 12:

$$Acidez\ trocável\ (cmolc_c kg^{-1}) = \frac{(V \times C \times 100)}{m}$$

Equação 12

Onde;

V = volume (mL) de NaOH gastos na titulação

C = concentração (mol L⁻¹) do NaOH

m = massa (g) da amostra

4.3.5. Determinação de carbono orgânico total

Para a determinação de carbono orgânico total, as amostras são introduzidas no tubo de combustão e oxidadas cataliticamente a uma temperatura de 900°C, sendo os componentes do carbono total convertidos a CO₂ e determinados por infravermelho. A calibração do aparelho é feita usando-se padrão de carbono na forma de biftalato de potássio, construindo-se uma curva analítica. O equipamento utilizado foi o modelo TOC-V_{CPH}, da Shimadzu, com detector de infravermelho (COTTA, 2008).

4.3.5.1 Água

As amostras de água foram filtradas (50 mL) em lã de vidro e acondicionadas em béquer. Em seguida, foram analisadas pelo equipamento de análise de Carbono Orgânico Total, modelo TOC-V_{CPH}.

4.3.5.2 Sedimento

Para a determinação de carbono total em sedimento, foram pesados no tubo de combustão 100 mg de amostra seca em estufa (50°C, por 24 horas) e em seguida foram analisadas pelo equipamento para análise de carbono modelo TOC-V_{CPH}, acoplado ao módulo de amostras sólidas, modelo SSM-5000A Shimadzu.

4.3.6. Sólidos totais e sólidos totais dissolvidos

4.3.6.1. Água

4.3.6.1.1. Sólidos Totais

Em uma capsula de porcelana de massa conhecida, adiciona-se 90 mL de amostra de água e coloca-se na estufa a 100 – 110°C até a secar. Em seguida, resfria-se em dessecador e pesar novamente o béquer. Calcula-se o teor de sólidos totais de acordo com a Equação 13:

$$\text{Sólidos totais (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{massa béquer} + \text{amostra seca}) - (\text{massa béquer seco})}{\text{volume da amostra}}$$

Equação 13

Após medição da massa, o cadinho que continha a amostra (agora sem a umidade) é levado à mufla por 4 horas à 500°C para combustão da matéria orgânica. Logo após, o cadinho é novamente pesado e através das diferenças de massas, calcula-se o teor de matéria orgânica, de acordo com a Equação 10, do item 4.3.3.2. (COTTA, 2008).

4.3.6.1.2. Sólidos Totais Dissolvidos

Em um béquer de massa conhecida, adiciona-se 90 mL de amostra de água e colocar na estufa a 180°C até a secura. Em seguida, resfriar em dessecador e pesar novamente o béquer. Calcular o teor de sólidos totais de acordo com a Equação 14.

Sólidos totais dissolvidos (mg L⁻¹)

$$= \frac{(massa\ béquer + amostra\ seca) - (massa\ béquer\ seco)}{volume\ da\ amostra}$$

Equação 14

4.3.6.2. Sedimento

O ensaio de sólidos totais é semelhante ao ensaio de determinação de umidade em sedimento. Já o ensaio de sólidos totais dissolvidos não é realizado devido a sua inviabilidade.

4.3.7. Determinação de Nitrogênio Kjeldahl e Fósforo Total

4.3.7.1. Água

A análise da água foi realizada via espectrômetro Hach pelo Método 399 (Nitrogênio total Kjeldahl (NKT)) e pelo Método 480 (Fósforo).

4.3.7.2. Sedimento

Em 1,0 g de amostra seca (a 60-65°C) e macerada, adicionaram-se 20 mL de H_2SO_4 , a mistura foi levada ao bloco digestor, onde a temperatura foi, então, elevada a 350°C por 4 horas. Após esse período, observar se a mistura se torna uma pasta negra; se não, deixar mais 1 hora.

Em seguida foram adicionados lentamente 2 mL de H_2O_2 ou mais, até que se obtivesse uma solução cinza claro.

Esperou-se a solução esfriar à temperatura ambiente e diluiu-se a mesma para um volume de 100 mL. A determinação do nitrogênio e do fósforo foi realizada via espectrômetro Hach pelo Método 399 (Nitrogênio total Kjeldahl (NKT)) e pelo Método 480 (Fósforo) (COTTA, 2008).

Para determinação da quantidade de N presente na amostra utilizou-se a Equação 15:

$$NKT (mg\ kg^{-1}) = \frac{75 \times A}{B \times C} \quad \text{Equação 15}$$

Onde:

A = $mg\ L^{-1}$ (leitura do aparelho).

B = massa da amostra para digestão (g).

C = Volume da amostra digerida (mL).

Na determinação do fósforo total foi utilizada a Equação 16:

$$P \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{(Abs - 0,000886277)}{(0,02219)} \frac{(V_{am})}{(V_{dil})} \frac{(V_{dil \text{ inicial}})}{(1000)} \frac{1}{(m_{am})} \frac{31}{95}$$

Equação 16

Onde:

Abs = valor de absorvância (leitura do aparelho)

V_{am} = volume de amostra usado (25mL)

V_{dil} = Volume final de diluição (1mL)

$V_{dil \text{ inicial}}$ = Volume inicial de diluição (pós abertura – 100mL)

m_{am} = massa amostra aberta (1g)

31 = massa atômica do fósforo (P)

95 = massa atômica molar do íon fosfato (PO_4^{3-})

4.3.8. Análise granulométrica do sedimento

A análise granulométrica do sedimento foi realizada para se caracterizar sua composição. Foi realizada de acordo com a norma técnica da ABNT NBR 7181/1984 (ABNT, 1984).

Para análise do sedimento utilizou-se um jogo de peneiras de números: 3/8, 4, 10, 16, 30, 50, 100, 140 e 200, a qual foi agitada em mesa agitadora por 15 minutos.

O ensaio foi realizado no Laboratório de Geotecnia da EESC-USP.

4.4. Validação da metodologia

4.4.1. Preparação das amostras padrão (real e fortificada)

Foram determinados os seguintes parâmetros para validação da metodologia de análise para determinação de glifosato e AMPA: seletividade, linearidade, limites de detecção/quantificação, robustez e exatidão.

