Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA SIMPLES, RÁPIDA E SEM ETAPA
DE CLEAN-UP PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS DE ÁGUA E SOLO POR HPLC/UV-VIS

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

Bruno Molero da Silva

Orientadora: Maria Olímpia de Oliveira Rezende

2009

*"Eu pedi força...
e Deus me deu dificuldades para me fazer forte.
Eu pedi sabedoria...
E Deus me deu problemas para resolver.
Eu pedi favores...
e Deus me deu oportunidade.
Eu não recebi nada do que pedi...
mas eu recebi tudo de que precisava".*

Autor desconhecido

*"A mente que se abre a uma
nova idéia jamais voltará ao
seu tamanho original".*

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Ataides e Marinês, por
sempre investirem na minha educação e por não
medirem esforços para me apoiar e incentivar em
todos os momentos da minha vida.
Amo vocês!*

*Ao meu avô Eduardo Silvestre Gonçalves da Silva
que deixa lembranças de um bom caráter, de sua
superação e sabedoria (in memorium).*

AGRADECIMENTOS

Em especial,

- À Deus pelo amor incondicional.*
- À Prof^a. Dr^a. Maria Olimpia de Oliveira Rezende pela orientação, aceitação, liberdade de trabalho e confiança.*
- À Diva pelo carinho e ensinamentos demonstrados durante o convívio.*
- À minha irmã Laíze e meu cunhado Rudnei, pelo apoio e incentivo nas horas mais difíceis.*
- À avó Matilde pela preocupação e afeto demonstrado nas minhas idas e vindas à Palmital.*
- Aos meus familiares, tios, tias e primos pelo carinho.*
- Aos colegas de laboratório: Isequiel, Régis, Paulo, Joel, Livia, Roberta, Ricardo, Andressa, Jussara, Cléver, Maichel, Estela e Daniely pela amizade e bons momentos compartilhados. Valeu galera!!*
- Ao Régis e Isequiel pela amizade e companheirismo.*
- À Roberta pela ajuda e ao Oscar pela recepção e ensinamentos dos ensaios realizados na Geotecnia da EESC/USP.*
- Aos amigos que frequentavam a República "Valdolândia": Zé Luis, Paulo, Magão, Baxin, Jairo, Tampico, Lenilson, Kiko, Rommel, André, Baiano, Camila, Bia e Evânia pelos bons momentos de descontração que passamos juntos.*
- Às colegas do Grupo de Análise Fitoquímica: Malu, Tati e ao Bené pela consideração e amizade.*
- Aos grandes amigos de Palmital que sempre estiveram me dando apoio.*
- Aos funcionários Maurílio e Generoso do SAAE que ajudaram na coleta das amostras.*
- Ao Instituto de Química de São Carlos/ USP, pelo apoio Institucional e as facilidades oferecidas.*

- Às secretárias da seção de Pós-graduação, Silvia e Andréia e às funcionárias da Biblioteca, principalmente à Sônia e a Bernadete pela constante disposição em ajudar-me.

- À minha namorada Isadora por estar ao meu lado tornando-me uma pessoa mais feliz a cada dia.

- A todos aqueles que, de maneira direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho. Muito Obrigado!

SUMÁRIO

Índice de Figuras	i
Índice de Tabelas	iv
Símbolos e Abreviações	v
Abstract	vi
Resumo	vii
1 – INTRODUÇÃO	2
1.1 – Glifosato: Aspectos gerais	2
1.2 – Degradação	10
1.3 – Adsorção	11
1.4 – Interação entre herbicidas e substâncias húmicas	13
1.4.1 – Ligação iônica (Troca iônica)	13
1.4.2 – Ligação de hidrogênio	14
1.4.3 – Transferência de carga (mecanismo doador- receptor de elétrons)	15
1.4.4 – Ligação covalente	15
1.4.5 – Forças de London - Van der Waals	16
1.4.6 – Troca de ligante	16
1.4.7 – Adsorção hidrofóbica	16
1.5 - Métodos de extração e determinação de glifosato e AMPA ..	17
1.6 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	20

2 – OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos específicos	24
3 – VALIDAÇÃO ANALÍTICA	25
3.1 - Curva Analítica	27
3.2 – Seletividade	27
3.3 – Fortificações	27
3.4 – Linearidade	28
3.5 – Limite de detecção e quantificação	29
3.6 – Precisão	30
3.7 – Robustez	31
3.8 – Exatidão	32
4 – PARTE EXPERIMENTAL	33
4.1 – Amostragem	33
4.2 – Materiais e Métodos	39
4.2.1 – Equipamentos	40
4.2.2 – Outros Materiais	40
4.3 – Características físico-químicas das amostras	41
4.3.1 – Determinação do pH	41
4.3.2 – Determinação da taxa de umidade e teor de matéria orgânica (MO)	41
4.3.3 – Determinação da capacidade de troca catiônica (CTC)	41
4.3.4 – Extrato húmico total	42

4.3.5 – Determinação de carbono total	44
4.4 - Análise granulométrica do solo	44
4.5 – Preparo das amostras para determinação em HPLC	45
4.5.1 – Água	45
4.5.2 – Solo	45
4.6 – Procedimento	45
4.7 – Testes com outros solos	48
4.8 - Preparação das soluções padrão	48
4.9 – Determinação das condições cromatográficas	48
4.10 – Estudo da adsorção	50
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 – Caracterização das amostras	51
5.2 – Determinação da CTC efetiva e matéria húmica total	53
5.3 – Carbono Total	54
5.4 – Análises Granulométricas	55
5.5 – Determinação cromatográfica	58
5.5.1- Validação da análise química do glifosato	58
5.5.2 – Seletividade	60
5.5.3 – Fortificações	61
5.5.4 – Limite de detecção e quantificação	64
5.5.5 – Branco do método	64
5.5.6 – Robustez	65

5.5.7 – Análise do solo calcinado e solo arenoso	67
5.5.8 – Análises das amostras de água em HPLC	69
5.5.9 – Análise das amostras de solo	69
6 – CONCLUSÕES	73
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01 – Estrutura química do glifosato e de seus principais produtos de degradação	3
Figura 02 – N-(fosfonometil) aminoacetato de isopropilamônio	6
Figura 03 - Dissociação do glifosato de acordo com seu comportamento zwitteriônico.....	9
Figura 04 - Ligação iônica entre substância húmica e s-triazina	14
Figura 05 - Ligação de hidrogênio entre substância húmica e s-triazina	15
Figura 06 - Mecanismo de troca de ligante na adsorção de s-triazina em substância húmica via ponte catiônica	16
Figura 07 - Esquema dos mecanismos (interação eletrostática, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligação covalente dativa dupla) envolvidos na sorção do glifosato em solo.....	17
Figura 08 - Equipamento básico de HPLC. a)reservatório da fase móvel; b)bomba de alta pressão; c)válvula de injeção; d)coluna; e)detector e f)registrador	21
Figura 09 - Localização da bacia hidrográfica do Rio Jacaré-Guaçu.	33
Figura 10 - Rede hidrográfica da bacia do alto Jacaré-Guaçu indicando os pontos de amostragem (RODRÍGUEZ, 2001, com modificações)	34
Figura 11 - Ponto de coleta 1	35
Figura 12 - Ponto de coleta 2	36
Figura 13 - Ponto de coleta 3	36
Figura 14 - Ponto de coleta 4	36
Figura 15 - Ponto de coleta 5	37

Figura 16 - Ponto de coleta 6	37
Figura 17 - Ponto de coleta 7	37
Figura 18 - Ponto de coleta 8	38
Figura 19 - Ponto de coleta 9	38
Figura 20 - Fluxograma das etapas da metodologia para determinação de glifosato em solo	47
Figura 21 - Comprimento de onda para absorção de luz UV/Vis para o glifosato em estudo ($500 \mu\text{g L}^{-1}$)	49
Figura 22 – Gráfico de dados de caracterização versus pontos de coleta	52
Figura 23 – Porcentagem granulométrica das amostras de solo.....	56
Figura 24 - Cromatograma das diferentes concentrações da solução padrão de glifosato para construção da curva analítica	59
Figura 25 - Curva analítica obtida para o glifosato	60
Figura 26 - Cromatograma da amostra de água fortificada com $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato (a) e da solução padrão (b)	61
Figura 27 - Cromatogramas das amostras de água fortificadas com 50 mg L^{-1} (a), 300 mg L^{-1} (b), 500 mg L^{-1} (c) e da solução padrão (d)	62
Figura 28 - Cromatogramas do branco de uma amostra de solo (a) e de água (b)	65
Figura 29 - Cromatograma de $55 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato sob as condições descritas no item 4.9	66
Figura 30 - Cromatograma de $73 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato sujeito as modificações em seus parâmetros	66
Figura 31 - Cromatograma de uma amostra de solo do campus 2 da USP com $737,6 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato	68

Figura 32 - Cromatograma de uma amostra de solo arenoso numa fazenda na região periférica de São Carlos. com $613,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato 69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01 - Principais produtos comercializados no país contendo glifosato na sua formulação (COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 2005)	4
Tabela 02 - Parâmetros que geralmente fazem parte de um processo de validação	26
Tabela 03 – Pontos de coleta com a sua exata localização e amostragem.....	35
Tabela 04 - Padrões e solventes utilizados.....	39
Tabela 05 – Determinação do pH, teor de matéria orgânica e umidade em solo.....	51
Tabela 06 – Determinações de carbono total e das características físico-químicas nas amostras de água.....	55
Tabela 07 – Análise granulométrica e classificação dos solos	57
Tabela 08 - Eficiência na recuperação obtida para o glifosato	63
Tabela 09 – Algumas características do solo estudado	68
Tabela 10 - Valores de adsorção, fortificação, recuperação e coeficiente de variação (CV) das amostras de solo	70

LISTA DE ABREVIATURAS

CTC - Capacidade de troca catiônica

AMPA - Ácido aminometilfosfônico

HPLC/UV- Vis – Cromatografia Líquida de alta eficiência (do inglês, high performance liquid chromatography/ ultraviolet-visible)

GC/MS – Cromatografia Gasosa acoplado ao espectrômetro de massas

LD - Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

EPA – Environmental Protection Agency

ABSTRACT

Glyphosate, N-(phosphonomethyl)glycine, is a systemic herbicide and post-emergent with great efficiency in the removal of weeds, featuring low cost, which is reflected on its wide application. Due to this fact, special care in order to not contaminate the environment has to be attend, since there is evidence of deleterious effects on the environment after its prolonged use including risks to human health. Therefore, the aim of this study was to develop an adequate methodology for the determination of glyphosate in samples of water and soil using the technique of high performance liquid chromatography (HPLC). The proposed method describes an efficient alternative for the determination of glyphosate in water samples by eliminating the steps of extraction and clean-up. The limits of detection and quantification related to the method were 9.93 and 30.1 mg L⁻¹. Samples of soil results in recovery of glyphosate ranged from 78.1 to 113.2% due to the percentage fraction of organic, inorganic, among other factors. Moreover, the proposed method proved to be selective, with good linearity, accuracy, repeatability and robustness.

