



UFMS

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO - NÍVEL: MESTRADO

TOMAZ ALVES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE
GLIFOSATO EM SOLO POR CG-EM**

Campo Grande–MS

2004



UFMS

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO -NÍVEL: MESTRADO

TOMAZ ALVES DE SOUZA

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE GLIFOSATO EM SOLO POR CG-EM

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Química, junto ao Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação da Professora Doutora Marcia Helena de Rizzo da Matta.

Campo Grande-MS

2004



UFMS

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO - NÍVEL: MESTRADO

TERMO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

de

TOMAZ ALVES DE SOUZA

“AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE GLIFOSATO EM SOLO POR CG-EM”

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação – Nível de Mestrado em Química, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química – Área de Concentração: Físico-Química.

Aprovada por:

Prof^a. Dr^a. Marcia Helena de Rizzo da Matta

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Ruaro Peralba

Prof. Dr. Honório Roberto dos Santos

Campo Grande–MS

2004

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me ajudaram em todos os meus momentos, minha Mãe, amigos e professores, que sempre confiaram em mim.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus**, que tem estado ao meu lado todos os dias.

À **minha Mãe**, que fez de tudo para que eu pudesse me formar.

À minha querida **Professora Doutora Marcia Helena de Rizzo da Matta**, que sempre me ajudou, orientou e repreendeu, sempre com o nobre objetivo de fazer de minha pessoa algo melhor.

Aos **Professores** do Departamento de Química, pelo conhecimento doado, compreendendo minhas falhas.

Ao meu **amigo Emérson Montagner**, que me ajudou em todos os momentos deste trabalho.

Ao **Leonardo**, pelo auxílio a todo momento nas análises cromatográficas.

Ao **Nico**, pelo apoio ao manuseio e desenvolvimento de vidraria.

À dona **Leozina , Celestino, Maria Otávia e Luis**, funcionários administrativos desta instituição pelo carinho e amizade.

Aos meus amigos **Adley, Diego, Gisele, João, Osmar, Eduardo, Magno, Hebert,** pela ajuda e amizade.

À **todas as pessoas** que contribuíram nestes dois anos, para que eu pudesse concluir este trabalho.

Obrigado!

**O homem tem direito
fundamental à liberdade, à
igualdade e ao desfrute de
condições adequadas,
em um meio ambiente de
qualidade tal que lhe permita
levar vida digna e gozar
de bem-estar.**

**Ele é portador solene da
obrigação de proteger e
melhorar o meio ambiente para
gerações presentes e futuras.**

Declaração sobre o Meio Ambiente, ONU, Estocolmo (1972)

Resumo

A soja é um dos produtos de maior destaque na exportação brasileira e atualmente a soja Roundup *ready* está presente em nossa alimentação, apesar das controvérsias em relação à esta questão. Tanto a soja comum como a transgênica utilizam o glifosato para controlar as plantas indesejáveis e também age como dessecante. Métodos para determinar glifosato e seu maior metabólito (AMPA - ácido aminometil fosfônico) em diferentes níveis têm sido descritos há anos. Entretanto, os métodos não são suficientemente sensíveis com os equipamentos freqüentemente utilizados. Neste estudo, foi testado em solo uma metodologia sensível e seletiva para determinação de glifosato e AMPA sendo que estas moléculas permanecem inalteradas dentro do grão. Como os analitos são solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos comuns, o método utiliza uma derivatização do glifosato e AMPA para gerar um produto suscetível de análise por cromatografia gasosa. Os resultados obtidos evidenciaram eficácia da metodologia testada, porém com algumas modificações na purificação dos extratos que aprimoraram o método. Com o equipamento e condições analíticas obteve-se o LOD de 10 ppb e LOQ de 30 ppb para o glifosato e AMPA, respectivamente. Recuperações obtidas situam-se na faixa de 60,88 a 92,24% para glifosato e de 67,87 a 110,46% para AMPA.

Mecanismo para a derivatização de glifosato e AMPA são propostos e estudos sobre a estabilidade dos produtos de derivatização demonstram que suas análises cromatográficas devem ser realizadas preferencialmente entre 20 e 28 horas após o processo de derivatização, respeitando igual tempo para o elaboração da curva de calibração.

Palavras-chave: Solo, glifosato, cromatografia gasosa, derivatização

Summary

The soy is one of the products of bigger prominence in the Brazilian market and currently the Roundup ready soy is present in our feeding, despite the controversies in relation to the this question. As much the common soy as the transgenic uses the glyphosate to control the weeds and also it acts as desiccant. Methods to determine glyphosate and its metabolite greater (AMPA - phosphonic aminomethyl acid) in different matrices have been described have years. However, the methods are not enough sensible with the equipment frequently used. In this study, we test in ground a sensible and selective methodology for determination of glyphosate and AMPA being that these molecules remain unchanged inside of the grain. As the analites they are soluble in water and insoluble in solvent organic common, the method uses a derivatization of glyphosate and AMPA to generate a susceptible product of analysis for gaseous chromatography. The gotten results had evidenced effectiveness of the tested methodology, however with some modifications in the cleaning of the extracts that had improved the method. With the equipment and analytical conditions we got the 10 LOD of 30 ppb and LOQ of ppb for glyphosate and AMPA, respectively. Gotten recoveries place in the band of 60,87 at 92.24% for glyphosate and 67,87 at 110.46% for AMPA.

Mechanism for the derivatization of glyphosate and AMPA are considered and studies on the stability of the derivatization products demonstrate that its chromatographic analyses must preferential be carried through between 20 and 28 hours after the derivatization process, respecting equal time for the elaboration of the calibration curve.

Key-words: Soil; glyphosate, gas chromatography, derivatization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	POLUIÇÃO AMBIENTAL.....	1
1.2	OS AGROTÓXICOS	2
1.3	CONCEITOS E CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS	6
1.4	OS HERBICIDAS	9
1.4.1	CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA.....	9
1.4.2	O USO DOS HERBICIDAS.....	12
1.5	O GLIFOSATO	13
1.6	A SOJA COMERCIAL.....	18
1.7	A PLANTA TRANSGÊNICA	19
1.7.1	A SOJA TRANSGÊNICA.....	21
1.8	ANÁLISE DOS AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS.....	22
1.8.1	A ANÁLISE DO GLIFOSATO.....	24
1.9	ANÁLISE DE RESÍDUO DE GLIFOSATO E AMPA EM SOLO.....	29
1.9.1	PROCESSOS DE EXTRAÇÃO.....	29
1.9.2	PROCESSOS DE DERIVATIZAÇÃO.....	30
1.9.3	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	32
1.10	CROMATOGRAFIA GASOSA.....	33
1.11	ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	35
1.11.1	DETECÇÃO DE ÍONS.....	35
1.11.2	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	36
2	OBJETIVOS	39
3	EXPERIMENTAL.....	40
3.1	ANÁLISE DO SOLO.....	40
3.1.1	AMOSTRAGEM.....	40
3.1.2	CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS.....	41
3.1.3	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE GRAVIMÉTRICA DO E UMIDADE RESIDUAL.....	41
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	41

3.2.1	PADRÕES, RESINAS, REAGENTES E SOLUÇÕES.....	41
3.2.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	42
3.2.3	PREPARO DA AMOSTRA DE SOLO PARA EXTRAÇÃO.....	43
3.2.4	PREPARO DAS COLUNAS PARA A TROCA IÔNICA.....	44
3.2.5	DERIVATIZAÇÃO	45
3.2.5	DETERMINAÇÃO DO LIMITE OBSERVADO DE DETECÇÃO (LOD) E DO LIMITE OBSERVADO DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ).....	45
3.2.6	FORTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	UMIDADE DO SOLO E UMIDADE RESIDUAL.....	47
4.2	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO SOLO.....	47
4.3	COMPOSIÇÃO FÍSICA DO SOLO.....	59
4.4	A DERIVATIZAÇÃO DO GLIFOSATO E AMPA A PARTIR DA METODOLOGIA MODIFICADA.....	50
4.5	PROPOSTA DE UM MECANISMO DE DERIVATIZAÇÃO.....	53
4.5.1	REAÇÕES COMPETITIVAS DURANTE A DERIVATIZAÇÃO.....	58
4.6	CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	59
4.7	ANÁLISE DE AMOSTRA REAL.....	65
4.8	ANÁLISE DE DEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA DERIVATIZADOS.....	65
5	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Rota de degradação do glifosato no solo.....	16
FIGURA 2 - Estrutura do glifosato e AMPA.....	24
FIGURA 3 – Espectro de Massas do agrotóxico organoclorado dicofol usando a ionização por impacto de elétrons.....	36
FIGURA 4 – Esquema do acoplamento CG – EM.....	38
FIGURA 5 - Diagrama de distribuição de porcentagem de argila, silte e areia para determinação de tipo de solo.....	56
FIGURA 6 - Estrutura do Glifosato e AMPA antes e depois de derivatizado em TFE e TFAA.....	50
FIGURA 7 - Cromatograma total de íons para uma injeção de 1µL de amostra de 6ppm de glifosato e AMPA depois de derivatizados no modo sem divisão (<i>split</i>).....	57
FIGURA 8 - Espécies iônicas do Glifosato em diferentes valores de pKa	52
FIGURA 9 - Cromatograma do AMPA e glifosato derivatizados na concentração de 30 µg.L ⁻¹ (1LOQ).....	59
FIGURA 10 - Cromatograma do AMPA e glifosato derivatizados na concentração de 90 µg.L ⁻¹ (3LOQ).....	59
FIGURA 11 - Cromatograma do AMPA e glifosato derivatizados na concentração de 150 µg.L ⁻¹ (5LOQ).....	59
FIGURA 12 - Cromatograma do AMPA e glifosato derivatizados na concentração de 300 µg.L ⁻¹ (10LOQ).....	60
FIGURA 13 - Cromatograma do AMPA e glifosato derivatizados em amostra de solo da Fazenda Bom Sucesso em Jaraguari-MS, novembro de 2003.....	65

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Curva de calibração para o glifosato derivatizado.....	68
GRÁFICO 2 - Curva de calibração para o AMPA derivatizado.....	69
GRÁFICO 3 - Acompanhamento da degradação do glifosato e do AMPA derivatizados, armazenados em freezer.....	74
GRÁFICO 4 - Acompanhamento da degradação do glifosato e do AMPA derivatizados, armazenados em geladeira.....	75
GRÁFICO 5 - Comparação entre os dois meios de armazenamento para o glifosato..	76
GRÁFICO 6 - Comparação entre os dois meios de armazenamento para o AMPA....	76

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1 - Volume recomendado nos estudos de dose	4
QUADRO 2 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos.....	4
QUADRO 3 - Avaliação da neurotoxicidade dos agrotóxicos.....	5
QUADRO 4 - Propriedades físicas e químicas do glifosato.....	14
QUADRO 5 – Classificação do princípio ativo do glifosato para o GUS, índice de vulnerabilidade de águas subterrâneas.....	25
QUADRO 6 - Resultados da análise química para macronutrientes de solo da amostra coletada na UFMS em 17 de julho de 2002, Campo Grande – MS.....	47
QUADRO 7 - Resultados da análise química do solo para micronutrientes da amostra coletada na UFMS em 17 de julho de 2002, Campo Grande – MS.....	48
QUADRO 8 - Resultados da análise granulométrica do solo da amostra coletada na UFMS em 17 de julho de 2002, Campo Grande – MS.....	48
QUADRO 9 – Quadro de classificação geral de análise de solo.....	48
QUADRO 10 - Dados obtidos para a confecção da curva de calibração para o glifosato derivativado.....	60
QUADRO 11 - Dados obtidos para a confecção da curva de calibração para o AMPA derivativado.....	61
QUADRO 12 - Porcentagem de recuperação obtida, em uma amostra fortificada com glifosato (1 LOQ), com extração 24h após a fortificação.....	63
QUADRO 13 - Porcentagem de recuperação obtida, em uma amostra fortificada com glifosato (3LOQ), com extração 24h após a fortificação.....	63
QUADRO 14 - Porcentagem de recuperação obtida, em uma amostra fortificada com glifosato (5LOQ), com extração 24h após a fortificação.....	63

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 - Proposta de mecanismo de reação para a derivatização do glifosato, com base em mecanismos de reações clássicas da química orgânica.....	53
ESQUEMA 2 - Proposta de mecanismo de reação para a derivatização do AMPA, com base em mecanismos de reações clássicas da química orgânica.....	56
ESQUEMA 3 - Reações que podem ocorrer durante o processo de derivatização do glifosato e AMPA.....	58

SIGLAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemist
CL ₅₀	Dose letal aguda Inalatória
CG	Cromatografia gasosa
CGAR-EM	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNA	Confederação Nacional da Agricultura e da Pecuária
CNT-Bio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CV	Coeficiente de variação
DCE	Detector de Captura de Elétrons
DFC	Detector Fotométrico de Chama
DL ₅₀	Dose letal aguda dérmica
2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
EEC	Comunidade Econômica Européia
EM	Espectrometria de massa
EI	Impacto de elétrons
EPA	Environmental Protection Agency
EPSPS	5-enolpiruvilchiquimato-fosfato sintase
eV	Elétron-volt
FAO	Food and Agriculture Organization - EUA
FE	Fase Estacionária
FELAS	Federação Latino-Americana de Associação de Sementeiros
GARP	Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
GOSS	Índice de Contaminação de Águas Superficiais
GUS	Índice de Vulnerabilidade de Águas Subterrâneas
ha	hectare (10000 m ²)
HFBA	Ácido heptafluorobutírico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IAGRO	Departamento de Inspeção e Defesa Agropecuária de Mato Grosso do Sul
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
I.E.	Impacto de Elétrons
I.Q.	Ionização Química
K _{oc}	Coeficiente de adsorção à matéria orgânica
K _{ow}	Coeficiente de partição água-octanol
K _H	Constante de Henry
Kpa	Kilo Pascal = 10 ³ Pascal
LC ₅₀	Toxicidade aguda Inalatória
LMR	Limite Máximo de Resíduo
LOD	Limite Observado de Detecção
LOQ	Limite Observado de Quantificação
m/z	Razão massa-carga
meq	Miliequivalente = 10 ⁻³ equivalente
M	Molar
M ⁺	Íon Molecular
MO	Matéria orgânica
MS	Ministério da saúde ou Mato Grosso do Sul
N.D.	Não detectado
NNG	N-nitrosoglifosato
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pa	Pascal
Pi	Fósforo inorgânico
pg	Picograma = 10 ⁻¹² grama
pKa	logaritmo negativo de uma constante de equilíbrio
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
POEA	Polietoxietilenoamina
rpm	Rotações por minuto

RR	Roundup Ready
SCAN	Em português: varredura, que significa varredura de íons totais
SIM	Single Ion Monitoring (monitoramento de íon selecionado)
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas
TFAA	Anidrido trifluoroacético
T	Massa total de íons
TFE	Trifluoroetanol
tr	Tempo de retenção
V	Saturação de bases

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poluição ambiental

Segundo FELLEMBERG, (1980) a idéia de poluição ambiental abrange uma série de aspectos, que vão desde a contaminação do ar, das águas e do solo, a desfiguração da paisagem, erosão dos monumentos e construções até a contaminação da carne de aves com hormônios. Na busca das causas da poluição ambiental, depara-se com dois fatores básicos. Um deles está arraigado à tendência do homem à mecanização. Como nenhum outro ser vivo, consegue o homem transformar as matérias primas que encontra de modo a torná-las úteis para si, seja como ferramentas ou máquinas ou como artefato de lazer e objeto de arte. Durante a confecção de todos estes artigos, formam-se quantidades apreciáveis de resíduos inúteis, que com o tempo acabam por comprometer o ambiente. A segunda causa do comprometimento do meio ambiente reside no contínuo aumento da população humana, que força uma crescente produção de alimentos. Como a área de terras cultiváveis não pode crescer no mesmo ritmo que a população, o necessário aumento de produção só pode ser atingido mediante uma intensificação da agricultura nas áreas já disponíveis. No campo da agricultura fala-se freqüentemente numa agricultura “natural”, isto é, isenta do uso do emprego de fertilizantes químicos e agrotóxicos. Se um plano de projeto destes fossem executados com certeza ocorreria esperar uma redução de até 50% nas colheitas. Com isso teríamos um agravamento no problema da fome, que assumiria proporções nunca antes vistas.

O fato é que esse modelo, implantado no país desde a década de 70, tende a se desgastar rapidamente frente as exigências globais de uma produção agrícola com tecnologia mais “limpas”. Nesse contexto, a questão ambiental ganha espaços com tendências, cada vez maiores, de exigências em relação à sustentabilidade dos sistemas de produção. Entre tais exigências estariam a adoção de produtos/técnicas de baixíssimo impacto negativo no ambiente, observando as particularidades de cada região (GOMES, 2002).

O comportamento dos agrotóxicos no solo pode ser influenciado por fatores tais como: adsorção, movimento e decomposição. A adsorção influencia diretamente a magnitude do efeito de outros fatores como biodegradabilidade, bioacumulação e outros (VIEIRA *et al.*, 1999). O movimento dos agrotóxicos no solo pode ocorrer por lixiviação, escoamento superficial e volatilização. As informações sobre o movimento de agrotóxicos são úteis para se fazer uma previsão da sua eficácia química. Os agrotóxicos estão sujeitos às interações que

interferem na sua bioatividade, biodegradação e mobilidade no ambiente. A natureza destas interações depende da composição do solo.

Segundo a ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) (1994) *apud* AMARANTE JUNIOR *et al.* (2002a), o glifosato tende a ser inativo em contato com solo, desde que seja adsorvido por este. O mecanismo não é inteiramente compreendido. No entanto, supõem-se ligações similares às do fosfato inorgânico. A competição com fosfato inorgânico tem sido demonstrada em laboratório mas não tem sido medido no campo. Íons específicos (Fe^{+2} , Fe^{+3} e Al^{+3}) complexam-se com glifosato e os complexos de metal com ácidos húmicos em solo podem ser um mecanismo de ligação deste às partículas do solo. O composto livre no solo é degradado rapidamente a dióxido de carbono pela atividade microbiana, enquanto que o glifosato adsorvido é degradado mais lentamente, ou não degradado, persistindo inativo durante anos. O herbicida tem sido relacionado à inibição da fixação anaeróbica de nitrogênio no solo.

1.2 Os agrotóxicos

Dentre os produtos agrícolas utilizados pelo produtor rural, os agrotóxicos destacam-se como um dos mais consumidos.

Com a aprovação da Lei Federal n.º 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto Lei n.º 98.816, no artigo 2, inciso II, o termo agrotóxico é definido como:

Os produtos e componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também de ambiente urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, afim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores do crescimento (BRASIL, 1989).

YOKOMIZO *et al.* (1985) utilizam as seguintes definições relacionadas a agrotóxicos:

a) Agrotóxicos são substâncias ou misturas de substâncias usadas para a prevenção ou controle de qualquer praga, incluindo-se todas as substâncias empregadas como reguladoras de crescimento de plantas, desfolhantes ou dessecantes.

b) Resíduos de agrotóxicos são todas as substâncias nos alimentos humanos ou animais, resultantes do uso de agrotóxicos, incluindo-se todos os derivados, tais como: produtos de degradação e conversão, metabólitos e produtos de reação que são considerados de significância toxicológica.

c) Boas práticas agrícolas no uso de agrotóxicos define-se como sendo o uso recomendado e autorizado oficialmente de agrotóxicos, sob condições práticas em qualquer estágio de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento de alimentos, levando em consideração as quantidades mínimas necessárias para alcançar o controle adequado, aplicado de maneira a deixar um mínimo de resíduos prático e que seja aceitável toxicologicamente.

d) Limite máximo de resíduos é a concentração máxima de resíduos de agrotóxicos recomendado pela *CODEX ALIMENTARIUS*, órgão da FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION-EUA) para ser permitido legalmente no alimento. A concentração é expressa em ppm (mg de resíduo/kg da amostra) (FAO, 2003).

e) Limite máximo, designado como tolerância, é usado para controlar os resíduos de agrotóxicos resultantes do uso aprovado de agrotóxicos sobre os alimentos considerados.

f) Limite máximo, designado como “limite prático de resíduo”, é usado para controlar resíduos de agrotóxicos resultantes das circunstâncias não projetadas para proteger os alimentos contra as pragas. O resíduo pode ser adquirido em qualquer estágio de crescimento, colheita, armazenamento, distribuição ou processamento do alimento.

Estas substâncias são necessariamente substâncias tóxicas e podem representar um risco toxicológico. Há uma diferença entre toxicidade e risco toxicológico. A toxicidade é inerente ao produto e o risco toxicológico está ligado ao uso inadequado e às condições de exposição.

A toxicidade dos agrotóxicos e de suas formulações comerciais, segundo LARINI (1999), é avaliada através dos seguintes parâmetros, com normas e critérios rígidos, definidos por organismos oficiais especializados:

- Toxicidade aguda; toxicidade crônica; neurotoxicidade; efeitos carcinogênicos; efeitos mutagênicos; efeitos teratogênicos; irritação e corrosão ocular; irritação e corrosão cutânea.

Quadro 01 – Volumes recomendados nos estudos de dose única

ANIMAL	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	VOLUME	
		Usual	Máximo
Camundongos	Oral	0,2 ml/20g	1 ml/ 20g
	Dérmica	0,1 ml/20g	0,1 mL/20g
Ratos	Oral	1 ml/ 100g	3 ml/100g
	Dérmica	0,1 ml/100g	0,1ml/100g

Fonte: Toxicologia dos praguicidas, Larini (1999).

Quadro 02 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos (*)

CLASSIFICAÇÃO		DL ₅₀ (via oral) mg/kg		DL ₅₀ (via dérmica) mg/kg		CL ₅₀ (Inalatória) (**)
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos	
Classe I Extremamente Tóxico Faixa vermelha	“A”	Todos os produtos cuja DL ₅₀ do constituinte ativo for igual ou inferior a 25 mg/kg (via oral) ou 100 mg/kg (via dérmica)				0,2 ou menos
	“B”	100 ou menos	200 ou menos	200 ou menos	400 ou menos	
Classe II Altamente tóxico Faixa amarela		Acima de 100 até 500	Acima de 200 até 2000	Acima de 200 até 1000	Acima de 400 até 4000	Acima de 0,2 até 2
Classe III Medianamente tóxico Faixa azul		Acima de 500 até 2000	Acima de 2000 até 6000	Acima de 1000 até 4000	Acima de 4000 até 12000	Acima de 2,0 até 20,0
Classe IV Pouco tóxico Faixa verde		Acima de 2000	Acima de 6000	Acima de 4000	Acima de 12000	Acima de 20,0

Fonte: FUNDACENTRO. Prevenção de acidentes no trabalho com agrotóxicos. Segurança e saúde no trabalho, v.3. São Paulo, 1999.

(*) portaria 04/DISAID de 30/04/1980 e Decreto Federal n.º 98.816 de 11/01/1990

(**) expressa em mg por litro de ar por 1 hora de exposição

Notas: 1) Os itens IB, II, III e IV referem-se à toxicidade de produtos formulados.

2) A colocação de um agrotóxico ou de uma formulação em uma das classes toxicológica não depende de todos os dados estarem na mesma classe. Sempre, o dado mais agravante será aquele utilizado para a classificação do produto.

Fonte: Toxicologia dos praguicidas, Larini (1999).

Quadro 03 – Avaliação da neurotoxicidade dos agrotóxicos

NÍVEIS	EFEITOS	CARACTERIZAÇÃO
1 (*)	Sintomas subjetivos reversíveis	Mudanças funcionais temporárias no sistema nervoso (cefaléia, vertigem, etc.)
2 (*)	Sintomas subjetivos irreversíveis	Mudanças funcionais irreversíveis em nível do sistema nervoso provocadas por doses elevadas do toxicante.
3 (**)	Parâmetros bioquímicos	Mudanças funcionais irreversíveis em parâmetros bioquímicos que permitem avaliar a Neurotoxicidade: neurotransmissores e neuromoduladores, seus precursores e metabólitos e enzimas envolvidos na síntese e metabolização.
4 (**)	Alterações fisiológicas e comportamentais	Ação neurotóxica evidenciada através de testes comportamentais, alterações psicológicas e através de eletroencefalograma.
5 (**)	Alterações neurológicas	Alteração neurotóxica demonstrada através de testes específicos.
6 (**)	Alterações morfológicas	Efeitos neurotóxicos irreversíveis (morte celular, axonopatia, etc.)

(*) Somente no homem; (**) No homem e em animais.

