

REINALDO FRANCISCO TEÓFILO

PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA A OTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA
VOLTAMÉTRICA NA DETERMINAÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO EM
SOLO, ÁGUA E VEGETAIS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

REINALDO FRANCISCO TEÓFILO

PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA A OTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA
VOLTAMÉTRICA NA DETERMINAÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO EM
SOLO, ÁGUA E VEGETAIS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 18 de julho de 2003.

Prof. César Reis
(Conselheiro)

Prof^a. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Conselheira)

Prof. Benjamin Gonçalves Milagres

Prof. José Fernando de Paiva

Prof. Efraim Lázaro Reis
(Orientador)

As ciências do meio ambiente estão à procura de uma nova síntese do saber e de uma nova prescrição, cujo princípio será mais ecológico do que econômico e mais ético do que científico.

Pierre Danserean

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me presenteado com saúde e perseverança para realizar este trabalho, entre outras tantas coisas.

Aos meus pais, Maria Elisa Migliorini Teófilo e Paulo Teófilo, pela vida, pelas orações, conselhos e apoio.

À Gilmare, que participou efetivamente de todos os acontecimentos desta escalada, sendo fundamental, pela sua afabilidade, dedicação, compreensão, companheirismo e sobretudo, pelo júbilo de sua presença.

Aos meus irmãos, irmãs, sobrinhos, sobrinhas, cunhados e cunhadas, que estiveram sempre presentes nos bons e maus momentos.

À professora Janice C. Pereira, pelo empenho em tornar possível a realização deste experimento, além de toda simpatia, amizade e confiança.

Ao professor José Fernando de Paiva, pelo auxílio, dedicação e paciência.

Ao professor Hermínio A. Nalini Jr., pela oportunidade, atenção e confiança.

Aos membros do Laboratório de Geoquímica, pela receptividade, desvelo e auxílio.

Ao laboratório de Geoquímica (DEGEO/UFOP), pela possibilidade do uso de suas instalações na condução dos trabalhos.

À República Aquarius, em especial ao companheiro Walter Pereira (Mulambo), pela receptividade nas estadias em Ouro Preto, pela confiança e amizade.

Ao Alisson Vaillant e Bruno (Tomate) pela amizade e receptividade nas estadias em Ouro Preto.

À Mariana Espósito, pelo auxílio e companheirismo.

Ao Dr. Francisco Affonso Ferreira, que muito contribuiu, tornando a realização deste experimento viável devido à doação de reagentes fundamentais, além de toda paciência e sugestões.

Ao meu orientador, Dr. Efraim Lázaro Reis, pela amizade, dedicação, ensinamentos e confiança.

Ao Dr. César Reis, pelas valiosas sugestões, pelas discussões e pela frutífera cooperação.

Ao Dr. Benjamin Gonçalves Milagres, pelo apoio, disponibilidade e conselhos.

À Dr. Maria Eliana L. R. Queiroz, pelos ensinamentos e participação.

Aos companheiros Rubens, Cida, Onezina e Marisa, pela paciência, disposição, dedicação e amizade.

Aos motoristas da linha UFV-BH, pela paciência e atenção.

Aos companheiros inesquecíveis da República “Os Largado”, Bruno dos Largado, Kepler (Manguinha), André (Boca), Harllen Sandro, Bruno (Beri), Schineider, Gabriel (Gabi), Márcio (Negão) e Germano, pelas festas, companheirismo, além do contentamento e despreocupação com a vida. A oportunidade desse convívio é uma terapia da alegria.

Aos companheiros eternos de universidade, Márcio Takaka, Rodrigo Cabelo, Fábio Gaúcho, Edinho Takahashi, Hallen, Monga, Eric Medeiros, Marco Aurélio, Lessando Boquinha, Junio Drogueira, Gutierrez, Breno, Léo Rato, Didi, Humberto Russo e tantos outros, pela presença amiga em todos os momentos.

Ao amigo Tiago Capão, pelas trocas de informações, bate-papos e pelo companheirismo nas idas ao mundo Matrix.

À Eunice, pelo almoço gostoso, pelos cuidados maternos e pelo zelo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química, pelo apoio incondicional e pela oportunidade oferecida para a realização deste curso e deste trabalho.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo aporte financeiro, permitindo a dedicação à pesquisa e a oportunidade da contribuição científica.

A todos os amigos do Departamento de Química e do Mestrado em Agroquímica, pelos bate-papos e colaborações.

Enfim, àqueles que embora não citados nominalmente, que nesta caminhada, em todos os momentos, me ajudaram, se não com ações, com exemplos e ensinamentos.

BIOGRAFIA

REINALDO FRANCISCO TEÓFILO, filho de Maria Elisa Migliorini Teófilo e Paulo Teófilo, nasceu em 30 de janeiro de 1978, em Corbélia, PR. Viveu, no entanto, durante toda sua infância e adolescência na cidade de Campo Belo, MG.