Key words: direct determination of glyphosate, water, soil, HPLC

RESUMO

O glifosato, N- Fosfometil- glicina, é um herbicida sistêmico e pós-emergente com grande eficiência na remoção de ervas daninhas, apresentando baixo custo, que é refletido na sua vasta aplicação. Assim, os cuidados relacionados com a possibilidade de contaminação ambiental com esta molécula devem ser estudados cautelosamente, já que há evidências de efeitos deletérios no ambiente após a sua utilização prolongada que podem causar riscos à saúde humana. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia adequada para a determinação de glifosato em amostras de água e solo utilizando a técnica de cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O método proposto descreve uma alternativa eficaz para a determinação de glifosato em amostras de água eliminando as etapas de extração e clean-up. Os limites de detecção e quantificação relacionados ao método foram 9,93 e 30,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Nas amostras de solo os resultados de recuperação do glifosato variaram de 78,1 a 113,2 % conforme a porcentagem da fração orgânica, inorgânica, entre outros fatores. Além disso, o método proposto demonstrou ser seletivo, com boa linearidade, precisão, repetibilidade e robustez.

Palavras chave: determinação direta de glifosato, água, solo, HPLC.

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Glifosato: Aspectos Gerais

Devido ao constante aumento da população e à crise de alimentos no mundo, o uso de pesticidas para o controle de ervas daninhas, doenças e pragas tornou-se comum para o aumento da produção agrícola. Em razão da intensiva utilização de produtos químicos na agricultura e à formação de grandes quantidades de resíduos, há uma maior preocupação em conhecer o comportamento e o destino dos pesticidas nos diversos ecossistemas (ARAÚJO, 2002). Assim, a preocupação com o ambiente tem estimulado pesquisas que estudam o destino de todas estas substâncias no meio ambiente, seja no solo, na água, no ar e as consequências da sua utilização à fauna, à flora, à micro-biota e ao homem (KERNEY, KAUFUMAN, 1975).

Pesticidas são todas as substâncias ou misturas que têm como objetivos impedir, destruir ou repelir qualquer praga, previnem a ação direta ou indireta de insetos, ácaros, fungos, bactérias ou qualquer forma de vida animal ou vegetal que causam danos à saúde humana (MELO; AZEVEDO, 1997). Como esses produtos causam efeito nocivo ao meio ambiente, seu uso deve ser recomendado de maneira criteriosa, a fim de reduzir o risco de impacto ambiental (ARAÚJO, 2002).

Dentre as classes de pesticidas, os herbicidas têm sido os mais usados nas lavouras mundiais com o objetivo de controlar as ervas daninhas e aumentar a eficiência na produção agrícola. Neste contexto, a produção agrícola moderna depende consideravelmente do uso de herbicidas, seja na pré ou pós-emergência das culturas.

Enquanto a produção e o uso de inseticidas têm permanecido estáticos com o passar dos últimos anos, tem ocorrido um enorme crescimento no uso de herbicidas na agricultura, sendo que hoje, os herbicidas constituem a principal porção de vendas de todos os pesticidas no sistema de produção agrícola no mundo ocidental industrializado (ROBERTS; HUTSON, 1987; PROCOPIO 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).

Um dos herbicidas mais empregados na atualidade, representando 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos é o glifosato (SOUZA et al., 2006), (Figura 1).

Figura 01 – Estrutura química do glifosato e de seus principais produtos de degradação

Como apresentado na Tabela 1, ao longo das últimas décadas houve um aumento no número de formulações deste herbicida.

Tabela 01 - Principais produtos comercializados no país contendo glifosato na sua formulação (COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 2005).

Produto	Composição
glifosatoFOS – Cheminova Brasil Ltda.	N-(fosfonometil)-glicina. concentração: 480 g/L (48% m/v). (Equivalente ácido) 360 g/L (36% m/v). Ingredientes inertes: 657 g/L.
glifosatoFOSATO 480 AGRIPEC - Agripec Química e Farmacêutica S.A. glifosatoFOSATO FERSOL 480 N.A. – Fersol Indústria e Comércio Ltda. glifosatoON – Milena Agro Ciências S.A.	sal de isopropilamina de N-(fosfonometil)-glicina. concentração: 480 g/L.
glifosatoFOSATO ALKAGRO – Alkagro do Brasil Ltda.	N- (fosfonometil) glicina, sal de isopropamina. concentração: 480 g/L.
glifosatoFOSATO ATANOR - Atanor do Brasil Ltda.	sal de isopropilamina de N-(fosfonometil)-glicina. concentração: 48 % m/v. (Equivalente ácido) 360 g/L ou 36% m/v. Ingredientes inertes: 67,9 g/L ou 67,9% m/v.
glifosatoFOSATO NORTOX- Nortox S.A.	sal de isopropilamina de N-(fosfonometil)-glicina. concentração: 48 % m/v ou 480 g/L. (Equivalente ácido) 360 g/L (36% m/v). Ingredientes inertes: 692 g/L ou 69,2% m/v.
glifosatoFOSATO NORTOX N.A. - Nortox S.A. glifosatoZ 480 CS – Dow AgroSciences Industrial Ltda. glifosatoZ 480 NA - Dow AgroSciences	sal de isopropilamina de N-(fosfonometil)-glicina. concentração: : 48 % m/v ou 480 g/L. Ingredientes inertes: 692 g/L (69,2% m/v).

Industrial Ltda.	
glifosatoFOSATO NORTOX WG - Nortox S.A.	sal de amônio de N-(fosfonometil)-glicina. concentração: 792,5 g/kg ou 79,25 % m/m. Equivalente ácido: 720 g/kg ou 72% m/m. Ingredientes inertes: 207,5 g/kg ou 20,75 % m/m.
glifosatoPHOGAN 480 - Agricur Defensivos Agrícolas Ltda.	N-(fosfonometil)-glicina. concentração: : 48 % m/v ou 480 g/L. Ingredientes inertes: 690 g/L ou 69% m/v.
RODEO - Monsanto do Brasil Ltda. RODEO NA - Monsanto do Brasil Ltda. ROUNDUP TRANSORB - Monsanto do Brasil Ltda.	sal de isopropilamina de N-(fosfonometil)-glicina. concentração: 648 g/L ou 64,8 % m/v. (Equivalente ácido) 48% m/v ou 480 g/L.
ROUNDUP MULTIAÇÃO - Monsanto do Brasil Ltda. ROUNDUP WG - Monsanto do Brasil Ltda.	sal de amônio de N-(fosfonometil)-glicina. concentração: 792,5 g/kg ou 79,25 % m/m. Equivalente ácido: 720 g/kg ou 72% m/m.
ROUNDUP NA - Monsanto do Brasil Ltda. ROUNDUP ORIGINAL - Monsanto do Brasil Ltda.	sal de amônio de N-(fosfonometil)-glicina. concentração: : 48 % m/v ou 480 g/L. (Equivalente ácido) 360 g/L ou 36% m/v.
RUSTLER - Monsanto do Brasil Ltda.	N-(fosfonometil)-glicina. concentração: : 48 % m/v ou 480 g/L. (Equivalente ácido) 360 g/L ou 36% m/v).

O glifosato, N-(fosfonometil)-glicina, é pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, é um herbicida pós-emergente, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica, com grande eficiência na eliminação de ervas daninhas, apresentando baixa toxicidade aos que o manipulam (AMARANTE JUNIOR et al., 2002, A; e GALLI; MONTEZUMA, 2005). Esse herbicida de

caráter polar e com grande tendência em formar espécies iônicas tem fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (m.m.=169,1 g mol⁻¹) e, na forma de sal de isopropilamônio, apresenta-se com a adição do grupo $(CH_3)_2CHNH_3^+$ (m.m.=228,2 g mol⁻¹).

A Monsanto, em 1973, introduziu no mercado os sais de glifosato-isopropilamônio (TEÓFILO, 2003). A fórmula estrutural desse sal pode ser vista na Figura 2.

Figura 02 – N-(fosfonometil) aminoacetato de isopropilamônio

Nas condições ambientes, tanto o glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos muito solúveis em água e quase insolúveis em solventes orgânicos (AMARANTE JUNIOR et al., 2002 B). 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 daninhas 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 glifosato é a inibição competitiva da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), interferindo na produção de aminoácidos aromáticos e outros compostos aromáticos em plantas. Com isso, as plantas não conseguem produzir os aminoácidos essenciais para sua sobrevivência (SOUZA et al., 2006).

Assim, toda vez que for aplicado de maneira inadequada e entrar em contato com a cultura, o produto também terá sua atividade herbicida e causará danos, de acordo com as proporções de dose e características da cultura (GALLI, MONTEZUMA, 2005).

A toxicidade relativamente baixa pode ser atribuída à modalidade bioquímica de ação do glifosato em um caminho metabólico nas plantas: (mecanismo do ácido chiquímico).

O glifosato apresenta relativamente baixo custo e excelente eficiência agronômica; 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 já há evidência 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).

O ácido aminometilfosfônico (AMPA) é o seu metabólito principal. (Figura 01, página 3). Embora tenha toxicidade baixa (sua DL_{50} é de 8300 mg

kg⁻¹), 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. 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 de água potável. (AMARANTE JUNIOR et al., 2002 B).

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, o que faz com que as plantas espontâneas acelerem o desenvolvimento de resistência ao produto (ARAÚJO, 2002).

O glifosato possui um comportamento zwitteriônico. Os valores de pK encontrados na literatura para o glifosato são: pK1 = 0,8; pK2 = 2,16; pK3 = 5,46; pK4 = 10,14 (AMARANTE JUNIOR et al., 2002, B). Tais constantes de dissociação indicam o grau de dissociação do herbicida em função do pH (Figura 3).

Figura 03 - Dissociação do glifosato de acordo com seu comportamento zwitteriônico (AMARANTE JÚNIOR, 2002 B).

Mesmo possuindo grande eficiência, o glifosato não tem ação sobre as sementes das ervas daninhas 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 ervas daninhas, nas culturas de ameixa, banana, cacau, pera, pêssigo, seringueira, entre outras. O glifosato pode ainda ser aplicado em corpos hídricos para o controle de ervas aquáticas.

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

No cultivo de pequenas áreas, o glifosato pode ser aplicado em pré-plantio da cultura e pós-emergência das plantas daninhas.

Para não atingir as partes verdes das plantas úteis (folhas, ramos ou caules jovens), o glifosato deve ser preferencialmente aplicado com jato dirigido. A “calda” pronta do formulado é altamente corrosiva. Por este motivo,

ele não deve ser armazenado em recipientes de ferro galvanizado, ferro ou aço comum.

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 dos sólidos do solo, mas também sua estrutura mineral e o estado de dispersão são fatores que influenciam as propriedades do solo.

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” (PENDIAS, 1985).

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 microrganismos 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).

Já a degradação no solo pode ser realizada por via química ou biológica; no entanto, a degradação microbiana é a via mais importante.

A degradação do glifosato no solo é muito rápida e realizada por uma grande variedade de microrganismos, 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 aminometil fosfônico (AMPA) como o principal metabólito (DICK; QUINN, 1995); (Figura 1, página 2).