Fonte: Toxicologia dos praguicidas, Larini (1999).

Estas características agrotóxicos apresentam dois pontos de vistas quanto à sua utilização, os benefícios e os malefícios (YOKOMIZO *et al.*,1985):

a) Benefícios:

- Proteção às culturas: reduz, impede ou elimina o desenvolvimento de insetos, de fungos, plantas, doenças ou qualquer outro organismo que podem reduzir a produção da cultura.
- Saúde à comunidade: combate à reprodução de insetos e aracnídeos que, são vetores de doenças tais como: dengue, malária, encefalite, tifo, doença do sono, elefantíase e muitas outras cujos vetores principais são insetos e aracnídeos.
- Econômico: reduz as perdas de uma cultura e automaticamente aumenta o lucro do produtos podendo se reverter em impostos e benefícios para a comunidade.
- Estético: melhora o ambiente em vivemos, tornando-o mais confortável sem mosquitos pestilentos, pernilongos, aumentando o valor estético com plantas mais saudáveis proporcionando uma melhor beleza natural.
- Malefícios:
- Contaminação dos alimentos: se a criação de um grande número de agrotóxicos e a sua aplicação na agricultura trouxeram benefícios à produção de alimentos,

introduziram, por outro lado, outro problema aos consumidores, este de natureza toxicológica, resultante da contaminação dos alimentos com os seus resíduos. A contaminação ocorre de diversas formas:

- Na aplicação direta nos alimentos;
- Forragens e rações contaminadas e ingeridas pelos animais, afetando a carne, o leite e seus derivados, gorduras, patês, salsichas, etc;
- Descarte dos agrotóxicos em rios e mares pelas indústrias;
- Descarte inadequado das embalagens dos produtos utilizados nas aplicações;

O homem, como consumidor final de diversos alimentos, intoxica-se ao se alimentar de produtos contaminados tanto “*in natura*” como processados, e também pode haver contaminação da criança durante a gestação ou depois na amamentação (ANVISA, 2002).

1.3 Conceito e classificação dos agrotóxicos

Literalmente, o termo defensivos agrícolas, pesticida ou agrotóxico tem o significado de produto com capacidade de destruir pragas (LARINI, 1999). Por sua vez, o termo praga aplica-se aos organismos, animais ou vegetais, capazes de reduzir a quantidade ou prejudicar a qualidade dos alimentos, das sementes, rações, forragens, plantas ornamentais e madeiras, durante o plantio, produção, colheita, processamento, armazenamento, transporte e uso, ou que podem transmitir doenças ao homem e aos animais (domésticos, de corte e produtores de leite). O termo aplica-se também aos organismos que injuriam e perturbam a qualidade de vida do homem ou, ainda, que danificam propriedades e objetos de uso pessoal.

O termo defensivo tem o significado de algo que serve para defender ou resistir ao ataque de um inimigo qualquer. Tem o sentido geral equivalente a um processo preventivo, não explicando o que ou quem está envolvido no processo. Um outro termo em uso é o “agrotóxico” que tem sentido geral para incluir todos os compostos químicos usados na agricultura, excluindo aqueles de uso domissanitário, da pecuária, os utilizados no combate à parasitas de animais domésticos ou plantas aquáticas e os utilizados na limpeza e manutenção das áreas com linhas de transmissão elétrica e ferrovias.

Os agrotóxicos são compostos químicos especialmente empregados pelo homem para destruir, repelir ou mitigar pragas (insetos, ácaros, nematódeos, roedores e outras formas de vida animal, fungos, plantas daninhas terrestres e aquáticas). Têm também função preventiva

contra pragas. Além disso, funciona como dessecante ou ainda como reguladores do crescimento de vegetais.

No mercado brasileiro existem inúmeros defensivos agrícola. De acordo com o COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS (1999), estes produtos apresentam o seguinte comportamento em relação aos seus compostos químicos:

- a) Acaricidas: combate ácaros;
- b) Aficidas: combate pulgões;
- c) Antibrotantes: regulador de crescimento;
- d) Antievaporantes: óleo mineral para cobertura ;
- e) Bactericidas: combate bactérias;
- f) Dessecantes: herbicidas;
- g) Espalhantes adesivos: resina de cobertura foliar;
- h) Estimulante hormônio vegetal: regulador de crescimento;
- i) Ferormônios: modificador bioquímico de comportamento animal;
- j) Formicidas: combate formigas;
- l) Fumigantes: herbicida, formicida e nematicida em um só produto;
- m) Fungicida: combate fungos;
- n) Herbicidas: combate plantas em geral;
- o) Inseticidas: combate insetos;
- p) Nematicidas: combate nematóides;
- q) Surfactantes: espalhante adesivo.

Para ser realizada a aplicação destes produtos é necessário que se tenha noções de segurança na utilização de defensivos agrícolas (MONSANTO, 2002):

- Uso obrigatório de Equipamentos de Proteção Individual (EPI): macacão com mangas compridas, chapéu de aba larga, luva, luvas, óculos, máscaras, botas e avental impermeável.
- Precauções gerais:
 - a) Uso exclusivamente agrícola;
 - b) Mantenha afastados de crianças e animais;
 - c) Não coma, não beba e não fume durante o manuseio do produto;
 - d) Não reutilize as embalagens;
 - e) Não desentupa bicos, orifícios e tubulações com a boca.
- Precauções no manuseio:

- a) Evite contato com os olhos e a pele;
- b) Ao abrir a embalagem, faça de forma a evitar respingos;
- c) Aplique somente a dose indicada.
- Precauções durante a aplicação:
 - a) não aplique o produto contra o vento;
 - b) Use macacão com mangas compridas, chapéu de aba larga, luvas, botas e avental impermeável.
- Precauções após a aplicação:
 - a) Não reutilize as embalagens;
 - b) Mantenha o restante do produto adequadamente fechado em local seguro;
 - c) Tome banho, troque e lave suas roupas.
- Precauções quanto a proteção ao meio ambiente:
 - a) Evite usar equipamentos com vazamentos;
 - b) Não aplique o produto em dias com muito vento;
 - c) Não lave o equipamento em lagos, riachos ou similares;
 - d) Descarte corretamente as embalagens;
 - e) Em caso de acidentes siga corretamente as instruções constantes na bula.
- Instruções em caso de acidentes:
 - a) utilizar o EPI;
 - b) Isolar e sinalizar a área contaminada;
 - c) Em caso de derrame, estancar o escoamento. Siga as instruções:
- Piso pavimentado: absorver o produto com terra, areia ou outro material devidamente identificado, armazenar em recipientes identificados para descarte adequado. Lavar o local com carbonato de sódio (Na_2CO_3);
- Solo: retirar as camadas de terra contaminada até atingir o solo seco;
- Corpos d'água: interromper imediatamente o consumo humano e animal e contactar o centro de emergência da empresa fabricante, visto que as medidas a serem adotadas depende das proporções do acidente, das características do recurso hídrico em questão e da quantidade do produto envolvido.

Diversos são os processos usados no controle das plantas daninhas; de acordo com HERTWIG (1977) temos:

- Culturais: que podem ser feitos através de arações, gradeações, calagens, rotações e competições de culturas, época de plantio, etc.

- Mecânicos: que podem ser manuais ou mecanizados:
 - a) Manual: arranque ou com o uso de enxadas.
 - b) Mecanizado: de tração animal, utilizando implementos ou cultivadores e de tração motorizada com o uso de implementos ou cultivadores acionados com motor próprio e pelo trator (cultivador de dentes, arado, grade, enxada rotativa).
- Biológicos: com o uso de animais, como boi, carneiro, insetos, etc.
- Físicos: com o uso de fogo ou inundações.
- Químicos: feito através de **herbicidas**.

1.4 Os herbicidas

Durante recentes anos o uso intensivo de herbicidas tem aumentado a preocupação ambiental, principalmente devido a sua poluição massiva do solo. Os herbicidas, dentre os agrotóxicos, são os produtos mais comercializados no mundo inteiro, face à necessidade de controle de ervas indesejáveis na cultura (ARAÚJO, 2002).

Segundo CAMARGO, (1986) os herbicidas são compostos que, aplicados às plantas, reagem com seus constituintes morfológicos ou interferem nos seus sistemas bioquímicos, promovendo efeitos morfológicos ou fisiológicos de graus variáveis, podendo levar à morte parcial ou total.

1.4.1 Classificação química

Os herbicidas classificam-se em herbicidas inorgânicos e herbicidas orgânicos.

Herbicidas inorgânicos: usados como herbicidas de contato, mas hoje em dia são raros, um destes ainda usado é o sulfamato de amônio (dessecante e arbusticida).

Herbicidas orgânicos: são classificados de acordo com a estrutura fundamental de suas moléculas, dentro das funções químicas a que pertencem. Assim, estes são divididos em três classes: herbicidas acíclicos, herbicidas homocíclicos e herbicidas heterocíclicos.

Classe I – Herbicidas Acíclicos

Grupos:

- 1- Haletos;
- 2- Álcoois;
- 3- Aldeídos;
- 4- Ácidos alifáticos;
- 5- Ésteres organofosforados;
- 6- Aminas acíclicas;
- 7- Uréias.

Classe II – Herbicidas Homocíclicos

Grupos:

- 1- Fenóis;
- 2- Benzenoaminas;
- 3- Benzonitrilas;
- 4- Ácidos homociclocarboxílicos;
- 5- Aminas homocíclicas;
- 6- Éteres de difenil;
- 7- Ciclocetonas;
- 8- Óleos minerais.

Classe III – Herbicidas Heterocíclicos

Grupos:

- 1- Azóis e derivados;
- 2- Azinas e derivados;
- 3- Tiazinas;
- 4- Azepinas;
- 5- Ciclônios;
- 6- Heterobiciclos.

Os herbicidas, segundo a ordem cronológica de lançamento no mercado e seu modo de ação podem ser classificados segundo a ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTA DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS (GARP, 1999) em:

- Reguladores de crescimento;
- Inibidores de fosforilação oxidativa;

- Inibidores de fotossíntese;
- Inibidores de mitose;
- Inibidores de pontos de crescimento;
- Formadores de radicais livres;
- Inibidores da síntese de aminoácidos;
- Inibidores da síntese de lipídios;
- Difeniléteres.

Segundo CAMARGO, (1986) o modo de atuação dos herbicidas podem ser classificados como:

- Herbicidas seletivos: são aqueles que quando aplicados, conforme as instruções de uso, não causam danos à cultura ou à pastagem para as quais são recomendados.
- Herbicidas residuais: são aqueles que quando aplicados no solo continuam sua atividade herbicida por um período de tempo mais longo, dissipando-se posteriormente.
- Herbicida de contato: são aqueles que atuam fitotxicamente nos locais onde atingiram a planta.
- Herbicida seletivo de contato: são aqueles que não causam danos à cultura e são fitotóxicos às plantas indesejáveis.
- Herbicidas sistêmicos ou de translocação: são aqueles que, penetrando na cutícula, atingem o apoplasto-simplasto (sistema xilemático – floemático).
- Arbusticidas: são formulações herbicidas destinadas para a eliminação da árvores e arbustos.

Os herbicidas também são classificados quanto a época de aplicação:

- Pré-plantio: a aplicação do herbicida é feita antes do plantio da cultura.
- Pré-plantio incorporado: a aplicação do herbicida é feita antes do plantio devido às suas características físico-químicas e deve ser incorporado ao solo com grades de disco, enxadas rotativas, etc.
- Pré-emergência: a aplicação é feita antes do aparecimento das ervas daninhas.
- Pós-emergência: a aplicação é feita após o aparecimento das ervas daninhas.

A deriva é o movimento do produto da pulverização do herbicida antes de atingir o solo ou as plantas. Pode ser reduzida, diminuindo-se a pressão do equipamento e evitando pulverizações com ventos fortes.

1.4.2 O uso dos herbicidas

Atualmente, o uso de insumos, sobretudo herbicidas, faz parte da rotina da maioria dos sistemas produtivos, apesar das evidências de alguns problemas de ordem ambiental (GOMES, 2002). O Brasil é o 4º maior consumidor de agrotóxicos utilizados na agricultura, no período de 1988 e 1998, o aumento da comercialização de agrotóxicos foi oito vezes superior ao da produção de grãos (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS – SINDAG, 2003).

O consumo de herbicidas no Brasil foi cerca de 174 mil toneladas de produtos formulados em 2000 (SPADOTTO, 2002). Expresso em quantidade de ingredientes ativos representa 81 mil toneladas. O consumo desses produtos difere nas regiões do país, onde se misturam atividades agrícolas intensivas e tradicionais.

Os herbicidas têm sido usados mais na região Sul (38,9%), Centro-Oeste (29,9%) e Sudeste (22,8%). O consumo de herbicidas na região Norte é muito pouco (2 %), enquanto na região Nordeste (6,3%) o uso está concentrado nas regiões de agricultura irrigada e de cana-de-açúcar. Pela elevada quantidade total de herbicidas usados, algumas culturas merecem atenção por ocuparem extensas áreas no Brasil como é o caso da soja, do milho e da cana-de-açúcar que foram cultivadas, respectivamente, em 13,6; 11,6 e 4,9 milhões de hectares em 2000 (GOMES, 2002).

Atualmente, o Brasil é o 2º maior produtor de soja do mundo. O crescimento desta produção em nosso país verificou-se de uma forma bastante rápida. Em 1954, o Brasil participava com 0,5% da produção, em 1976, essa participação atingia 16% e continua crescendo até nossos dias. Segundos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 1995, a área plantada foi de 11,7 milhões de hectares (SILVA, 1999).

A soja, embora originária de região de clima temperado, apresenta boa adaptação às condições de clima subtropical e tropical das regiões produtoras brasileiras. Com isso, sofrendo severa concorrência das plantas daninhas, que, relacionada à competição com a cultura, provocam perdas de água, luz, nutrientes e espaço físico, além de servirem como hospedeiras para pragas e doenças, reduzem a qualidade da semente e provocam quedas

drásticas na produção. Mas, junto à evolução da humanidade, a agricultura e os métodos de controle de plantas daninhas são inseparáveis. Os métodos utilizados através do tempo, no controle de plantas daninhas, podem ser assim resumidos (MUZIK, 1970 *apud* SILVA, 1999):

- a) Com as mãos;
- b) Com o uso de objetos pontiagudos;
- c) Com enxadas;
- d) Implementos mecânicos;
- e) Controle químico com herbicidas.

Segundo MARCONDES (1982), o uso de herbicidas na agricultura constitui-se numa prática agrícola mais avançada, sendo adotada e utilizada em caráter permanente nos países mais desenvolvidos. O sucesso depende do conhecimento e reação da planta daninha ao produto. O emprego de herbicida na soja representa 30% do total consumido no Brasil, sendo a cultura que apresenta o maior consumo e com o maior número de estudos oficiais da utilização de produtos químicos para o controle de plantas daninhas.

1.5 O Glifosato

O comércio mundial de agrotóxicos cresce a cada ano. Embora muitas mudanças e inovações surjam conforme as necessidades do mercado, há entre elas o advento das culturas transgênicas, resistentes a algumas pragas, onde o uso de herbicidas é destacado, visto que a maioria destas inovações não impede o desenvolvimento de ervas daninhas no campo.

Atualmente, o herbicida glifosato N-(fosfonometil)glicina, não seletivo, sistêmico, pós-emergente, representa 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos, contabilizando um total de 1,2 bilhão/ano de dólares com vendas do produto (AMARANTE e SANTOS, 2002a). Este herbicida apresenta elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas. Desde 1971, quando foi relatado primeiramente como herbicida, três tipos de glifosato vêm sendo comercializado: Glifosato-isopropilamônio, glifosato-sesquisódio (patenteado pela MONSANTO e vendido com o nome comercial *Roundup*®) e glifosato-trimesium (patenteado por ICI, atual SYNGENTA). Seja como sal de amônio ou sódio, glifosato é um organofosforado, no entanto não afeta o sistema nervoso da mesma maneira que outros organofosforados (em geral inseticidas inibidores da enzima colinesterase). Apesar do glifosato ser citado como pouco tóxico, há evidência de efeitos deletérios no ambiente,

principalmente devido à resistência adquirida por algumas espécies de ervas, após o uso prolongado do herbicida.

O glifosato é um sólido branco. As propriedades físicas e químicas são mostradas no Quadro 4 (MINDEFENSA, 2000).

Quadro 04 - Propriedades físicas e químicas do glifosato

Propriedade	Composto puro Glifosato	Sal de glifosato-isopropilamínico
Fórmula molecular	$C_3H_8NO_5P$	$C_6H_{17}N_2O_5P$
Peso molecular	$169,1 \text{ g.mol}^{-1}$	$228,2169,1 \text{ g.mol}^{-1}$
Estado físico	Sólido branco	Líquido viscoso de cor âmbar ao amarelo
Odor	Inodoro	Ligeiro odor de amina
Densidade	$0,5 \text{ g.mL}^{-1}$	$1,16-1,18 \text{ g.mL}^{-1}$
Ponto de fusão	$184,5^\circ\text{C}$	Não aplicável, pois é líquido
Pressão de vapor	$1,84 \times 10^{-7} \text{ mm de Hg}$ a 25°C	$3 \times 10^{-7} \text{ mm de Hg}$ a 25°C
pH em solução de 1%	2,5	4,7
Solubilidade em água	12000 ppm a 25°C	9000000 ppm a 25°C
Outros solventes	Nenhum	Nenhum
Estabilidade	32 dias a 25°C e Ph 5,7 a 9	32 dias a 25°C e pH 5,7 a 9
Coeficiente de partição água/octanol K_{oc}	-2,8	N.D.
Constante da Lei de Henry	$< 7 \times 10^{-11}$	N.D.
Corrosividade	Não corrosivo	Não corrosivo

Fonte: Identificação do Herbicida glifosato, MINDEFENSA, 2000

É um herbicida pós-emergente de ação total, não seletivo às culturas, utilizado no controle de plantas daninhas em citrus, cacau, café, seringueira, banana, eucalipto, pinho e frutíferas, e aplicado antes da semeadura nas culturas de soja, milho, trigo e arroz (LARINI, 1999). A BULA do GLIFOSATO NORTOX S.A. o classifica como herbicida sistêmico, não seletivo de pós emergência, apresentado como concentrado solúvel e devido as suas propriedades sistêmicas, permite o controle total de ervas daninhas, tanto monocotiledôneas e

dicotiledôneas. O glifosato também é recomendado na renovação e na manutenção de pastagens para a eliminação de reboleiras de ervas indesejáveis.

As marcas comercializadas no Estado de Mato Grosso do Sul, estão relacionadas no CADASTRO DE AGROTÓXICOS do IAGRO - Departamento de Inspeção e Defesa Agropecuária de Mato Grosso do Sul (2003) são as seguintes:

Nome comercial dos produtos com o princípio ativo glifosato		
Agrisato 480 Cs	Command	Glifosato 480 Agripec
Direct	Glyphogan 480	Glifosato 480 Cs Sinon
Glifos	Pilarsato	Glifosato Atanor
Glifosato Alkagro	Polaris	Glifosato Nortox
Glifosato Dow Agrosiences	Radar	Glifosato Nortox Wg
Glifosato Fersol 480 Na	Rodeo Na	Glifosato Nufarm
Gliz 480 Cs	Roundup Multiação	Glion
Ryvolt 480	Roundup	Rodeo
Scout	Trop	Trop

O modo primário de ação do glifosato, princípio ativo do herbicida *Roundup*, é a inibição competitiva da 5-enolpiruvilchiquimato-fosfato sintase (EPSPS) e a 3-deoxi-D-arabino-heptulosinato-7-fosfato sintase. Esta enzima é parte da via de chiquimato que está envolvida na produção de aminoácidos aromáticos e outros compostos aromáticos em plantas (MONSANTO, 2002). Quando as plantas são tratadas com glifosato não conseguem produzir os aminoácidos aromáticos necessários para a sua sobrevivência. Aproximadamente 50% da molécula do glifosato é degradada no solo em 28 dias e cerca de 90% em 90 dias, esta degradação ocorre rapidamente por que este é degradado por microrganismos do solo tal como mostra a figura 01 a seguir. ARAÚJO (2002), cita que o glifosato é um composto que rapidamente é degradado na presença de microrganismos, pois este estimula a microbiota, favorecendo a decomposição deste.

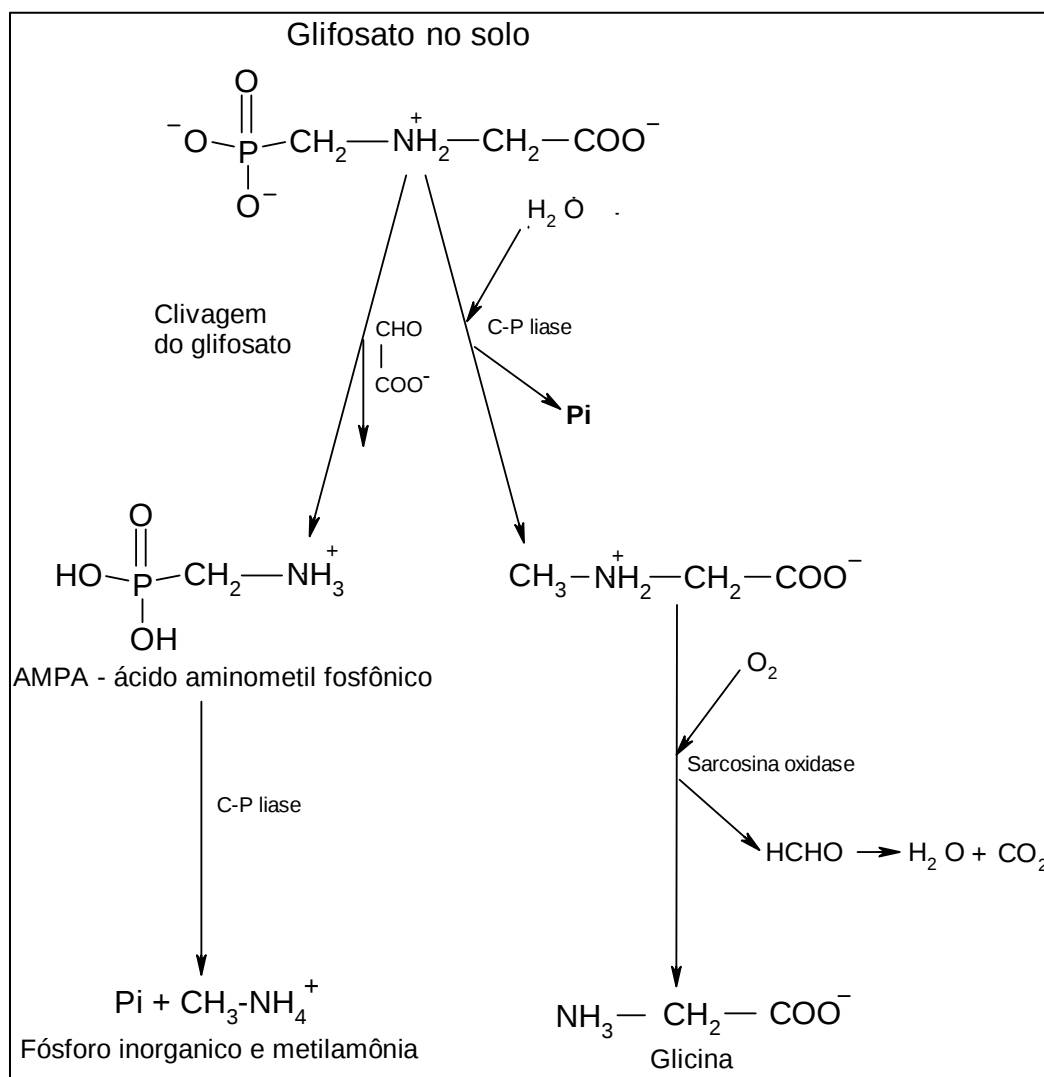


Figura 1 - Rotas de degradação do glifosato no solo (OMS, 1994)

O glifosato apresenta uma baixa toxicidade aguda para mamíferos. Em ratos, a sua DL₅₀ oral é de 4.870mg.kg⁻¹ e em camundongos de 1.570mg.kg⁻¹. A sua DL₅₀ dérmica em coelhos é estimada como sendo superior a 5.000mg.kg⁻¹.

A Portaria MS n.º 1.469, de 29 de dezembro de 2000 (PORTARIA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, PUBLICADA NO DIÁRIO OFICIAL DA NAÇÃO de 2 de janeiro de 2001), que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade determinou o limite de 500µg.L⁻¹ para o glifosato.