Para tal, preparou-se solução estoque dos analitos (um mix dos analitos na mesma solução) à concentração de 100 mg L^{-1} em água. Para os ensaios preparou-se soluções de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 e $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

A determinação de glifosato e AMPA foi realizada via CG-EM. Cerca de 1 mL de amostra foi adicionado em ampolas de vidro, onde foram secas sob fluxo de nitrogênio, e logo após, adicionou-se $800 \text{ } \mu\text{L}$ de TFAA e $400 \text{ } \mu\text{L}$ de TFE. Após lacrarem-se as ampolas (em bico de Bunsen), estas foram à estufa por 1 hora, a 100°C .

Após atingirem a temperatura ambiente, secou-se novamente as amostras sob fluxo de nitrogênio e retomam-se as amostras com 1 mL de acetato de etila. A Figura 19 mostra o fluxograma de preparação das amostras.

Figura 19 – Fluxograma de derivatização de amostras

As determinações foram realizadas em um cromatógrafo a gás com detector de massas modelo QP 2010 Plus, da Shimadzu com injetor automático, no modo SIM. Os fragmentos monitorados para o AMPA foram m/z 246 e 302 e para o glifosato foram m/z 246, 260 e 411. O equipamento tem coluna capilar HP 5 da Hewlett-Packard, de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

4.5. Preparo das amostras para análise em CG-EM

4.5.1. Água

Coluna de vidro de 1,5 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento foi empacotada com 6,0 mL de resina catiônica (Amberlite IR-120). 50,0 mL da amostra foi acidificada a pH 2 e eluída nessa coluna, que foi previamente condicionada com

20,0 mL de água deionizada, 40,0 mL de HCl (0,2 mol L⁻¹) e 1,0 mL de HCl (6,0 mol L⁻¹). Todo o eluato foi descartado. Após esse procedimento, eluiu-se o retido na resina com 1 x 2,8 mL e 2 x 3,7 mL de HCl (6,0 mol L⁻¹) sob fluxo de 2 mL min⁻¹. O eluato foi coletado em frasco de vidro e adicionou-se 4,0 mL de HCl 10 mol L⁻¹.

Em seguida, outra coluna com as mesmas características da anterior, foi empacotada com 5,0 mL de resina aniônica (Amberlite IRA-420) previamente condicionada com 3 x 2,5 mL de HCl (6,0 mol L⁻¹) e 1,0 mL de HCl concentrado, descartando-se todo o eluato. As substâncias retidas nessa coluna foram eluídas com 1 x 1,0 mL e 2 x 2,0 mL de HCl 6,0 mol L⁻¹.

Após isso a amostra foi armazenada em balão de fundo redondo e seca em rotaevaporador Fisatom 802 D a 60°C. Em seguida, adicionou-se 5,0 mL de água deionizada e evaporou-se à secura novamente. Retomou-se o volume de cada amostra com 1,0 mL de uma solução água:metanol:ácido clorídrico (160:40:2,7) (v/v/v), onde foi transferido para ampola de vidro e procedeu-se a derivatização conforme descrito no item 4.4.1. A Figura 20 apresenta um fluxograma explicativo do preparo de amostras aquosas.

Figura 20 – Fluxograma para preparo de amostras aquosas

4.5.2. Sedimento

As amostras de solo e sedimento que foram usadas para os testes de determinação e recuperação de glifosato e AMPA foram levadas à estufa por 24 horas à 40°C.

A determinação de glifosato e AMPA foram realizadas nas amostras de solo/sedimento pesando-se 10 g da amostra. Em seguida foram adicionados 25 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹ e levadas em banho de ultrassom durante 30 minutos, com controle de temperatura.

Logo após, as amostras foram levadas à centrífuga Novatecnica NT 810 a 3000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante de cada amostra foi filtrado em papel de filtro, e ao filtrado, adicionou-se 4,2 mL de HCl concentrado, ajustando-se o pH para 2 e em seguida, avolumou-se para 200 mL. Aproximadamente 50 mL da amostra foi separado para a etapa de purificação.

A etapa de purificação é praticamente a mesma realizada no item 4.5.1. com apenas algumas mudanças.

Os 50 mL da amostra foram eluídos em coluna empacotada com resina de troca catiônica (Amberlite IR-120 – a coluna possui as mesmas características que a usada no item 4.5.1) previamente condicionada com 20,0 mL de água deionizada, 40,0 mL de HCl ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e 1,0 mL de HCl ($6,0 \text{ mol L}^{-1}$). Todo o eluato foi descartado. Após esse procedimento, eluiu-se o retido na resina com 1 x 2,8 mL e 2 x 3,7 mL de HCl ($6,0 \text{ mol L}^{-1}$) sob fluxo de 2 mL min^{-1} . O eluato foi coletado em frasco de vidro e adicionou-se 6,0 mL de NaOH 10 mol L^{-1} e o pH ajustado na faixa de 6-8.

Em seguida, o eluato tratado na resina de troca catiônica foi eluído na resina de troca aniônica (Amberlite IRA-420 – a coluna possui as mesmas características que a usada no item 4.5.1) previamente condicionada com 3 x 2,5 mL de HCl ($6,0 \text{ mol L}^{-1}$) e 1,0 mL de HCl concentrado, descartando-se todo o eluato. As substâncias retidas nessa coluna foram eluídas com 1 x 1,0 mL e 2 x 2,0 mL de HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Após isso a amostra foi armazenada em balão de fundo redondo e seca em rotaevaporador Fisatom 802 D a 60°C . Em seguida, adicionou-se 5,0 mL de água deionizada e evaporou-se à secura novamente. Retomou-se o volume de cada amostra com 1 mL de uma solução água:metanol:ácido clorídrico (160:40:2,7)

(v/v/v), onde transferiu-se para ampola de vidro e procedeu-se à derivatização conforme descrito no item 4.4.1. A Figura 21 apresenta um fluxograma do processo de extração de amostras sólidas.

Figura 21 – Fluxograma do processo de extração de amostras sólidas

4.5.3. Recuperação

Para a recuperação em amostras de água, dopou-se água isenta de contaminante com três concentrações: baixa (30 µg L⁻¹), média (90 µg L⁻¹) e alta (200 µg L⁻¹). Procedeu-se a extração conforme o item 4.5.1.

Para a recuperação em solo, foram usados dois tipos do mesmo: latossolo vermelho e solo arenoso. Fortificou-se amostras de solo com três concentrações: baixa (6 mg kg^{-1}), média (12 mg kg^{-1}) e alta (60 mg kg^{-1}). Procedeu-se a extração conforme o item 4.5.2.