Segundo Liu et al. (1991), existem duas vias principais de degradação microbiana do glifosato: a primeira envolve a clivagem da molécula produzindo o AMPA. A segunda é pela clivagem da ligação C-P do composto, por ação da enzima C-P liase, produzindo sarcosina. Os microorganismos possuem a capacidade de metabolizar esses compostos via suas enzimas e transformá-los em energia e nutrientes para sua sobrevivência.

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 mesmo (ARAÚJO, 2002).

1.3 - Adsorção

Além da degradação, a molécula de um herbicida pode sofrer adsorção. Adsorção é a passagem de um soluto (adsorbato) da fase aquosa para a superfície de uma substância sólida (adsorvente), prendendo-se a ela por meio de interações físicas ou químicas. A quebra dessas interações, que causa a liberação do adsorbato, é a dessorção.

A sorção é um processo interfacial e refere-se à adesão ou atração de uma ou mais camadas iônicas ou moleculares para uma superfície.

O mecanismo de sorção de herbicidas, por estes se tratarem de moléculas orgânicas nos mais variados arranjos, é muito mais complexo do que a de dois íons que servem como nutrientes para as plantas. Ligações de

hidrogênio, forças de van der Waals, forças eletrostáticas, ligações covalentes e interações hidrofóbicas são os principais mecanismos que podem contribuir com a sorção dos herbicidas; estes mecanismos podem atuar concomitantemente na sorção de uma mesma molécula. Podemos destacar as ligações eletrostáticas para moléculas que se ionizam, como exemplo os herbicidas pertencentes ao grupo das triazinas, o imazaquin (BHALLA et al., 1991), e para aqueles que já possuem carga em sua estrutura, como o paraquat e diquat, as ligações covalentes para moléculas que apresentam grupos fosfônicos como os óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio do solo, como é caso do glifosato e, principalmente, a interação hidrofóbica dos herbicidas com a matéria orgânica do solo. Este último mecanismo tem maior relevância para moléculas apolares, mas não deixa de ter sua importância para todas as outras moléculas. Já as interações de van der Waals e as ligações de hidrogênio estão sempre atuando sobre as moléculas, independentemente do envolvimento de outros mecanismos de ligação.

Os herbicidas adsorvidos podem sofrer a absorção das moléculas pelas plantas ou a lixiviação das moléculas para camadas sub-superficiais do solo.

A adsorção reduz a concentração dos herbicidas, removendo parte de sua ação potencial. Cada herbicida possui um mecanismo de adsorção e degradação, que varia de acordo com suas propriedades químicas.

O glifosato no solo apresenta alta capacidade de adsorção devido a fatores como: troca de ligantes com os óxidos de ferro e alumínio e ligações de hidrogênio com as substâncias húmicas presentes no solo (TONI; SANTANA; ZAIA; 2006).

A adsorção diminui com o aumento do pH da solução solo/água. Esta diminuição na adsorção é atribuída a um aumento no número de cargas negativas do glifosato, assim como da superfície do solo, resultando em uma maior repulsão eletrostática. O glifosato se adsorve tanto às argilas como à matéria orgânica do solo, sendo sua recuperação normalmente baixa.

A adsorção do glifosato também pode ocorrer devido à presença de óxidos de ferro e alumínio, sendo essa fração inorgânica a de maior importância no processo de adsorção (TONI; SANTANA; ZAIA; 2006).

Para se descrever um fenômeno adsorptivo, devem-se obter informações sobre: a) relação entre a quantidade adsorvida e a concentração da solução em contato com o adsorvente, no equilíbrio (isotermas de adsorção); b) energias que caracterizam o equilíbrio entre a superfície sólida e a fase líquida (tratamentos termodinâmicos da adsorção); c) a velocidade em que o equilíbrio é atingido e a magnitude das energias envolvidas (estudo cinético).

1.4 – Interação entre herbicidas e substâncias húmicas

São vários os mecanismos verificados para adsorção de herbicidas no solo. Esses mecanismos, que podem ser de natureza física ou química, variam conforme a molécula adsorvida e com as condições do meio, sendo que podem ocorrer, simultaneamente, mais de um dos mecanismos citados a seguir.

1.4.1 - Ligação iônica (Troca iônica)

Ocorre entre cátions e superfícies carregadas negativamente ou ânions e superfícies carregadas positivamente (cátions). A primeira situação é mais comum para adsorção de glifosato em argilas ou em substâncias húmicas.

Essa ligação ocorre basicamente em herbicidas com forma catiônica em solução, como o diquat, paraquat e o clodimeform, ou pesticidas básicos (dependendo da sua basicidade e do pH do sistema) que aceitam um próton, tornando-se catiônico, como as s-triazinas (Figura 4), amitrole e dimefox. As trocas iônicas são mais verificadas em isothermas do tipo H ou isothermas de Langmuir (JAVARONI et al.,1999).

Figura 04 - Ligação iônica entre substância húmica e s-triazina

1.4.2 - Ligação de Hidrogênio

Importante forma de adsorção de vários herbicidas polares não-iônicos (s-triazinas, uréias substituídas, alaclor, malation etc.). Herbicidas ácidos, como o 2, 4-D, podem ser adsorvidos por ligação de hidrogênio em pH abaixo de seu pKa (em formas não ionizadas). A Figura 5 mostra um modelo de adsorção de uma s-triazina em substâncias húmicas por ligação de hidrogênio (JAVARONI et al.,1999).

Figura 05 - Ligação de hidrogênio entre substância húmica e s-triazina

1.4.3 - Transferência de carga (mecanismo doador-aceptor de elétrons)

A presença em substâncias húmicas de grupos deficientes de elétrons, como as quinonas, ou ricos em elétrons, como os difenóis, sugere a formação de complexos de transferência de carga com pesticidas com propriedades elétron-doadores ou elétron-aceptoras, envolvendo sobreposição parcial de seus orbitais moleculares (π - π). A interação de s-triazinas com estruturas deficientes de elétrons das substâncias húmicas, como quinonas, pode ser confirmada por estudos em Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), que mostrariam um aumento na concentração de radicais livres, uma vez que esse processo envolve formação do intermediário semiquinona. (TRAGHETTA et al., 1996).

1.4.4 - Ligação Covalente

Formação de ligação covalente através de catálise química, fotoquímica ou enzimática, levando a uma estável e irreversível incorporação do herbicida no solo. É típico de adsorção de clorofenoxiácidos, como o 2, 4-D. (VIEIRA et al., 1999).

1.4.5 - Forças de London-van der Waals

As forças de van der Waals consistem em fracas atrações, de natureza física, do tipo dipolo-dipolo induzido e dipolo instantâneo-dipolo induzido, chamados, respectivamente, de forças de Keesom (de orientação), forças de Debye (de indução) e forças de London (de dispersão). Sua contribuição é maior com o aumento da molécula do herbicida e com sua capacidade de se adaptar à superfície das substâncias húmicas (GEVAO et al., 2000).

1.4.6 - Troca de ligante

Envolve associação de cátions metálicos e água de hidratação em substâncias húmicas. Ocorre em s-triazinas (Figura 6) e pesticidas aniônicos (PRATA, 2002).

Figura 06 - Mecanismo de troca de ligante na adsorção de s-triazina em substância húmica via ponte catiônica

1.4.7 - Adsorção hidrofóbica

Mecanismo independente de pH para retenção de herbicidas não-polares (interagindo fracamente com água) nos sítios ativos hidrofóbicos (como

cadeias laterais alifáticas ou porções lipídicas) de substâncias húmicas. É um importante mecanismo para vários herbicidas (YAMADA; CASTRO, 2007).

A Figura 7 representa todos os mecanismos citados anteriormente no solo.

Figura 07 - Esquema dos mecanismos (interação eletrostática, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligação covalente dativa dupla) envolvidos na sorção do glifosato em solo

1.5 - Métodos de extração e determinação de glifosato e AMPA

Há diversos métodos de extração e determinação de glifosato e AMPA encontrados na literatura.

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. 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).

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.

Devido a sua elevada polaridade, e baixa volatilidade, este herbicida pode ser analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, em inglês). Alguns autores consideram esse tipo de análise inapropriada, já que o herbicida não possui agentes cromóforos em sua molécula, tornando-se necessário, portanto, o uso de reações de derivatização, geralmente em pós-coluna. No entanto, a detecção por UV-vis pode ser eficiente com o uso de uma coluna de troca iônica, já que a molécula do glifosato apresenta 4 grupos ionizáveis que podem estar na forma protonada ou dissociada de acordo com valor do pH do meio (Figura 2, página 7). Tal fato já foi demonstrado por Audino e colaboradores (1983) que desenvolveram uma metodologia por HPLC com coluna de troca aniônica e fase móvel composta por água e metanol (96+4) usando $0,0062 \text{ mol L}^{-1}$ de KH_2PO_4 e pH ajustado para 1,9 com H_3PO_4 85% e a detecção com comprimento de onda fixo em 195 nm com detector de UV.

Um método por cromatografia líquida para a determinação de glifosato foi testado por 28 laboratórios. As amostras foram dissolvidas na fase móvel e injetadas diretamente no HPLC com coluna de troca aniônica e fase móvel com 96 % de solução tampão com $0,0062 \text{ mol L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , e 4% de metanol e a

detecção com comprimento de onda fixo em 195 nm com detector de UV (MORLIER; TOMKINS, 1997).

Assim, é possível a utilização do sistema HPLC/UV para análise de glifosato em águas e no solo tornando-se desnecessária uma prévia derivatização da molécula, usando agentes derivatizantes que geram problemas em demanda de tempo e alto custo em análises.

A minimização do uso de solventes, com redução da geração de resíduos vem ao encontro dos conceitos da Química Verde. Essa filosofia visa a criação, o desenvolvimento, e a aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente. Os doze princípios da Química Verde podem ser sintetizados por: (1) prevenção; (2) economia de átomos; (3) reações com compostos de menor toxicidade; (4) desenvolvimento de compostos seguros; (5) diminuição do uso de solventes e auxiliares; (6) eficiência energética; (7) uso de substâncias renováveis; (8) evitar a formação de derivados; (9) catálise; (10) desenvolvimento de compostos degradáveis; (11) análise em tempo real para prevenção da poluição; (12) química segura para prevenção de acidentes (CORRÊA, 2009)

Dentre os métodos de determinação e quantificação de glifosato e seu principal metabólito encontrados na literatura, a análise por cromatografia líquida é a mais empregada, sendo os detectores mais utilizados para esse tipo de análise os UV, fluorescência, colorimétricos e por espectrometria de massas.

Além da cromatografia líquida, o glifosato e o AMPA podem ser analisados usando cromatografia gasosa. (CG). Para essa técnica

cromatográfica, a espectrometria de massas e a fotometria em chama são os detectores comumente usados.

Além das técnicas cromatográficas, existem outras técnicas que vêm sendo desenvolvidas tais como: ressonância magnética nuclear de P-31 (RMN 31P), espectrofotometria, polarografia e eletroforese (AMARANTE JUNIOR et al., 2002, A).