A toxicidade do glifosato depende conjuntamente de vários fatores do ecossistema e das condições fisiológicas de cada organismo vivo. Os listados a seguir são os mais importantes, porém, para o caso do emprego do herbicida nos programas de erradicação de

cultivos ilícitos (combate ao narcotráfico), as possibilidades de contaminação com doses significativas são mínimas porque na prática, cada espécie ilícita trata-se somente por uma única vez (MINDEFENSA, 2000):

- a) Características físico-química da formulação de uso;
- b) Quantidade do produto por paciente (exposto ao produto);
- c) Tempo de exposição do organismo receptor do produto;
- d) Via ou vias de entrada no organismo (boca, nariz, olhos ou pele);
- e) Classe e tipo dos materiais inertes da formulação;
- f) Grau de susceptibilidade do organismo receptor;
- g) Estado de saúde do organismo;
- h) Importância do sistema fisiológico afetado;
- i) Eficiência do sistema de desintoxicação do organismo;
- j) Estabilidade química da formulação empregada.

No entanto, o processo de preparação das formulações de qualquer agrotóxico, incluindo o glifosato, é uma tarefa complexa e onde se dispõem de procedimentos básicos que obrigam a introduzir modificações na seleção e na qualidade das matérias primas, com ênfase especial aos solventes e às misturas de surfactantes aniônicos e catiônicos. Para o caso do glifosato são disponibilizadas as seguintes informações:

- Ingrediente ativo: Glifosato, N-(Fosfonometil) glicina em sal de Isopropilamina a 48,0%.
- Inertes: Seboaminas etoxiladas a 52,0%.

Estas seboaminas etoxiladas são substâncias químicas perigosas, capazes de causar irritações gastrointestinais, náuseas, vômitos e diarreia. Algumas das formulações comerciais do glifosato incorporaram um surfactante conhecido como POEA (polietoxietileno amina) em uma proporção de 15 %. Este composto, segundo várias investigações toxicológicas, pode ser causa de danos gastrointestinais, certas afecções do sistema nervoso, alguns problemas respiratórios e ser capaz de destruir glóbulos vermelhos do sangue humano. POEA também pode conter uma impureza identificada como 1,4 dioxano a qual, que tem demonstrado capacidade cancerígena para animais e de causar danos ao fígado e rins de humanos (MINDEFENSA, 2000).

O mercado de glifosato, em 2000, foi de aproximadamente 78,5 milhões de litros, sendo que a MONSANTO teve uma expressiva participação de 50% deste volume. Se considerarmos que outras empresas adquirem matérias-primas e produto técnico diretamente da MONSANTO, a sua participação se eleva para 80% do mercado.

Com a introdução da soja transgênica (soja RR ou soja *Roundup Ready*), estima-se que esse consumo nos próximos anos atinja 200 milhões de litros/ano, visto a experiência da utilização glifosato já vivenciada pela Argentina e EUA, que adotaram o cultivo deste tipo de soja.

1.6 A soja comercial

A soja (*Glicine max*, Linneu) é uma leguminosa domesticada pelos chineses há cerca de cinco mil anos. Sua espécie mais antiga, a soja selvagem, crescia principalmente nas terras baixas e úmidas, junto aos juncos nas proximidades dos lagos e rios da China Central. Há três mil anos, a soja espalhou-se pela Ásia, onde começou a ser utilizada como alimento. Foi no início do século XX que passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos. A partir de então, houve um rápido crescimento na produção com o desenvolvimento das primeiras cultivares comerciais (AGROMIL, 2003).

O interesse do governo brasileiro pela expansão na produção da soja para atender à indústria fez com que a leguminosa ganhasse cada vez mais incentivos oficiais. Para atender às exigências de produção de uma cultura altamente tecnificada foi criado, em 1975, o Centro Nacional de Pesquisa de Soja como uma das unidades da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), estrategicamente localizado para que pudesse atender às demandas da produção nacional. Sua principal incumbência era conquistar a independência tecnológica para a produção brasileira, que até então estava concentrada nos estados do Sul do país, aproveitando a entressafra da cultura do trigo que, na época, recebia incentivos do governo. A boa adaptação da soja nas terras do Sul do país e a crescente demanda dos mercados interno e externo deram estabilidade aos preços do produto no mercado, o que incentivou o aumento de área. A produção de soja é dominada por apenas quatro países, que respondeu em 1998 por 88% da colheita mundial de 154,7 milhões de toneladas: Estados Unidos (47%), Brasil (20%), Argentina (11%) e China (10%) (PARCERIAS ESTRATÉGICAS, 2001).

Líder na exportação agrícola brasileira, responsável por 80% do total de grãos, a soja está estimulando novas rotas de escoamento, impulsionando os portos do Sul e do Sudeste e atingindo também os portos do Norte e Nordeste.

A soja brasileira faz sucesso no exterior, entre outras coisas, por produzir óleo com um dos mais elevados teores de qualidade do mundo e de cor amarelo-ouro, aspecto valorizado

pelos compradores, fatores influenciados pela insolação o ano todo, clima favorável e solo fértil existentes no País. Tudo isso fez do Brasil o segundo maior exportador mundial de soja, perdendo apenas para os Estados Unidos da América.

1.7 A planta transgênica

O ponto de partida foi a descoberta da estrutura do DNA em 1953, a “dupla hélice”, que daria em 1962 o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina ao norte-americano James Watson e ao britânico Francis Crick. Os degraus dessa molécula em forma de escada torcida são constituídos pelos chamados nucleotídeos, cuja composição comporta apenas quatro tipos de “letras” (bases nitrogenadas) do alfabeto genético: (A) adenosina, (C) citosina, (G) guanina e (T) timina. A informação genética propriamente dita é fornecida pela sucessão de degraus, ou seja pela seqüência de pares de bases (uma de cada lado da fita de DNA). Duas décadas depois, geneticistas começaram a desenvolver processos em laboratório para manipular e interferir na seqüência do DNA, dando origem ao que ficaria conhecido como engenharia genética. As possibilidades abertas nas áreas de saúde humana e agropecuária logo ficaram evidente: modificar genes (blocos funcionais de DNA responsáveis pela codificação de uma proteína ou característica hereditária) para corrigir “defeitos”, como doenças, ou introduzir características desejadas. Uma das formas de fazê-lo é transferir genes inteiros de um organismo para outro, quando então o OGM (ORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO) é dito “Transgênico”, pois adquire uma característica que nunca fizera parte do repertório de sua espécie e, mais do que isso, a capacidade de transmiti-la para sua progênie, uma vez que o traço genético é definitivamente incorporado ao genoma alterado (PARCERIAS ESTRATÉGICAS, 2001).

Hoje, a biotecnologia é promissora para os consumidores que buscam qualidade, segurança e sabor nos alimentos que escolhem, para os agricultores que buscam novos métodos para aumentar sua produtividade e rentabilidade, e para os governantes e organizações não-governamentais que defendem a redução da fome mundial, a garantia da qualidade ambiental, a preservação da biodiversidade e a promoção da saúde e do bem-estar por meio de alimentos abundantes, seguros e nutritivos (EMBRAPA, 1998).

Os conhecimentos básicos, derivados da genética e da biologia celular moderna, que permitiram criar a ovelha Dolly podem ser utilizados para a agricultura moderna melhorar

espécies de plantas essenciais para a alimentação humana e animal (KLEBA, 1998). Desde o início da agricultura, os objetivos da agricultura são:

- Aumentar a produtividade de determinadas culturas pela seleção de variedades que apresentem:
 - a) Resistência a doenças e pragas;
 - b) Resistência a encharcamento e à seca;
 - c) Tolerância a condições ambientais hostis;
 - d) Maior resposta ou independência a fertilizantes;
 - e) Maior conteúdo de óleo;
 - f) Maior valor nutritivo;
 - g) Maior facilidade de colheita e armazenagem.

As primeiras plantas transgênicas foram desenvolvidas em 1983, quando um gene codificante para a resistência contra o antibiótico canamicina foi introduzido em plantas de fumo.

Para se obter uma planta transgênica é necessário:

- a) Um gene de interesse;
- b) Uma técnica para transformar células vegetais através de introdução do gene de interesse;
- c) Uma técnica para regenerar, a partir de uma só célula transformada, uma planta inteira.

Após a última etapa tem-se uma planta transgênica, porque ela contém além dos genes naturais, um gene adicional proveniente de outro organismo, que pode ser de uma planta, uma bactéria ou até um animal.

Discutem-se diversos itens em relação às plantas transgênicas, dentre elas cita-se (EMBRAPA, 1998):

Vantagens:

- a) Redução da quantidade de herbicidas utilizados e um reduzido impacto nos ecossistemas agrícolas, na biodiversidade e para os seres vivos;
- b) Ocorre uma melhor possibilidade de implantação do plantio direto, conseqüentemente diminuindo a erosão.

Desvantagens:

- a) Devido a diminuição da mão-de-obra, suprime-se o controle manual de ervas daninhas, o que deve causar maior êxodo rural;

- b) Possibilidade de risco em seu possível caráter alérgico;
- c) Um fator de risco adicional advém do aumento da produção de fitoestrogênio em leguminosas;
- d) Probabilidade de uma expressão severa com uma resposta indesejável em um agente susceptível que tenha sido exposto;
- e) Perigo de fuga de um gene introduzido em decorrência de uma contaminação gênica das espécies silvestres;
- f) Ocorrência de fluxo gênico entre plantas transformadas e plantas silvestres;
- g) Perigo de uma planta transgênica tornar-se invasora por adquirir vantagens adaptativas em relação ao seu parental;
- h) Alteração da agressividade do genótipo nas plantas transgênicas;
- i) Presença de organismos nunca encontrado na natureza.

1.7.1 A soja transgênica

A soja *Roundup Ready* (RR) da MONSANTO é a primeira planta transgênica a ser aprovada para pesquisa no Brasil (EMBRAPA, 1998). A soja RR foi modificada por técnicas de ADN recombinante (ADNr) pela inserção de um gene da bactéria *Agrobacterim sp.*, que a torna insensível ao glifosato, ingrediente ativo do herbicida *Roundup*. O herbicida *Roundup*, através de seu ingrediente ativo glifosato, mata ervas, bloqueando a enzima EPSP *synthase* (enolpiruvilchiquimato-fosfato-sintase), encontrada em plantas e bactérias sendo responsável pela produção de aminoácidos aromáticos essenciais para a sobrevivência e crescimento da maior parte das plantas (KRIMSKY & WRUBEL, 1996).

A soja *Roundup Ready*, evento 40-3-2, foi produzida pela introdução da sequência de codificação CP4 EPSPS, naturalmente ao glifosato, no genoma da soja, usando-se a transformação por aceleração de partículas, também conhecida por biolística (MONSANTO, 2002).

Mesmo ocupando o segundo lugar na produção de soja no mundo, o Brasil é o único que ainda não liberou totalmente a soja transgênica resistente a herbicida, uma tecnologia agrícola que vem fascinando produtores agrícolas onde foi regulamentada. Nos Estados Unidos, desde a introdução do plantio das variedades geneticamente modificadas em 1995, a cultura biotecnológicas já ocupava em 1998 cerca de 55%, da área plantada de soja (PARCERIAS ESTRATÉGICAS, 2001).

O Brasil foi extremamente criterioso referente a abertura de mercado para os transgênicos. O tema passou pelo crivo técnico da Justiça e de organismos oficiais do setor. Foi objeto de pesquisa da COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA (CNT-Bio), que reúne alguns dos maiores especialistas no assunto, representando os Ministérios da Agricultura e Meio Ambiente, da Saúde, da Ciência e Tecnologia, da Justiça e das Relações Exteriores. E concluiu-se que o Brasil deve se abrir para a transgenia, a exemplo do que acontece em outros países como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Holanda, Dinamarca e Japão, que já estão produzindo e consumindo transgênicos (MIYAMOTO, 2001).

Na opinião dos representantes da FEDERAÇÃO LATINO-AMERICANA de ASSOCIAÇÃO DE SEMENTEIROS – FELAS (REVISTA CULTIVAR, 2000), da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai, Chile, Equador, Colômbia, Venezuela e Uruguai, o desenvolvimento científico na área tecnológica é fundamental para o progresso da agricultura na América do Sul e Caribe e a utilização de organismos geneticamente modificados é essencial para se alcançar esse objetivo.

Considerando que a soja é um dos produtos de maior produção de nosso Estado (Mato Grosso do Sul-MS); a crescente necessidade de desenvolvimento de métodos de análise da mesma para certificação para exportação; visto a proibição pela legislação do plantio, da comercialização e do consumo da soja transgênica em vários países e sabendo-se que o glifosato é utilizado como único herbicida na planta transgênica, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologia para a análise do glifosato

1.8 Análise dos agrotóxicos em alimentos

Com o constante aumento da população mundial, é da mais elevada importância salvaguardar as nossas fontes de alimentação. Para tal, o uso correto dos agrotóxicos traz um grande benefício aos agricultores e contribui para a abundância, variedade, qualidade e economia de nosso suprimento alimentar (YOKOMIZO et. al., 1985).

No entanto, esperava-se que com o aumento do uso de agrotóxicos ocorreria o aumento da produção, no entanto isso não ocorreu, na realidade a qualidade dos alimentos decaiu devido aos resíduos de agrotóxicos (muitos são extremamente prejudiciais a saúde). E estes tiveram um aumento de consumo e ainda existe o perigo do uso de agrotóxicos contrabandeados e usados inadequadamente. Devido aos riscos que os resíduos de agrotóxicos

em alimentos trazem a saúde de quem os consome, há necessidade de um monitoramento constante dos níveis de concentração dos mesmos nos mais variados produtos agrícolas (FERREIRA, 1995).

Segundo o GARP (1999), existem os seguintes critérios de avaliação:

- a) Limite Máximo de Resíduos (LMR): quantidade máxima de resíduos de agrotóxicos legalmente aceita no alimento.
- b) Ingestão Diária Aceitável: é a quantidade máxima ingerida durante toda a vida.

Entende-se por tolerância a concentração máxima de um resíduo de agrotóxico que é permitida em uma substância alimentícia em um estágio determinado, por ocasião da colheita, do armazenamento ou ainda do transporte, da comercialização, do preparo, ou do consumo. Esta concentração é expressa em partes (em peso) do agrotóxico por milhão de partes (em peso) do alimento (ppm ou mg/kg) (YOKOMIZO *et al.*, 1985).

Segundo a ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 2002) em relatório concluído indica índices preocupantes. Dentre os quais, a constatação de que 81,2 % de amostras de alimentos analisadas exibiam resíduos de agrotóxicos. Desse total, 22,17% apresentaram irregularidades porque os percentuais de resíduos ultrapassavam os limites permitidos pela legislação. O mais grave é que entre as amostras 7,04% continham resíduos de agrotóxicos não autorizados para as respectivas culturas, devido ao seu alto grau de toxicidade – como o Dicofol e os Ditiocarbamato. Do total, 8.945 estavam acima do Limite Máximo de Resíduo) e 6,18% apresentavam as duas irregularidades.

Com isso se faz necessário o desenvolvimento de técnicas que permitam o monitoramento desses agrotóxicos. Já existem várias técnicas que são utilizadas para a determinação qualitativa e quantitativa de agrotóxicos em alimentos, mas segundo FERREIRA (1995) a cromatografia é a técnica que melhor se adapta a este tipo de monitoramento, uma vez que possibilita uma separação eficiente das substâncias, mesmo em quantidades muito pequenas, em nível de traços ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$). Mas para que se possa fazer a análise propriamente dita no cromatógrafo seja ele a gás ou líquido é necessário primeiramente o tratamento prévio do analito, como a extração do agrotóxico de uma determinada matriz, bem como a purificação da amostra e síntese de um derivado.

1.8.1 A análise do glifosato

O Glifosato é um herbicida orgânico da classe ácida, do grupo dos ácidos alifáticos e do subgrupo dos aminoácidos fosforados. Os aminoácidos fosforados resultam da substituição de um hidrogênio amínico de um aminoácido por um radical de éster fosfórico. O nome químico do glifosato varia com sua forma estrutural:

1) Ácido N-(fosfonometil) aminoacético; ácido N-(fosfonometil) glicina .

Formula molecular: $C_3H_8NO_5P$, a estrutura do glifosato e seu principal metabólito apresenta-se na figura 2.

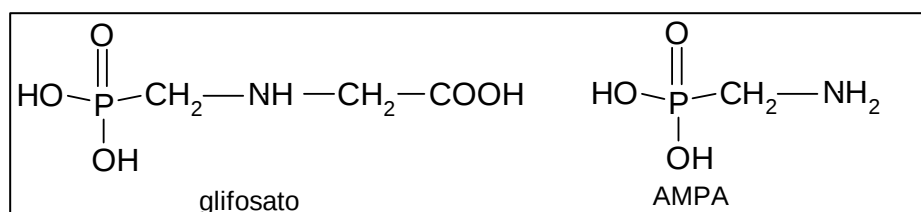


Figura 2 - Estrutura do glifosato e AMPA

Devido sua corrosividade a metais, utiliza-se galões plásticos (polietileno) para o seu envasamento (MINDEFENSA, 2000).

A toxicidade em animais é baixa, tal como citadas a seguir:

- Oral: DL_{50} 5600mg.Kg⁻¹ em ratos.
- Dérmica: DL_{50} 500mg.Kg⁻¹ em coelhos.
- Inalatória: LC_{50} > 12,2 mg.L⁻¹ de ar para 4 horas de expiração para ratos.

No entanto, de acordo com a MONSANTO, a formulação típica do glifosato de uso comercial apresenta 41% de ingrediente ativo (glifosato) e 59% de substâncias inertes (seboaminas etoxiladas), (COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 1999; MINDEFENSA, 2000). Estes compostos inertes são surfactantes, substâncias que melhoram o desempenho do defensivo (LOH, 2002). Mas em algumas formulações comerciais do glifosato incorporam um surfactante conhecido como POEA - polietileno amina, em uma proporção de 15%.

Este composto, segundo várias investigações toxicológicas (MINDEFENSA, 2000; ARROYAVE, 2002; PAGANELLA e CLARO, 2003), pode causar problemas gastrointestinais, problemas no sistema nervoso central, respiratórias, destruição dos glóbulos vermelhos no sangue.

Segundo PAGANELLA e CLARO (2003) o glifosato apresenta mutagenicidade em células animais e vegetais; carcenogenicidade devido a presença de N-nitrosoglifosato (NNG) que é altamente cancerígena; efeitos na reprodução, com redução na contagem de espermatozóide; degradação perigosa, o metabólito principal, AMPA, induz em ratos diminuição de peso corporal, diminui peso no fígado e provoca excesso de divisão celular nos rins e na bexiga; contaminação dos alimentos, encontra-se glifosato um ano após o tratamento; exposição humana, contaminação pela deriva, ingestão ou banho com águas com resíduos.

CORREA *et al.* (2002) cita que doses de glifosato a partir de 72 g.ha⁻¹ de ingrediente ativo provocam fitointoxicações diminuindo o crescimento de plantas de milho, reduzindo em 40% sua área foliar.

Além dos problemas para a saúde, existem pesquisas que verificam a potencialidade de toxidez do glifosato para ambientes aquáticos (DORES e DE-LAMONICA-FREIRE, 2001), estes autores utilizaram as propriedades físico-químicas do glifosato para avaliar o seu potencial de risco. O Quadro 5 apresenta as propriedades físico-químicas do glifosato para avaliar seu potencial de contaminação de águas subterrâneas.

Quadro 05 Classificação do ingrediente ativo do glifosato para o GUS, índice de vulnerabilidade de águas subterrâneas

Princípio ativo	Pressão de vapor	Solubilidade em água	Log K _{ow}	K _{oc}	DT ₅₀ Solo	GUS
	mmHg	mg.L ⁻¹		Cm ³ .g ⁻¹	Dias	
Glifosato	10 ⁻⁷	900.000	1,7.10 ⁻³	24.000	47	2,81

Fonte: ARAÚJO: Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solo. Piracicaba - SP, 2002.

Segundo os dados da EPA (Agência de Proteção Ambiental) o glifosato é contaminante em potencial para águas subterrâneas. No entanto no índice de GUS, os dados são inconclusivos, PRATA (2002), faz uma severa critica ao GUS para este estudo dá-se o fato de que o índice é calculado a partir dos valores de K_{oc} e a sorção do glifosato não se relaciona com o conteúdo de matéria do solo, o GUS serve apenas como indicativo para lixiviação, sendo que resultados mais minuciosos devem ser obtidos com o uso de colunas e lisímetros.

Os critérios utilizados pela EPA para a avaliação de contaminação de águas subterrâneas são apresentados:

- Solubilidade em água: $> 30 \text{ mg.mL}^{-1}$
- Coeficiente de adsorção à matéria orgânica K_{oc} : $< 300-500 \text{ mL.g}^{-1}$
- Constante de Henry K_H : $< 10^{-2} \text{ Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$
- Meia-vida no solo (DT_{50} no solo): $> 14-21$ dias
- Meia-vida na água (DT_{50} na água): > 175 dias

Fonte: comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina, PRATA (2002)

Segundo DORES e DE-LAMONICA-FREIRE (2001), O índice de vulnerabilidade de águas subterrâneas (GUS), é calculado através dos valores de meia-vida do composto no solo e do coeficiente de adsorção à matéria orgânica, não levando em consideração outras propriedades como solubilidade em água. As faixas de classificação dos compostos, de acordo com sua tendência de lixiviação, são:

- $GUS < 1,8$ não sofre lixiviação
- $1,8 < GUS < 2,8$ faixa de transição
- $GUS > 2,8$ provável lixiviação

O valor de GUS serve como ferramenta auxiliar para identificação de agrotóxicos a serem priorizados de monitoramento ambiental *in loco*. Permite a identificação do provável compartimento em que o composto deve ser monitorado no caso sedimento ou água.

Para avaliar o risco de contaminação de águas superficiais é usado o método de GOSS (DORES e DE-LAMONICA-FREIRE, 2001), que classifica o potencial de contaminação em solo em alto, médio e baixo em função do transporte do agrotóxico adsorvido a colóides de solo ou dissolvido em água.

O potencial de contaminação para sedimentos será alto caso os valores forem os seguintes:

- DT_{50} no solo: ≥ 40 dias,
 - K_{oc} : $\geq 1000 \text{ mL.g}^{-1}$,
- ou;
- DT_{50} no solo: ≥ 40 dias,
 - K_{oc} : $\geq 500 \text{ mL.g}^{-1}$,
 - Solubilidade em água $\leq 0,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O potencial de transporte dissolvidos em água será alto quando os valores forem:

- DT_{50} no solo: > 35 dias,
 - K_{oc} : $< 100.000 \text{ mL.g}^{-1}$,
 - Solubilidade em água $\geq 1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$,
- ou;
- K_{oc} : $\leq 700 \text{ mL.g}^{-1}$,
 - Solubilidade em água entre 10 e $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, ou;

Com essas informações o glifosato é classificado como contaminante em potencial para águas subterrâneas. Para águas superficiais o índice de GOSS. Caracteriza o glifosato como alto potencial de contaminação (SPADOTTO, 2002).

Segundo PRATA e LAVORENTI (2000), o comportamento de um agrotóxico no solo e na água é regulado por propriedades do composto como reatividade, solubilidade em água (K_{oc}), pressão de vapor e retenção no solo. Propriedades como solubilidade e reatividade levam uma maior adsorção ao solo. Quando um agrotóxico está dissolvido no solo, este pode ser arrastado com a água. Entretanto, a solubilidade não deve ser considerada por si só, independentes das cargas iônicas ou residuais que a molécula apresenta, que refletem em propriedades básicas, ácidas, anfóteras ou não ionizáveis. Assim, uma molécula com cargas positivas (como o glifosato), tende a ser mais fortemente adsorvida em colóides do solo. O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), mede a hidrofobicidade da molécula, sendo que quanto maior a hidrofobicidade da molécula, maior a adsorção.

A adsorção é o processo pelo qual a molécula do agrotóxico é transferida da fase móvel (líquida ou gasosa), para a fase estacionária (sólida). A adsorção é reversível e pode seguir ambas as direções, adsorção ou desorção, sendo regida pela lei geral da dispersão, segundo a qual, em determinada composição do adsorvente e do adsorvido e sob certas condições externas, como temperatura e pressão, cada substância se distribui de tal forma que seu nível de concentração, em ambas as fases permanece constante. Duas características importantes e determinantes para a adsorção são o conteúdo de matéria orgânica no solo e a solubilidade do composto. O índice de retenção no solo (K_{oc}), refere-se a capacidade da molécula do agrotóxico se ligar ao carbono orgânico do solo, quando moléculas polares orgânicas ligam-se prontamente à superfícies orgânicas ou inorgânicas do solo.