Em março de 1996 iniciou o Curso de Física na Universidade Federal de Viçosa. Transferiu-se para o curso de Química, Bacharelado e Licenciatura, em 1998, concluindo-o em agosto de 2001.

De outubro de 1998 a agosto de 1999, foi estagiário do Conselho Regional de Química - 2ª Região, Minas Gerais.

De setembro de 1999 a agosto de 2000, foi bolsista de iniciação científica no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa.

Entre outubro de 2000 e julho de 2001, foi tutor da Unidade de Apoio Educacional da Universidade Federal de Viçosa.

Em setembro de 2001, iniciou o Curso de Mestrado em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em 18 de julho de 2003.

CONTEÚDO

ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT... ..	XV
Introdução.....	1
1. INTRODUÇÃO	2
Revisão Bibliográfica.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Ervas Daninhas e Herbicidas.....	6
2.2. O Herbicida Glifosato	8
2.2.1. Características	9
2.2.1.1. Nomenclatura	9
2.2.1.2. Propriedades Físico-Químicas.....	10
2.2.2. Degradação, Mobilização e Dispersão.....	11
2.2.3. Interações com os Compartimentos do Solo	11
2.2.4. Toxicidade.....	14
2.2.5. Extração, Purificação e Determinação	17
2.3. Técnicas Voltamétricas	22
2.3.1. Voltametria com Onda Quadrada	23
2.3.2. Voltametria com Pulso Diferencial	24
2.3.3. Voltametria do Herbicida Glifosato.....	25
2.4. Quimiometria.....	26
2.4.1. Planejamento Experimental	27
2.4.2. Planejamento Fatorial	28
2.4.3. Metodologia para Superfície de Resposta	29
Parte Experimental.....	31
3. PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1. Otimização da Resposta Voltamétrica	32
3.1.1. Instrumentação	32
3.1.2. Materiais	32
3.1.3. Preparação das Soluções	33
3.1.4. Derivatização	33
3.1.5. Procedimento para a Otimização e Tratamento Quimiométrico.....	33
3.1.6. Parâmetros Eletroanalíticos	34
3.1.7. Voltametria com Onda Quadrada	34
3.1.8. Voltametria com Pulso Diferencial	35

3.2. Aplicação da Técnica Otimizada	36
3.2.1. Instrumentação	36
3.2.2. Materiais	36
3.2.3. Linearidade	37
3.2.4. Limites de Detecção e Quantificação	37
3.2.5. Tratamento das Resinas e Preparação da Coluna	38
3.2.6. Origem e Preparação das Amostras	39
3.2.6.1. Amostra de Referência Preparada	39
3.2.6.2. Água	40
3.2.6.3. Vegetais	40
3.2.6.4. Solo	40
3.2.7. Coleta do Glifosato e Derivatização	41
Resultados e Discussão	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Otimização da Resposta Voltamétrica	43
4.1.1. Voltametria com Onda Quadrada	43
4.1.1.1. Estudo dos Parâmetros Voltamétricos	43
4.1.1.2. Planejamento Fatorial – Triagem dos Fatores	45
4.1.1.3. Metodologia para a Superfície de Resposta	49
4.1.1.4. Superfície de Resposta - SWV	51
4.1.2. Voltametria com Pulso Diferencial	54
4.1.2.1. Estudo dos Parâmetros Voltamétricos	54
4.1.2.2. Planejamento Fatorial – Triagem dos Fatores	57
4.1.2.3. Metodologia para a Superfície de Resposta	61
4.1.2.4. Superfície de Resposta - DPV	63
4.2. Aplicação da Técnica Otimizada	67
4.2.1. Linearidade	67
4.2.1.1. Linearidade da Voltametria com Onda Quadrada	67
4.2.1.2. Linearidade da Voltametria com Pulso Diferencial	68
4.2.2. Limites de Detecção e Quantificação	69
4.2.3. Análise das Amostras	70
4.2.3.1. Amostra Referência Preparada	70
4.2.3.2. Água	72
4.2.3.3. Vegetais	72
4.2.3.4. Solo	74
Conclusões	77
5. CONCLUSÕES	78
5.1. Recomendações Futuras	79
Referências Bibliográficas	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