1.6 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas cromatográficas mais empregadas na atualidade. Esta técnica se difundiu a partir da década de 50 por Martin e Synge (prêmio Nobel de Química em 1952), sendo utilizada para separação de diversas substâncias, para análises qualitativas e quantitativas.

Essa técnica cromatográfica apresenta muitas vantagens para as análises de combinações orgânicas. Amostras não voláteis e termolábeis são preferencialmente analisadas por HPLC devido à sua agilidade, sensibilidade e precisão nas medições realizadas pelo equipamento, que apesar de sofisticado e de alto custo, possui aplicação em diversos tipos de matrizes, tais como: fitoterápicos, aminoácidos, proteínas, antibióticos, hidrocarbonetos, carboidratos, drogas, pesticidas, entre outros. (SKOOG; HOLLER, 1992 ; SNYDER et al., 1997).

Fundamentalmente, a amostra a ser analisada é distribuída entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária. A fase estacionária compreende uma fase fixa de um líquido em sólido, ou sólido fixo,

ou material orgânico aderido a uma superfície sólida ou uma resina de troca iônica, ou um líquido presente em um sólido polimérico (SKOOG; HOLLER, 1992; SNYDER et al., 1997).

As separações dos analitos são alcançadas por diferentes maneiras de acordo com o grau de retenção e tipo de equilíbrio envolvido, como por exemplo: partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária. A Figura 8 mostra a representação esquemática dos principais componentes do equipamento de HPLC.

Figura 08: Equipamento básico de HPLC. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador

Reservatório da fase móvel: dependendo da natureza do analito, são utilizados solventes orgânicos tais como: metanol, acetonitrila, tampões, entre outros.

Bomba de alta pressão: as mais utilizadas são de fluxo constante podendo ser do tipo seringa e recíprocas. As bombas apresentam grande

flexibilidade para atingir vazões de 0,1 a 10,0 mL min⁻¹, com grande flexibilidade e pequena margem de erro (REIMBERG, 2006).

Válvula injeção ou injetor: o método mais empregado de introdução da amostra em HPLC é baseado num sistema de válvula de amostragem ou “loop”. Frequentemente, as válvulas estão disponíveis para permitir a escolha do volume da amostra de 5 a 500 µL. Muitos instrumentos de HPLC incorporam auto-amostradores que operam em conjunto com injetores automáticos podendo injetar volumes variáveis (SKOOG et al., 2002).

Coluna: são geralmente construídas de aço inoxidável, capaz de suportar até 6000 psi de pressão, embora tubos de vidro sejam algumas vezes empregados em aplicações de baixa pressão (< 600 psi). A maioria das colunas apresenta comprimento na faixa de 10 a 30 cm e possui diâmetros internos entre 2 e 5 mm. Os recheios da coluna são geralmente de sílica e apresentam partículas de diâmetros entre 3 e 10 µm. (SKOOG et al., 2006).

Detector: o detector de absorção no UV é baseado no princípio de absorção de radiação no ultravioleta, ou de radiação visível, quando o efluente da coluna passa por uma pequena célula de escoamento atravessada pelo feixe de radiação. (NOSSACK, 2001).

Existem três tipos diferentes de detectores UV: o detector de comprimento de onda fixo, o detector de comprimento de onda variável e o detector por arranjo de diodos. No primeiro tipo, apenas um comprimento de onda é utilizado, restringindo-se a análises de compostos que absorvam no comprimento de onda em que eles operam. No detector de comprimento de onda variável, é possível escolher um comprimento mais adequado a cada análise. Estes podem emitir luz ultravioleta por lâmpada de deutério como

também na região do visível, utilizando-se lâmpada de tungstênio, cobrindo uma faixa de 190-800 nm, não havendo necessidade de troca das lâmpadas. (VILA, 2006).

Já os detectores de arranjo de diodos fornecem espectros no UV-Vis do eluente da coluna em determinados intervalos de tempo. Em um arranjo de diodos, os elementos fotosensíveis individuais são pequenos fotodiodos de silicone. São especialmente úteis para o desenvolvimento de métodos, por possibilitarem uma “varredura” da região UV-Vis em uma única corrida cromatográfica, para medidas de pureza de iço e para a análise de amostras desconhecidas (CASS, DEGANI, 2001).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi criar uma nova metodologia analítica verde para determinação de glifosato em águas e no solo em diversos pontos de amostragem nos rios Ribeirão do Feijão e Jacaré-Guaçu na cidade de São Carlos - SP.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi elaborar um método simples e robusto usando alguns princípios da Química Verde como uma alternativa eficaz para determinação de glifosato em amostras de água e solo.

2.1 - Objetivos específicos

a) Determinar glifosato em águas, eliminando as etapas de extração e clean-up via injeção direta das amostras no HPLC.

b) Validar metodologia para determinação de glifosato nas amostras de água e solo.

c) Propor uma metodologia sem o uso de solventes orgânicos, que além dos seus elevados custos ainda causam problemas ao meio ambiente.

3. VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Em análises químicas, gerar resultados isentos de erros e incertezas é uma tarefa praticamente impossível. Em cada operação que constitui a análise química há uma incerteza associada. Cada operação ou conjunto de operações deve ser realizado de modo adequado e correto para que os resultados gerados tenham validade. É necessário que a qualidade das medições químicas seja demonstrada por meios rastreáveis e comparáveis. Isso permite que, ao final de uma análise química, os resultados possam atender, por exemplo, às exigências das regulamentações nacionais e internacionais em que pese a necessidade de valores de análises confiáveis. Dessa forma, para garantir informações seguras e confiáveis é realizada uma avaliação denominada validação de ensaio químico (ICH, 1994).

De maneira geral, o processo de validação de um método tem como objetivo fornecer evidências de que o método é adequado pra realizar o que se propõe com exatidão, reprodutibilidade e credibilidade (HUBER, 2000).

O desenvolvimento de um novo método já validado, quando bem definido e documentado, deve sempre fornecer evidências organizadas, claras e objetivas de que o método e o sistema são adequados para o uso desejado.

Não há um consenso a respeito de quais parâmetros devem ser validados, variando de uma área para outra. No entanto alguns órgãos e instituições criaram guias de validação que são facilmente aceitos (LANÇAS, 2004). Dentre os órgãos podemos citar: USA-FDA, ANVISA E MAPA entre outros.

No presente estudo, o procedimento de validação da metodologia incluiu os seguintes parâmetros de desempenho: Especificidade/Seletividade, Faixa

de trabalho e Faixa linear de trabalho, Linearidade, Sensibilidade, Limite de Detecção, Limite de Quantificação, Exatidão, Precisão e Robustez, que estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 02. Parâmetros que geralmente fazem parte de um processo de validação.

Parâmetro	Definição
Exatidão	Expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência.
Precisão	É a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra.
Linearidade	É a resposta obtida em virtude da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado.
Limite de Detecção	Corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato.
Limite de Quantificação	Corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada.
Seletividade	Corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação.
Recuperação	É uma medida da eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz

	na qual se encontra presente.
Robustez	É uma medida da capacidade de um método de não sofrer alterações em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método.

3.1 - Curva Analítica

Para a construção da curva analítica foram preparadas cinco soluções em água nas concentrações 50, 75, 150, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de um padrão analítico glifosato PESTANAL, N-(FOSFONOMETIL) GLICINA (99,7%.) que foi adquirido da SIGMA-ALDRICH, Catalogo: 45521, lote: 8014X, validade: 14/10/2015. As soluções foram injetadas (em triplicata) em um sistema HPLC/UV.

3.2 - Seletividade

A seletividade do método é realizada para avaliar se possíveis interferentes eluem no mesmo tempo de retenção do composto de interesse. Para realizar tal procedimento, foi coletada água de um rio poluído com esgoto, que passou pelo procedimento descrito no item 4.5.1 (para injeção de amostras de água) e, em seguida foi injetado em um sistema HPLC-UV.

3.3 - Fortificações

As amostras de água foram fortificadas em três níveis de concentração para se avaliar a recuperação e a exatidão do método. As fortificações foram realizadas com a água coletada no Ribeirão do Feijão e no Jacaré-Guaçu.

Uma solução estoque foi preparada utilizando o padrão de glifosato na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e injetada em triplicata. Foram preparadas outras soluções nas concentrações de 50, 100 e $300 \mu\text{g L}^{-1}$ com adição de H_3PO_4 até $\text{pH} = 2,0$.

3.4 - Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer sinais que sejam diretamente proporcionais à quantidade do analito em um determinado intervalo de concentração. A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a concentração da espécie, na maioria dos casos é definida por uma equação matemática, que pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as curvas analíticas devem ser construídas por cinco pontos.

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser realizada a partir de método matemático conhecido como regressão linear (ICH, 1995).

Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir de pontos experimentais, o coeficiente de correlação **r**. A recomendação do INMETRO para o coeficiente de correlação é de valores acima de 0,90, já a ANVISA recomenda valores superiores a 0,99 (INMETRO, 2003).

A relação matemática utilizada para o cálculo da concentração dos analitos pode ser obtida usando o modelo conhecido como regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados, e é definida pela equação da reta $y = a_x + b$, onde:

y = resposta medida ou sinal analítico

x = concentração do analito, variável independente

a = inclinação da curva analítica

b = intersecção da curva com a ordenada, quando x = 0 (coeficiente linear).

A escolha da regressão pelo modelo linear e a verificação do ajuste em função dos valores experimentais da curva podem ser avaliados pela análise da variância. Calcula-se a porcentagem máxima de variação explicável para os dados experimentais e a porcentagem de variação explicada (r^2), (Barros Neto et al., 1996).

3.5 - Limite de detecção e quantificação

É definido como a menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada como um valor exato.

O limite de detecção (LD) pode ser expresso como:

$$LD = \frac{3,3 \cdot s}{S}$$

Onde;

s = desvio padrão da resposta

S = inclinação (tangente) da curva analítica

O “s” é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e **S** é a inclinação (tangente) ou coeficiente angular da curva analítica.

Limite de quantificação (LQ) é considerado como a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental. O LQ segue o mesmo princípio do LD, porém com a relação sinal/ruído de 10:1, ou seja, $LQ = \frac{10 \cdot s}{S}$. Na maioria das vezes, o LQ é determinado como sendo o ponto de menor concentração da curva analítica, excluindo-se o branco (ICH, 1995).

3.6 - Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Normalmente, a precisão é avaliada em termos de desvio-padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR), conhecida como coeficiente de variação (CV), é expressa pela equação:

$$CV\% = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100$$

Para o qual:

$\bar{x}$ = média aritmética das medições;

s = desvio padrão das medições;

A taxa de aceitação de DPR nos processos de validação de métodos analíticos é de até 20%, dependendo do protocolo e da complexidade da amostra. Assim, a precisão em validação de métodos analíticos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (RIBANI et al., 2004).

- **Repetitividade:** representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo local, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições e repetições em curto espaço de tempo.
- **Precisão intermediária:** representa a precisão sobre a mesma amostra quando um método é aplicado várias vezes pelo mesmo laboratório, porém variando condições como analistas, equipamentos e tempos diferentes (INMETRO, 2000).
- **Reprodutibilidade:** É o grau de concordância entre os resultados de medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos etc...(INMETRO, 2000).