Para ambos os casos, foi construída uma tabela de Concentração teórica e Concentração esperada, onde foi determinada a recuperação, desvio padrão e coeficiente de variação das recuperações.

4.5.4. Robustez

O ensaio de robustez foi realizado fazendo pequenas variações (conforme mostrado da Tabela 28 no item 5.3.8) em cinco parâmetros distintos, a saber: temperatura do forno, temperatura do injetor, temperatura da interface, temperatura da fonte de íons e velocidade linear do gás de arraste.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização das amostras de sedimento

Todas as determinações foram realizadas em triplicata, sendo o erro para um intervalo de confiança de 95 % calculado pela Equação 17:

$$e = \pm \frac{(t \times \sigma)}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação 17}$$

onde:

e = erro;

t = coeficiente de Student tabelado;

σ = desvio-padrão;

n = tamanho da amostra (3).

Nas Tabelas 9 e 10 são apresentados os resultados das determinações de pH, matéria orgânica, umidade, CTC efetiva, carbono orgânico total, fósforo total, nitrogênio Kjeldahl, nitrogênio amoniacal e razão C/N.

Resultados e Discussões

Tabela 9 – Determinação de pH, teor de matéria orgânica, umidade e CTC em sedimento

Ponto de amostragem	pH	Matéria orgânica (%)	Umidade (%)	CTC Efetiva (cmol _c kg ⁻¹)
1	6,26 (0,08)	1,24 (0,04)	24,79 (0,66)	4,77 (0,35)
2	6,66 (0,07)	0,48 (0,02)	7,57 (0,74)	3,30 (0,22)
3	5,25 (0,09)	2,68 (0,09)	16,67 (0,34)	0,87 (0,05)
4	6,06 (0,05)	1,78 (0,08)	25,75 (0,95)	5,34 (0,31)
5	5,78 (0,09)	5,86 (0,13)	21,71 (0,49)	6,65 (0,26)

( ) erro a 95% de confiança.

Tabela 10 – Determinação de carbono orgânico, fósforo total, nitrogênio Kjeldahl, nitrogênio amoniacal e razão C/N em sedimento

Ponto de amostragem	Carbono total (mg kg ⁻¹)	Fósforo Total (mg kg ⁻¹)	Nitrogênio Kjeldahl (mg kg ⁻¹)	Nitrogênio Amoniacal (mg kg ⁻¹)	C/N
1	4750 (131)	75,1 (7,5)	450,7 (1,9)	70,7 (1,9)	12,30 (2,2)
2	1007 (35)	616,9 (35,8)	74,3 (1,0)	101,3 (3,9)	15,81 (1,5)
3	1972 (43)	604,7 (35,8)	73,3 (2,6)	106,0 (3,4)	31,39 (1,8)
4	10030 (77)	1427,7 (30,0)	1276,0 (4,5)	82,0 (3,4)	9,17 (1,1)
5	15650 (388)	1253,8 (35,8)	900,7 (3,5)	52,0 (3,4)	20,27 (1,6)

( ) erro a 95% de confiança.

Uma representação gráfica global dos resultados é apresentada na Figura 22.

Figura 22 - Gráfico de dados de caracterização versus pontos de coleta (sedimento)

A Figura 23 apresenta as curvas analíticas usadas para as determinações de carbono total em água e sedimento. Foram construídas usando um padrão de biftalato de potássio seco em estufa por 24 horas.

Figura 23 – Curvas analíticas usadas para a determinação de carbono total em água (esquerda) e sedimento (direita)

O teor de matéria orgânica das amostras de sedimento foi baixo. O maior valor foi no Ponto 5 (5,83%) e o menor no Ponto 2 (0,48%). Como é possível notar na Tabela 11 e Figuras 20 a 24, o sedimento nos cinco pontos amostrados é muito arenoso (mais de 80% de areia em todos os pontos). Para todas as amostras, os valores de pH foram abaixo de 7, o que já era de se esperar, visto que o solo brasileiro tem como uma de suas características o pH menor que 7.

Pelas Tabelas 9 e 10 nota-se que os sedimentos analisados possuem quantidades diferentes de NKT e fósforo e o sedimento que possui maior quantidade destes compostos é o Ponto 4.

O sedimento do Ponto 5 apresenta maior CTC, quando comparado com os demais sedimentos, provavelmente isso se deva aos colóides da argila presente nos sedimentos, uma vez que tal sedimento possui uma quantidade pequena de MO.

A Tabela 11 e as Figuras 24 a 28 mostram a caracterização granulométrica por peneiramento realizada nas amostras dos cinco pontos.

Tabela 11 – Caracterização granulométrica das amostras de sedimento

Ponto de amostragem	Pedregulho (%)	Areia (%)	Finos (Silte + Argila) (%)
1	3,1	92,7	4,2
2	1,1	95,7	3,2
3	0,8	96,2	3,0
4	0,4	93,8	5,8
5	5,9	83,7	10,4

Figura 24 – Curva de Distribuição Granulométrica (Ponto 1)

Figura 25 – Curva de Distribuição Granulométrica (Ponto 2)

Figura 26 – Curva de Distribuição Granulométrica (Ponto 3)

Figura 27 – Curva de Distribuição Granulométrica (Ponto 4)

Figura 28 – Curva de Distribuição Granulométrica (Ponto 5)

Como é possível notar, as amostras de sedimento apresentaram uma grande quantidade de areia; a fração prevaleceu nos cinco pontos com mais de 90%, com exceção do Ponto 5. A porcentagem de argila e silte, denominada como finos, ficou abaixo de 5%, com exceção dos Pontos 4 e 5.

Como há um alto teor de areia e baixo teor de argila, silte, umidade e matéria orgânica, é de se esperar que os compostos de interesse (glifosato e AMPA) estejam dissolvidos na água e adsorvidos no material em suspensão e não no sedimento, uma vez que ele é pobre em sítios de ligação.

5.2. Caracterização das amostras de água

Nas Tabelas 12 a 14 e Figura 29 são apresentados os resultados das determinações de pH, temperatura, condutividade, carbono total, cor, turbidez, DQO, DBO, sólidos totais, sólidos totais dissolvidos, fósforo total, nitrogênio Kjeldahl e nitrogênio amoniacal.

Os ensaios foram realizados em triplicata e o erro foi calculado de acordo com o descrito no item 5.1.