Apêndice	91
A. APÊNDICE.....	92
A1- Cálculo dos Efeitos.....	92
A1.1. Cálculo dos Erros dos Efeitos.....	94
A2. Cálculo dos Coeficientes.....	94
A2.1. Cálculo dos Erros dos Coeficientes	95
A2.2. Ajuste dos Coeficientes Significativos	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. N-(fosfonometil) aminoacetato de isopropilamônio.	9
Figura 2. Dissociação do glifosato de acordo com seu comportamento zwitteriônico.....	10
Figura 3. Etapas gerais empregadas na extração, limpeza e determinação do glifosato por cromatografia.	19
Figura 4. Representação esquemática dos pulsos da varredura com onda quadrada.	23
Figura 5. Representação esquemática dos pulsos diferenciais durante a varredura.	24
Figura 6. Equação da reação de nitrosação da amina secundária na molécula do glifosato.	25
Figura 7. Equação da reação de redução da nitrosamina do herbicida glifosato nos meios ácido e básico.	25
Figura 8. Voltamogramas cíclicos da nitrosamina do glifosato em meio ácido*.	26
Figura 9. (a) planejamento central múltiplo para dois fatores ($k=2$ e $\alpha=\sqrt{2}$). (b) planejamento central múltiplo para três fatores ($k=3$ e $\alpha=\sqrt{3}$) (Response surface Methodology, 1995) ¹²²	30
Figura 10. Célula voltamétrica do analisador polarográfico 757 VA Computrace Stand, destacando os três eletrodos e o agitador não magnético.	32
Figura 11. Parâmetros voltamétricos da SWV escolhidos para serem estudados no planejamento fatorial.	35
Figura 12. Parâmetros voltamétricos da DPV escolhidos para serem estudados no planejamento fatorial.	36
Figura 13. Sistema de coluna e bomba peristáltica, utilizado na limpeza e pré-concentração do herbicida na resina de troca aniônica.	38
Figura 14. Colunas cromatográficas dispostas no laboratório.....	39
Figura 15. Estudo do parâmetro incremento de voltagem (VS) na SWV, com os parâmetros A e Fr fixados em 0,05 volt e 50 hertz, respectivamente.	43
Figura 16. Estudo do parâmetro amplitude (A) na SWV, com os parâmetros VS e Fr fixados em 0,01 volt e 50 hertz, respectivamente.	44
Figura 17. Estudo do parâmetro frequência (Fr) na SWV, com os parâmetros VS e A fixados em 0,01 volt e 0,05 volt, respectivamente.	44
Figura 18. Representação gráfica dos efeitos de segunda ordem.	47
Figura 19. Superfície de resposta com incremento de voltagem fixo em -1,682.	51
Figura 20. Superfície de resposta com incremento de voltagem fixo em +1,682.	51
Figura 21. Superfície de resposta com a amplitude fixa em -1,682.	52
Figura 22. Superfície de resposta com a amplitude fixa em +1,682.	52
Figura 23. Superfície de resposta com o eletrólito de suporte fixo em -1,6.	53
Figura 24. Superfície de resposta com o eletrólito de suporte fixo em +1,8.	53
Figura 25. Estudo do parâmetro incremento de voltagem (VS) para a DPV, com os parâmetros AP, TP e VT fixados em 0,05 volt, 0,05 s e 0,50 s, respectivamente.	55
Figura 26. Estudo do parâmetro amplitude do pulso (AP) para a DPV, com os parâmetros VS, TP e VT fixados em 0,01 volt, 0,05 s e 0,50 s, respectivamente.	55