Os agrotóxicos no solo tornam-se parte de processos de transporte e degradação, que afetam todos os produtos químicos orgânicos adicionados a um ecossistema dinâmico. Há diversos processos de transporte dos resíduos de agrotóxicos dentro ou fora do ecossistema do solo. O transporte pelo processo de volatilização leva o agrotóxico do solo para a atmosfera.

Os que tem pressão de vapor superior a 10^{-6} mmHg a 25°C , são grandemente afetados. Assim, como a pressão de vapor aumenta com a temperatura, outros fatores também podem modificar a cinética da volatilização, como velocidade de ventos, umidade do ar e do solo e conteúdo de matéria orgânica. Portanto, o entendimento da sorção, biodegradação e transporte de produtos químicos orgânicos do solo e aquífero é essencial para prever o destino e o impacto desses produtos no ambiente.

AMARANTE e SANTOS (2002a) descreve as vias de atuação do herbicida na planta; as duas rotas de degradação, sendo a formação de sarcosina pela ação da *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* e a formação do seu principal metabólito o AMPA (demonstrado na figura 01). Este autor também cita que não há limite legal estabelecido para glifosato em solo; no entanto a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA-US) estabelece limite consultivo em saúde 700 mg.L^{-1} de glifosato em água potável. Entre tanto a Comunidade Econômica Européia (EEC) estabelece o limite em $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, e no Brasil, segundo a Portaria 1469 de 29 dezembro de 2000, nas normas de qualidade da água para consumo humano, o limite é de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

No Brasil, segundo SPADOTTO (2002) em 2000, o consumo de herbicidas foi cerca de 174 mil toneladas de produtos formulados, expresso em forma de ingrediente ativo representando mais de 81 mil toneladas, divididos entre as regiões Sul (38,9%), Centro-Oeste (29,9%), Sudeste (22,8%), Norte (2,0%) e Nordeste (6,3%) e neste quadro a soja corresponde a 39,8% do consumo, seguida do milho (23,5%), cana-de-açúcar (12,9%), café (4,4%) e arroz irrigado (3,7%). Nota-se que a soja corresponde à maior produção e que o glifosato é o herbicida mais utilizado em sua produção.

O glifosato também vem associado a outros herbicidas para o controle de plantas daninhas. RAMOS e DUREGAN (1996) avaliam a eficiência da mistura de glifosato com 2,4 amina no controle de trapoeraba (*Commelina virginica* L.) e os resultados mostraram que o controle foi mais eficiente em relação aos produtos aplicados isolados. ALMEIDA e BRONHARA (1982) verificam que o tratamento com glifosato + 2,4 amina + paraquat apresentaram um controle superior para capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea* (Linr.) Hitch), picão preto (*Bidens pilosa* L.) e graxuma (*Sida* spp) em relação as misturas de paraquat + 2,4 D e 2,4 D aplicados individualmente ou em duplas. RODRIGUES e ALMEIDA (1988), verificaram que ocorre uma redução na atividade do imazanquin quando misturado com glifosato e 2,4-D. VICTORIA e VOLL (1988), compararam os herbicidas paraquat e glifosato no trabalho de resteva de trigo para o posterior plantio de soja e em avaliações visuais não verificaram diferenças. HASSK *et al.* (1980), analisaram o glifosato

utilizado como dessecante para colheita mecânica do feijão miúdo (*Vigna sinensis* Var. Mississippi purple L.) e verificaram que as sementes apresentaram uma menor qualidade e envelhecimento precoce. FERRE *et al.* (1980) estudaram a eliminação de cepas de cana-de-açúcar (variedades NA 56-79; CB 45-79; CB45-155; IAC 51/205; IAC 48/65; IAC 52/150; IAC 53/57) e obtiveram êxito em plantas de 70 a 120 cm com controle de 90%. (2001) e AMARANTE e SANTOS (2002a) avaliaram o risco de contaminação de água superficial e subterrânea por agrotóxicos em áreas cultivadas com coqueiro e eucalipto no Nordeste Brasileiro, quanto ao glifosato e concluíram que este apresenta baixa lixiviação, alto potencial de transporte associado ao sedimento para o GOSS e parcialmente positivo para os critérios da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - EPA-US.

1.9 Análise de resíduo de glifosato e AMPA em solo

Os métodos de identificação e de quantificação de glifosato e de seus metabólitos AMPA (ácido aminometil fosfônico) e sarcosina, têm sido de grande interesse nos últimos anos.

A análise do glifosato, de seus metabólitos e de seus derivados em matrizes alimentícias e em outras (água e solo) é complicada visto não haver um método, por cromatografia gasosa, que analise estes compostos diretamente sem derivatização e, mesmo com derivatização, sua análise é complexa e muito trabalhosa (SILVEIRA *et al.* 2002).

Segundo AMARANTE e SANTOS (2002b), a molécula de glifosato apresenta elevada polaridade e ausência de cromóforo. Por estes motivos, a determinação do glifosato por cromatografia necessita de adaptações que permitam sua detecção. Tais adaptações, incluem, basicamente, reações de derivatizações ou, ainda, alterações de alguma propriedade física que possa ser relacionada à quantidade de glifosato na amostra.

1.9.1 Processos de extração

Devido a alta polaridade do glifosato e sua tendência em formar espécies iônicas, a maioria dos procedimentos de extração do herbicida baseiam-se em reações ácido-base, onde o composto, inicialmente ligado à espécies iônicas do solo através do grupo fosfato, passa, então, a interagir com os íons da solução, assim, nos processos de extração são utilizadas, geralmente, soluções de bases fortes (como NaOH e KOH), sais de bases fortes (como

KH_2PO_4), bases fracas (tais como; trietilamina, NH_4OH) ou ácidos fracos, seguindo-se, na maioria das vezes, de etapas de retenção/eluição em resinas de troca iônica. A eficiência no processo de extração do glifosato e AMPA está diretamente relacionado ao tipo de solo. Em geral, melhores recuperações são observadas para solos orgânicos, enquanto que para solos argilosos e minerais, devido à elevada competitividade pelos sítios iônicos do solo, a eficiência no processo de extração fica relativamente comprometida, resultando em menores recuperações (THOMPSON *et al.*, 1989).

MILES e MOYE (1988), também apresentaram diferentes formas de extração do herbicida glifosato, de acordo com as características do solo. Para solos argilosos e com alto teor de matéria orgânica, foi utilizado solução de KOH $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (extrações por 15 minutos). Para solos com baixos teores de argila e matéria orgânica, foi usada uma solução de KH_2PO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. ALFERNESS e IWATA (1994), utilizaram solução de KH_2PO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e NH_4OH $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$, para a extração de solos arenosos e argilosos. EBERBACH e DOUGLAS (1991), utilizaram trietilamina $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, para a extração.

A extração dos analitos neste trabalho utilizou 25 ml de NaOH 1 mol.L^{-1} em ultrassom e centrifuga.

1.9.2 Processo de derivatização

O termo derivatização refere-se, em cromatografia, à transformação de um composto químico em outro com o intuito de obter-se uma análise mais rápida, conveniente ou mais exata (LANÇAS, 1993). Após a derivatização o composto formado deve apresentar uma ou mais das seguintes vantagens em relação ao composto de partida: Deve ser mais facilmente extraído ou cromatografado, medido com maior sensibilidade ou exatidão, ou mais facilmente separado de interferentes.

HARRIS (2001), define como alteração química para prender um grupo a uma molécula de forma que ela pode ser detectada convenientemente, este tratamento altera a volatilidade e a solubilidade.

A derivatização serve também para contornar uma das maiores limitações, se não a maior, da cromatografia gasosa, visto que, compostos de elevada polaridade, baixa volatilidade e/ou instabilidade térmica, não podem ser analisados por cromatografia gasosa. Assim muitas moléculas são excluídas da análise por cromatografia gasosa. Porém estas podem ser adequadamente analisadas na forma de um derivado conveniente.

Compostos com massa molecular elevada e grupos polifuncionais não são, usualmente, adequados à análise direta por cromatografia gasosa. Em geral, estes grupos funcionais tornam o composto bastante polar e reduzem sua volatilidade, tornando o tempo de retenção demasiadamente longo. Em casos extremos, o composto não é eluído da coluna cromatográfica. Por exemplo, os ácidos carboxílicos apresentam elevada polaridade e moderada solubilidade em água, dificultando a obtenção de bons resultados quantitativos, particularmente em baixas concentrações.

Compostos de alta polaridade eluídos em cromatografia gasosa, geralmente sofrem adsorção na coluna ou decomposição na coluna ou no injetor, dificultando a obtenção de dados quantitativos confiáveis. Como exemplo podemos citar o colesterol, o qual, apesar de ser volatilizado, apresenta elevada adsorção e decomposição na forma livre, mas, pode ser quantificado facilmente na forma de um derivado.

Porém, apesar da derivatização ser uma reação com o intuito de tornar possível a análise de um composto que não possua características necessárias, para ser analisada por cromatografia gasosa, ela é também uma fonte de erros em potencial, visto que, esta aumenta o número de etapas do processo. Alguns aspectos importantes devem ser observados a fim de diminuir estas possibilidades de erro, são: pureza dos reagentes e solventes, estabilidade dos derivados formados, tempo de reação, dentre outros. As reações de derivatização propiciam um grande impulso na análise de moléculas de interesse na área biomédica, tornando possível a análise por cromatografia gasosa de classes de compostos como carboidratos, esteróides, aminoácidos, constituintes de ácidos nucleicos, ácidos do ciclo de Krebs, hormônios da tireóide e muitas outras (LANÇAS, 1993).

A técnica de cromatografia gasosa é amplamente empregada para determinação de glifosato. Para a determinação do herbicida por este método, faz-se necessária uma prévia derivatização para obtenção de um composto volátil, porém, esta técnica apresenta a vantagem da ótima sensibilidade.

Uma reação eficiente de derivatização é a primeira e a etapa crítica para um método bem sucedido e aplicação reprodutível na CG, a análise para ácidos fosfônicos e os herbicidas de aminoácidos requerem derivatizações prévias para uma cromatografia convenientemente satisfatória.

O glifosato pode ser considerado como um caso especial, devido a sua natureza polar e a solubilidade em água elevada, que limita a possibilidade de usar as técnicas padrão de derivatização empregadas freqüentemente na análise derivatização de CG-EM, geralmente, envolve o uso de anidrido trifloroacético (TFAA), trifluoroetanol (TFE) e ácido

heptafluorobutírico (HFBA). O uso das misturas dos anidridos fluorados e álcoois perfluorados, fornecem os derivatizados do glifosato e AMPA que podem ser detectados por CG-MS com sensibilidade e seletividade elevados (TADEO *et al.*, 2000).

SILVEIRA *et al.* (2002), analisaram três técnicas de derivatização, a primeira com trimetilortoacetato e ácido acético, a segunda com diazometano e cloroformiato de N-butila e a terceira com anidrido trifluoroacético e trifluoroetanol. Destas três técnicas somente a terceira apresentou um espectrograma de massa dos compostos perfeitamente identificáveis. Portanto a análise do glifosato e AMPA neste trabalho será feita derivatizando-se o glifosato com anidrido trifluoroacético e trifluoroetanol. Este procedimento também foi utilizado por DEYRUP *et al.* (1985), EBERBACH e DOUGLAS (1991), BÖRJENSSON e TORSTENSSON (2000), KUDZIN *et al.* (2002).

KATAOKA *et al.* (1996), usaram 0,1 mL de 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido 4-aminobutílfosfônico com um padrão interno e 0,05 mL de cloroformiato de isopropila. DEYRUP *et al.* (1985) comparou a derivatização do glifosato e AMPA com anidrido trifluoroacético e anidrido heptafluorobutírico com álcool trifluoroetanol e pentafluoropentanol e a combinação anidrido trifluoroacético e álcool trifluoroetanol, ofereceram os melhores resultados. ALFERNESS e IWATA (1994), derivatizaram o glifosato e AMPA com anidrido trifluoroacético e 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol.

Em suas pesquisas, AMARANTE e SANTOS (2002b), citam outros compostos usados para derivatização do glifosato em AMPA em solo e outras matrizes.

1.9.3 Métodos analíticos

Vários métodos analíticos para determinação de glifosato e AMPA foram descritos, a cromatografia de camada delgada (RAGAB, 1978), polarografia (FRIESTAD e BRONSTAD, 1985; SANCHO *et al.*, 1996) *apud* AMARANTE e SANTOS (2002b), cromatografia líquida de alta eficiência (VREEKEN *et al.*, 1998; MILES e MOYE, 1988; POWELL *et al.*, 1990; ABDULLAH *et al.* 1995; COWELL *et al.* 1986; ARAÚJO, 2002), espectroscopia de cintilação líquida (PRATA, 2002), ressonância magnética nuclear de ^{31}P , espectrofotometria e eletroforese (AMARANTE e SANTOS, 2002b) e cromatografia gasosa (ROY e KONAR, 1989; KATAOKA *et al.* 1996; ALFERNESS e IWATA, 1994; BÖRJENSSON e TORSTENSSON, 2000; DEYRUP *et al.* 1985; TSUNODA, 1993; KUDZIN *et al.* 2002).

Devido às propriedades físico-químicas do glifosato e AMPA e das modificações que estes sofrem em cada processo este pode ser analisado por diferentes métodos.

A cromatografia gasosa (CG) é um método mais versátil e sensível para análise de resíduos, devido à alta sensibilidade obtida com Detector de Captura de Elétrons (DCE) (EBERBACH, 1991) e Detector Fotométrico de Chama (DFC) (DEYRUP *et al.*, 1985). Os detectores fotométricos de chama são específicos para elementos selecionados, tais como S, P, Pb ou Sn (HARRIS, 2001).

Adicionalmente, Espectrometria de Massa (EM) é a técnica de detecção mais valiosa porque fornece informação sobre a estrutura molecular do composto e também é altamente sensível e seletiva quando no modo de monitoramento de um único íon (COLLINS, 1993). É uma técnica comum com poder de resolução excelente, e uma sensibilidade bastante acentuada. Como inconveniente, se a substância não for volátil e termicamente estável, há a necessidade de se formar um derivado com estas características, o que nem sempre é possível. Na maioria das vezes é necessário etapas de preparação da amostra, antes que ela possa ser analisada, para que não haja interferências durante a análise e contaminação da coluna.

O detector de uso mais geral para a cromatografia gasosa é o espectrômetro de massa. O detector por condutividade térmica é a forma mais geral de se detectar todas as classes de compostos, mas ele não é suficientemente sensível para a análise de traços. Os detectores sensíveis para análise de traços respondem, cada um a um número limitado de compostos. O detector por captura de elétrons é específico para moléculas que contêm halogênios, carbonilas conjugadas, nitrilas e nitrocompostos. O detector por fotoionização pode ser específico para compostos aromáticos e insaturados. O detector de nitrogênio-fósforo tem a sensibilidade aumentada para compostos que contêm qualquer um desses dois elementos, mas também é sensível aos hidrocarbonetos. Os detectores quimiluminescentes de enxofre e nitrogênio respondem cada um a apenas um elemento (HARRIS, 2001).

1.10 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica utilizada para separar gases ou substâncias voláteis. A separação se baseia na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa).

A amostra através de um sistema de injeção é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas convenientes no local da injeção da amostra e na

coluna permite a vaporização destas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. O uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação destas substâncias (COLLINS, 1993).

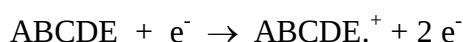
É uma técnica com poder de resolução excelente e uma sensibilidade bastante acentuada, com um inconveniente, se a substância não for volátil e termicamente estável, há a necessidade de se formar um derivado com estas características, o que nem sempre é possível. É necessário na maioria das vezes, etapas de preparação da amostra antes que ela possa ser analisada para que não haja interferências durante a análise e contaminação da coluna (COLLINS, 1993).

As características fundamentais de um sistema de CG são: retenção, seletividade, eficiência e resolução:

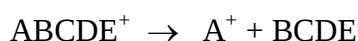
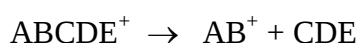
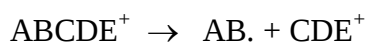
- Retenção: Na CG, o parâmetro de retenção é o tempo de retenção, t_r . Ele é definido como o tempo transcorrido entre a injeção da amostra e o máximo do pico cromatográfico. Porém, mesmo que a substância não interagisse de forma alguma com a FE, o seu tempo de retenção não seria nulo, pois transcorreria algum tempo entre a sua injeção e a sua passagem pelo detector. Este tempo corresponde ao tempo que o gás de arraste demora em percorrer a coluna, é denominado tempo de retenção do composto não retido (ou tempo morto), t_m .
- Tempo de retenção ajustado: é parâmetro que realmente reflete as características físico-químicas de retenção de um determinado composto. É o tempo de retenção descontado do tempo morto.
- A seletividade: capacidade de um sistema de diferenciar dois compostos, sendo uma característica que, na CG, é mais associada à coluna cromatográfica.
- Eficiência: Na CG, a eficiência é expressa pelo número de pratos teóricos, que é calculada usando-se um parâmetro de retenção e a largura do pico cromatográfico - no caso, a largura de base.
- Resolução. Na CG, a resolução entre duas substâncias é a razão entre a diferença das distâncias de migração e a média das larguras das bandas.

1.11 Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa é usada na cromatografia líquida e gasosa para identificar e quantificar os constituintes. O princípio da espectrometria de massa é a ionização ou a fragmentação do composto a ser analisado por meio de um bombardeio de elétrons, ela tem sido uma ferramenta poderosa na elucidação de estruturas moleculares, como também na quantificação de traços de compostos em várias matrizes (BUSTILLOS *et al.* 2003). Os íons são produzidos por colisão de elétrons que se movem rapidamente com as moléculas do gás a ser analisado. As colisões entre elétrons e moléculas orgânicas produzem quase sempre íons positivos em vez de negativos; sendo que a razão entre íons positivos e negativos é da ordem de 1000:1. Se a amostra a se analisar apresentar pressão de vapor apreciável, ela é introduzida no instrumento por difusão através de um escape. Se não for volátil terá que ser vaporizada. Moléculas da amostra são bombardeadas por elétrons (modo EI: impacto de elétrons) ou íons (modo CI: ionização química), da seguinte forma:



O íon formado se fragmenta:



1.11.1 Detecção de íons

Os espectrômetros de massa separam os íons em fase gasosa com diferentes razões massa/carga (m/z). O constituinte é ionizado pelo impacto do elétron ou pela ionização química. O impacto cria o íon molecular M^+ , e, habitualmente, vários fragmentos de íons menores. Os íons são acelerados por um campo elétrico, ficando todos com a mesma energia cinética. Um detector como o corpo de Faraday ou um multiplicador de elétrons mede a abundância relativa de cada tipo de íon. O espectro de massa é um gráfico da abundância versus m/z (HARRIS, 2001).

A figura 3 apresenta um exemplo de espectro de massa de um analito.

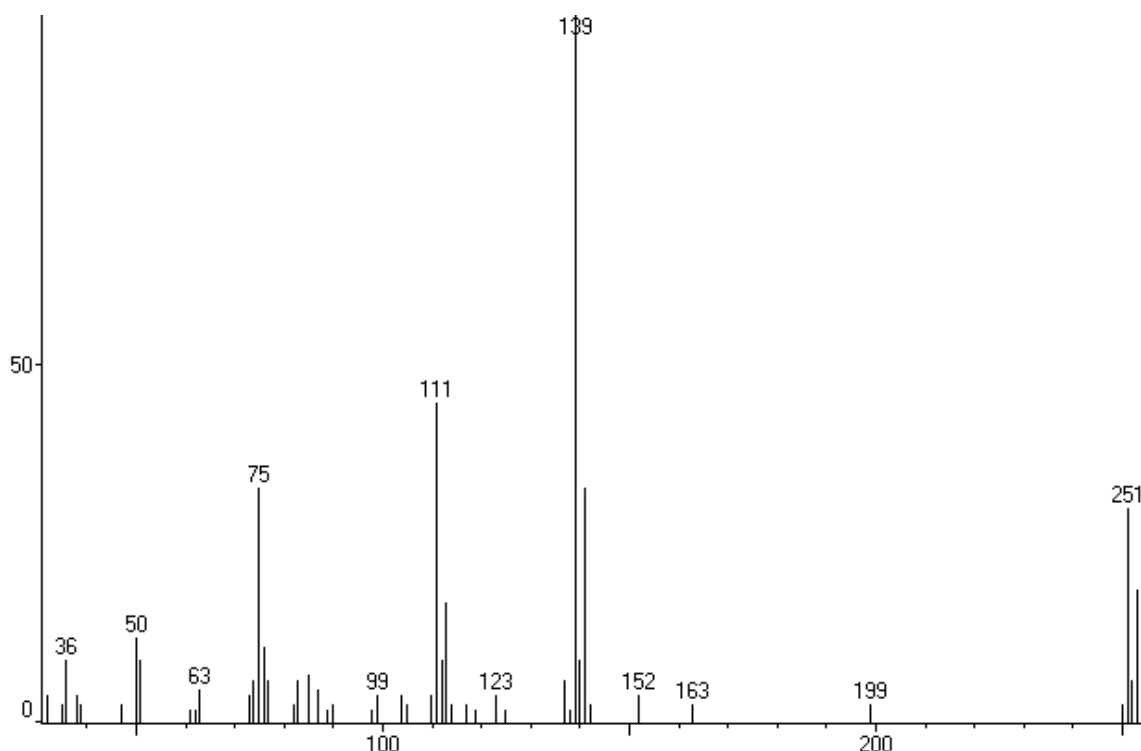


Figura 3 – Espectro de massa do agrotóxico organoclorado dicofol usando a ionização por impacto de elétrons.

O monitoramento pode ser de dois métodos, é feito primeiramente do modo SCAN (varredura) onde são analisados e posteriormente através do modo SIM (Single Ion Monitoring), ou seja, Monitoramento de Íon Seleccionado, seleccionando-se um ou mais fragmentos característicos resultantes da fragmentação da espécie de interesse para otimizar a quantificação. Gera-se o cromatograma e plotando o número de íons detectados com a massa desses fragmentos em função do tempo.

1.11.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

A combinação da Cromatografia Gasosa de Alta Resolução com a Espectrometria de Massa (CGAR-EM) resulta em um instrumento com um excelente potencial na identificação e quantificação de vários compostos. Basicamente, o CGAR-EM consta de um cromatógrafo gasoso com coluna capilar, uma interface para ligação dos sistemas, uma câmara de ionização onde os íons são formados, uma câmara mantida sob vácuo onde ocorre a separação dos mesmos e um sistema de detecção dos íons e interpretação dos dados obtidos (COLLINS, 1993).

A saída da coluna cromatográfica está conectada ao espectrômetro de massa através de uma interface, tendo esta o propósito de baixar a pressão para valores menores que 10^{-3} Pa

(10^{-8} bar), na câmara de ionização, pois a pressão na saída da coluna é, geralmente, muito alta.

As moléculas da amostra se ionizam na câmara de ionização. Este processo ocorre, geralmente, por impacto eletrônico ou ionização química. A câmara é aquecida para evitar a condensação da amostra e mantida sob vácuo para que os íons formados não colidam com outras moléculas que não foram ionizadas.

No método do impacto eletrônico, um fluxo de elétrons, com energia de ionização específica, é produzido por um filamento de tungstênio ou rênio aquecido. Estes elétrons com energia de, geralmente 70 eV, colidem com as moléculas da amostra, provocando a ionização, bem como a fragmentação das mesmas. A ionização química é produzida por reações íon-molécula, entre a molécula neutra da amostra e íons provenientes de reagentes presentes na câmara de ionização. Para favorecer este tipo de mecanismo a concentração do reagente é suficientemente maior que a da amostra, de maneira que praticamente somente as moléculas do reagente são ionizadas por impacto eletrônico. Neste caso a pressão na câmara é maior para favorecer a reação íon-molécula.

Depois de formados, os íons deixam a câmara de ionização e entram na câmara de vácuo, onde são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z), através da imposição de um campo elétrico ou magnético externo. Após a separação, os íons são detectados e um sistema apropriado processa os dados obtidos, fornecendo informações quantitativas e qualitativas da amostra analisada.