Tabela 12 – Determinação de pH, temperatura, condutividade e carbono orgânico em água

Ponto de amostragem	pH	Temperatura (°C)	Condutividade (uS mol ⁻¹)	Carbono total (mg L ⁻¹)
1	7,15 (0,16)	17	24,7 (5,2)	58,30 (1,61)
2	6,46 (0,10)	16	13,7 (3,5)	11,43 (0,46)
3	6,46 (0,12)	14	11,3 (2,5)	10,70 (0,16)
4	7,43 (0,77)	15	54,7 (8,5)	35,80 (0,65)
5	7,41 (0,47)	13	19,7 (4,2)	3,88 (0,26)

( ) erro a 95% de confiança.

Tabela 13 – Determinação de matéria orgânica, cor, turbidez, DQO, DBO, sólidos totais em água

Ponto de amostragem	Matéria Orgânica (%)	Cor ^a (UH)	Turbidez ^b (NTU)	DQO ^c (mg O ₂ L ⁻¹)	DBO ^d (mg O ₂ L ⁻¹)	Sólidos Totais (mg L ⁻¹)
1	70,52 (2,43)	164	35,5	128	36	254,19 (6,23)
2	16,87 (1,46)	51	5,34	32	12	23,74 (2,37)
3	15,25 (3,04)	56	6,70	12	2	57,52 (2,98)
4	59,54 (4,11)	102	18,2	23	7	199,0 (3,0)
5	4,72 (0,88)	36	3,40	6	1	87,46 (11,05)

a, b, c e d – análises realizadas junto ao Laboratório de Saneamento, EESC-USP
( ) erro a 95% de confiança

Tabela 14 – Determinação de Sólidos Totais Dissolvidos, nitrogênio Kjeldahl, nitrogênio amoniacal e fósforo total em água

Ponto de amostragem	Sólidos Totais Dissolvidos (mg L ⁻¹)	Nitrogênio Kjeldahl (mg L ⁻¹)	Nitrogênio Amoniacal (mg L ⁻¹)	Fósforo (mg L ⁻¹)
1	123,81 (6,84)	13,0 (0,4)	7,30 (0,09)	0,05 (0,01)
2	23,57 (2,02)	1,00 (0,09)	1,50 (0,09)	0,08 (0,01)
3	21,67 (1,86)	3,00 (0,09)	1,46 (0,02)	0,06 (0,01)
4	135,11 (4,26)	7,00 (0,17)	5,60 (0,19)	0,15 (0,01)
5	21,75 (1,91)	2,00 (0,19)	0,27 (0,02)	0,18 (0,01)

( ) erro a 95% de confiança

Figura 29 – Gráfico de dados de caracterização versus parâmetros avaliados (água).

Os Pontos 2, 3 e 5 foram os que apresentaram menor teor de matéria orgânica e condutividade. Sendo assim, a presença de pouca quantidade matéria orgânica facilita a solubilidade dos compostos de interesse, visto que a solubilidade em água de ambos é alta.

Portanto, é de grande importância a realização da caracterização dos parâmetros físico-químicos das amostras, pois auxilia na elucidação da causa da contaminação em maior grau de um rio em detrimento dos demais, uma vez que os rios são geograficamente próximos uns dos outros.

Resultados e Discussões

A Figura 30 mostra os parâmetros analisados para cada ponto amostrado de acordo com os valores máximos permitidos pela CONAMA 357. A Figura mostra para cada parâmetro, a comparação com a Classe II e III do referido documento.

Resultados e Discussões

Figura 30 - Comparação com valores da CONAMA 357

Como é possível observar através dos gráficos, as amostras coletadas nos cinco pontos amostrais da cidade de São Carlos apresentam uma alta concentração de fósforo, maior que o limite estabelecido pela CONAMA 357 para águas de Classe III, o que indica a presença de fertilizantes do tipo NPK ou esgoto doméstico.

O Ponto 1, que é o mais próximo à ETE Monjolinho apresenta alto teor de nitrogênio Kjeldahl e cor. Este ponto recebe toda a carga de esgoto doméstico sem tratamento da mancha urbana de São Carlos, conforme pode ser visto na Figura 15 no item 4.1. (o tratamento de esgoto no município é recente). Outro fator que indica a presença de esgoto doméstico é o alto valor de DBO neste ponto, o que mostra a necessidade de uma alta quantidade de oxigênio para os microrganismos consumirem a matéria orgânica presente neste ponto. Por sua vez, o Ponto 5, que fica dentro da Fazenda Santa Maria, que é conhecida pelo turismo ecológico, apresenta todos os parâmetros analisados dentro da Classe II.

5.3. Validação da Análise Química do Glifosato e AMPA

A Tabela 15 apresenta as condições cromatográficas otimizadas para a análise do Glifosato e do AMPA via CG-EM.

Tabela 15 – Condições cromatográficas para determinação do Glifosato e do AMPA.

Parâmetros de injeção			
Lavagem solvente		3 vezes	
Descarte amostra		3 vezes	
Volume de injeção		1 µL	
Parâmetros do injetor			
Modo		Splitless	
Temperatura		280°C	
Parâmetros da coluna			
Coluna		Capilar HP 5 – 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	
Fluxo total		15,1 mL min ⁻¹	
Fluxo coluna		2,02 mL min ⁻¹	
Velocidade linear		57,3 cm s ⁻¹	
Pressão total		157,7 kPa	
Gás de corrida		Hélio	
Parâmetros do Forno			
Temperatura inicial		80°C	
Rampas			
	Taxa (°C min ⁻¹)	Temperatura final (°C)	Tempo final (min)
		80	2,00
	28,80	270	
Tempo total		8,60 minutos	
Parâmetros do detector			
Modo		SIM	
Tempo de corte do solvente		3,00 minutos	
Temperatura fonte de íons		200°C	
Temperatura da interface		260°C	

Como mencionado no item 4.4.1, foram preparadas nove soluções mix de glifosato e AMPA em água nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os cromatogramas das diferentes soluções padrão encontram-se nas Figuras 31 a 33. O tempo de retenção para o AMPA foi de 4,3 minutos e para o glifosato foi de 5,3 minutos.

Resultados e Discussões

Figura 31 – Cromatograma das soluções padrão de diferentes concentrações (1 a $75 \mu\text{g L}^{-1}$) de Glifosato e AMPA para a construção da curva analítica

Resultados e Discussões

Figura 32 – Cromatograma das soluções padrão de diferentes concentrações (100 a 500 ug L⁻¹) de Glifosato e AMPA para a construção da curva analítica

Figura 33 – Sobreposição dos cromatogramas das diferentes concentrações da solução padrão de Glifosato e AMPA

5.3.1. Linearidade

O método apresentou-se linear com coeficientes de correlação (R) e determinação (R^2) significativos dentro da faixa de concentração proposta. A Figura 31 mostra a curva analítica obtida a partir desses resultados.