Figura 27. Estudo do parâmetro tempo de pulso (TP) para a DPV, com os parâmetros VS, AP e VT fixados em 0,01 volt, 0,05 volt e 0,50 s, respectivamente.....	56
Figura 28. Estudo do parâmetro tempo do incremento de voltagem (VT) para a DPV, com os parâmetros VS, AP e TP fixados em 0,01 volt, 0,05 volt e 0,05 s, respectivamente.....	56
Figura 29. Representação gráfica dos efeitos de segunda ordem.....	59
Figura 30. Superfície de resposta com incremento de voltagem fixo em -1,682.....	63
Figura 31. Superfície de resposta com incremento de voltagem fixo em +1,682.....	63
Figura 32. Superfície de resposta com a amplitude do pulso fixa em -1,682.....	64
Figura 33. Superfície de resposta com a amplitude do pulso fixa em +1,682.....	64
Figura 34. Superfície de resposta com o tempo de pulso fixo em -1,682.....	65
Figura 35. Superfície de resposta com o tempo de pulso fixo em +1,682.....	65
Figura 36. Curva analítica linear para a determinação do herbicida glifosato por SWV, na faixa de 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 1,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$	67
Figura 37. Curva analítica linear para a determinação do herbicida glifosato por SWV, na faixa de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	67
Figura 38. Curva analítica linear para a determinação do herbicida glifosato por DPV, na faixa de 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 1,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$	68
Figura 39. Curva analítica linear para a determinação do herbicida glifosato por DPV, na faixa de 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	68
Figura 40. Análise por adição de padrão da amostra referência 1.....	71
Figura 41. Análise por adição de padrão da amostra referência 2.....	71
Figura 42. Análise por adição de padrão da amostra referência 3.....	71
Figura 43. Análise por adição de padrão da amostra de água natural 1.....	72
Figura 44. Análise por adição de padrão da amostra de água natural 2.....	72
Figura 45. Análise por adição de padrão da amostra de forrageira VPA.....	73
Figura 46. Análise por adição de padrão da amostra de forrageira VPA fortificada.....	73
Figura 47. Análise por adição de padrão da amostra de forrageira VCF.....	73
Figura 48. Análise por adição de padrão da amostra de forrageira VCF fortificada.....	74
Figura 49. Análise por adição de padrão da amostra de solo SPA.....	74
Figura 50. Análise por adição de padrão da amostra de solo SPA fortificado.....	75
Figura 51. Análise por adição de padrão da amostra de solo SCF.....	75
Figura 52. Análise por adição de padrão da amostra de solo SCF fortificado.....	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Valores de vendas de pesticidas no Brasil, valor em US\$ (sem ICMS)	8
Tabela 2. Empresas genéricas que comercializam o glifosato no Brasil ¹³⁵⁻¹³⁷	9
Tabela 3. Limites de tolerância e carência para glifosato, em alimentos, estabelecidos pela ANVISA	16
Tabela 4. Soluções extratoras de glifosato do solo	18
Tabela 5. Análise por cromatografia gasosa do herbicida glifosato	20
Tabela 6. Análise por cromatografia líquida do herbicida glifosato	20
Tabela 7. Outras técnicas analíticas	21
Tabela 8. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial para a SWV	45
Tabela 9. Planejamento fatorial completo e respectivas respostas para a SWV	45
Tabela 10. Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial para a SWV	46
Tabela 11. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento CCD para a SWV	49
Tabela 12. Resultado do Planejamento CCD com k=3, para a SWV	49
Tabela 13. ANOVA do planejamento CCD, para a SWV	50
Tabela 14. Coeficientes e erros para o modelo da superfície de resposta para a SWV	50
Tabela 15. Parâmetros otimizados para a análise do herbicida glifosato por voltametria com onda quadrada	54
Tabela 16. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial para a DPV	57
Tabela 17. Planejamento fatorial completo e respectivas respostas para a DPV	57
Tabela 18. Efeitos e erros para do planejamento fatorial para a DPV	58
Tabela 19. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento CCD para a DPV	61
Tabela 20. Resultado do Planejamento CCD com k=3 e $\alpha = 1,682$ para a DPV	61
Tabela 21. ANOVA do planejamento CCD para a DPV	62
Tabela 22. Coeficientes e erros para o modelo para a superfície de resposta para a DPV ...	62
Tabela 23. Parâmetros otimizados para a análise do herbicida glifosato por voltametria com pulso diferencial	66
Tabela 24. Estimativas das regiões de detecção e quantificação	69
Tabela 25. Limites de detecção e quantificação na análise do glifosato	69
Tabela 26. Sensibilidades de algumas técnicas voltamétricas	70
Tabela A1.1. Planejamento fatorial 2 ⁵	92
Tabela A1.2. Matriz dos coeficientes de contraste para um fatorial 2 ⁵	93
Tabela A2.1. Planejamento CCD	95
Tabela A2.2. Coeficientes de contraste para o planejamento CCD	95

RESUMO

TEÓFILO, Reinaldo Francisco, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2003.
Planejamentos Experimentais para a Otimização da Resposta Voltamétrica na Determinação do Herbicida Glifosato em Solo, Água e Vegetais. Orientador: Efraim Lázaro Reis. Conselheiros: César Reis e Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

O desenvolvimento, através de planejamentos experimentais, de um procedimento voltamétrico de análise, simples, rápido, sensível e de baixo custo, para a determinação do herbicida glifosato, é descrito. O comportamento eletroquímico deste herbicida exibe a corrente baseada na redução do grupo *N*-nitroso, adicionado à sua molécula. Os parâmetros de duas diferentes técnicas voltamétricas, a voltametria com onda quadrada (SWV) e a voltametria com pulso diferencial (DPV), foram otimizados. As variáveis selecionadas para o estudo foram: incremento de voltagem (V), amplitude (V), frequência (Hz), concentração do eletrólito de suporte (mol L^{-1}) e a área da gota (mm^2), para a SWV, além das variáveis, incremento de voltagem (V), amplitude do pulso (V), tempo de pulso (s), tempo do incremento de voltagem (s) e concentração do eletrólito de suporte (mol L^{-1}), para a DPV. Um estudo preliminar, dos níveis dos fatores, foi executado antes da etapa de triagem, que empregou neste último, um planejamento fatorial 2^5 completo, tanto para a SWV quanto para a DPV. Nesta etapa, após avaliação dos efeitos, as variáveis selecionadas para o estudo da superfície de resposta, que empregou o planejamento *CCD- central composite design*, para a voltametria com onda quadrada foram: incremento de voltagem, amplitude e concentração do eletrólito de suporte; e para a voltametria com pulso diferencial, foram: incremento de voltagem, amplitude do pulso e tempo de pulso. As condições ótimas encontradas para se obter a melhor resposta voltamétrica foram para a SWV: 0,02502 volt, 0,125 volt, 70 Hz e $1,25 \text{ mol L}^{-1}$ para os fatores, incremento de voltagem, amplitude, frequência e concentração do eletrólito de suporte, respectivamente, e para a DPV foram: 0,026 volt, 0,175 volt, 0,0075 seg., 0,50 seg e $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ para os fatores incremento de voltagem, amplitude do pulso,