O espectrômetro de massa é dotado de um sistema de biblioteca de dados, que armazena cerca de 35.000 espectros de massa. Isto permite uma comparação do espectro obtido para o composto de interesse com aquele da biblioteca. Além do espectro de massa dos padrões existente no banco de dados, o sistema oferece um índice de similaridade entre os 10 compostos, cujos espectros de massa melhor se relacionam com aqueles do composto em estudo.

Uma das principais vantagens do CGAR-EM é fornecer informações estruturais a respeito dos compostos eluídos na coluna, o que possibilita a identificação com alto grau de confiabilidade da maioria dos compostos de interesse na cromatografia gasosa.

Como principal limitação prática deste tipo de equipamento pode-se citar o elevado custo quando comparado ao cromatógrafo gasoso, maior tempo de treinamento e especialização do operador e, ainda, certos isômeros apresentam o mesmo espectro de massa, o que dificulta sua identificação (LANÇAS, 1993). A figura 4 ilustra um esquema do acoplamento CGAR-EM.

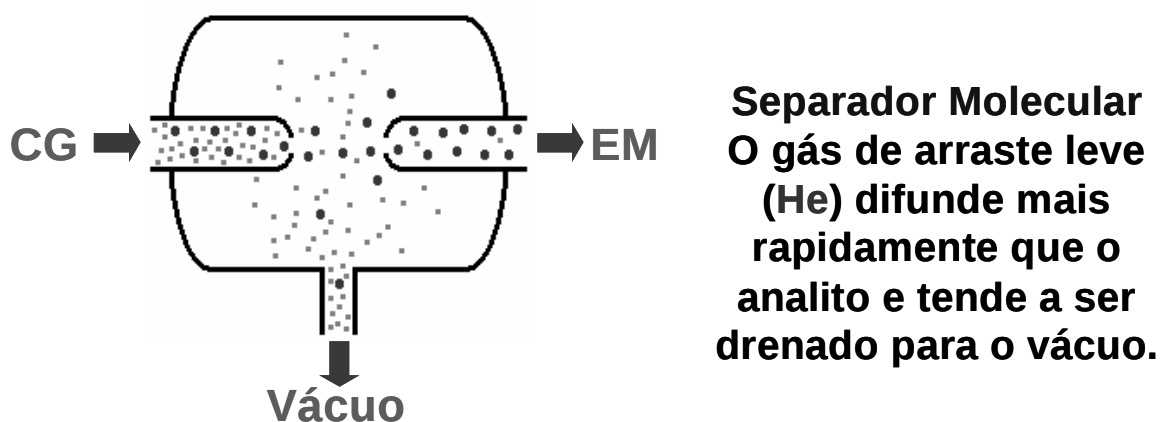


Figura 4 – Esquema do acoplamento CG - EM. (ANDRADE e CUSTÓDIO, 2003)

A determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa é amplamente utilizada por pesquisadores KUDZIN *et al.* (2002), apresentou o método como sendo de potencial analítico superior para a análise, indicando as vantagens da resolução da coluna capilar do cromatógrafo, da sensibilidade elevada e da alta seletividade do detector espectrômetro de massa, suas recuperações variaram de 97 a 97,5% com níveis de 0,01 a 10 pmol. BÖRJESSON e TORSTENSSON (2000), utilizando amostras de solo e água e derivatizados com TFAA e TFE, previamente tratados em colunas de troca iônica, foram concentrados e derivatizados. O derivatizado foi dissolvido em acetato de etila e analisado por CG-EM, e ambos identificados por três íons característicos, a análise apresentou boa linearidade para o agrotóxico e o seu metabólito, seus limites de detecção foram de 0,05 e 0,003 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e recuperações de 58 a 91%. Recuperações de 99 a 101% com nível de 0,1 a 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ foi obtido por KATAOKA *et al.* (1996), sendo os analitos derivatizados com ácido 4-aminobutilfosfônico.

2 OBJETIVOS

Geral:

- Contribuir com pesquisas para o desenvolvimento de metodologia para avaliação de resíduos de pesticidas em solos e alimentos. Objetivando contribuir com as diretrizes do grupo de Química Analítica Ambiental do DQI/CCET/UFMS.

Específicos:

- Avaliar e otimizar metodologia de análise de glifosato e AMPA em solo por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massa.
- Estudar e avaliar a derivatização do Glifosato e AMPA utilizando-se anidrido trifluoroacético e trifluoroetanol.
- Estudar e avaliar o momento adequado para iniciar as análises dos compostos derivatizados por CG-EM.
- Testar metodologia de análise de glifosato em soja por cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massa.

3 EXPERIMENTAL

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Química Analítica Ambiental (Laboratório de Pesquisa 3 – LP3), do Departamento de Química (DQI), do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (CCET), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), situado na cidade de Campo Grande/MS. O solo está na unidade da Bacia Sedimentar do Paraná, no compartimento denominado “Planalto de Maracajú - Campo Grande”, assentado nas Formações Caiuá. Este tipo de solo é composto de arenitos finos, médios, grosseiros e ferruginosos. O clima, segundo a classificação de Köppen, situa-se na faixa de transição entre o sub-tipo mesotérmico úmido sem estiagem, em que a temperatura do mês mais quente é superior a 25°, tendo o mês mais seco mais de 30mm de precipitação e o sub-tipo tropical úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno. Cerca de 75% das chuvas ocorre entre os meses de outubro e abril e o período mais seco é o de agosto (UNIDERP, 2003).

No mês de novembro foi realizada a coleta de amostras de solo no município de Jaraguari-MS, a 45 km da cidade de Campo Grande, na Fazenda Bom Sucesso, de propriedade do Engenheiro Agrônomo Irineu Miguel Tissiani. Na fazenda foi aplicado 3,7 L.ha⁻¹ de Glifosato Nortox com 5,0 L.ha⁻¹ de 2,4-D, para dessecação do sorgo e posterior plantio direto de soja. A coleta foi realizada uma semana após a aplicação dos herbicidas.

As metodologias de extração, purificação e derivatização aplicadas neste trabalho foram baseadas na descrita por BÖRJESSON e TORSTENSSON (2000), com modificações.

3.1 Análise do solo

3.1.1 Amostragem

As amostras de solo foram coletadas em pontos diferentes de uma área de solo nativo da UFMS, situada no município de Campo Grande-MS, na profundidade de 0-10cm, segundo normas da ABNT para formar uma amostra composta significativa para os estudos em questão.

3.1.2 Características das amostras

As amostras coletadas foram previamente caracterizadas pelo IAGRO - Departamento de Inspeção e Defesa Agropecuária de Mato Grosso do Sul.

Sendo os resultados estão expostos nos quadros 7, 8, 9 e 10 e as interpretações dos mesmos no quadro 11.

3.1.3 Determinação de umidade gravimétrica do solo e umidade residual

Para a determinação da umidade gravimétrica do solo foram pesadas, em triplicata, 10g de solo com precisão de 0,001g; posteriormente, foram secas à temperatura de 105°C por 24h e, após aclimatamento em dessecador, na sala de pesagem, foram novamente pesadas na mesma balança utilizada no início.

Na determinação da umidade residual, à 150g de solo seco (a 105°C, por 24h) adicionou-se 2mL de água destilada com o auxílio de uma pipeta graduada. O torrão formado foi retirado e colocado em uma placa de Petri e levado à estufa à temperatura de 105°C por 24 horas. A umidade residual foi calculada pelo peso seco do solo que absorveu os 2mL de água adicionados em relação à umidade volumétrica.

A umidade residual representa a quantidade de água que esta consegue adsorver e a planta não consegue retirar e a umidade do solo (gravimétrica) indica a quantidade de água no momento da análise, sendo ambos os resultados expressos em percentagem.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Padrões, resinas, reagentes e soluções

Os padrões de Glifosato (98% de pureza) e AMPA ($1\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), ambos puros e certificados (Dr. EHRENSTORFER, AUGSBURG, ALEMANHA), foram importados. O HCl classe concentrado para análise (MALLINCKRODT), metanol para HPLC (EM-

SCIENSE), acetato de etila para HPLC (MERK) e NaOH (DINÂMICA) foram utilizados para a extração e na troca iônica.

As resinas IRA-420 Amberlite fortemente básica (Cl^-) e IR-120 Amberlite fortemente ácida (Na^+) (SYNTH) foram utilizadas para a troca iônica.

O anidrido trifluoroacético (VETEC) e o trifluoroetanol (J. T. BAKER) foram utilizados na derivatização do glifosato e do AMPA. A água utilizada para a análise foi água ultra-pura.

Foram utilizados também um purificador de água Milli Q da MILIPORE, um banho de ultra-som UNIC-120W e 40Khz, estufa à vácuo TECNAL TE-395 anexada em uma bomba a vácuo TECNAL TE-058, centrífuga COLE-PARMER (3000rpm), rotaevaporador TE-120 da TECNAL (60 rpm a 60°C e -650 mmHg), titulador TRITOLINE ALPHA da SCHOTT.

As soluções estoque de glifosato e AMPA foram preparadas com água deionizada nas concentrações de 1009ppm para glifosato e 1 ppm para AMPA. Preparou-se uma solução intermediária de 100ppm para o glifosato.

As soluções de trabalho foram de 0,1; 1,0 e 2,0 ppm para glifosato e 1,0 ppm para AMPA.

3.2.2 Instrumentação

As análises foram realizadas em um CG-EM (cromatógrafo gasoso GC-17A acoplado a um espectrômetro de massa QP-5000, da SHIMADZU), com uma coluna capilar de 30m de comprimento, diâmetro de 0,32mm e espessura do filme de 0,5 μm (VA-608) da VARIAN, específica para pesticidas com temperatura limite de 280°C. O gás utilizado para o arraste foi o Hélio ultra puro e modo de injeção sem divisão de amostra (*splitless*).

As condições cromatográficas foram:

- Temperatura do injetor: 260°C

- Temperatura da interface: 260°C
- Temperatura inicial: 70°C
- Programa de temperatura da coluna: 70° durante 2 minutos;
70 - 270°C (28,8°C.min⁻¹).
270°C (6,06 min.)
- Pressão da coluna: 20 kPa
- Fluxo da coluna: 1,5 mL. min⁻¹
- Tempo de amostragem: 15 minutos
- Modo de injeção: sem divisão (*splitless*)
- Volume de injeção: 1µL.

O espectrômetro de massa é operado na modalidade de impacto de elétrons (EI), os íons monitorados foram m/z 238,05; 260; 411 para o glifosato e m/z 246 e 302,05 para o AMPA, estes íons foram escolhidos devido as suas fortes intensidades, o íon-molecular 511 (massa do glifosato derivatizado) não foi monitorado devido à massa elevada e para o AMPA derivatizado o seu íon-molecular não apresentou-se com uma intensidade significativa e poderia prejudicar a sensibilidade. Nestes espectros, os fragmentos com massas moleculares correspondentes apresentaram maior intensidade.

3.2.3 Preparo da amostra de solo para extração

Nesta fase seguimos a metodologia descrita por BÖRJESSON e TORSTENSSON (2000).

Amostras de 10g de solo são tratadas por 30 minutos com 10mL de NaOH 1M no ultra-som, sendo, posteriormente, centrifugadas por 10 minutos em 3400 rpm. e os sobrenadantes filtrados em papel de filtro quantitativo. Repete-se o procedimento, lavando-se finalmente o frasco com 5mL de NaOH 1M.

Alíquota de 4,2mL de HCl concentrado é adicionada a cada extrato e o volume elevado a 200mL com água ultrapura. Ajusta-se o pH para 2, mantendo a amostra em

temperatura ambiente por 1-2 horas (ocorre formação de precipitados de ácidos orgânicos). Reserva-se 50mL da parte superior do extrato.

3.2.4 Preparo das colunas para a troca iônica

Nesta fase seguimos a metodologia descrita por BÖRJESSON e TORSTENSSON (2000) com modificações.

Um volume de 8 mL de resina Amberlite IR-120 é adicionado a uma coluna de vidro de 10 cm de altura e 3 cm de largura. A resina é condicionada com a adição em sequência de 20 mL de água deionizada, 40 mL de HCl 0,2 M e 1 mL de HCl 6 M. Descarta-se esse material eluído. A amostra é passada pela coluna a um fluxo de 2 mL.min⁻¹ por duas vezes. O eluato é obtido com a aplicação de 1 x 2,8mL e 2 x 3,7mL de HCl 6 M em um fluxo de 2 mL.min⁻¹. Os eluídos isolados são coletados em tubos, aos quais adiciona-se 4 mL de NaOH 10 M.

Um volume de 4 mL de resina Amberlite IRA-420 é adicionado a uma coluna de vidro, sendo a resina condicionada com três parcelas de 2,5mL de HCl 6 M e 1 mL de HCl concentrado. Os eluídos anteriormente isolados são passados nesta coluna a um fluxo de 2 mL.min⁻¹; repete-se o procedimento. A amostra é eluída da coluna com 1 x 1mL e 2 x 2mL com HCl 6 M.

Todas as amostras são coletadas em frascos de vidro de fundo redondo. A amostra é evaporada à secura sob vácuo em um rotaevaporador a 60°C e pressão de 500 mmHg. Adiciona-se 5 mL de água e a evaporação é repetida. Dissolve-se a amostra em 1mL de água-metanol-HCl (160-40-2,7) (v/v/v) e transfere-se para uma ampola de vidro; essa solução é utilizada para impedir que o glifosato e o AMPA fiquem adsorvidos na parede de vidro do recipiente. A amostra é evaporada à secura sob nitrogênio.

3.2.5 Derivatização

A derivatização é realizada adicionando-se 800µL de anidrido trifluoroacético (TFAA) e 400µL de trifluoretanol (TFE) dentro da ampola. A ampola, fechada em bico de Bunsen, é mantida a 100°C por 1,5 hora. Após a aclimação em temperatura ambiente, a amostra é evaporada sob fluxo de nitrogênio e redissolvida em 1mL de acetato de etila, sendo finalmente transferida a um frasco com tampa e reservada para análise cromatográfica no CG-EM.

A derivatização é uma etapa crítica devido às perdas que podem ocorrer com a mostra em alta temperatura (100°C). Para evitar perdas, a amostra é colocada em uma ampola e lacrada em bico de Bunsen.

Foi preparada uma amostra com 250 µg.L⁻¹ de glifosato e AMPA, realizou-se a derivatização, suspendeu a 1 mL com acetato de etila e injetou-se a mesma três horas após a derivatização e anotou-se a área do pico. Esta amostra foi dividida em duas partes, uma parte foi armazenada em geladeira, enquanto a outra foi armazenada em freezer, a fim de se testar a estabilidade do composto derivatizado. Estas amostras foram injetadas em triplicata, após um período de 3, 24, 48, 72, 96 e 360 horas.

3.2.6 Determinação do Limite Observado de Detecção (LOD) e do Limite Observado de Quantificação (LOQ)

Os limites de detecção do método (LOD) foram calculados conforme proposto por LONG e WINEFORDNER (1983) e LEITE (2002), segundo os quais tais limites são calculados a partir de três vezes o sinal de ruído do detector ou da linha base. Os limites de quantificação (LOQ) foram calculados como dez vezes o sinal de ruído do detector ou produzido pela linha base, obtido a partir das curvas de calibração de cada um dos padrões (MILLER e MILLER, 1993).

3.2.7 Fortificação das amostras

As contaminações foram feitas em 10 g de solo com solução de trabalho de 2 e 1 ppm de glifosato e AMPA, de modo a se obter concentração final de 1, 3 e 5 LOQ (Limite Observado de Quantificação), as concentrações foram obtidas com 60, 180 e 300 µL da solução de glifosato e 40, 120 e 200 µL com microseringa HAMILTON 81000 de 100 µL. Para cada nível, as contaminações foram feitas em triplicatas, sendo realizadas também em triplicata as injeções cromatográficas de cada fortificação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Umidade do solo e umidade residual

Os resultados obtidos para a umidade residual e umidade de solo foram 3,71% e 28,63%. Estes dados indicam que o solo consegue reter 3,71% de umidade do solo e as plantas não conseguem retirar essa água, porque a atração entre as partículas de argila e as moléculas de água são maiores que a atração das raízes das plantas. A água no solo nem sempre encontra-se disponível, a umidade do solo indica que existe uma determinada quantidade de água, no entanto este é um valor variável, pois esta pode provir de chuva ou irrigação, a medida que penetra no solo. O ar é deslocado e ela ocupa os poros, tanto os macroporos e os microporos. Como o fornecimento é descontinuo, no decorrer dos dias esse volume diminui, por evaporação, percolação e absorção pelas raízes, neste momento a sucção matricial é de 0,1 a 0,2 bar (BRADY, 1983), se a retirada continuar, haverá água no solo e no entanto ela estará retida com grande intensidade, pelos colóides do solo, recebendo o termo de coeficiente higroscópico, este apresenta-se a abaixo de 5% de umidade e a tensão é de 15 bar acima.

4.2 Composição química do solo

Os resultados da análise do solo estão nas quadros 6, 7 e 8 e as interpretações nas quadro 9.

Quadro 6 – Resultados da análise química para macronutrientes de solo da amostra coletada na UFMS em 17 de julho de 2002, Campo Grande- MS

pH	P	M.O.	Tex-	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al ⁺³	H ⁺ +Al ⁺³	S	T
	µg.cm ⁻³	%	Tura	Emq.100cm ⁻³						
5,7	2,3	1,5	1	0,19	3,4	1,3	0,2	3,3	4,89	8,19

Quadro 7 – Resultados da análise química do solo para micronutrientes da amostra coletada na UFMS em 17 de julho de 2002, Campo Grande- MS

Ferro	Manganês	Cobre	Zinco
mg.dm ⁻³			
110,28	141,00	22,16	37,17

Quadro 8 – Resultados da análise granulométrica do solo coletado na UFMS em 17 de julho de 2002, Campo Grande- MS

Argila	Silte ou limo	Areia total
%	%	%
44	20	36

Quadro 9 – Quadro de classificação geral de análise química de solo

Nível	pH	Fósforo			Potás- Sio m.e.	M.O. %	Ca ⁺² + Mg ⁺²	Al ⁺³	Mg ⁺²
		Textura					m.e.	m.e.	m.e.
		1	2	3			m.e.	m.e.	m.e.
Muito baixo	0 – 5,0	0 a 3,0	0 a 6,0	0 a 10	0 a 0,05	0 a 2,5	0 a 2	0 a 0,3	0 a 0,4
Baixo	5,1 - 5,5	3,1 a 6	6,1 a 12	10,1 a 20	0,06 a 0,1				
Médio	5,6 - 6,0	6,1 a 9	12,1 a 18	20,1 a 30	0,11 a 0,16	2,6 a 5	2,1 a 4	0,4 a 0,7	0,5 a 0,8
Bom	+ 6,0	+ 9	+ 18	+ 30	+ 0,16	+ 5	+ 4	***	+ 0,8

Observações:

Os números 1, 2 e 3 correspondem a solos argilosos, francos e arenosos respectivamente.

1- com mais de 35% de argila; 2- contem 15 a 35% de argila ; 3- com menos de 15% de argila

*** acima de 0,7 m.e. (miliequivalente) é considerado nível alto, tóxicos para a maioria das culturas.

O termo macronutrientes indica os elementos essenciais obtidos do solo pelas plantas em quantidades relativamente grandes, quais são: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre. Os micronutrientes são indispensáveis também em quantidades reduzidas e quando em teores elevados causam toxidez as plantas.

A análise química do solo indicou (pH 5,7), com teor de fósforo disponível de 2,3 µg.cm⁻³ e a matéria orgânica de 1,5% estavam muito baixo do ideal. O teor de potássio de 0,19 meq.100cm⁻³ e magnésio estavam bom, isto ocorreu devido a aplicação de calcário dolomítico neste solo. Este mineral chamado dolomítico, também denominado de "calcáreo" é usado largamente na agricultura, como corretivo de solo, pois é composto de

cálcio e magnésio. O teor de alumínio, elemento tóxico para as plantas, apresentou-se baixo ($0,2 \text{ meq.}100\text{cm}^{-3}$), devido também a aplicação de calcário.

Os teores dos micronutrientes ferro ($110,28 \text{ mg.dm}^{-3}$), manganês ($141,00 \text{ mg.dm}^{-3}$), (22,16 mg.dm^{-3}) e zinco ($37,17 \text{ mg.dm}^{-3}$) estavam muito elevado o que pode provocar toxidez em plantas cultivadas.

4.3 Composição física do solo

A textura do solo foi classificado como argiloso, pois seu teor de argila foi de 44% e teores acima de 35% são assim denominados. A porcentagem de silte foi de 36% e o teor de areia 36%.

A argila é composta por partículas com menos de 0,002 mm de diâmetro, o silte varia de 0,002 a 0,02 mm, a areia de 0,02 a 2 mm e acima de 2 mm é a denominação de cascalho (BRADY, 1983).

O solo foi classificado como sendo Latossolo Vermelho, textura argilosa.

Este elevado teor de argila e silte no solo compete com a extração do glifosato e AMPA do solo (SHEALS *et al.*, 2003).

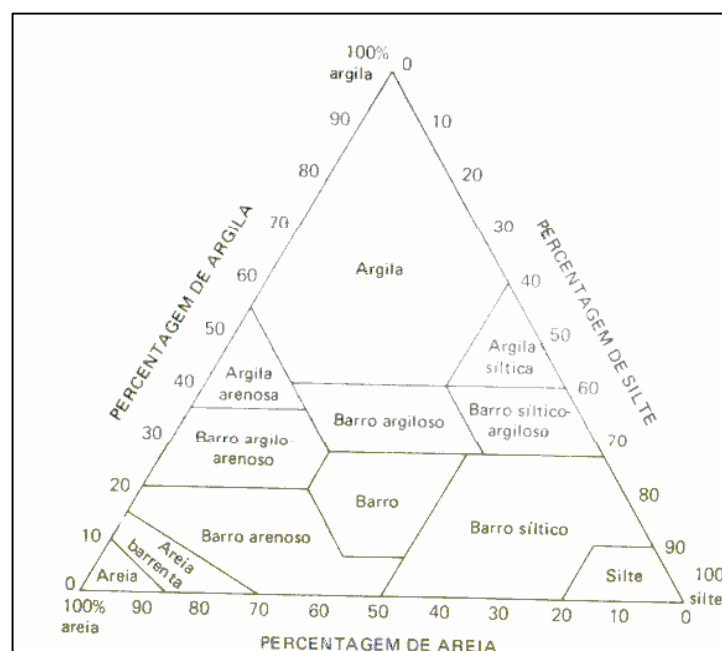


Figura 5 Diagrama de distribuição de porcentagem de argila, silte e areia para determinação de tipo de solo (BRADY, 1983)

O diagrama da figura 5 mostra a relação entre o nome da classe de um solo e sua distribuição por porcentagem de partículas. Na utilização do diagrama, os pontos correspondentes às porcentagem de argila e silte serão utilizados para determinar o tipo de solo. São traçadas linhas internas, primeiramente paralela ao teor de argila a partir do teor de areia, depois traceja-se uma paralela ao teor de areia a partir do teor de argila. O compartimento em que as duas linhas se cruzarem determina o tipo de solo. A amostra de solo utilizada foi classificada como argilosa.

4.4 Derivatização do glifosato e AMPA com TFAA e TFE

A análise dos compostos derivatizados de glifosato e AMPA foram analisadas na forma como é mostrado na figura 6.

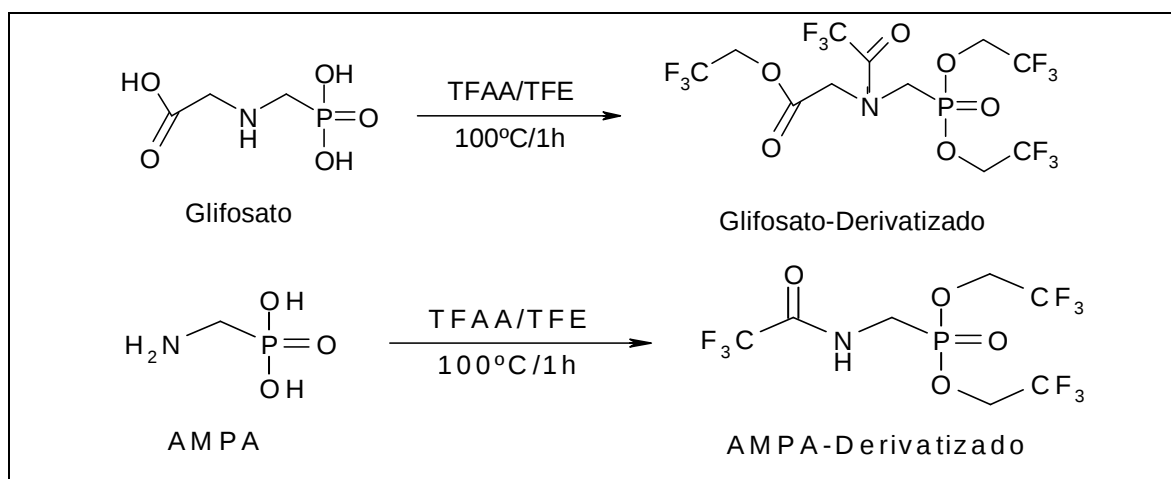


Figura 6 Estrutura do Glifosato e AMPA antes e depois de derivatizado com TFE e TFAA.