3.7 - Robustez

É a habilidade do método em fornecer resultados inalterados quando sujeito a pequenas mudanças na execução de experimentos analíticos. Em métodos cromatográficos, o ensaio de robustez mede a sensibilidade do método variando-se a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em HPLC.

A robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de metanol na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5^{\circ}\text{C}$ (RIBANI et.al, 2004).

Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser introduzidas ao procedimento.

3.8 - Exatidão

Consiste no grau de aproximação entre o resultado de um experimento e o valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição padrão.

A avaliação da exatidão do presente método foi realizada no estudo de recuperação que consiste na fortificação (“spike”) da amostra com concentração conhecida do analito de interesse em pelo menos três níveis distintos, sendo, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração intermediária ao intervalo estimado. A recuperação é calculada conforme a equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_{\text{experimental}}}{C_{\text{teórica}}} \times 100$$

onde:

$C_{\text{experimental}}$: é a concentração encontrada

$C_{\text{teórica}}$: é a concentração adicionada

Todos os frascos usados para a coleta de água foram previamente imersos em solução de detergente Extran alcalino (Merck) por 24 horas e enxaguados sucessivamente, 6 vezes em água corrente, 3 vezes em água destilada, 1 vez com água isenta de orgânicos e 1 vez com acetona. A secagem foi feita em estufa (exceto material volumétrico). Os frascos foram enxaguados com a própria amostra durante a coleta. As amostras de solo foram coletadas com o auxílio de uma cavadeira. Após o procedimento de coleta e das análises *in situ*, as amostras de água foram conservadas a 4 °C em geladeira e as amostras de solo foram mantidas sob refrigeração no freezer a - 10 °C.

Os pontos de coleta no Alto Jacaré-Guaçu são mostrados no mapa da Figura 10 e nas figuras de 11 a 19. Na tabela 3 apresentam-se os pontos de coleta com a sua exata localização e amostragem.

Figura 10 - Rede hidrográfica da bacia do alto Jacaré-Guaçu indicando os pontos de amostragem (RODRÍGUEZ, 2001, com modificações).

Tabela 03 – Pontos de coleta com a sua exata localização e amostragem

Pontos de coleta	Localização	Amostragem
1 ou F1	Ribeirão do Feijão na ponte sobre a estrada, aproximadamente a 3,5 km das nascentes	Água e solo
2 ou F2	Ribeirão do Feijão, dentro da Fazenda Yolanda, a montante da casa principal.	Água e solo
3 ou F3	Córrego do São José (formador do Córrego do Laranja Azeda, afluente do Ribeirão do Feijão)	Água e solo
4 ou F4	Córrego do Laranja Azeda, na Fazenda Yolanda	Água e solo
5 ou F5	Ribeirão do Feijão, a montante da captação do SAAE.	Água e solo
6 ou J1	Rio Jacaré-Guaçu, após a confluência dos Ribeirões do Feijão e Lobo.	Água e solo
7 ou J2	Rio Jacaré-Guaçu, após a ponte a jusante da Represa de Santa Ana	Água e solo
8 ou J3	Rio Jacaré-Guaçu, antes da confluência com o Rio do Monjolinho	Água e solo
9 ou J4	Rio Jacaré-Guaçu, aproximadamente 500 m após da confluência com o Rio do Monjolinho.	Água e solo
10 ou M3	Rio Monjolinho, após a entrada do Córrego da água Fria.	Água

Figura 11: Ponto de coleta 1

Figura 12: Ponto de coleta 2

Figura 13: Ponto de coleta 3

Figura 14: Ponto de coleta 4

Figura 15: Ponto de coleta 5

Figura 16: Ponto de coleta 6

Figura 17: Ponto de coleta 7

Figura 18: Ponto de coleta 8

Figura 19: Ponto de coleta 9

4.2 – Materiais e métodos

Tabela 04: Padrões e solventes utilizados.

<i>Padrões</i>	<i>Solventes</i>
Glifosato (SIGMA-ALDRICH)	Ácido Fosfórico (Sigma)
	Água Milli- Q-SistemaMillipore
	Metanol- Tedia (grau HPLC)
	Ácido Acético Glacial (Sigma)

4.2.1 - Equipamentos

- Mesa Agitadora- TECNAL
- TOC-V_{CPH} modelo SSM-5000A, Shimadzu
- Sistema HPLC Shimadzu
- Balança Analítica - SCIENTECH AS 210
- Balança Semi Analítica – BG 1000 GEHAKA
- Estufa – QUIMIS
- Espectrofotômetro UV-Vis- JASCO V-630
- Agitador- QUIMIS
- pHmetro – pH Meter Tec- 2- TECNAL
- Centrifuga HITACHI- himac CR 20B2
- Mufla –EDGCON- 1P.

4.2.2 - Outros Materiais

- Hidróxido de sódio-Synth
- CaCl₂ 0,01 mol.L⁻¹
- Filtro seringa Cel Reg 0,45 µm de diâmetro (Minisart RC 15) para filtração
- Papel de filtro comum
- Peneira número 10
- Solução defloculante (Synth)
- Dihidrogeno-fosfato de Potássio
- Pirofosfato de sódio 0,1molL⁻¹
- Dicromato de Potássio
- Ácido Sulfúrico – Synth (P.A)

4.3 - Características físico-químicas das amostras

Determinaram-se as características químicas, como pH, teor da taxa de umidade e da matéria orgânica, CTC, matéria húmica total e determinação de carbono orgânico total das amostras de solo coletadas.

4.3.1 - Determinação do pH das amostras de solo

Para determinação do pH pesaram-se 5,00 g de amostra seca em estufa a aproximadamente 50 °C por 24 horas que foi transferida a um erlenmeyer de 125 mL, juntamente com 50 mL de CaCl_2 0,01 mol.L⁻¹, e após 30 minutos de agitação determinou-se o pH em suspensão.

4.3.2 - Determinação da taxa de umidade e do teor de matéria orgânica (MO)

A determinação da taxa de umidade e o teor de matéria orgânica foram realizados pesando-se aproximadamente 5,00 g de amostra em cadinho de porcelana; o mesmo foi levado à estufa à temperatura de 100 a 110 °C por 12 horas. A taxa de umidade é calculada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ umidade} = \frac{100 \cdot (M_{\text{úmida}} - M_{\text{seca}})}{M_{\text{úmida}}}$$

Após medir a massa, o cadinho que continha a amostra (agora sem a umidade), foi levado à mufla por 4 horas a 500°C para combustão da matéria orgânica. Após esse tempo, o cadinho foi novamente pesado, e através das diferenças entre as massas calculou-se o teor de matéria orgânica.

4.3.3 - Determinação da capacidade de troca catiônica (CTC)

Na determinação da CTC pesaram-se aproximadamente 2,50 g de amostra seca, transferiu-se a mesma para um erlenmeyer de 125 mL e adicionaram-se 25 mL de CH_3COOH 1 mol L^{-1} . A mistura foi levada à agitação orbital constante durante 1 hora. Após a agitação, mediu-se o pH da solução em suspensão e realizaram-se os seguintes cálculos para se determinar a CTC da amostra a partir da seguinte equação (MAPA, 2007):

$$\text{CTC} = (\text{pH}_1 - \text{pH}_2) \times 22$$

Onde,

pH_1 = pH da suspensão

pH_2 = pH da solução de ácido acético

22 = Constante logarítmica

4.3.4 - Extrato húmico total (EHT)

O extrato húmico total foi determinado a partir da pesagem com precisão de 0,1 mg de uma quantidade de amostra previamente seca e pulverizada. Transferiu-se para um erlenmeyer de 250 mL e acrescentaram-se 100 mL de uma solução extratora recém preparada, com 44,5 g de $\text{NaP}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ em água com a adição de 4 g de NaOH completando-se o volume até 1 litro.

Tampou-se o erlenmeyer e agitou-se por 30 minutos em agitador Wagner a 40-50 rpm. Transferiu-se o conteúdo do erlenmeyer para o tubo de centrífuga e ajustou-se a velocidade da centrífuga para 4000-4500 rpm e promoveu-se a centrifugação por 25 minutos.

Transferiu-se a solução sobrenadante para balão volumétrico de 1000 mL. Repetiu-se a operação de centrifugação por até 5 vezes, adicionando alíquotas de 100 mL da solução extratora, até que o líquido de extração permanecesse incolor ou levemente corado. Todos os extratos foram completados com água destilada no balão volumétrico de 1000 mL e homogeneizados. A esta solução denominou-se “extrato húmico total”.

Tomou-se 50 mL do extrato, medido com pipeta volumétrica, para um erlenmeyer de 250 mL. Levou-se a um banho-maria a 90°C e evaporou-se até a secura. Acrescentaram-se 10 mL de $K_2Cr_2O_7$ 0,20 mol L⁻¹ e, em seguida, 20 mL de H_2SO_4 concentrado, agitando suavemente. A suspensão foi coberta com vidro de relógio e deixou-se em repouso por 30 minutos, para esfriar.

Transferiu-se o erlenmeyer tampado com o vidro de relógio para uma chapa aquecedora por 30 minutos, levando a temperatura acerca de 140°C.

Terminado o tempo de reação, retirou-se o erlenmeyer da chapa e deixou-se esfriar, sempre coberto com o vidro de relógio. Acrescentaram-se aproximadamente 100 mL de água destilada, 10 mL de H_3PO_4 e deixou-se esfriar. Em seguida, acrescentou-se 0,5-1mL da solução indicadora de difenilamina e titulou-se com a solução de sulfato ferroso amoniacal.

Conduziram-se, simultaneamente, pelo menos duas provas em branco, omitindo-se a presença do extrato-amostra. O teor percentual e carbono orgânico (m/m) é dado por:

$$\%C = \frac{36C(Vb - Va)}{G} \quad , \text{ onde:}$$

C = concentração da solução de sulfato ferroso amoniacal

Va = volume da solução de sulfato ferroso amoniacal gasto na amostra.

Vb = volume médio da solução de sulfato ferroso amoniacal gasto nas replicatas da prova em branco.

G = massa inicial da amostra

O cálculo de teor de carbono orgânico é efetuado com base na premissa de que cada mol de $K_2Cr_2O_7$ consumido reage com 1,5 mol de carbono orgânico (MAPA, 2007).

A porcentagem de EHT é dada por:

$$\%EHT = 1,724 \cdot \%C$$

4.3.5 - Determinação de carbono total

Para a avaliação do carbono total, 100 mg da amostra seca em estufa a 50°C por 24h foram introduzidos no tubo de combustão e oxidados cataliticamente a uma temperatura de 900 °C, sendo os componentes do carbono total convertidos a dióxido de carbono e determinados por infravermelho. A calibração do aparelho foi feita usando-se um padrão de carbono na forma de biftalato, construindo-se a curva de calibração.

Para a análise foi utilizado um aparelho carbono total, modelo TOC-V_{CPH}, acoplado ao módulo de amostras sólidas, modelo SSM-5000A, marca SHIMADZU com detector de combustão.