Como discutido no item 3.5, o coeficiente de correlação (R) indica a probabilidade de existir uma relação linear entre x e y , quanto mais próximo da unidade. Já o coeficiente de determinação (R^2) indica que, quanto mais próximo da unidade ele estiver, melhor terá sido o ajuste do método às respostas observadas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002).

Figura 34 – Curvas Analíticas obtidas para o AMPA e o Glifosato.

Para o AMPA, a equação da reta foi $y = -334480,19776 + 26262,44875 x$. R e R^2 calculados para esta curva foram 0,99505 e 0,9901 respectivamente.

Já para o Glifosato, a equação da reta foi $y = -78128,86851 + 23743,33998 x$. R e R^2 calculados para esta curva foram 0,99627 e 0,9925 respectivamente.

5.3.2. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) relativos ao método foram calculados de acordo com Ribani et al, (2004). Para o AMPA, os resultados obtidos para tais parâmetros foram, respectivamente $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,45 \mu\text{g L}^{-1}$. Isso indica que o método está adequado para detectar e quantificar o ácido aminometil fosfônico.

Para o glifosato, os limites de detecção e quantificação obtidos foram de $0,67 \mu\text{g L}^{-1}$ e $2,02 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.

Souza et al (2006) trabalharam com uma curva de trabalho de 30 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ e conseguiram limites de detecção e quantificação de 10 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, tanto para AMPA como para glifosato. O R^2 obtido foi de 0,9991 para o AMPA e 0,9974 para o glifosato. Já Börjesson e Torstensson (2000) trabalharam com uma curva de trabalho entre 0,1 e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e obtiveram limites de detecção e quantificação de 0,05 e 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, tanto para AMPA como para glifosato. O R^2 obtido foi de 0,9751 para o AMPA e 0,9483 para o glifosato.

No presente trabalho, o intervalo da curva de trabalho foi de 1,0 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e conforme apresentado nos itens 5.3.1 e 5.3.2, é possível observar que apesar de um baixo limite de detecção e quantificação obtido por Börjesson e Torstensson (2000), o R^2 , que indica a possibilidade de um modelo matemático ser ajustado ao método fica comprometido, o que não é viável quando se fala em validação. Portanto, vale ressaltar que o presente trabalho usa uma ampla faixa de concentração, porém, sem comprometer a qualidade do coeficiente de determinação R^2 .

5.3.3. Branco

Não foi identificado nenhum pico cromatográfico que pudesse coeluir com a substância de interesse, conforme mostrado nas Figuras 35 e 36.

Figura 35 – Cromatograma branco para água.

Figura 36 – Cromatograma branco para solo arenoso

5.3.4. Seletividade

O método apresentou boa seletividade, conforme mostrado nas Figuras 37 e 38, onde são comparados cromatogramas de amostras sem contaminação e com fortificação de AMPA e glifosato a $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 37 – Sobreposição dos cromatogramas de uma amostra de água isenta de contaminação e de outra dopada com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de AMPA e glifosato.

Figura 38 – Sobreposição dos cromatogramas de uma amostra de solo isenta de contaminação e de outra dopada com $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de AMPA e glifosato.

Como é possível observar, não existem picos cromatográficos que eluem no mesmo tempo de retenção do AMPA (4,3 minutos) e do glifosato (5,3 minutos).

5.3.5. Sensibilidade

De acordo com o descrito no item 3.3., a sensibilidade do método é definido pelo coeficiente angular da curva analítica (ou tangente da reta). Sendo assim a sensibilidade para o AMPA é de 26262 e para o glifosato é de 23743.

5.3.6. Recuperação

Nas Tabelas 16 a 21, a seguir, são apresentados os valores de recuperação obtidos para glifosato e AMPA em água e solo (arenoso e latossolo vermelho).

Tabela 16 – Recuperação do AMPA em água

Concentração teórica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Média (%)	s^a	CV%^b
30	32	111	115	14,9	14,1
	28	88,4			
	37	116			
90	91	101	106	8,6	8,1
	103	116			
	92	102			
200	179	88,8	96,2	6,8	7,1
	196	97,9			
	204	102			

^a desvio padrão das médias de recuperação; ^b coeficiente de variação das médias das recuperações.

Tabela 17 – Recuperação do glifosato em água

Concentração teórica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Média (%)	s^a	CV%^b
30	25	81,3	102	18,9	18,5
	32	107			
	35	118			
90	97	108	105	6,8	6,4
	99	110			
	88	97,7			
200	179	89,6	102	7,9	7,7
	220	110			
	189	94,4			

^a desvio padrão das médias de recuperação; ^b coeficiente de variação das médias das recuperações.

Tabela 18 – Recuperação do AMPA em solo arenoso

Concentração teórica (mg kg^{-1})	Concentração obtida (mg kg^{-1})	Recuperação (%)	Média (%)	s^a	CV%^b
6,0	7,2	121	114	23,3	20,2
	5,6	88,4			
	8,4	133			
12,0	10,7	87,1	92,4	17,4	18,9
	13,2	112			
	9,7	78,0			
60,0	57,9	96,3	106	20,6	19,5
	76,5	129,4			
	55,2	91,5			

^a desvio padrão das médias de recuperação; ^b coeficiente de variação das médias das recuperações.

Tabela 19 – Recuperação do glifosato em solo arenoso

Concentração teórica (mg kg⁻¹)	Concentração obtida (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)	Média (%)	s^a	CV%^b
6,0	6,5	103	89,8	17,5	19,5
	5,8	96,3			
	4,4	70,0			
12,0	14,0	117	113	16,0	14,1
	11,5	95,4			
	15,1	126			
60,0	69,3	115	115	9,2	8,0
	74,1	124			
	63,3	106			

^a desvio padrão das médias de recuperação; ^b coeficiente de variação das médias das recuperações.

Tabela 20 – Recuperação do AMPA em latossolo vermelho

Concentração teórica (mg kg⁻¹)	Concentração obtida (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)	Média (%)	s^a	CV%^b
6,0	5,0	71,0	82,8	15,6	18,9
	6,7	100			
	5,2	76,8			
12,0	10,9	89,6	98,7	5,2	5,9
	11,3	93,5			
	13,9	113			
60,0	45,3	73,8	82,1	10,6	13,0
	47,1	77,0			
	56,4	95,6			

^a desvio padrão das médias de recuperação; ^b coeficiente de variação das médias das recuperações.