Foram feitas modificações na metodologia que aumentaram a detecção dos compostos estudados. 1) A reação de derivatização foi realizada em estufa à 100°C por 1 hora e, os reagentes foram colocados em ampolas de vidro e, as mesmas foram fechadas soldando-se a ponta da ampola com o auxílio de um bico de Bunsen e uma pinça. 2) A troca do HCl 10 mol.L⁻¹ por NaOH 10mol.L⁻¹, uma vez que a resina Amberlite IRA-420, tem o comportamento de realizar troca de ânions, assim ao adicionarmos uma solução 10 mol.L⁻¹ de NaOH, no eluato da resina Amberlite IR-120, que realizou troca catiônica com a amostra, o sinal detectado foi aumentado, por mais glifosato pode ser extraído da coluna.

Esse aumento ocorre porque o glifosato ao ser eluído da resina catiônica apresenta carga positiva com pKa em torno de 2. Ao ser adicionado 6 mL de NaOH 10 mol.L⁻¹ e o pH da solução ajustado em 6-8, de acordo com o seu pKa, o glifosato apresentaria ionização de todos os grupos H⁺ com exceção do próton do grupo amino. Isso pode ser observado analisando a figura 8.

O LOD e o LOQ foram calculados em relação altura do pico do cromatograma mostrado na figura 7. Os valores obtidos foram 30 µg.L⁻¹ para o glifosato e o AMPA.

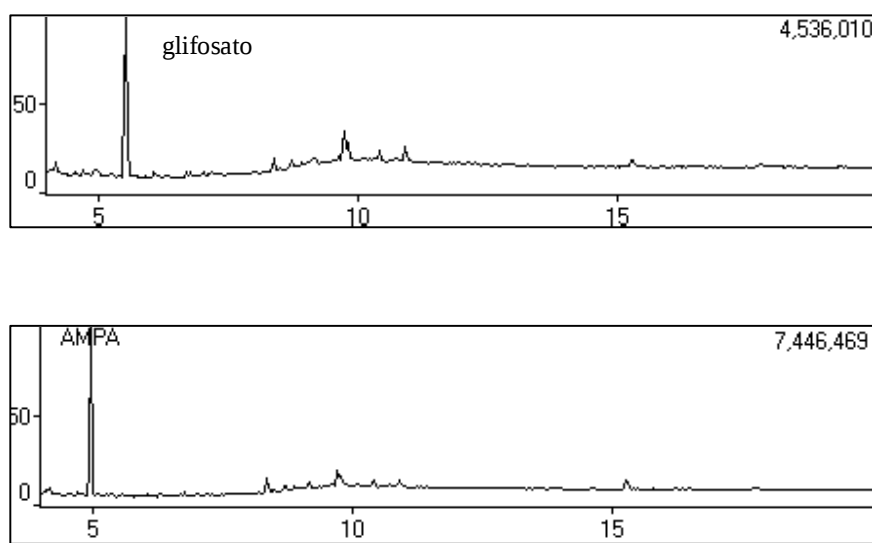


Figura 7 Cromatograma total de íons para uma injeção de 1µL de amostra de 6ppm de glifosato e AMPA depois de derivatizados no modo sem divisão (*splitless*).

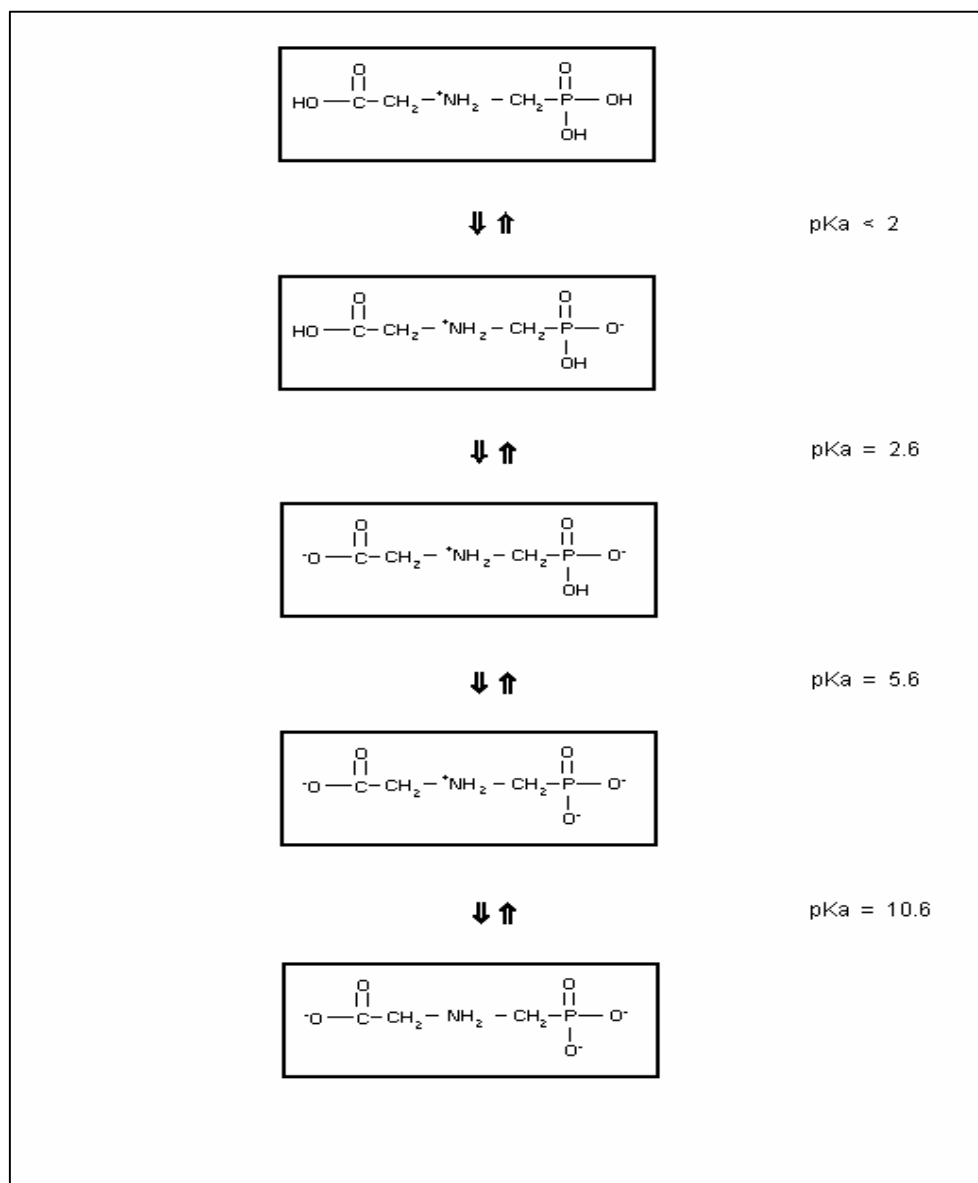


Figura 8 Espécies iônicas do glifosato em diferentes valores de pKa (SPRANKLE *et.al.*,1975).

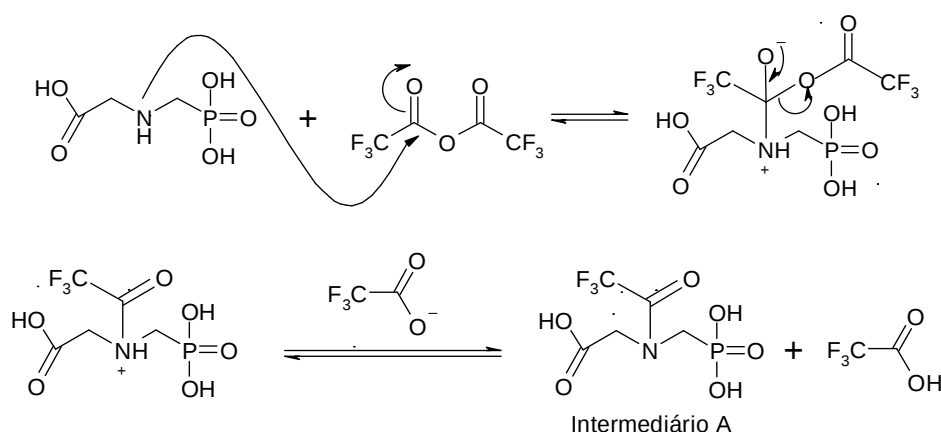
4.5 Proposta de um mecanismo de derivatização

Nos esquemas 1 e 2 estão apresentados os seguintes mecanismos propostos, segundo as reações clássicas da química orgânica para a derivatização do glifosato e do AMPA, respectivamente.

Esquema 1 Proposta de mecanismo de reação para a derivatização do glifosato, com base em mecanismos de reações clássicas da química orgânica

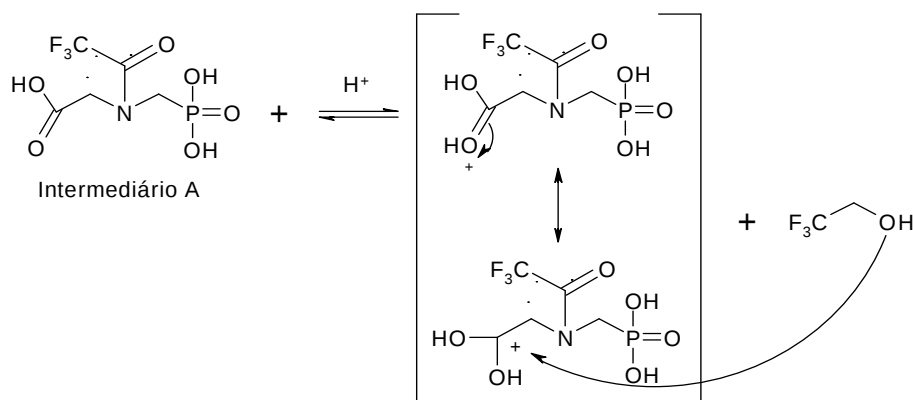
Etapa 1 - Ataque nucleofílico do nitrogênio do glifosato ao anidrido trifluoroacético -

Reação de acilação

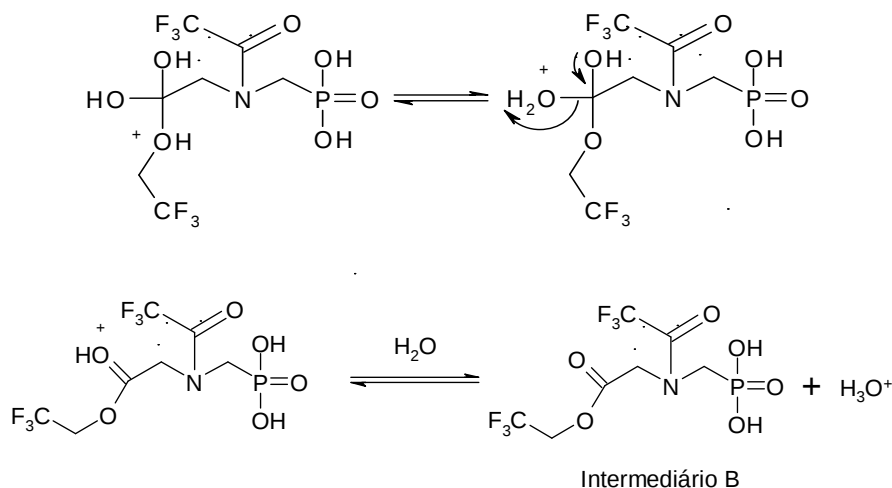


Etapa 2 - Ataque nucleofílico do trifluoroetanol ao intermediário A, sob catálise ácida -

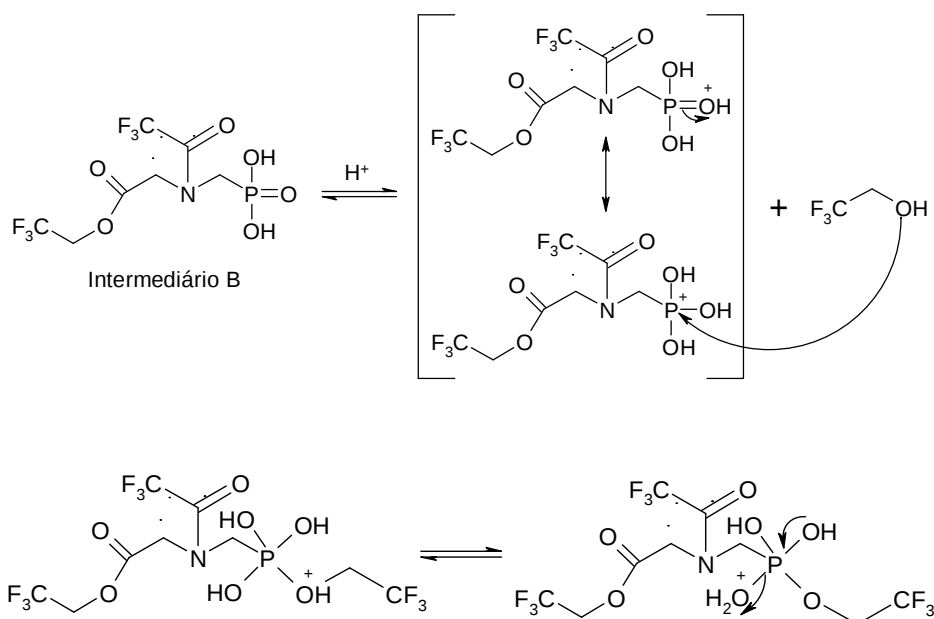
Processo de esterificação de ácidos carboxílicos

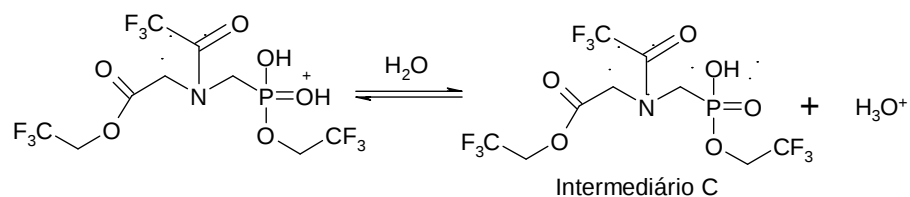


Esquema 1 Proposta de mecanismo de reação para a derivatização do glifosato, com base em mecanismos de reações clássicas da química orgânica (*continuação*)

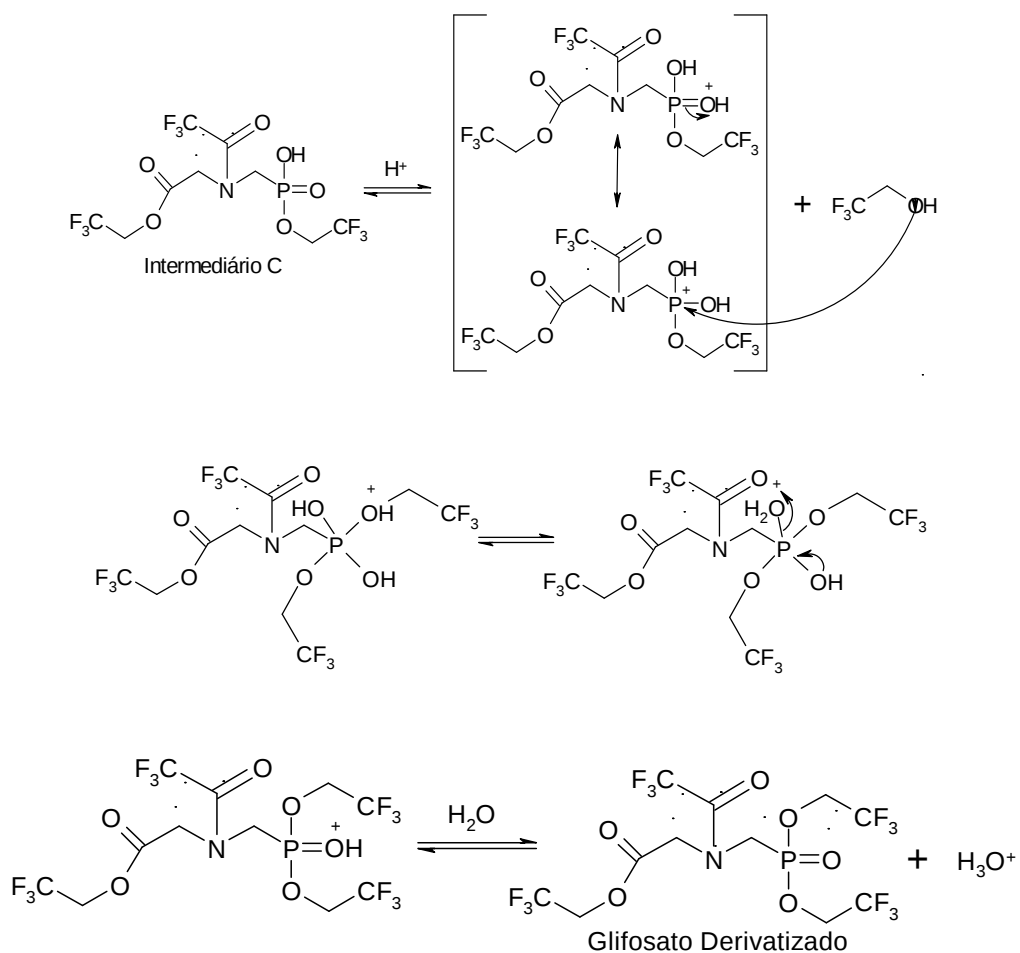


Etapa 3 - Ataque nucleofílico do trifluoroetanol ao grupo fosfônico do intermediário B sob catálise ácida.





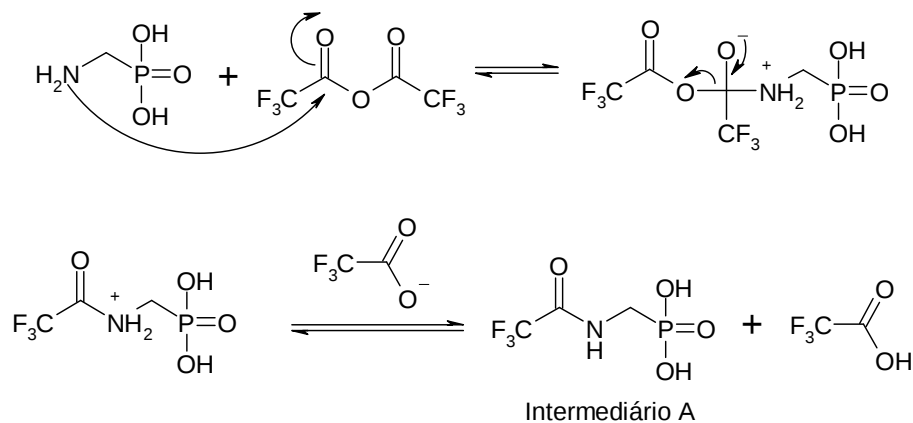
Etapa 4 – Novo ataque nucleofílico do trifluoroetanol ao grupo fosfônico do intermediário C, sob catálise ácida.



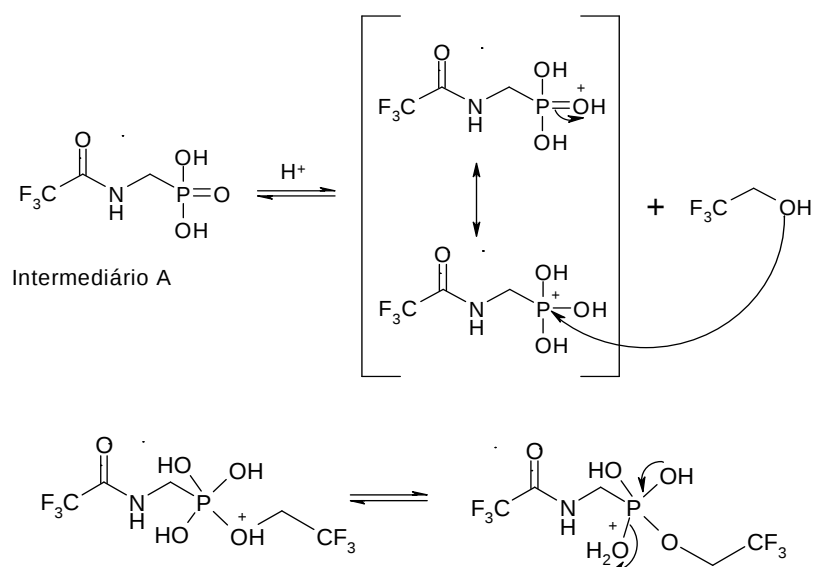
Esquema 2 Proposta de mecanismo de reação para a derivatização do AMPA, com base em mecanismos de reações clássicas da química orgânica

Etapa 1 - Ataque nucleofílico do nitrogênio do AMPA ao anidrido trifluoroacético-

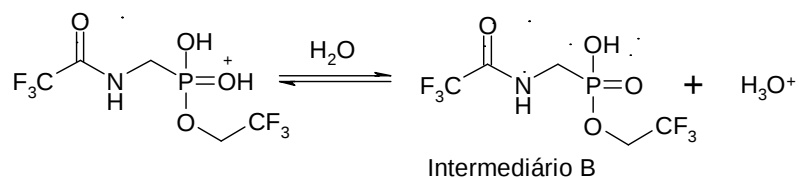
Reação de acilação



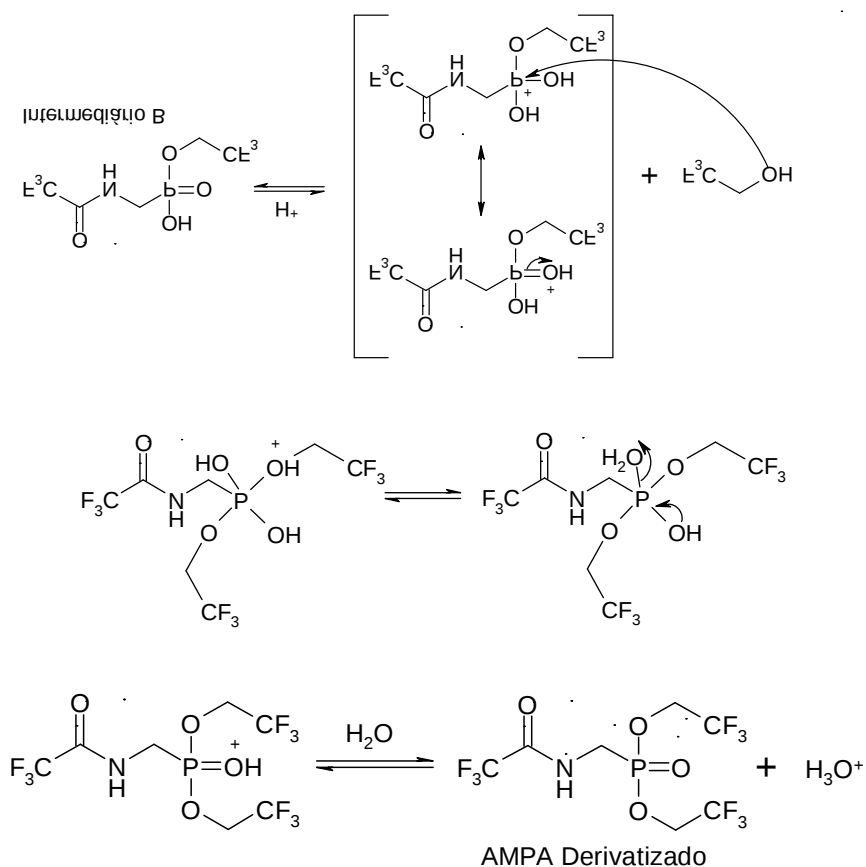
Etapa 2 - Ataque nucleofílico do trifluoroetanol ao grupo fosfônico do intermediário A, sob catálise ácida



Esquema 2 Proposta de mecanismo de reação para a derivatização do AMPA, com base em mecanismos de reações clássicas da química orgânica (*continuação*)



Etapa 3 – Novo ataque nucleofílico do trifluoroetanol ao grupo fosfônico do intermediário B, sob catálise ácida.