tempo do pulso, tempo do incremento de voltagem e concentração do eletrólito de suporte, respectivamente. O parâmetro área da gota, foi fixado nas duas técnicas em 0,60 mm². Aplicando as condições otimizadas, a faixa linear foi de 0,050 a 100,0 µg mL⁻¹ para a SWV e de 0,010 a 100,0 µg mL⁻¹ para a DPV. Os limites de detecção e de quantificação foram, respectivamente, de 1,20 e 60,0 µg L⁻¹ para a SWV e de 22,0 e 53,8 µg L⁻¹ para a DPV. Finalmente, o método voltamétrico com pulso diferencial foi usado para determinar a concentração do herbicida glifosato em amostras de água, solo e vegetais, naturais e/ou fortificadas, sendo que as mesmas foram previamente purificadas em uma coluna cromatográfica com resina de troca-iônica, seguido de tratamento do eluato com carvão ativado e posterior derivatização.

ABSTRACT

TEÓFILO, Reinaldo Francisco, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2003. Design experiments to optimize the voltammetric response in determination of glyphosate herbicide in soil, water and vegetables. Adviser: Efraim Lázaro Reis. Committee Members: César Reis and Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

The development, by experimental design, of a voltammetric procedure of analysis, in a simple, fast, sensible and low cost way to determine the glyphosate herbicide is described. The electrochemical behavior of this herbicide exhibits the current based on the reduction of the *N*-nitroso group added to its molecule. The parameters of two different voltammetric techniques, the square wave voltammetry (SWV) and the differential pulse voltammetry (DPV), were optimized. The selected variables to the study were the voltage step (V), the amplitude (V), the frequency (Hz), the supporting electrolyte concentration (mol L^{-1}) and the drop size (mm^2), in the SWV case, besides the following variables, voltage step (V), pulse amplitude (V), pulse time (s), voltage step time (s) and the supporting electrolyte concentration (mol L^{-1}), to the DPV. A preliminary study of the factor levels was performed before the screening phase, which applied to the last one a 2^5 full factorial design, to the SWV as the DPV. In this stage, after checking the effects the selected variables to the response surface study that used the *CCD - Central Composite Design*, to the square wave voltammetry were: voltage step, amplitude and support electrolyte concentration, and to the differential pulse voltammetry they were the voltage step, the pulse amplitude and the pulse time. The optimum conditions that allowed the best voltammetric response to the SWV were 0,02502 volt, 0,125 volt, 70 Hz and $1,25 \text{ mol L}^{-1}$ to the factors voltage step, amplitude, frequency and support electrolyte concentration, respectively, and to the DPV were 0,026 volt, 0,175 volt, 0,075 seg. and $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ to the factors voltage step, pulse amplitude, pulse time, voltage step time and supporting electrolyte concentration, respectively the drop size parameters was fixed in both techniques in $0,60 \text{ mm}^2$. Applying the optimized conditions, the linear range was from 0,050 to

100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to the SWV and from 0,010 to 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to the DPV. The detection and quantification limits were, respectively, 1,20 and 60,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to the SWV, and 22,0 and 53,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to the DPV. Finally, the differential pulse voltammetry was used to determine the glyphosate herbicide in water, soil and vegetables samples, being these ones natural, some of them fortified, which was previously purified by a chromatographic column on ion-exchange resin, followed of an eluato treatment using activated charcoal and later derivatization.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A introdução e subsequente destruição e/ou acumulação de substâncias estranhas no sistema ambiental contribui para os princípios de um grande número de novos e desenvolvidos aspectos da ciência moderna. Drogas, detergentes, pesticidas, poluentes e inúmeras outras substâncias têm recebido grande atenção nos últimos anos. O contínuo interesse ambiental tem estimulado novas e originais pesquisas que estudam o destino de todas estas substâncias no meio ambiente, seja no solo, na água, no ar e as conseqüências da sua utilização à fauna, à flora, à micro-biota e ao homem¹.

Neste contexto, a produção agrícola moderna depende consideravelmente do uso de herbicidas para controlar as ervas daninhas, seja na pré ou pós-emergência das culturas². Enquanto a produção e o uso de inseticidas têm permanecido estáticos com passar dos últimos anos, tem ocorrido um dramático crescimento no uso de herbicidas na agricultura, sendo que hoje, os herbicidas constituem a principal porção de vendas de todos os pesticidas no sistema de produção agrícola altamente organizado do mundo ocidental industrializado. Além disso, como a situação de produção de alimentos no mundo tem se tornado mais crítica, especialistas concordam que as maiores taxas de expansão na produção de pesticidas continuará acontecendo no campo de herbicidas^{1,24,32}. Embora muitas mudanças e inovações surjam conforme as necessidades do mercado, entre elas o advento das culturas transgênicas, resistentes a algumas pragas, o uso de herbicidas é destacado, visto que a maioria destas inovações não impede o florescimento de ervas daninhas no campo³. Nos últimos anos, o número de trabalhos científicos com ênfase no comportamento dos herbicidas no ambiente tem demonstrado o quanto vem aumentando o interesse da sociedade em conhecer o destino final e o comportamento destes compostos⁵, principalmente devido à preocupação com seus níveis tóxicos na água para o consumo humano e em alimentos, além dos constantes interesses ambientais⁶. O movimento descendente dessas moléculas no perfil do solo talvez seja um dos processos que mais tem chamado a atenção da sociedade científica, em razão da possibilidade de contaminação do lençol freático, uma das principais fontes de abastecimento dos reservatórios de água para consumo humano e animal⁷.