4.4 - Análises granulométricas do solo

Foi realizada análise granulométrica das amostras do solo utilizado no estudo para fins de caracterização da composição do mesmo. A análise granulométrica foi realizada seguindo a norma técnica NBR 7181/1984 (ABNT, 1984). Para a análise do solo utilizou-se um jogo de peneiras de número: 4, 10,

16, 30, 50, 100, 200, a qual foi agitada em mesa agitadora por 15 minutos. As determinações das frações silte e argila são feitas pelo método do densímetro, segundo a mesma norma técnica (ABNT, 1984).

Os ensaios de Análise Granulométrica Conjunta foram realizados no departamento de Geotecnia no laboratório de Mecânica dos solos da EESC-USP.

4.5 - Preparo das amostras para a determinação em HPLC

4.5.1 - Água

As amostras de água foram previamente acidificadas com ácido fosfórico até pH = 2,0 e filtradas através de um filtro de seringa com membranas de 0,45 µm e injetadas no sistema HPLC/UV.

4.5.2 - Solo

As amostras de solo foram colocadas em estufa por 24 horas à temperatura de 40 °C.

O estudo de recuperação foi realizado utilizando três níveis de concentrações, baixo (1 mg L⁻¹), médio (2 mg L⁻¹) e alto (3 mg L⁻¹). Foram realizadas extrações sólido-líquido utilizando-se uma mistura extratora proveniente de um sal de KH₂PO₄ mol L⁻¹ em água.

4.6 - Procedimento

- Foram pesados 5 g das amostras de solo para todos os pontos de coleta.

- Fortificaram-se as amostras para os três níveis de recuperação adicionando 5 mL de glifosato a 1 mg L^{-1} , 2 mg L^{-1} e 3 mg L^{-1} e foram deixadas em repouso por 1 hora.
- As amostras foram submetidas ao processo de extração (sólido-líquido) com a adição de 20 mL de solução de KH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.
- Agitaram-se as amostras na mesa agitadora por 45 minutos entre 100-200 agitações por minuto.
- O sobrenadante foi separado.
- Uma alíquota do sobrenadante foi filtrada em uma seringa com membrana de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro.
- Analisaram-se as amostras em HPLC/UV.

Figura 20: Fluxograma das etapas da metodologia para determinação de glifosato em solo

4.7 - Testes com outros solos

Os testes foram realizados seguindo os passos do procedimento descrito no fluxograma da figura 20 visando a uma boa recuperação do herbicida em dois outros diferentes tipos de solo. Utilizaram-se solo do campus 2 da USP em São Carlos e solo de uma fazenda da região de São Carlos.

4.8 - Preparação das soluções padrão

Preparou-se uma solução padrão estoque de 3 mg L⁻¹ do herbicida glifosato em água.

A partir de diluições da solução estoque, obtiveram-se as soluções padrão adequadas para a análise.

4.9 - Determinação das Condições Cromatográficas

As análises foram realizadas em um HPLC modelo LC-10AVP equipado com detector de UV-Vis SPD-10VP da Shimadzu.

Para seleção do melhor comprimento de onda de detecção, mediu-se a absorção do analito na região de 190 a 500 nm. O resultado pode ser visualizado na **Figura 21**.

Figura 21: Comprimento de onda para absorção de luz UV/Vis para o glifosato em estudo ($500 \mu\text{g L}^{-1}$).

A fase móvel utilizada foi um tampão preparado usando 0,68g de KH_2PO_4 com adição de ácido fosfórico (85%) até $\text{pH}=2$, completando o volume para um litro de água ultra-purificada (Milli-Q) em sistema isocrático de eluição com uma vazão de $2,3 \text{ mL min}^{-1}$.

Devido a sua alta polaridade e por não ser uma molécula volátil, o glifosato foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com coluna de troca aniônica, PARTISIL 10SAX com 250 mm de comprimento por 4,6 mm de D.I. (diâmetro interno) e tamanho da partícula igual a $10 \mu\text{m}$.

A temperatura da coluna foi mantida a 25°C e o comprimento de onda de detecção em 195 nm. O volume de injeção permaneceu constante em $20 \mu\text{L}$.

Diante dos dados de comprimento de onda obtidos (Figura 21), selecionou-se o comprimento de onda de 195 nm, no qual havia melhor absorção do analito. Portanto, fixou-se o comprimento de onda para detecção em 195 nm para as análises das amostras de água, assim como para as amostras de solo.

4.10 - Estudo de adsorção

As amostras de solo foram previamente secas em estufa a 40 °C por 24 horas. Foram adicionados 5 mL dos padrões de glifosato a 1 mg L⁻¹ em cada amostra.

A solução permaneceu em repouso por 1 hora. Uma alíquota de cada amostra foi filtrada com um filtro de seringa com membranas de 0,45 µm de diâmetro e injetadas no sistema HPLC/UV sob as condições descritas no item 4.9.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Caracterização das amostras de solo

Os resultados da determinação de pH, teor de matéria orgânica, umidade, CTC efetiva, porcentagem de MHT da MO e carbono total das amostras de solo são mostrados na tabela 5.

Tabela 05 – Determinação do pH, teor de matéria orgânica, umidade, CTC efetiva, porcentagem de MHT da MO e carbono total em solo.

Ponto de amostragem	pH	Teor de MO (%)	Umidade (%)	CTC Efetiva (cmol _c kg ⁻¹)	(%) Matéria Húmica Total da MO	Carbono Total (g kg ⁻¹)
1	3,89	3,54	4,43	3,74	24,98	17,49
2	5,0	4,56	3,11	6,82	31,51	55,84
3	5,48	10,82	7,87	5,94	39,54	36,99
4	5,93	4,50	3,56	0,88	4,40	3,73
5	4,97	2,65	1,27	5,06	18,15	38,17
6	4,12	2,80	2,55	2,42	6,57	8,25
7	5,73	2,77	2,64	1,98	5,94	2,87
8	5,08	5,31	4,56	1,81	20,74	31,64
9	4,75	3,09	2,33	5,28	14,49	35,26

Uma representação gráfica dos resultados de caracterização versus pontos de amostragem é mostrada na (Figura 22) com dados de pH, teor de MO, umidade e CTC efetiva do solo.

Figura 22 – Gráfico de dados de caracterização versus pontos de coleta.

O solo é formado pelos constituintes minerais e orgânicos, entre outros. Um solo produtivo pode ter, por exemplo, 5 % de MO e 95 % de matéria inorgânica. Inversamente, solos como turfa podem conter até 95% de MO. Apesar de pequena a quantidade de MO, em comparação à quantidade de material inorgânico em solos produtivos, a fração orgânica do solo desempenha um papel fundamental na regulação dos processos químicos (REZENDE, 1999).

De maneira geral, as porcentagens de matéria orgânica foram baixas para todas as amostras de solo. O ponto 3 apresentou a maior porcentagem de

matéria orgânica. Já a umidade dos solos estudados, variou de 1,27 a 7,87% com uma média de 3,59%.

Nos solos podem ser encontrados valores de pH variando de 3,0 a 10, com variação mais comum nos solos brasileiros entre 4,0 e 7,5. Desta forma, com exceção do ponto 1, pode-se ver que os valores encontrados coincidem com os valores encontrados para solos brasileiros. Solos com pH abaixo de 7,0 são chamados de solos ácidos. As amostras de solo em sua totalidade apresentaram pH abaixo de 7,0, ou seja, solos ácidos.

5.2 - Determinação da CTC efetiva e matéria húmica total

Os valores mais elevados para a CTC das amostras de solo foram observados no ponto de amostragem 2 e os menores no ponto 4. Solos com uma CTC $< 5 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ são considerados solos com uma baixa CTC.

As determinações da CTC efetiva e matéria húmica total no solo são mostrados na Tabela 5.

A CTC é definida como a quantidade de cátions que um solo (ou constituintes do solo) pode reter nas suas cargas negativas (RAIJ et al., 1996). As cargas negativas existentes nos ácidos húmicos são originárias dos grupos carboxílicos e fenólicos, devido à presença de hidrogênios dissociáveis. A dissociação do hidrogênio deixa sítios negativos nas substâncias húmicas, os quais podem atrair outros cátions como cálcio, magnésio e potássio. O grau de dissociação depende do pH do meio (REZENDE, 1999).

Os grupos funcionais ácidos, carboxílicos e fenólicos, são os principais responsáveis pelas interações que ocorrem entre os ácidos húmicos e

moléculas orgânicas, tais como os pesticidas. As quantidades desses grupos nos ácidos húmicos variam de acordo com a natureza do material.

Vários modelos foram propostos para os mecanismos de adsorção de pesticidas no solo. A interação pode ser de natureza física ou química, conforme o pesticida adsorvido e as condições do meio, sendo que pode ocorrer, simultaneamente, mais de um mecanismo. O modo de dissipação de pesticidas pode ser através da proposição de mecanismos de interação com as substâncias húmicas da fração orgânica do solo.

Segundo Senesi (1992), aqueles pesticidas que em solução estão na forma catiônica ou aqueles que podem se protonar sofrem adsorção via ligação ou troca iônica. Esse mecanismo envolve grupos ionizáveis ou facilmente ionizáveis como os grupos carboxílicos e ou fenólicos das substâncias húmicas.

A maior porcentagem de matéria húmica total foi encontrada no ponto 3 e a menor porcentagem foi encontrada no ponto 4.

5.3 - Carbono Total

A concentração de carbono total variou de 2,87 mg L⁻¹ a 55,84 mg L⁻¹, as amostras de solo do ponto 7 apresentaram a menor concentração de carbono orgânico total e as amostras do ponto 2 apresentaram a maior concentração. As determinações de carbono total em amostras de água são mostradas na Tabela 6.

Já na Tabela 6, apresentam-se algumas características físico-químicas das amostras de água.

Tabela 06 – Determinações de carbono total e das características físico-químicas nas amostras de água.

Pontos de amostragem	Carbono Total (mg L ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Cor (uH)	Turbidez (NTU)
1	12,24	6,53	15	161	20,4
2	10,13	6,13	14	108	8,09
3	20,36	5,81	15	130	9,71
4	12,35	6,33	15	179	16,5
5	11,23	6,34	16	147	13,5
6	15,44	5,98	17	139	19,2
7	17,20	6,72	16	142	16,3
8	17,17	6,91	17	173	19,4
9	22,81	5,84	15	151	9,07

Para as amostras de água a concentração de carbono total foi de 10,13 a 22,81 mg L⁻¹, sendo que a amostra 2 apresentou a menor concentração de carbono total e a amostra 9 com a maior concentração.

5.4 - Análises granulométricas

Na avaliação das características físico-químicas dos solos, devem ser considerados os grânulos de argila, silte, areia e material grosso.

A análise granulométrica dos solos revelou que a fração areia predominou em todos os pontos e as outras frações ficaram divididas entre silte

e argila. Apenas o ponto 6 apresentou pedregulhos médio e os pontos 2, 3 e 6 apresentaram pedregulhos finos em comum.

Os resultados das determinações granulométricas nos solos dos 9 pontos de coleta podem ser vistos na figura 23 e na Tabela 7.