A reação de derivatização é feita com excesso de TFAA e TFE por dois motivos: o primeiro deve-se ao fato de as etapas de formação do composto derivatizado serem de

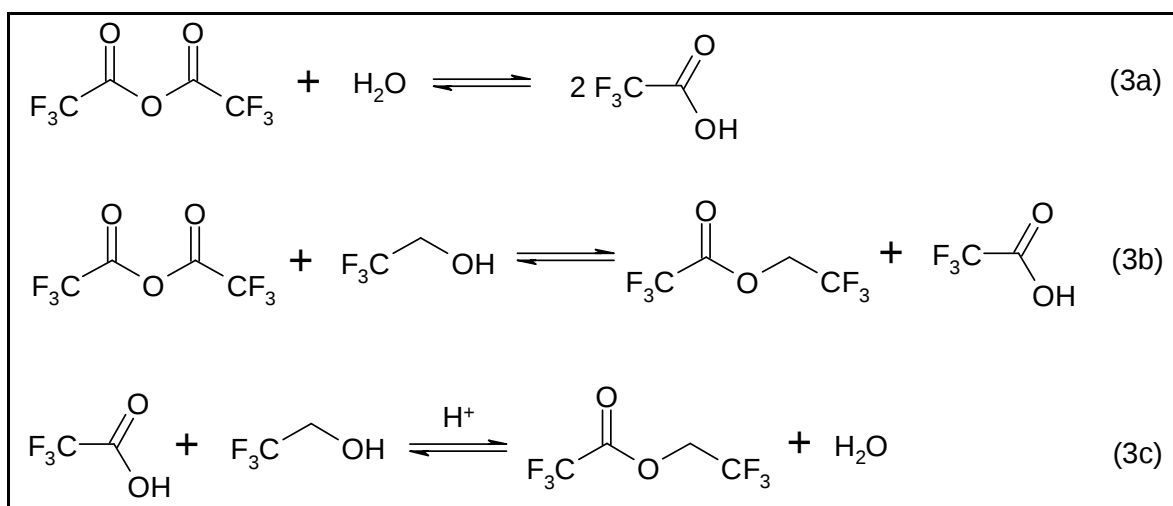
equilíbrio; assim, pela adição de excesso de pelo menos um dos reagentes, a reação tenderá a se deslocar no sentido de formação dos compostos derivatizados. O segundo motivo é a possível reação do TFE e/ou do TFAA com interferentes que possam ter ficado na amostra mesmo após a purificação. Além dos fatos citados, existem, também, possíveis reações competitivas entre os reagentes e os produtos formados durante a reação.

4.5.1 Reações competitivas durante a derivatização

O esquema 3 mostra as reações competitivas que podem ocorrer durante o processo de derivatização.

Durante a derivatização do glifosato e AMPA, ocorre a formação de água, a qual pode reagir com o TFAA formando o seu ácido correspondente. O TFAA também pode reagir com o próprio TFE formando um éster e um ácido correspondente, originando a necessidade de se colocar um excesso ainda maior de TFAA, mesmo ele reagindo apenas no grupamento amínico do glifosato e AMPA. O TFE além de reagir com o TFAA, também pode reagir com o ácido trifluoroacético, formado em uma das etapas de derivatização ou pela reação do TFAA com a água, formando um éster e mais água.

Esquema 3 Reações competitivas que podem ocorrer durante o processo de derivatização do glifosato e do AMPA



4.6 Curva de calibração

Apenas o padrão referente a 0,5 LOQ não apresentou uma boa resposta e por isso, o mesmo foi descartado para confecção da curva de calibração. Segue abaixo alguns cromatogramas obtidos para a confecção da curva de calibração.

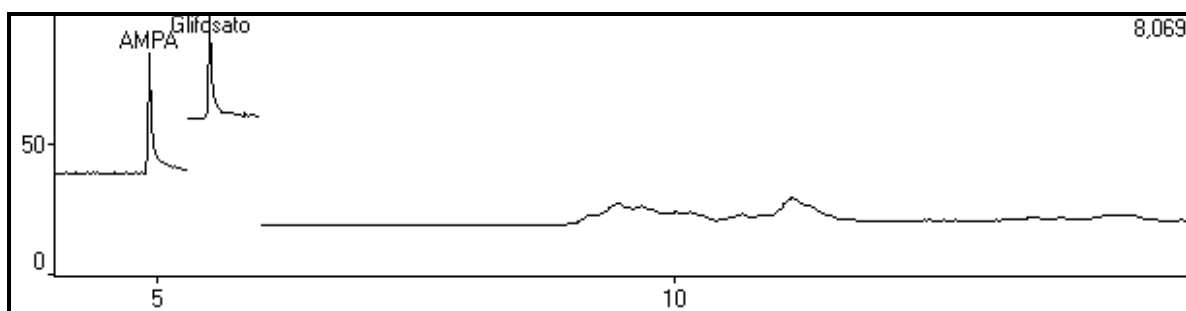


Figura 9 Cromatograma do AMPA e glifosato derivatizados na concentração de 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (1LOQ).

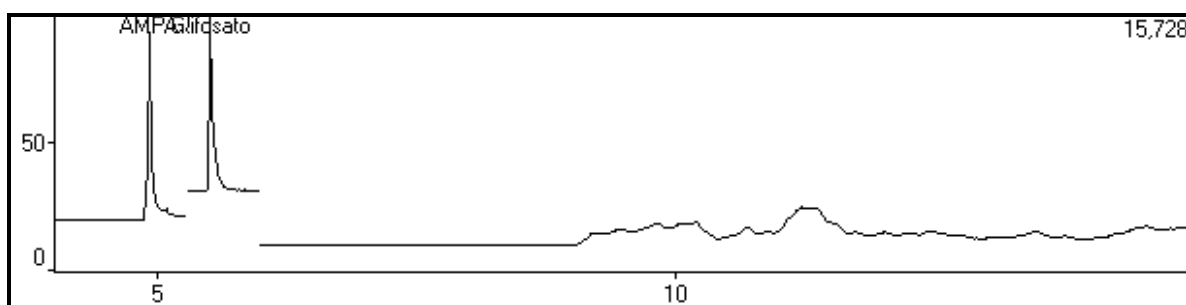


Figura 10 Cromatograma do AMPA e glifosato derivatizados na concentração de 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (3LOQ).

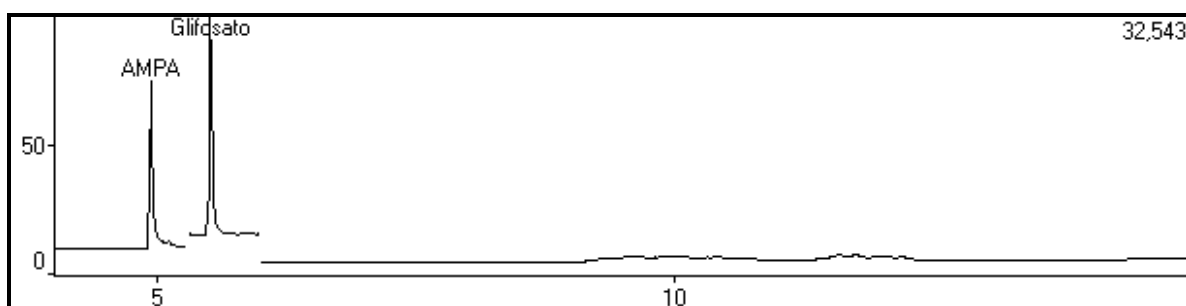


Figura 11 Cromatograma do AMPA e glifosato derivatizados na concentração de 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (5LOQ).

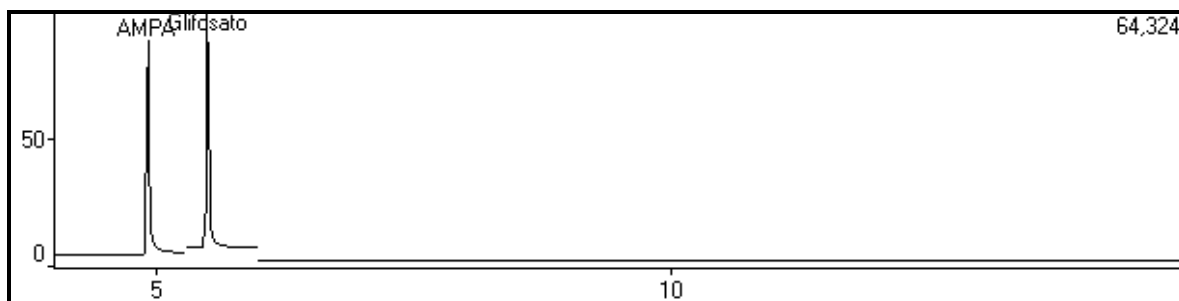


Figura 12 Cromatograma do AMPA e glifosato derivatizados na concentração de 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (10LOQ).

Os padrões foram injetados 3 vezes para cada concentração 24 horas após a derivatização, sendo que era injetado um volume de 1 μL no modo sem divisão. Obteve-se os seguintes dados constantes na quadro 10.

Quadro 10 Dados obtidos para a confecção da curva de calibração para o glifosato derivatizado

Massa (ng)	Área Média	CV (%)	T _r Médio (min)	CV (%)
0	0	0	0	0
30	8254	1,322	5,512	0,237
90	26744	0,603	5,510	0,051
150	47146	0,611	5,516	0,0105
300	102838	9,05	5,511	0,346

Com os dados da quadro acima confeccionou-se a curva de calibração a seguir.

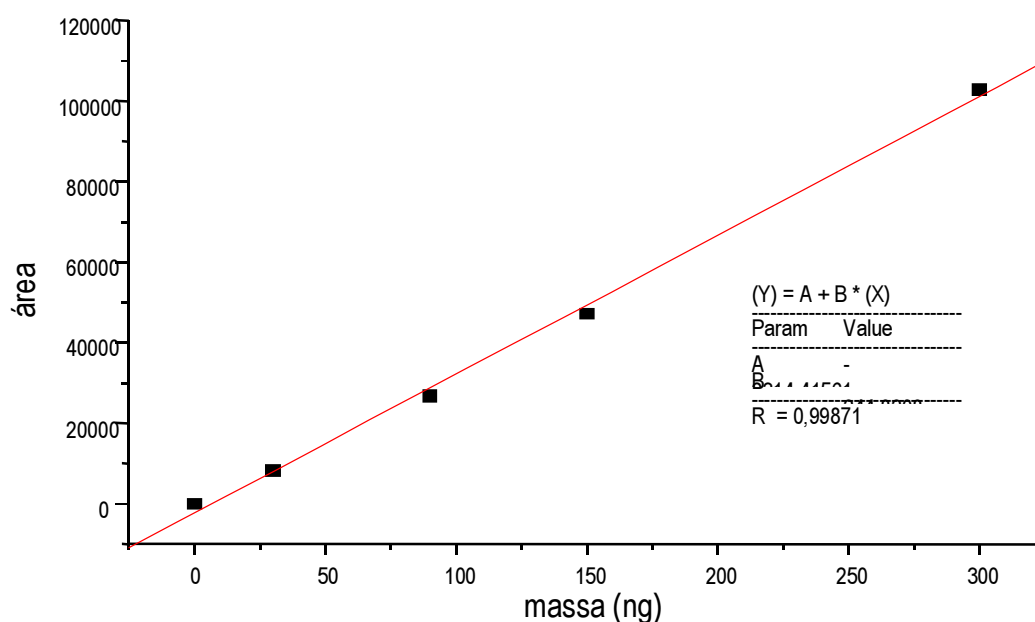


Gráfico 1 Curva de calibração para o glifosato derivatizado.

Do gráfico 1 obteve-se a seguinte equação da reta:

$A = -2314,41561 + 344,83084 \cdot M$, onde:

A corresponde à área do pico e M à massa de glifosato derivatizado.

A linearidade obtida foi considerada boa, pois foi adicionado um ponto de massa consideravelmente “alta” (10LOQ), com o qual nem sempre se obtém uma linearidade satisfatória. Os dados obtidos para a confecção da curva de calibração do AMPA estão no quadro 11 e a curva no gráfico 2.

Quadro 11 Dados obtidos para a confecção da curva de calibração para o AMPA derivatizado

Massa (ng)	Área Média	CV (%)	T _r Médio (min)	CV (%)
0	0	0	0	0
30	8028	1,92	4,939	0,272
90	23399	1,23	4,951	0,0143
150	42181	1,14	4,944	0,0429
300	81059	1,93	4,942	0,172

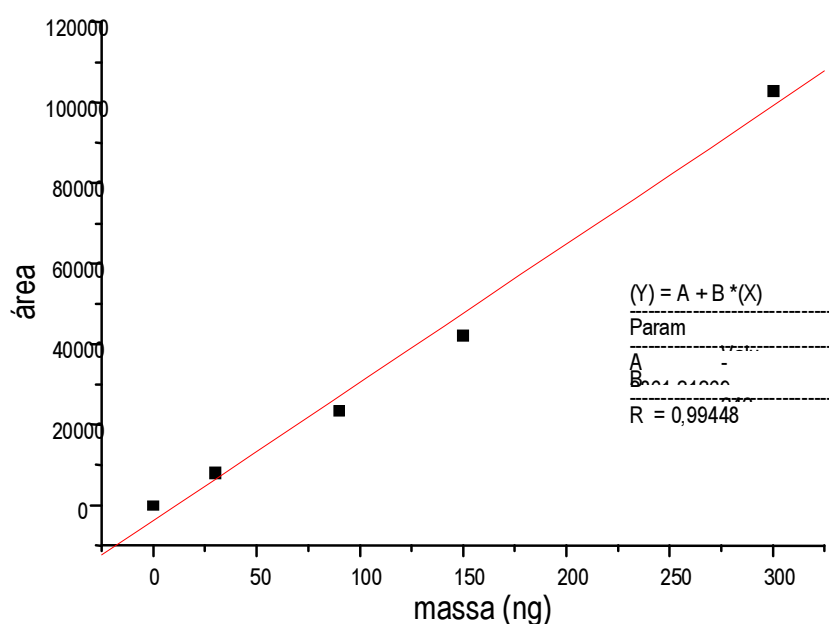


Gráfico 2 Curva de calibração para o AMPA derivatizado.

Do gráfico 2 obteve-se a seguinte equação da reta:

$A = -3861,83084 + 343,42468 M$, onde:

Onde A corresponde à corresponde a área do pico e M a Massa de AMPA derivatizado.

A linearidade obtida foi melhor que a obtida para o glifosato, utilizando-se os mesmos valores de massa, uma vez que o LOQ do AMPA é igual ao do glifosato. O coeficiente de variância relativo (CV) também é menor para o AMPA do que para o glifosato, mesmo na concentração de 10 LOQ, o CV do AMPA se mostrou relativamente baixo, o que não ocorreu para o glifosato, no qual, nesta mesma concentração o CV teve um grande aumento comparado-se com os de concentrações menores.

Após a confecção das curvas de calibração, fez-se a fortificação de 10 g de solo com 120, 360 e 600 ng glifosato e AMPA, esperou-se um período de 24 horas e fez-se a extração, purificação e derivatização conforme descrito no procedimento experimental, essa amostra durante o processo de extração é dividida em quatro partes.

As amostras foram feitas em triplicata para cada concentração e, cada amostra foi injetada três vezes 24 horas após a derivatização. Os dados obtidos encontram-se nas quadros 12-17.

Quadro 12 Porcentagem de recuperação obtida, em uma amostra fortificada com glifosato (1 LOQ), com extração 24h após a fortificação

Amostra	Área Média	CV (%)	T _r Médio (min)	CV (%)	Recuperação (%)
1 A	6677	3,57	5,504	0,103	86,92
1 B	6020	4,03	5,519	0,077	80,56
1 C	4966	1,13	5,532	0,480	70,37

Quadro 13 Porcentagem de recuperação obtida, em uma amostra fortificada com glifosato (3 LOQ), com extração 24h após a fortificação

Amostra	Área Média	CV (%)	T _r Médio (min)	CV (%)	Recuperação (%)
3 A	21662	16,41	5,634	2,97	77,26
3 B	16579	4,77	5,574	1,70	60,88
3 C	17092	6,74	5,509	0,039	62,53

Quadro 14 Porcentagem de recuperação obtida, em uma amostra fortificada com glifosato (5 LOQ), com extração 24h após a fortificação

Amostra	Área Média	CV (%)	T _r Médio (min)	CV (%)	Recuperação (%)
5 A	43346	2,31	5,522	0,051	88,27
5 B	45398	1,82	5,520	0,021	92,24
5 C	40592	4,03	5,516	0,128	82,95

Quadro 15 Porcentagem de recuperação obtida, em uma amostra fortificada com AMPA (1 LOQ), com extração 24h após a fortificação

Amostra	Área Média	CV (%)	T _r Médio (min)	CV (%)	Recuperação (%)
1 A	8828	3,06	4,932	0,17	108,83
1 B	9052	5,7	4,939	0,23	110,46
1 C	7120	4,25	4,944	0,021	87,90

Quadro 16 Porcentagem de recuperação obtida, em uma amostra fortificada com AMPA (3 LOQ), com extração 24h após a fortificação

Amostra	Área Média	CV (%)	T _r Médio (min)	CV (%)	Recuperação (%)
3 A	19750	0,34	4,935	0,27	80,94
3 B	16553	8,30	4,931	0,10	67,87
3 C	22564	12,00	4,928	0,029	92,44

Quadro 17 Porcentagem de recuperação obtida, em uma amostra fortificada com AMPA (5LOQ), com extração 24h após a fortificação

Amostra	Área Média	CV (%)	T _r Médio (min)	CV (%)	Recuperação (%)
5 A	39344	4,410	4,946	0,100	96,63
5 B	36177	0,416	4,933	0,258	88,86
5 C	37200	3,490	4,933	0,258	91,37

As baixas recuperações amostras de solo, ocorrem devido ao alto teor de ferro, alumínio e cobre no solo. BARJA *et al.*, 2001, verificou que o ferro forma complexos facilmente com glifosato. AMARANTE JUNIOR *et al.*(2001b), cita que existe uma competição do fosfato com íons Fe^{+2} , Fe^{+2} e Al^{+3} e SHEALS *et al.* (2003) estuda a adsorção do glifosato e cobre em goetita (A goetita é um óxido de ferro que confere cores amareladas ao solo, estando presente em condições mais frias e úmidas).

O glifosato e o AMPA também podem ficar adsorvidos ao solo de forma que a extração com NaOH 1 mol.L^{-1} seja apenas parcial.

Excluindo-se algumas recuperações do glifosato e AMPA em 3 LOQ, as recuperações obtidas podem ser consideradas satisfatórias visto que, grande parte destas recuperações está na faixa de 70-120% que é a faixa de recuperação recomendada pelo GARP e EPA.

Uma grande fonte de erro é o fato de que houve várias etapas de preparo da amostra para a injeção, (extração, purificação e derivatização) o que pode acarretar em perdas significativas do analito.

O processo de purificação deve ser feito com cuidado, pois ocorre a formação de cloreto de sódio no final do processo, sendo que este tem uma pequena solubilidade em acetato de etila, o que pode obstruir a coluna cromatográfica ou falsear o resultado da análise. Portanto, as resinas devem ser lavadas até teste negativo para cloreto antes de se fazer a eluição, a fim de se eliminar o Na^{+} e o excesso de Cl^{-} .

4.7 Análise de amostra real

A análise do solo forneceu o cromatograma apresentado na figura 13:

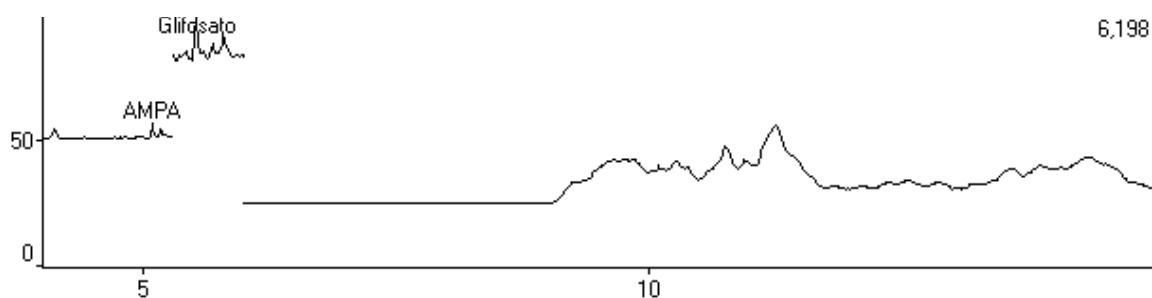


Figura 13 Cromatograma do AMPA e glifosato derivatizados em amostra de solo da Fazenda Bom Sucesso em Jaraguari-MS, novembro de 2003.

O solo apresentou uma média de massa de 22,36 ng.g⁻¹ de glifosato e 4,4012 ng.g⁻¹ para AMPA.

4.7 Análise de degradação de glifosato e AMPA derivatizados

No acompanhamento da degradação os dados obtidos encontram-se no quadro 19, o tempo zero não é acompanhado pois a amostra deve ser aclimatada na temperatura ambiente.

Quadro 18 Variação da área do pico relativo ao glifosato e ao AMPA, com o tempo, sendo estes armazenados em freezer (-2°C).

Tempo (h)	Área Média	CV (%)	Área Média	CV (%)
	Glifosato		AMPA	
3	23486	2,59	23680	7,37
24	61473	9,22	72160	5,14
48	54573	6,13	55450	7,02
72	52971	3,97	48987	5,78
96	50398	4,56	44977	0,70
360	41366	12,49	43113	1,94

Com estes dados foi plotado o gráfico a fim de ver o decaimento da área do pico relativo ao glifosato e AMPA quando estes são armazenados no freezer.

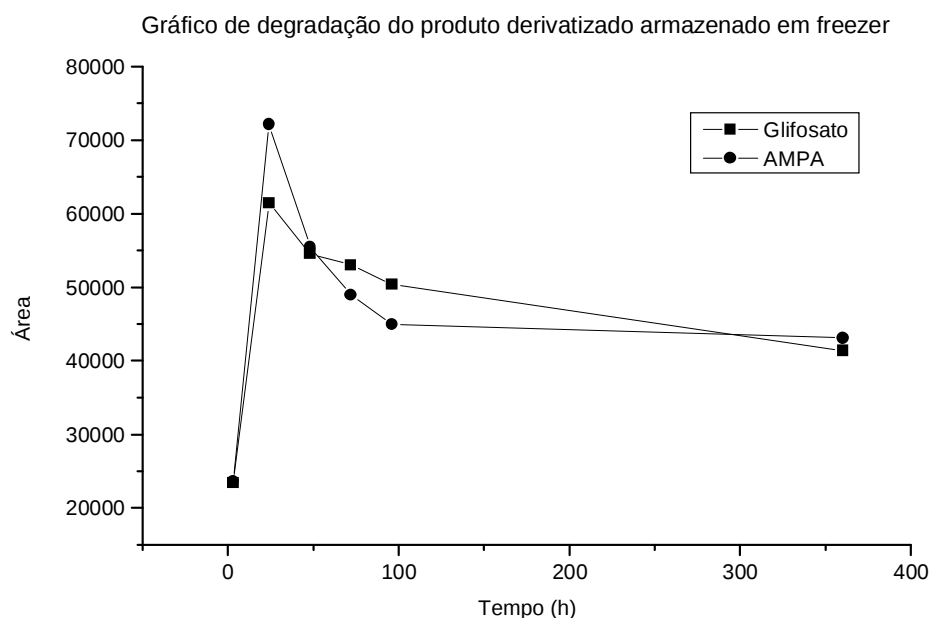


Gráfico 3 Acompanhamento da degradação do glifosato e do AMPA derivatizados, armazenados em freezer.