Tabela 21 – Recuperação do Glifosato em latossolo vermelho

Concentração teórica (mg kg⁻¹)	Concentração obtida (mg kg⁻¹)	Recuperação (%)	Média (%)	s^a	CV%^b
6,0	3,4	56,8	70,1	16,4	23,4
	3,8	65,1			
	5,4	88,8			
12,0	10,4	86,2	85,0	5,3	6,2
	10,8	89,6			
	9,6	79,2			
60,0	49,8	82,7	83,9	5,4	6,5
	54,0	89,8			
	47,7	79,2			

^a desvio padrão das médias de recuperação; ^b coeficiente de variação das médias das recuperações.

Os resultados obtidos para recuperação foram considerados aceitáveis, visto que apresentaram valores de recuperação entre 82,8 e 115%. A ANVISA recomenda valores de recuperação entre 70-120% (BRASIL, 2003).

Trabalhos de Börjesson e Torstensson (2000), Souza et al (2006) e Abreu, Matta e Montagner (2008) obtiveram recuperações de 75-103 para AMPA/glifosato em água e solo, 85-102% para AMPA/glifosato em solo e 80,5-92% para glifosato em grãos de soja respectivamente. Portanto, os resultados obtidos para a recuperação do método estão dentro dos já publicados até o momento.

5.3.7. Exatidão

Para o cálculo da exatidão pode-se aplicar o teste de significância, usando o Teste t de Student. Foi utilizado o teste hipótese, estabelecendo-se como hipótese

Resultados e Discussões

nula (H_0): $u = 100\%$ e como hipótese alternativa (H_1): $u \neq 100\%$. O valor de t experimental foi calculado pela da Equação 18:

$$t_{\text{exp}} = \frac{(X_{\text{rec}} - \mu)\sqrt{n}}{S_{\text{rec}}} \quad \text{Equação 18}$$

Onde:

X_{rec} = média das recuperações do método;

μ = valor esperado (100%);

n = tamanho da amostra (3);

S_{rec} = desvio padrão das médias de recuperação de cada nível de fortificação.

Tabela 22 – Teste hipótese para AMPA em água

Nível Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	X_{rec} (%)	S_{rec}^a	$ t_{\text{exp}} ^b$
30	111	104	7,53	1,012
90	106			
200	96,2			

^a desvio padrão das médias de recuperação; ^b t de Student experimental.

Tabela 23 – Teste hipótese para Glifosato em água

Nível Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	X_{rec} (%)	S_{rec}^a	$ t_{\text{exp}} ^b$
30	102	102	3,51	0,822
90	105			
200	98,0			

^a desvio padrão das médias de recuperação; ^b t de Student experimental.

Tabela 24 – Teste hipótese para AMPA em solo arenoso

Nível Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	X rec (%)	S rec ^a	t exp ^b
30	114	104	10,9	0,655
90	92,4			
200	106			

^a desvio padrão das médias de recuperação; ^b t de Student experimental.

Tabela 25 – Teste hipótese para Glifosato em solo arenoso

Nível Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	X rec (%)	S rec ^a	t exp ^b
30	89,8	106	14,0	2,238
90	113			
200	115			

^a desvio padrão das médias de recuperação; ^b t de Student experimental.

Tabela 26 – Teste hipótese para AMPA em latossolo vermelho

Nível Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	X rec (%)	S rec ^a	t exp ^b
30	84,6	88,5	8,95	2,232
90	98,7			
200	82,1			

^a desvio padrão das médias de recuperação; ^b t de Student experimental.

Tabela 27 – Teste hipótese para Glifosato em latossolo vermelho

Nível Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	X rec (%)	S rec ^a	t exp ^b
30	70,1	79,6	8,30	4,241
90	85			
200	83,9			

^a desvio padrão das médias de recuperação; ^b t de Student experimental.

O valor de t tab para $t = 95\%$ é de 4,303 ($n-1 = 2$). Os resultados obtidos de acordo com o teste da hipótese nula variam de 0,655 a 4,241, o que mostra que $t_{\text{exp}} \leq t_{\text{tab}}$, ou seja aceita-se a hipótese nula, isto é, não se pode afirmar que há diferenças entre o valor esperado e o encontrado, com 95% de confiança, mostrando que o método proposto é exato. Resultados na literatura para o teste hipótese podem ser encontrados no trabalho de Abreu, Matta e Montagner, 2008.

5.3.8. Robustez

A determinação da robustez foi realizada através do Teste de Youden. Neste estudo preliminar foram avaliados cinco (5) fatores que afetam a robustez do método em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas: temperatura do forno, temperatura do injetor, temperatura da interface, temperatura da fonte de íons e a velocidade linear do gás de arraste, conforme mostrado nas Tabelas 28 a 30 e Figura 39.

Tabela 28 – Condições cromatográficas a serem variadas no teste de robustez

Fator	Nominal	Variável
Temperatura Forno	80 (A)	70 (a)
Temperatura Injetor	280 (B)	290 (b)
Temperatura Interface	260 (C)	270 (c)
Temperatura Fonte de Íons	200 (D)	190 (d)
Velocidade Linear	57,3 (E)	60,0 (e)

Tabela 29 – Variação da área e do tempo de retenção de acordo com os ensaios realizados para a avaliação da robustez

Condição	Área		Tempo de retenção	
	AMPA	Glifosato	AMPA	Glifosato
1	11532574	11171155	4,239	5,292
2	11179247	10956508	4,166	5,225
3	11133046	10922771	4,252	5,294
4	11013716	10690297	4,174	5,225
5	10858590	10628049	4,401	5,417
6	11011580	10659141	4,473	5,484
7	11028902	10560134	4,410	5,420
8	11062946	10816059	4,482	5,486

Tabela 30 – Concentração obtida para Glifosato e AMPA de acordo com as modificações realizadas no teste de robustez

Conjunto de modificações	Concentração (ug L ⁻¹)	
	AMPA	Glifosato
Sem modificações	479	488
Temp. Interface, velocidade linear,	465	479
Temperatura injetor, fte de ions	463	477
Temp injetor, interface, fte de ions, velocidade linear	458	467
Forno, fonte de ions, velocidade linear,	452	464
Forno, injetor, velocidade linear	458	466
Forno, injetor, interface	459	461

Figura 39 – Influência de cada fator modificado no teste de robustez para análise de glifosato e AMPA.