Figura 23 – Percentagem granulométrica das amostras de solo.

Tabela 07 – Análise granulométrica e classificação dos solos.

Pontos de amostragem	Argila (%)	Silte (%)	Areia Fina (%)	Areia Média (%)	Areia Grossa (%)	Pedregulo Fino (%)	Pedregulho Médio (%)	Classificação
1	24,9	9,8	16,3	42,3	6,7	0,0	0,0	Areia média a fina argilosa marrom escuro
2	14,5	24,1	23,4	29,8	7,8	0,4	0,0	Areia média a fina siltosa marrom escuro
3	6,0	9,2	49,8	28,7	6,0	0,3	0,0	Areia fina a média siltosa marrom escuro
4	1,1	0,8	48,1	48,7	1,3	0,0	0,0	Areia média a fina argilosa marrom escuro
5	7,6	2,5	51,9	37,6	0,4	0,0	0,0	Areia média a fina siltosa com presença de pedregulhos médio a fino marrom escuro.
6	10,7	11,7	22,6	33,2	6,6	7,4	7,8	Areia fina a média argilosa marrom intermediário
7	1,4	2,1	9,5	73,6	13,4	0,0	0,0	Areia média a grossa siltosa marrom claro
8	8,4	9,2	44,4	35,6	2,4	0,0	0,0	Areia fina a média argilosa marrom escuro
9	9,0	6,5	39,5	43,1	1,9	0,0	0,0	Areia média a fina argilosa marrom escuro

5.5 - Determinação Cromatográfica

5.5.1 - Validação da análise química do glifosato

Para a construção da curva analítica foram preparadas cinco soluções em água nas concentrações 50, 75, 150, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de um padrão analítico de glifosato.

Os cromatogramas das diferentes soluções padrão encontram-se na Figura 24.

Figura 24 - Cromatogramas das diferentes concentrações da solução padrão de glifosato para construção da curva analítica

O método utilizado apresentou-se linear com coeficientes de correlação significativos dentro da faixa de concentração de 50 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. A Figura 25 representa a curva analítica obtida a partir desses resultados.

Figura 25 - Curva analítica obtida para o glifosato.

A equação da reta foi $y = 25284,7192x - 187,6813$

Os coeficientes de relação (r) e determinação (r^2) calculados para esta curva foram: $r = 0,9982835$ e $r^2 = 0,99657$, respectivamente.

5.5.2 - Seletividade

Para os testes de seletividade, as amostras de água foram coletadas no Rio Monjolinho na cidade de São Carlos – SP (Figura 10, ponto M3). É importante enfatizar a presença de interferentes na amostra em decorrência da contaminação do rio com descarte de esgoto.

A seletividade do método foi avaliada pela adição da substância padrão (analito) à matriz, nesse caso água. Nenhum interferente eluiu no mesmo tempo de retenção do glifosato.

A determinação cromatográfica por HPLC/UV apresentou boa seletividade, como pode ser observado na Figura 26.

(a)

(b)

Figura 26 - Cromatogramas da amostra de água fortificada com $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato (a) e da solução padrão (b).

5.5.3 - Fortificações

As amostras de água foram fortificadas em três níveis de concentração para se avaliar a recuperação e a exatidão do método. As fortificações foram realizadas com a água coletada no Ribeirão Feijão.

Foram preparadas outras soluções nas concentrações de 50, 100 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ com adição de H_3PO_4 até $\text{pH} = 2,0$. Os cromatogramas são apresentados na Figura 27.

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 27 - Cromatogramas das amostras de água fortificadas com 50 mg L⁻¹ (a), 300 mg L⁻¹ (b), 500 mg L⁻¹ (c) e da solução padrão (d)

Os valores de recuperação e os coeficientes de variação para as amostras de água são apresentados na Tabela 8.

Tabela 08 - Eficiência na recuperação obtida para o glifosato.

Nível de Fortificação	Recuperação	CV
($\mu\text{g. L}^{-1}$)	(%)	(%)
50	86,0	18,6
300	103,66	4,18
500	114,80	2,43

A recuperação dos níveis de fortificação foi calculada por comparação a partir da injeção em triplicata da solução-padrão diluída em água de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato. Outras soluções padrão preparadas com a mesma solução estoque diluída em água nas concentrações de 50, 300, 500 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de glifosato foram acidificadas com H_3PO_4 e injetadas em sistema HPLC/UV. Seus valores de área foram comparados com os valores de área da solução estoque para o cálculo da recuperação

A recuperação variou de 86 a 114,8 % para o glifosato, sendo considerados resultados excelentes, visto que se encontram na faixa de recuperação, entre 70-120%, recomendada pela EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1990). O método apresentou boas recuperações, mesmo com a amostra de água apresentando interferentes como mostrado na Figura 26.

Além disso, observa-se pela Tabela 8 que o método empregado possui boa precisão, porque o coeficiente de variação porcentual (CV) é inferior a 15 % em todos os níveis de fortificação (RIBANI, et. al., 2004).

5.5.4 - Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do equipamento foram calculados pela relação de 2 ou 3 vezes a magnitude da linha de base com ruído. Os valores de LD e LQ, relativos ao equipamento nas condições analíticas utilizadas, foram 3,3 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (KRULL, 1998). Já os valores de LD e LQ, relativos ao método foram, respectivamente, de 9,93 e 30,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Isso indica que o método está adequado para detectar e quantificar o herbicida em baixos níveis de concentração.

5.5.5 - Branco do método

Não foi identificado nenhum pico interferente proveniente da fase móvel, solução extratora ou da fase sólida nas amostras de solo ou de água que podem coeluir com o composto de interesse. Na figura 28 apresentam-se os cromatogramas do branco.

(a)

Figura 28: Cromatogramas do branco de uma amostra de solo (a) e de água (b)

5.5.6 - Robustez

De acordo com o INMETRO, a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Em HPLC, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de metanol na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH, a temperatura da coluna em $\pm 5^\circ\text{C}$ e o comprimento de onda de detecção em $\pm 2\%$. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez (RIBANI, et al., 2004).

Para tanto, foram realizados testes com a adição de metanol até 20 mL no preparo de uma solução tampão fosfato de 1 L. O pH foi alterado em ordem crescente de 1,9 até 2,1. A temperatura da coluna foi modificada

progressivamente de 20°C a 30°C e o comprimento de onda de detecção manteve-se fixo em 191 e depois em 199 nm. As modificações dos parâmetros estudados em cromatografia foram avaliadas sob condições variadas, tais como mudança de operador e análises em dias diferentes. Mesmo com estas alterações, os resultados mostraram-se similares, o que confere a reprodutibilidade do método.

Na Figura 29 apresenta-se o cromatograma sem a variação em seus parâmetros.

Figura 29 - Cromatograma de 55 µg L⁻¹ de glifosato sob as condições descritas no item 4.9.

Já a Figura 30 apresenta o cromatograma com a variação máxima dos parâmetros citados anteriormente.

Figura 30 - Cromatograma de 73 µg L⁻¹ de glifosato sujeito as modificações em seus parâmetros.

Assim, os resultados gerados das medições do glifosato, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador e análises realizadas em dias diferentes) não foi afetado por modificações pequenas e deliberadas em seus parâmetros.

Além da robustez, a repetitividade que representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições; mesmo procedimento; mesmo local; repetições em curto intervalo de tempo foi testada apresentando resultados satisfatórios.

Os resíduos gerados, metanol para limpeza da coluna cromatográfica e a fase móvel $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, foram encaminhados ao Laboratório de Resíduos Químicos para tratamento adequado (ALBERGUINI et al., 2003).

5.5.7 - Análise de solo calcinado e solo arenoso

Nas amostras de solo previamente calcinadas do campus 2 da USP de São Carlos - SP foi adicionada uma solução defloculante preparada com hexametáfosfato de sódio em água para remoção de silte e argila da amostra. Este teste foi realizado já que o teor de silte e argila interferem na adsorção do herbicida. Da mesma forma o teor de matéria orgânica também pode afetar no processo de adsorção. (TONI; SANTANA; ZAIA, 2006).

O teste foi realizado nessas condições, buscando uma recuperação máxima do herbicida, já que provavelmente houve pouca adsorção do glifosato na amostra.

Na figura 31 apresenta-se o cromatograma da amostra de solo do campus 2.

Figura 31 - Cromatograma de uma amostra de solo do campus 2 da USP com 737,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato.

A recuperação do glifosato foi de 119,17 % e o coeficiente de variação de 0,14%.

Para a amostra de solo arenoso da fazenda a recuperação diminuiu consideravelmente dentro dos limites de aceitação, já que as concentrações da fração inorgânica e orgânica interferiram no processo de adsorção.

A Tabela 9 apresenta as características do solo estudado.

Tabela 09 – Algumas características do solo estudado.

CARACTERÍSTICAS	
pH	3,5
Teor de cinzas (%)	83,30
CTC ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	55
Teor de umidade (%)	11,76
Matéria orgânica (%)	1,0
Argila (%)	15,6
Silte (%)	4,7
Areia Total (%)	78,7

Assim, a recuperação do glifosato para essa amostra foi de 102,25 % e o coeficiente de variação de 4,40%.

A figura 32 mostra o cromatograma da amostra de solo arenoso da fazenda.

Figura 32 - Cromatograma de uma amostra de solo arenoso numa fazenda na região periférica de São Carlos. com $613,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato

5.5.8 - Análise das amostras de água em HPLC

Em nenhuma amostra de água natural foi encontrado o herbicida, o que já era de se esperar.

No ambiente, as concentrações mais altas de glifosato são encontradas no solo. A ocorrência de glifosato em água subterrânea foi citada uma única vez, no estado do Texas, EUA, reportado por Hallberg (1989), mas a concentração encontrada não foi especificada (AMARANTE JUNIOR et al., 2002, B).

5.5.9 - Análise das amostras de solo

Todas as amostras foram submetidas aos testes de adsorção. A solução padrão foi injetada na concentração de 1 mg L^{-1} e depois da adição de 5 mililitros da mesma solução-padrão na amostra, a suspensão permaneceu em

repouso por 1 hora. O mesmo procedimento foi adotado usando a solução-padrão nas concentrações de 2 mg L⁻¹ e 3 mg L⁻¹. Uma alíquota da suspensão previamente filtrada com um filtro de seringa com membrana de 0,45 µm de diâmetro foi injetada no sistema HPLC/UV. A adsorção foi calculada a partir da subtração da concentração obtida no preparo da solução padrão pela concentração encontrada após a suspensão ficar em repouso por 1 hora.

A Tabela 10 apresenta os valores de adsorção, fortificação, recuperação e coeficiente de variação (CV).