O aminoácido fosfonado glifosato, (*N*-(fosfonometil)glicina), herbicida não seletivo, sistêmico, pós-emergente, foi divulgado em 1971 por Baird et al.⁸ e introduzido no mercado em 1973 principalmente com marca Roundup®, sendo hoje o produto químico fundamental da Monsanto Co., além de ser comercializado também, no Brasil, por muitas empresas nacionais e multinacionais como a Nortox (Glifosato Nortox®), a Dupont (Polaris®) e a Syngenta (Touchdown®). As vendas do glifosato representam 60% do mercado mundial de herbicidas,

contabilizando um total de US\$ 1.200 milhões de dólares ao ano e desta maneira é considerado o herbicida não seletivo mais extensivamente usado no mundo^{9,24}. O glifosato é indicado no controle de muitas ervas daninhas perenes, bienais e anuais, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, em culturas de arroz irrigado, cana-de-açúcar, café, citros, maçã, milho, ameixa, banana, cacau, soja (plantio direto ou indireto), fumo, uva, soqueira em cana-de-açúcar, além de pastagem, arbustos de folhas largas e lenhosas. Seu uso é devido, principalmente, ao seu amplo espectro na eliminação de ervas daninhas⁴. Atualmente, com o auxílio da biotecnologia, ou seja, plantas manipuladas a serem resistentes ao uso deste herbicida, as vendas alcançam, surpreendentemente, um aumento anual ao redor de 20%⁹.

Uma grande preocupação ambiental surge a cada ano sobre o uso extensivo deste herbicida. Apesar de a Organização Mundial de Saúde concluir que não há evidência de carcinogenicidade em mamíferos, os efeitos no ambiente, seja na fauna, na flora e na população microbológica do solo são preocupantes¹²⁻¹⁵.

Considerando-se a ampla utilização do herbicida glifosato em todo o mundo, seu impacto no ambiente está se tornando mais permanente devido a sua acumulação. Torna-se importante portanto, um estudo de suas propriedades físico-químicas, interações com componentes da água e do solo, bem como sua extração, detecção e quantificação em amostras naturais^{3,4}.

Atualmente, a técnica mais utilizada para a determinação de glifosato entre outros herbicidas é a cromatográfica. Trabalhos recentes, utilizando cromatografia de troca aniônica integrada a um detector de pulso amperométrico (PAD)¹⁶, cromatografia iônica (IC)¹⁷ e cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (CG-MS)¹⁸, entre outros, foram publicados destacando o glifosato como herbicida a ser determinado. Porém, devido à sua alta polaridade, o glifosato e seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), tem levado ao desenvolvimento de muitos métodos de análise baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de modo que a maioria das investigações relatadas na literatura para este herbicida se refere a esta técnica analítica. A dificuldade desta análise está na forma de detecção dos compostos, glifosato e AMPA, visto que ambos não possuem grupos cromóforos, que possam ser detectados diretamente por detectores colorimétricos, UV ou fluorimétricos³.

Entretanto, um método rápido, simples, sensível e de baixo custo é ainda necessário. A grande maioria dos métodos cromatográficos são morosos no preparo de amostras e os equipamentos e reagentes utilizados são de alto custo.

A molécula do glifosato apresenta em sua estrutura um grupo amínico secundário, que quando tratado com ácido nitroso, é convertido a um grupo *N*-nitroso (também chamado de nitrosamina)¹⁹. O grupo *N*-nitroso, por ser facilmente reduzível em função do baixo potencial, pode ser determinado voltametricamente²¹. Bronstad e Friestad (1976)²⁰, mostraram ser viável a polarografia de pulso diferencial como técnica econômica, rápida e razoavelmente sensível para a determinação de glifosato em meio aquoso. Além disso, métodos voltamétricos, foram aplicados com sucesso em análises de diversos pesticidas e herbicidas e outras substâncias usadas na agricultura^{22-23, 109}. Tais métodos não apresentam a seletividade de métodos cromatográficos, mas são em geral mais rápidos e podem ser executados em soluções turvas. Como a determinação de agroquímicos usualmente não envolve misturas complexas de moléculas relativamente parecidas, o limite de seletividade das análises voltamétricas é freqüentemente suficiente²⁵. Além disso, a sensibilidade de uma análise voltamétrica pode ser melhorada utilizando ferramentas quimiométricas, através de planejamentos fatoriais e metodologia para superfície de resposta (MSR)²⁶⁻²⁹ ou pelo método simplex seqüencial³⁰.