Da amostra armazenada na geladeira obteve-se os dados do quadro 19:

Quadro 19 Variação da área do pico relativo ao glifosato e ao AMPA, com o tempo, sendo estes armazenados em geladeira (5°C)

Tempo (h)	Área Média	CV (%)	Área Média	CV (%)
	Glifosato		AMPA	
3	23486	2,59	23680	7,37
24	71615	5,23	80649	9,64
48	62699	0,52	67125	1,15
72	52752	9,45	51189	2,79
96	50766	1,40	43113	2,73
360	39558	3,51	42716	7,37

Com estes dados fez-se um gráfico a fim de ver o decaimento da área do pico relativo ao glifosato e AMPA quando estes são armazenados na geladeira.

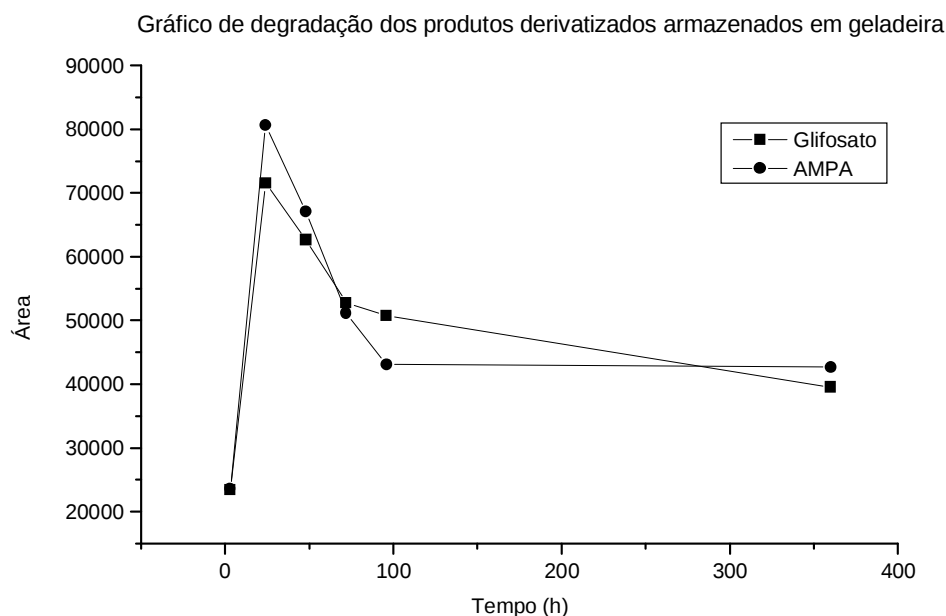


Gráfico 4 Acompanhamento da degradação do glifosato e do AMPA derivatizados, armazenados em geladeira.

Através dos gráficos 3 e 4, pode-se notar claramente que 24 horas após a derivatização, obtém-se a área máxima tanto para glifosato quanto para o AMPA. A partir daí as áreas dos picos relativos a glifosato e AMPA derivatizados começam a decair, até que, após cinco dias começa a estabilizar e não se notando grande diferença de área dez dias depois. Para a análise o ideal seria que a amostra fosse injetada 24 horas após a derivatização.

O composto derivatizado se decompõe rápido nos primeiros dias, porém à medida que o tempo passa a taxa de decomposição vai diminuindo até um ponto onde o composto apresenta uma degradação lenta em relação aos primeiro 4 dias.

Como após 24 horas se obtém o maior valor de área para os picos não importando a forma de armazenamento. As amostras de solo como as para confecção da curva foram injetadas apenas 24 horas após a derivatização. Este aumento pode ser decorrente do fato de que o composto derivatizado precise de um tempo maior que 3 horas para atingir o

equilíbrio. Este equilíbrio estará mais deslocado no sentido dos produtos derivatizados, após um tempo de aproximadamente um dia.

Com o intuito de verificar qual o melhor local de armazenamento do composto derivatizado plotou-se um gráfico, comparando-se o decaimento da área do glifosato derivatizado com o tempo, sendo um armazenado no freezer e outro na geladeira.

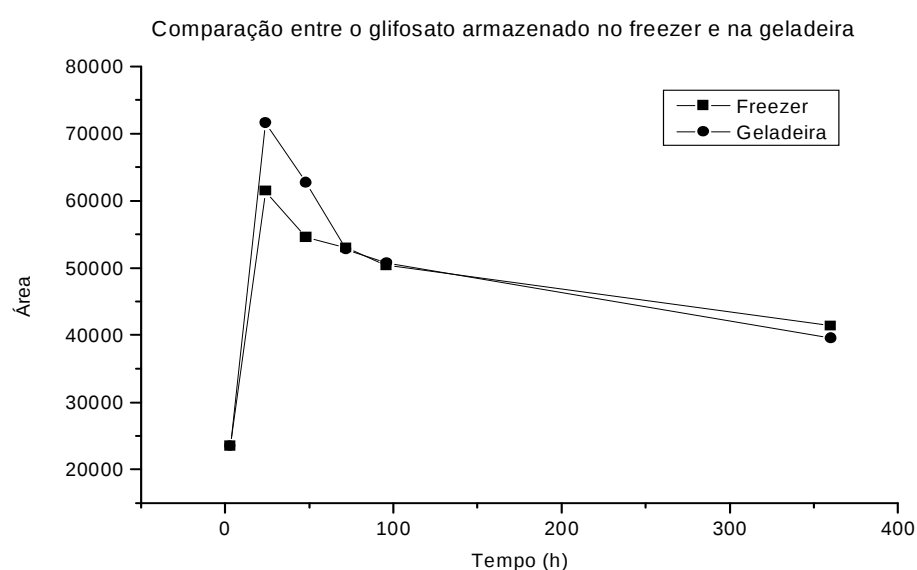


Gráfico 5 Comparação entre os dois meios de armazenamento para o glifosato (freezer x geladeira).

Fez se o mesmo para o AMPA e obteve-se o seguinte gráfico:

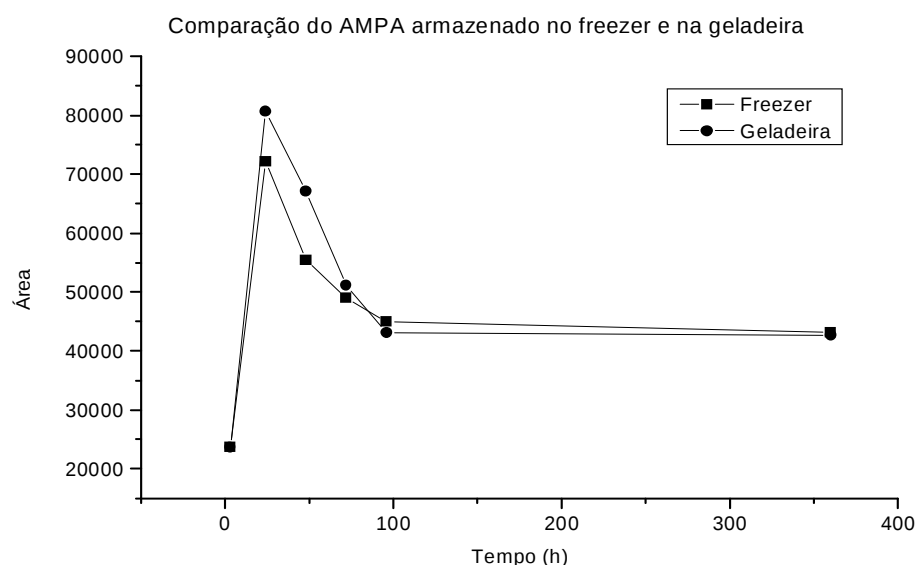


Gráfico 6 Comparação entre os dois meios de armazenamento para o AMPA (freezer x geladeira).

Com base nos gráficos acima se pode afirmar que para o armazenamento a um período maior que o de uma semana, não há diferença significativa entre as áreas de glifosato e AMPA derivatizados, sejam eles armazenados na geladeira ou no freezer. Porém o pico de maior área (após 24 horas) tanto para glifosato derivatizado quanto para AMPA derivatizado é maior quando estes são armazenados na geladeira, portanto as amostras foram armazenadas na geladeira por 24 horas, para depois serem injetadas no cromatógrafo.

5 CONCLUSÃO

As recuperações para o AMPA e o glifosato, coincidiram com os valores obtidos na metodologia de BÖRJESSON e TORSTENSSON (2000). No entanto nas amostra de 20 e 40 dias após a contaminação não foi detectado glifosato e AMPA.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, que observaram que o glifosato foi rapidamente e extensivamente mineralizado após a aplicação. Os autores ainda observaram que 50% do herbicida aplicado foi mineralizado e que 60% do composto foi convertido para dióxido de carbono após uma segunda aplicação, justificando a não detecção do glifosato e AMPA nas amostras de solo.

A derivatização com anidrido trifluoroacético e trifluoroetanol forneceu compostos que apresentaram reprodutividade e linearidade para análise por cromatografia gasosa. Após a derivatização a injeção deve ser realizada preferencialmente entre 20 e 28 horas, pois o composto derivatizado apresenta o máximo de área cromatográfica.

Portanto pode-se afirmar que:

- A metodologia pode ser melhorada com a substituição do HCl por NaOH durante a purificação, antes da solução ser passada pela resina IRA-420.
- O glifosato e seu metabólito o AMPA pode ser quantificado a partir de 30ppb e qualificado a partir de 10ppb.
- A injeção deve ser entre 20 e 28 horas após a derivatização, pois nesse tempo a recuperação apresentou as melhores recuperações.
- Sugestões: A pesquisa deve ser melhorada para ser validada.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M.P.; DAUD, J.; HONG, K.S.; YEW, C.H. **Improved method for the determination of glyphosate in water.** . Journal of Chromatography A, 697, 363-369, 1995.
- AGROMIL: ASSOCIAÇÃO DOS ENGENHEIROS AGRÔNOMOS CAMPOS GERAIS. **Cultura da Soja.** [disponível em <http://www.agromil.com.br/origemsoja.html>, acessado em 25/12/2003].
- ALFERNESS, P.L.; IWATA, Y. **Determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil, plant and animal matrices, and water by capillary gas chromatography with mass-selective detection.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 2751-2759, 1994.
- ALMEIDA, V.; BRONHARA, A.A. **O uso de herbicidas no plantio direto de soja.** In: XIV Congresso Brasileiro de Herbicidas e Ervas Daninhas. *Resumos...* Londrina, 1982, 54-55 p.
- AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R. **Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação.** Química Nova, v. 25, nº 4, p.589-593, 2002a.
- AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R. **Métodos de Extração e Determinação do Herbicida Glifosato: Breve Revisão.** Química Nova, v. 25, nº 3, p.420-428, 2002b.
- ANDRADE, J.C.; CUSTÓDIO, R. **Cromatografia a gás: curso em diapositivos.** Copyright 1996 - 2003 [disponível em http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/cagced_2/cagced_2.htm, acessado em 17/12/2003)
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** “ANVISA investiga alimentos contaminados por agrotóxicos”. Boletim Informativo, Nº 25, novembro, p. 4-5, 2002.
- ARAÚJO, A.S.F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos.** Piracicaba, USP, 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2002.

- ARROYAVE, M.E. **Análisis al informe final: Estudio de las denuncias de daños a la salud relacionadas con la erradicación aérea en la Colombia.** Defensoria del Pueblo da Colômbia, Mayo de 2002. [disponível em <http://www.cipoonline.org/colombia/02053001>, acessado em 20/01/2003].
- BARJA, B.C.; HERSZAGE, J.; AFONSO, M.S. **Iron (III)-phosphonate complexes.** Polyedron, 20, 1821-1830, 2001.
- BÖRJESSON, E.; TORSTENSSON, L. **New methods for determination of and (aminomethyl) phosphonic acid in water and soil.** Journal of Chromatography A, 886, 207-216, 2000.
- BRADY, N.C. **Natureza e propriedades dos solos.** 6. ed. Rio de Janeiro: Livraria Freitas Bastos S.A., 1983. 647p.
- BRASIL. Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989., regulamentada pelo Decreto nº 98816, artigo 2, inciso II.
- BUSTILLOS, O.V.; SASSINE, A.; MARCH, R. **A espectrometria de massas quadrupolar.** 1. ed. São Paulo: Scor, 2003. 162 p.17-24 p.
- CAMARGO, P.N. **Herbicidas orgânicos: fundamentos químicos-estruturais.** 2 ed. São Paulo: Manole, 1986. 275 p. 1-7 e 160-161 p.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos.** 5. ed. Campinas: UNICAMP, 1993. 288 p.
- CORREA, T.M; ALVES, E.; QUEIROZ, C.A.S.; VELINI, E.D.; CORREA, M.D. **Avaliação dos níveis de intoxicação de plantas cultivadas pelo glifosato: Destino dos Herbicidas no Ambiente.** In: XXIII Congresso Brasileiro de Controle de Plantas Daninhas. *Resumos...* São Paulo, 2002.

COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS. 6 ed. São Paulo: Organização Andrei Editora Limitada, 1999, 483p.

COWELL, J.E.; KUNSTMAN, J.L.; STEINMETZ, J.R.; WILSON, G.R. **Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite: An interlaboratory study.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34, 955-960, 1986.

DEYRUP, C.L.; CHANG, S.; WEINTRAUB, R. A.; MOYE, A. **Simultaneous esterification and acylation of pesticides for analysis by gas chromatography. Derivatization of glyphosate and alcohols-perfluorinated anhydrides.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 33, 944-947, 1985.

DORES, E.F.G.C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. **Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: água usada para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso: análise preliminar.** Química Nova, v. 24, n. 4, 589-593, 2001.

EBERBACH, P.L.; DOUGLAS, L.A. **Method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil using electron capture gas chromatography.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 1776-1780, 1991.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA: **Manual de métodos de análises de solo.** 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997. 212p.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA: **Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas: O caso da soja RR da Monsanto.** Caderno de Ciência & Tecnologia. Brasília: v.15, n. 3, set/dez, 1998. 42p.

FAO-Food and Agriculture Organization: **Manual on the submission and evaluation of pesticide residues data,** 2002 [disponível em <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/faom2002.doc>, acessado em 17/12/2003]

- FELLEMBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental**. São Paulo: EUSP, 1980. 196p.
- FERRE; J.L.E.; LINS, I.A.; CAMPOSILVAN, D.; KASHIWARA, Y. **Eliminacion com glifosato de cepas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)**. Seminário de la Sociedad Ecuatoriana de Malezas. 1980. Guayaquil, Equador. 1980.
- FERREIRA, L.H. **Desenvolvimento de um novo sistema para extração com fluido supercrítico e sua aplicação na análise de resíduos de clorotalonil em alimentos**. Dissertação (Mestrado), Instituto de Física e Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 1995.
- FRIESTAD, H.O.; BRONSTAD, J.O. **Determinations of trace amounts of 9, 10-anthraquinone in aqueous systems by differential pulse polarography**, *Analytica Chimica Acta*, 119, 243-249, 1985.
- FUNDACENTRO. **Prevenção de acidentes no trabalho com agrotóxicos**. Segurança e saúde no trabalho, v.3. São Paulo, 1999.
- GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas: **Cursos teórico-prático de análise resíduos de pesticidas em vegetais**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz., 1999.
- GOMES, M.A.F. **Herbicidas no Meio Ambiente – Uma abordagem para regiões de alta vulnerabilidade natural**. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das plantas daninhas. 2002. [disponível em <http://www.cnpa.embrapa.br/herbicidas>, acessado em 01/07/2002]
- HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos editora S.A., 2001. 862p.

HASSK, E.; CERDEIRA, A.; COLE, A.; WAINE, A. **Uso do glifosato como dessecante em feijão miúdo**. Seminário de la Sociedad Ecuatoriana de Malezas. 1980. Guayaquil, Equador. 1980.

HERTWIG, K.V. **Manual de herbicidas, desfolhantes, dessecantes e fitorreguladores**. São Paulo: CERES, 1977. 479p.

KATAOKA, H.; RYU, S.; SAKIYAMA, N.; MAKITA, M. **Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection**. Journal of Chromatography A, 882, 256-258, 1996.

KLEBA, J.B. **Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas – o caso da soja RR da Monsanto**. EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, caderno de Ciências e Tecnologia. Brasília, v. 15, n. 3, 1-42, 1998.

KRIMSKY, S.; WRUBEL, R. **Agricultural biotechnology and the environmental – Science, policy and social issues**. Urbana, Chicago: University of Illinois Press, 1996.

KUDZIN, Z.H.; GRALAK, D.K.; DRABOWICZ, J.; LUCZAK, J. **Novel approach for the simultaneous analysis of glyphosate and its metabolites**. Journal of Chromatography A, 947, 129-141, 2002.

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

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manole, 1999. 230p.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Átomo, 2002. 278p. 65-68p.

LOH, W.; LISBOA, C.P. **Físico-Química de soluções de polímeros e surfactantes**. São Paulo: UNICAMP, 2003. 50p. [disponível em <http://www.pcserver.iqm.unicamp.br/~wloh/cursos/qp433/seminarios/2002/chrislane.pdf>, acessado em 25/03/2003].

LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. **Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition.** Analytical Chemistry, 55, 712-724A, 1983.

MARCONDES, D.A.S. **Controle Preventivo e Legais de Plantas Daninhas.** In: Controle Integrado de Plantas Daninhas. São Paulo: CREA, 1982.

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, 36, 486, 1988.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. **Statistic for analytical chemistry.** 3. Ed. Chinchester: Ellis Horwood, 1993. Chapter 5, p. 101-141.

MINDEFENSA. **Documento Planejado de Manejo Ambiental Para Erradicação de Cultivos Ilícitos: 2000.** [disponível em http://www.mindefensa.gov.co/conflicto_armado/narcotrafico/toxicologia_glifosato.pdf, acessado em 25/03/2003].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Substâncias com ação tóxica sobre animais e/ou plantas.** : Brasília: Ed. Coronário, 1984. 180p.

MONSANTO- **Avaliação da segurança alimentar e ambiental da Soja Roundup Ready®, Evento 40-3-2.** [disponível em http://www.monsanto.com.br/biotecnologia/estudoRRS_ExecSafety_port.pdf, acessado em 11/07/2002].

MUZYK, T.J. **Weed biology and control.** New York: McGraw Hill Book Company, 1970.

MYIAMOTO, Y. **“Cuidado com a Transgênica”.** Revista Cultivar, n. 31, agosto, 5-6, 2001.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE: PROGRAMA INTERNACIONAL NA SEGURANÇA QUÍMICA CRITÉRIOS DE SAÚDE AMBIENTAIS. **Glyphosate:**

Environmental Health Criteria 159 (programa internacional na segurança química critérios de saúde ambientais); Genebra: OMS, 1994. [disponível em <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159htm>, acessado em 10/04/2003].

PAGANELLA, F.; CLARO, J.A. **Agrotóxicos que afetam a vida.** Sobradinho, PR. [disponível em <http://www.acquacontato.hpg.ig.com.br/agrotoxicos.htm>, acessado em 26/03/2003].

PARCERIAS ESTRATÉGICAS. 10. ed. Brasília: Ministério da Ciência e da Tecnologia, Centro de Estudos Estratégicos, 174-185, março, 2001.

PARKER, G.A. **Validation of methods used in Florida department of agriculture and consumer services chemical residue laboratory.** Journal of Association of Official Analytical Chemists, Arlington, v. 74, n. 5, p.868-871, Sept./Oct., 1991.

POWELL, H.A.; KERBY, N.W.; ROWELL, P. **High-performance liquid chromatography determination of the herbicide glyphosate and its metabolite (aminomethyl)phosphonic acid and their extraction from cyanobacteria.** Journal of Chromatography , 502, 201-207, 1990.

PRATA, F.; LAVORENTI, A. **Comportamento de herbicidas no solo: influência da matéria orgânica.** Universidade de Taubaté, Taubaté-SP, Programa de Pós-Graduação, p. 6, 2000. [disponível em <http://www.unitau.br/prppg/publica/biocienc/downloads/comportamentoherbicidas-N2-2000.pdf> acessado em 05/01/2004].

PRATA, F. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina.** Piracicaba, USP, 2002. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2002.

RAGAB, M.T.H. **Thin-layer chromatographic detection of glyphosate herbicide (N-phosphonomethyl glycine) and its aminomethyl phosphonic acid metabolite,** Chemosphere, 7, 143-153, 1978.

- RAMOS, H.H.; DUREGAN, J.C. **Avaliação da eficiência da mistura pronta de glifosato+2,4-D no controle de corda-de-viola (*Commelina virginica* L.) em citrus.** Planta Daninha, vol. 31, n. 15, 33-41, 1996.
- REVISTA CULTIVAR: **Sementeiros do FELAS apoiam transgênicos.** São Paulo: n. 23, dezembro, 2000.
- ROBERTSON, B.; ALEXANDER, M. **Grow-linked and cometabolic biodegradation: possible reason for occurrence or absence of accelerated pesticide biodegradation.** Pesticide Science, 41, 311-318, 1994.
- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.L.S. **Misturas de herbicidas de manejo com residuais, na cultura da soja em plantio direto.** In: XVII Congresso Brasileiro de Herbicidas e Ervas Daninhas. Piracicaba, 175-176, 1988.
- ROY, D.N.; KONAR, S. **Development of an analytical method for the determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid residues in soils by nitrogen-selective gas chromatography.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 37, 441-443, 1989.
- SANCHO, J.V.; HERNADEZ, F.; LÓPEZ, F.J.; HOGENDOORP, E.A.; DIJKMAN, E. **Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography.** Journal of Chromatography A, 737, 75-83, 1996.
- SHEALS, J.; GRASTRÖM, M.; SJÖBERG, S.; PEARSSON, P. **Coadsorption of Cu(II) and glyphosate at the water-goethite (α -FeOOH) interface: molecular structures from FTIR and EXAFS measurements.** Journal of Colloid and Interface Science, 262, 38-47, 2003.
- SILVA, M.J. **Análise de Herbicida na cultura de soja.** Campo Grande: UCDB, 1999. 111p.

SILVEIRA, M.L.; SCHURK, E.A.; PERALBA, M.C.R. **Análise do herbicida glifosato e de seu metabólito, o ácido aminometil fosfônico (AMPA) por GC-MS.** In: XIV Salão de Iniciação Científica. SIC. Ciências Exatas e da Terra. UFRGS-Campus Olímpicus, RS, 2002.

SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. [disponível em: <http://www.sindag.com.br>, acessado em 10/01/2003].

SOLOMONS, T.W.G. **Química Orgânica I.** 6. Ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 1991, 645p.

SOLOMONS, T.W.G. **Química Orgânica II.** Ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 1991.

SPADOTTO, C.A. **Uso de herbicidas no Brasil.** Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das plantas daninhas. 2002. [disponível em <http://www.cnpa.embrapa.br/herbicidas>, acessado 01/07/2002]

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W.F.; PENNER, D. **Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil.** Weed Science, 23, 229-234, 1975.

TADEO, J.L.; SANCHEZ-BRUNETE, C.; PEREZ, R.A.; FERNANDEZ, M.D. **Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables.** Journal of Chromatography A, 882, 175-191, 2000.

THOMPSON, D.G.; COWELL, J.E.; DANIELS, R.J.; STAZNIK, B.; MacDONALD, L.M. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, 72, 355, 1989.

TSUNODA, N. **Simultaneous determination of the herbicides glyphosate, glufosinate and bialaphos and their metabolites by gas chromatography-ion-trap mass spectrometry.** . Journal of Chromatography A, 637, 167-173, 1993.

UNIDERP: UNIVERSIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO DO ESTADO E DA REGIÃO DO PANTANAL: **O Município de Campo Grande, atlas geográfico digital de**

Mato Grosso do Sul. [disponível em <http://www.uniderp.br/atlas/cgrande.htm>, acessado em 13/05/2003]

VICTORIA, R.; VOLL, E. **Efeitos do manejo da resteva de trigo, do preparo do solo e de herbicidas, no controle de plantas daninhas na cultura da soja.** Resumos: Congresso Brasileiro de Herbicidas e Ervas Daninhas. XVII. Piracicaba, 179-180, 1988.

VIEIRA, E.M.; PRADO, G.S.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O. **Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica.** Química Nova, v. 22, nº 3, p.305-308, 1999.

VREEKEN, R.J.; SPEKSNIJDER, P.; BOBELDIJK-PASTOROVA, I.; NOIJ, T.H.M. **Selective analysis of the herbicides and aminomethylphosphonic acid water by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, 794, 187-199, 1998.

YOKOMIZO, Y.; LARA, W.; PUGA, F.; BATISTA, G.; BARRETO, H.; MALTONE, C.; DOEGE, M. **Resíduos de pesticidas em alimentos.** Instituto de tecnologia de alimentos: Campinas, 1985. 226p.