Tabela 10: Valores de adsorção, fortificação, recuperação e coeficiente de variação (CV) das amostras de solo

Ponto de Coleta	Adsorção (µg Kg ⁻¹)	Fortificação (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	CV (%)
1	361	1	98,59	14,28
		2	83,7	19,15
		3	99,45	7,34
2	416	1	94,2	2,7
		2	85,0	10,0
		3	112,67	7,08
3	235	1	84,05	14,7
		2	81,69	5,6
		3	92,37	3,30
4	14	1	113,4	1,34
		2	87,98	8,35
		3	112,5	1,35
5	332	1	87,6	5,13
		2	101,2	7,03
		3	106,4	7,74
6	88	1	85,53	18,6
		2	94,35	17,72
		3	97,77	13,08
7	44	1	105,54	4,46
		2	113,2	17,09
		3	92,74	4,51
8	297	1	105,9	9,40
		2	108,5	3,27
		3	106,93	11,97
9	258	1	78,1	9,48
		2	96,36	2,79
		3	110,06	5,10

As frações granulométricas mais importantes nas discussões sobre a influência na recuperação do herbicida são silte e argila. Essas partículas, de menor tamanho, apresentam maior potencial de adsorção do glifosato. Segundo Miles e Moye (1988), a porcentagem de recuperação do glifosato diminui com o aumento da porcentagem de argila e matéria orgânica no solo. Tal fato foi confirmado usando a técnica de HPLC com detecção fluorométrica.

Por outro lado, Alferness e Iwata (1994) realizaram um trabalho por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS), onde a porcentagem de recuperação do glifosato num solo com elevada quantidade de fração inorgânica (argila + silte), 85%, apresentou uma recuperação final de 93%, mostrando a disparidade entre os resultados mostrados por Miles e Moye (1988) que apontavam a diminuição da porcentagem de recuperação do herbicida com o aumento da argila.

No entanto, outro teste realizado por Alferness e Iwata (1994) com um solo composto por 66% de areia manteve-se com 97 % de recuperação do glifosato.

Sendo assim, é evidente que os valores de porcentagem de recuperação do glifosato estão relacionados à sua adsorção no solo. Para tanto, não existe uma regra para o aumento ou diminuição da adsorção. Por se tratar de uma matriz heterogênea, o solo pode apresentar diferenças nas porcentagens de recuperação e conseqüentemente nos coeficientes de variação.

Para efetuar os cálculos das porcentagens de recuperação do glifosato nos três níveis de fortificação, foram descontados os valores de adsorção, pois a maioria dos pontos de amostragem apresentou valores significantes.

A recuperação nas 9 amostras de solo variou de 78,1 a 113,2 % para o glifosato, sendo considerados resultados de acordo com os que se encontram na faixa de recuperação, entre 70-120%, recomendada pela EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1990). Além disso, observa-se que o método empregado possui boa precisão, porque o coeficiente de variação porcentual (CV) foi inferior a 20 % em todos os níveis de fortificação. (RIBANI, et. al., 2004).

6 - CONCLUSÕES

A grande utilização de glifosato pode levar os efeitos deletérios no ambiente após seu uso prolongado. Portanto, torna-se necessário desenvolver metodologia adequada para sua determinação. Nesse contexto, o método proposto pelo Laboratório de Química Ambiental descreve uma alternativa eficaz com uma metodologia analítica verde para a determinação de glifosato em amostras ambientais de águas e solo.

Devido a sua alta polaridade e por não ser uma molécula volátil, o glifosato é analisado pelo método proposto em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção de UV-vis. Alguns autores consideram esse tipo de análise inapropriada, já que o herbicida não possui agentes cromóforos em sua molécula, tornando-se necessário, portanto, o uso de reações de derivatização, geralmente em pós-coluna. No entanto, a detecção por UV-visível foi eficiente com o uso de uma coluna de troca aniônica, já que a molécula do glifosato apresenta 4 grupos ionizáveis que podem estar na forma protonada ou dissociada de acordo com valor do pH do meio. Assim, a resposta do método foi significativa.

O método cromatográfico sofreu algumas alterações em suas variáveis e mesmo assim continuou apresentando uma robustez satisfatória.

Além disso, o método proposto para determinação de glifosato em águas e no solo mostrou-se bastante eficiente, com boa linearidade, reprodutibilidade e repetibilidade, já que os testes referentes à validação analítica como seletividade, fortificação, linearidade e robustez foram realizados com amostras reais.

. Os valores de LD e LQ, relativos ao método foram, respectivamente, de 9,93 e 30,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Isso indica que o método está adequado para detectar e quantificar o herbicida em baixos níveis de concentração.

O presente trabalho sugere a determinação de glifosato em águas eliminando as etapas de extração e clean up, que geralmente são inviáveis devido ao uso de grandes quantidades solventes orgânicos nas mais variadas formas de extração. Outra vantagem deste método foi o uso de um tampão fosfato como fase móvel utilizada nas condições cromatográficas que após um simples tratamento pode ser facilmente descartado, ao contrário da maioria dos solventes orgânicos que devido a sua toxicidade podem causar danos à saúde humana e ao ambiente.

Assim, no método ora proposto, contemplaram-se diretamente os princípios 3, 4, 5, 8 e 10 da Química Verde.

O glifosato pode ser adsorvido tanto às argilas como à matéria orgânica do solo, devido a fatores como: troca de ligantes com os óxidos de ferro e alumínio e ligações de hidrogênio formadas entre o glifosato e as substâncias húmicas presentes no solo, sendo sua recuperação normalmente baixa.

A recuperação nas amostras amostradas nos 9 pontos de coleta do solo variou de 78,1 a 113,2 % para o glifosato, sendo considerados resultados de acordo com os que se encontram na faixa de recuperação entre 70-120%, recomendados pela EPA. Observou-se que o método empregado possui boa precisão, porque o coeficiente de variação porcentual (CV) é inferior a 20 % em todos os níveis de fortificação.

Por se tratar de uma matriz heterogênea, o solo pode apresentar diferenças nas porcentagens de recuperação e consequentemente nos coeficientes de variação.

Portanto, torna-se necessário um estudo mais elaborado da adsorção do glifosato no solo para avaliar a influência da fração inorgânica, matéria orgânica e de outros fatores tais como: umidade, pH do solo e quantidade de substâncias húmicas que interferem na recuperação do glifosato.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA RDC 48. Disponível < [www.anvisa.gov.br/ e-legis/](http://www.anvisa.gov.br/e-legis/)>. Acesso em 18 de Fevereiro de 2009.

AIROLDI, F. P. S. **Avaliação de processos de degradação de pesticidas organoclorados para a descontaminação de matrizes ambientais.** 2001. 167 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

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, p. 291-295, 2003.

AMARANTE JUNIOR, 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.

AMARANTE JUNIOR, 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.

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos.** 2002. 63 f. 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. p. 109.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos.** Campinas: Editora da Unicamp, Campinas, 1996. p. 300.

BHALLA, P.; HACKETT, N. M.; HART, R. G.; LIGNOWSDI, M. Imazaquin herbicide. In: SHANER, D. L.; O’CONNOR, S.L. (Eds.). **The imidazolinone herbicides.** Boca Raton: CRC, 1991. p. 237-245.

CASS, B. C.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC:** fundamentos, estratégias e validação. São Carlos: Apontamentos, 2001. 77 p.

ICH- International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).** Disponível em : <http://www.ich.org/lob/media/media417.pdf>. acesso em 26 jun.2009.

COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS. guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 7. ed. São Paulo : Organização Andrei Editora LTDA. 2005. 1141 p.

CORRÊA, A. G.; ZUIN, V. G. **Química Verde: fundamentos e aplicações**. São Carlos: EduFSCar, 2009. 171 p.

DAMIN, V. **Biodegradação, sorção e dessorção do herbicida ¹⁴C- Diuron em dois latossolos tratados com lodo de esgoto**. 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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.

ENVIRONMENTAL POLLUTION AGENCY (EPA). **Chemical- Specific Parameters**. Disponível em:

<http://www.epa.gov/oerrpages/superfund/health/conmedia/soil/toc.htm>>. Acesso em: 18 ago. 2008.

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

GEVAO, B.; SEMPLE, K. T.; JONES, K. C. Bound pesticide residues in soils: a review. **Environmental Pollution**, v. 108, n. 1, p. 3- 14, 2000.

HUBER, L.; A primer good laboratory practice and current good manufacturing practice - Agilent Technologies Deutschland GmbH, Germany, 2000.

KERNEY, P. C, KAUFMAN, D. D. **Herbicides: chemistry, degradation and mode of action**. New York: Marcel Dekker, 1975. v. 1.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO e QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia**. 2.ed. Brasília: SENAI, 2000. 75 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa DAS nº 28 de 27 de julho de 2007. Diário Oficial da União, Brasília, 31 de Julho. 2007. Seção 1, p.11.

KRULL, I.; SWARTZ, M. Determining limits of detection and quantification. **LC-GC**, v. 16, n.10, p.922-924, 1998.

JAVARONI, R. C. A.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para cultivo de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 58- 64, 1999.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Editora Rima, 2004. 46 p.

LIU, L.; PUNJA, Z. K.; RAHE, J. E. Effect of Phytium spp. and glyphosate on phytoalexin production and exudation by bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots grown in different media. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 47, n. 6, p. 391-405, 1991.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA CNPMA, 1997. cap. 17, p. 415-418.

MILES, C. J.; MOYE, H. A. Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 486-491, 1988.

NOSSACK, A. C. **Desenvolvimento de metodologia para a análise quantitativa de triterpenos em *Maytenus aquifolium***. 2001. 156f. Tese (Doutorado em Química Analítica)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

PENDIAS, A. K. **Trace elements in soil and plants**. Boca Raton: CRC, 1985. 315 p.

PRATA, F. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina**. 2002. 122f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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.

RAIJ, B. van.; CANTARELA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônomo & Fundação IAC, 1996. 285 p. (Boletim Técnico n° 100).

REIMBERG, M. C. H. **Estudo de algumas variáveis que interferem na concentração de flavonóides em *Passiflora incarnata***. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

REZENDE, Maria Olímpia Oliveira. **A importância ambiental das substâncias húmicas**. 1999. 152f. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C.B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p.771-780, 2004.

TADEO J. L.; SANCHEZ, B. C.; PEREZ, R. A.; Fernandez M.D. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, v. 882, n.1, p. 175-191, 2000.

SENESE, N. Biding mechanisms of pesticides to soil humic substances. **The Science of the Total Environment**, v. 120, p. 63-76, 1992.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2.ed. New York : John Willey, 1997. 765 p.

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.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 836p.

TRAGHETTA, D. G.; VAZ, C. M. P.; MACHADO, S. A. S.; CRESTANA, S.; VIEIRA, E. M.; MARTIN NETO, L. Mecanismos de sorção da atrazina em solos: estudos espectroscópicos e polarográficos. **Comunicado técnico**, n. 14, p. 1-7, 1996.

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.

TEÓFILO, R. F. **Planejamentos experimentais para a otimização da resposta voltamétrica na determinação do herbicida glifosato em solo, água e vegetais**. 2003. 96f. Mestrado (Magister Scientiae)- Programa de pós graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

VIEIRA, E. M.; PRADO, A. G. S.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Estudo da adsorção /dessorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica). **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 305-308, 1999.

VILA, F. C. **Identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar. (*Saccharum officinarum* L.)** 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. Efeitos do glifosato nas plantas : implicações fisiológicas e agronômicas. **International Plant Nutrition**, v. 119, p. 5-15, 2007.