De acordo com o observado nas Tabelas 28 a 30 e na Figura 39, nota-se que a temperatura do forno é o parâmetro que mais influencia no resultado da análise, visto que, em temperaturas menores (no caso 10°C a menos), os analitos derivatizados podem condensar na coluna e retardar seu tempo de retenção, pois tem uma velocidade menor de eluição.

A velocidade linear do gás de arraste e a temperatura da fonte de íons também apresentaram influência considerável no resultado das análises, pois o primeiro fator está diretamente relacionado ao tempo em que o composto eluirá na coluna e o segundo fator está intrinsecamente ligado ao fato que a fonte de íons cria partículas carregadas para o bombardeamento das moléculas, a fim de se obter os fragmentos moleculares a serem analisados pelo detector. Tendo uma temperatura menor (no caso, 10°C a menos), a quantidade de íons gerados pode comprometer o resultado da análise.

De acordo com a Tabela 30, o pior resultado obtido foi quando se variou simultaneamente os três fatores acima mencionados (temperatura do forno, da fonte de íons e a velocidade linear do gás).

A temperatura do injetor se mostrou o fator que menos influencia na análise, mas vale ressaltar que neste parâmetro em si, a variação foi positiva, logo, o efeito foi pouco pronunciado. Caso essa variação fosse negativa, um injetor resfriado poderia comprometer o resultado da análise, devido a possível condensação dos compostos de interesse.

5.3.9. Amostras reais

Conforme descrito nos itens 5.1 e 5.2 espera-se encontrar glifosato e AMPA nas amostras de água, mais especificamente nos Pontos 2, 3 e 5. De acordo com as análises realizadas, confirmou-se a presença de AMPA em dois pontos amostrados: os Pontos 2 e 3.

O cálculo realizado para a quantificação do AMPA nessas amostras está ilustrado na Equação 19.

$$x = \frac{(y+334480,19776)}{26262,44875} \times \frac{(\% \frac{rec}{100})}{V \text{ diluição}} \quad \text{Equação 19}$$

onde:

x – concentração encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)

y – área encontrada no cromatograma

% Rec – porcentagem de recuperação do método

V diluição – 51mL (na etapa de clean up, foram eluídos 50mL de amostra e no final, 1mL foi analisado via CG-EM).

As Figuras 40 a 42 apresentam os cromatogramas obtidos nas análises de água dos Pontos 2 e 3 e um cromatograma do sedimento do Ponto 3.

Figura 40 – Cromatograma Ponto 02 (água) com $4,19 \mu\text{g L}^{-1}$ de AMPA.

Figura 41 – Cromatograma Ponto 03 (água) com $6,22 \mu\text{g L}^{-1}$ de AMPA.

Figura 42 – Cromatograma Ponto 03 (sedimento).

Como o AMPA e o glifosato apresentam alta solubilidade em água (10^5 mg L^{-1} a 20°C e $10,1 \text{ g L}^{-1}$ a 20°C respectivamente), é de se esperar que a maior parte destes compostos esteja presente na água. O glifosato apresenta um tempo de meia vida muito menor que o do AMPA (chegando a até 3 dias, contra 199 dias, no

mínimo, do AMPA), sendo assim, a possibilidade de se encontrar AMPA em amostras ambientais é muito maior que a de se encontrar glifosato.

Para sedimento, para se ter uma maior certeza sobre a contaminação por glifosato e AMPA, é necessário realizar testes de adsorção, pois é possível que parte dos analitos estejam adsorvidos na matéria orgânica, argila e silte das amostras.

Nas amostras dos cinco pontos coletados, determinou-se AMPA nas amostras de água dos pontos 2 e 3. Não se detectou AMPA e tampouco glifosato nos demais pontos. Pelos resultados obtidos, pode-se afirmar que o método proposto é adequado e atende à legislação, no caso do glifosato. No entanto, para o AMPA não há valor máximo permitido estabelecido por nenhuma agência reguladora.

6. CONCLUSÕES E CONTINUIDADE

O método proposto para a determinação de glifosato e o ácido aminometilfosfônico (AMPA) apresenta boa linearidade, seletividade, exatidão e robustez de acordo com os critérios de validação da ANVISA e do INMETRO.

O estudo no curso do rio Monjolinho mostrou que o mesmo apresenta resíduo de AMPA (chegando a $4,19 \mu\text{g L}^{-1}$), mas como o mesmo não é contemplado por nenhuma legislação brasileira, não existe a possibilidade de afirmar se o mesmo apresenta algum potencial tóxico. Sendo assim, há necessidade de que o AMPA seja contemplado em alguma legislação, visto que atualmente, tanto na CONAMA 357 como na MS 518, somente o glifosato é contemplado.

Outro ponto importante que foi constatado foi que, no Ribeirão Água Quente (Ponto 1), há grande quantidade de esgoto doméstico despejado in natura. Com o funcionamento da ETE Monjolinho, essa quantidade de esgoto tenderá a diminuir e não só este rio, mas toda a bacia do Monjolinho terá a qualidade de suas águas melhorada, devido à capacidade de autodepuração dos corpos d'água.

Para trabalhos futuros, há necessidade de realizar estudos de adsorção e dessorção de glifosato e AMPA, melhorar o teste para robustez, a fim de acrescentar outros fatores que podem contribuir para o rendimento da análise (coluna cromatográfica, tempo de extração e tipo de solvente, no caso de amostras de solo/sedimento), bem como realizar um estudo comparativo de outras metodologias para determinação do herbicida e seu metabólito principal, a fim conhecer o custo benefício dos métodos, bem como sua rapidez e sensibilidade.

REFERÊNCIAS

ABREU, A.B.G.; MATTA, M.H.R.; MONTAGNER, E. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 5-9, 2008.

ALBERGUINI, L.B.A.; SILVA, L.C.; REZENDE, M.O.O. Laboratório de resíduos químicos do campus USP – São Carlos – resultados da experiência pioneira em gestão e gerenciamento de resíduos químicos em uma instituição de ensino superior. **Química Nova**, v. 26, n. 2, 291-295, 2003.

ALBERGUINI, L.B.A.; SILVA, L.C.; REZENDE, M.O.O. **Tratamento de resíduos químicos**: guia prático para a solução dos resíduos químicos em instituições de ensino superior. Rima: São Carlos, 2005. 100p.