O objetivo deste trabalho foi executar planejamentos experimentais para estudar a influência dos diversos parâmetros voltamétricos na análise do herbicida glifosato e sobretudo, executar a Metodologia para a Superfície de Resposta (MSR), com a finalidade de obter o pico mais simétrico e a maior intensidade de corrente e, então, aumentar a sensibilidade da metodologia para níveis de concentração ainda mais baixos deste herbicida, com vista a um método alternativo à cromatografia. Desta maneira, planejamentos experimentais independentes foram executados empregando as voltametrias com pulso diferencial (DPV) e com onda quadrada (SWV).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ERVAS DANINHAS E HERBICIDAS

Herbicidas são substâncias ou misturas de substâncias utilizadas para prevenir o aparecimento, reduzir, ou destruir ervas daninhas e outros tipos de plantas, quer sejam aquáticas ou terrestres. Podem, ainda, ser utilizados para causar a morte de apenas partes das plantas¹⁰.

O termo erva daninha apresenta uma série de significados de acordo com a situação em particular. Cientificamente, como tal, somente se considera plantas não lenhosas, cujas partes aéreas vivem menos de um ano. Na prática, pode ser definida, de modo geral, como qualquer planta indesejável num determinado local. Todavia, na agricultura e horticultura, é aquela planta que difere da cultura específica em crescimento. Nas ferrovias, estradas, pátios industriais, aeroportos, represas e etc., é a vegetação como um todo ¹²⁶.

O controle das ervas daninhas torna-se a cada dia mais importante em função dos prejuízos que causam e da demanda sempre crescente, de alimentos, fibras e energia por parte da população que aumenta continuamente³. O comércio mundial de pesticidas cresce a cada ano. Embora muitas mudanças e inovações surjam conforme as necessidades do mercado, entre elas o advento das culturas transgênicas, resistentes a algumas pragas, o uso de herbicidas é destacado visto que a maioria destas inovações não impede o florescimento de ervas daninhas no campo⁴. Por outro lado, a tecnologia transgênica trabalha no sentido de produzir culturas resistentes ao herbicida de interesse e desta maneira, incentiva o aumento de seu consumo⁹.

O extermínio de vegetais nocivos, por meios químicos, era realizado até a Segunda Guerra Mundial, através da utilização de soluções a base de ácidos e sais inorgânicos¹²⁷. Porém, problemas relacionados com a segurança na aplicação, somados à necessidade de uma certa seletividade no controle dessas plantas, provocaram o desenvolvimento dos herbicidas orgânicos¹⁰.

O primeiro composto orgânico usado como tal foi, provavelmente, o derivado fenólico 2-metil-4,6-dinitrofenol ou dinitro-o-cresol (DNOC), introduzido no mercado em 1934¹²⁶. Uma série de outros compostos de diferentes funções químicas foi desenvolvida nos anos seguintes, com finalidade predominantemente herbicida, os quais vêm substituindo os meios mecânicos de controle de ervas daninhas nas últimas décadas, especialmente onde é prática comum a agricultura intensiva e mecanizada.

Já o campo de estudos e pesquisas em herbicidas, ao qual podemos chamar de herbicidologia, está direcionado na busca de novas substâncias que sejam mais eficazes, econômicas e, acima de tudo, não ofereçam riscos ambientais ou à vida. Por outro lado, é preciso conhecer o comportamento dos herbicidas, no solo, na atmosfera, nas águas, nas plantas e seu envolvimento com a microbiota, com a vida animal e humana³².

O uso crescente de compostos herbicidas tem razões econômicas, técnicas e sociais. A mão-de-obra para o controle mecânico de ervas daninhas tornou-se escassa e dispendiosa. Além disso, mudanças econômicas e tecnológicas na produção agrícola, associadas à necessidade de produção de mais alimentos por unidade de terra cultivada, exigem práticas mais eficientes, as quais somente os herbicidas podem fornecer¹⁰.

A principal fonte humana de alimentos é a vegetal. Os vegetais competem com aproximadamente 30.000 espécies de ervas daninhas no mundo todo, com cerca de 1.800 delas causando sérias perdas econômicas⁴³. Essa competição, contribui para uma redução de 9-10% nas colheitas mundiais, de um total de 35% de perdas causadas por pragas em geral¹²⁶. As ervas daninhas privam as plantas de umidade e nutrientes do solo, impedem a incidência direta de luz solar reduzindo assim seu crescimento e contaminam grãos das safras com sementes quase sempre tóxicas ao homem e aos animais⁴³.