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

AMARANTE JÚNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002. (B).

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRANAGA, M.R.; MARTÍNEZ, M.A.; CASTELLANO, V.J.; MARTÍNEZ, M.; MARIN, M.T.; NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminonethylphosphonic acid in rats. **Toxicology Letters**, v. 190, p. 91-95, 2009.

ARAÚJO, A.S.F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. 2002. 63f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR: 7181/1994**: solo: análises granulométricas de solo: método de ensaio. Rio de Janeiro, 1984.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora da Unicamp, 2002. 401p.

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

BOTTA, F.; LAVISON, G.; COUTURIER, G.; ALLIOT, F.; MOREAU-GUIGON, E.; FAUCHON, N.; GUERY, B.; CHEVREUIL, M.; BLANCHOU, H. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. **Chemosphere**, v. 77, p. 133-139, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1, p.56.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Revoga-se a Resolução CONAMA nº 020, de 18 de junho de 1986. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de março de 2005, Seção 1, páginas 58-63.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº28, de 27 de julho de 2007. Revoga a Instrução Normativa nº261 de 12 de julho de 2007. **Diário Oficial da União**, Brasília, 31 julho de 2007, Seção 1, p.11.

CASTRO, Andréa Souza. **Avaliação pontual da degradação e transporte do herbicida glifosato no solo da bacia do Arroio Donato – Perujuçara – RS**. 2005. 102f. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CASTRO JÚNIOR, João Vieira de. **Avaliação do impacto do herbicida glifosato na microbiota do solo e biodegradação por cepas de *Fusarium***. 2006. 108f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

COTTA, Jussara Aparecida de Oliveira. **Aplicação de vermicompostagem para a biorremediação de solos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. 2008. 199f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**. São Paulo: CETESB, 2001, 389p.

COOPERATIVA DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS E INDUSTRIAIS (CPTI). **Plano de Bacia da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Tietê/Jacaré (UGRHI 13)**. São Paulo: CBH-TJ /FEHIDRO, 2008. (Relatório de situação dos recursos hídricos n. 340 e 402).

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

COUTINHO, C. F. B.; COUTINHO, L. F. M.; MAZO, L.H. Estudo do comportamento eletroquímico de substâncias complexantes utilizando eletrodo de cobre. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 228-233, 2009.

DICK, R.E.; QUINN, J.P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples occurrence and pathways of degradation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 545-550, 1995.

DORNELLES, Claudio Turene Almeida. **Percepção ambiental: uma análise na bacia hidrográfica do Rio Monjolinho**, São Carlos, SP. 2006. 177f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

ESPÍNDOLA, E.L.G.; VILA, J.S.V.; MARINELLI, C.E. ABDON, M. M. **A bacia hidrográfica do rio monjolinho**. São Carlos: Rima, 2000, 188p.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. Jaboticabal: ACADCOM, 2005. 66p.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876p.

HUNG, Liu Chun. **Imobilização de resinas de troca iônica em polímeros**. 1994. 100f. Dissertação (Mestrado em Reatores Nucleares de Potência e Tecnologia do Combustível Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

HSU, C.C.; WHANG, C.W. Microscale solid phase extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and guava fruit extract using alumina-coated iron oxide nanoparticles followed by capillary electrophoresis and electrochemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8575-8580, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Resultado do censo 2010**. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/censo2010>>. Acesso em: 05 jan. 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMATIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Coordenação Geral de Acreditação. **Orientação sobre Validação de métodos analíticos – DOC CGRE-008**. Brasília, 2010. 20p.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soil and plants**. Boca Raton: CRC, 2001. 413p.

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

LANÇAS, F.M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 240p.

LEITE, F. **Validação em análise química**. São Paulo: Átomo, 2008. 357p.

LLASERA, M.P.G.; GÓMEZ-ALMARAZ, L.; VERA-AVILA, L.E.; PEÑA-ALVAREZ, A. Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, p.139–146, 2005.

MARCHI, G.; MARCHI, E.C.S.; GUIMARÃES, T.G. **Herbicidas: mecanismos de ação de uso**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 36p.

MOTOJYUKU, M.; SAITO, T.; AKIEDA, K.; OTSUKA, H.; YAMAMOTO, I. INOKUCHI, S. Determination of glyphosate, glyphosate metabolites and glufosinate in human serum by gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, n. 875, p. 509–514, 2008.

PROCÓPIO, S.O.; SANTOS, J.B.; SILVA, A.A.; PIRES, F.R.; RIBEIRO, J.I.J.; SANTOS, E.A. Potencial de espécies vegetais para a remediação do herbicida Trifloxysulfuron-Sodium. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 9-16, 2005.

REDDY, K. N.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O.; NANDULA, V.K. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2125 – 2130, 2008.

RIANI, Josiane Costa. **Utilização de resinas de troca iônica em efluentes de galvanoplastia**. 2008. 117f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, H.G.; BATISTA, M.T.A.; FONSECA, L.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 7-16, 2009.

SANCHO, J.V.; HERNANDÉZ, F.; LÓPEZ, F.J.; HOGENDOORN, E.A.; DIJKMAN, E.; ZOONEN, P. Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 737, p. 75-83, 1996.

SEE, H.H.; HAUSER, P.C.; IBRAHIM, W.A.W.; SANAGI, M.M. Rapid and direct determination of glyphosate, glufosinate and aminophosphonic acid by online preconcentration CE with conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 31, p. 575-582, 2010.

SISTEMA de Informações para o Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo (SigRH). **Comitê da bacia hidrográfica do Tietê – Jacaré**. Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2006. 836p.

SOUZA, T.A.; MATTA, M.H.R.; MONTAGNER, E.; ABREU, A.B.G. Estudo da recuperação de glifosato e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1372-1376, 2006.

TADEO, J.L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; PÉREZ, R.A.; FERNÁNDEZ, M.D. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 175-191, 2000.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TONI, L.R.M.; SANTANA, H.; ZAIA, D.A.M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 829-833, 2006.

TUNDISI, J.G.; MATSUMURA-TUNDISI, T., PARESCHI, D.C., LUZIA, A.P., VON HAELING, P. H., FROLLINI, E.H. A bacia hidrográfica do Tietê-Jacaré: estudo de caso de pesquisa e gerenciamento. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, p. 159-172. 2008.

WOLT, J. **Soil solution chemistry**: applications to environmental science and agriculture. New York: Wiley, 1994. 345p.