O uso de herbicidas orgânicos apresenta, além das econômicas, algumas vantagens toxicológicas e ecológicas. O fato de que muitos destes compostos agem por inibição de fotossíntese (mecanismo de ação tóxica específico para plantas) implica, quase sempre, baixa toxicidade para organismos não-alvos, inclusive o homem. Além disso, como são aplicados, geralmente, bem antes da colheita, o problema relacionado à presença de resíduos é relativamente pequeno, embora haja muitas exceções⁷⁶.

Os herbicidas constituem a principal parcela de vendas de todos os pesticidas no sistema de produção agrícola de alta escala comercial no mundo industrializado do hemisfério ocidental³². No Brasil, porém, não existem dados estatísticos oficiais a respeito do uso atual de herbicidas. O valor de vendas, entretanto, nos dá uma indicação da escala em que são aplicados. De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas, SINDAG¹²⁸, a quantidade de herbicidas vendidos no Brasil em 1.995 soma aproximadamente 834,1 milhões de dólares, mais que três vezes o valor de inseticidas e 3,5 vezes o valor de fungicidas vendidos no mesmo ano (Tab.1). As culturas responsáveis por este elevado consumo são principalmente soja (que corresponde por quase metade do valor total de vendas), cana-de-açúcar, milho e arroz¹⁰.

Tabela 1. Valores de vendas de pesticidas no Brasil, valor em US\$ (sem ICMS)

Pesticidas	1993	1994	1995
Herbicidas	588.597	775.792	834.085
Inseticidas	195.894	300.246	336.779
Fungicidas	166.384	211.080	226.389
Acaricidas	73.816	90.826	98.389
Outros*	25.120	26.133	39.612
Total	1.049.811	1.404.047	1.535.249

* Reguladores de crescimento e espalhantes adesivos

Fonte: SINDAG

A ampla e indiscriminada aplicação de herbicidas pode trazer conseqüências nocivas para o homem, entre elas, a contaminação ambiental e a presença de seus resíduos nos alimentos utilizados para consumo humano.

A discussão atual em torno da nocividade desses agentes químicos está centralizada nas propriedades mutagênicas, carcinogênicas e/ou teratogênicas, suspeitas ou demonstradas, associadas a alguns herbicidas ou seus contaminantes e subprodutos dos processos de síntese encontrados em quantidades traços nos produtos grau técnico¹²⁹. Todavia, dados relativos aos níveis residuais de herbicidas em alimentos, tanto no Brasil como em outros países, são ainda escassos e necessitam ser obtido em maior número para uma avaliação da situação atual¹⁰.

O número de trabalhos científicos com ênfase no comportamento dos herbicidas no ambiente tem demonstrado o quanto vem aumentando o interesse da sociedade em conhecer o destino final desses compostos. Os resultados dessas pesquisas levam muitas vezes à condenação de várias formulações, consideradas de elevado poder impactante, e ao desenvolvimento de novos compostos, especialmente aqueles formulados visando a sua eficiência no controle das plantas daninhas e, principalmente sem riscos para o meio ambiente⁵.

2.2. O HERBICIDA GLIFOSATO

As propriedades do herbicida glifosato foram divulgadas em 1971 por Baird, (1971)⁸. O composto foi encontrado durante um estudo do efeito herbicida dos ácidos terciários aminometilfosfônicos derivados de várias aminas primárias e secundárias. Apenas dois dos compostos produzidos mostraram alguma atividade herbicida, mas ambos tiveram baixa atividade. Entretanto, a propriedade dos compostos de regular o crescimento das plantas, introduziu um deles no mercado, a glifosina, como um agente capaz de amadurecer a cana de açúcar (Polaris, Monsanto Co.). A tentativa de encontrar um ácido terciário

aminometilfosfônico com as melhores atividades herbicidas falhou. Como último recurso, foi sugerido que a degradação dos dois compostos pudessem produzir um metabólito ativo (contrária à tendência geral dos metabólitos). O glifosato estava entre os possíveis metabólitos dos dois compostos, e foi encontrado como tendo alta atividade herbicida³³.

O seu modo de ação primário parece ser a inibição competitiva do “ácido 5-enolpiruvilshikimico-3-fosfato (EPSPs) sintase”, uma enzima que pertence à rota do ácido shikimico, precursor principal da biossíntese dos aminoácidos aromáticos. Esta rota está ligada ao metabolismo primário e secundário das plantas. Os principais produtos finais são os aminoácidos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp); tais aminoácidos são precursores da lignina, dos flavonóides, taninos e outros compostos fenólicos, todos produtos da rota do ácido shikimico^{34,35}, desta maneira o aminoácido fosfonado glifosato é um herbicida não seletivo, sistêmico, pós-emergente, com rápida absorção foliar e translocação, tanto pelo xilema quanto pelo floema da planta tratada⁴¹.

2.2.1. CARACTERÍSTICAS

2.2.1.1. Nomenclatura

N-(fosfonometil)glicina é o nome reconhecido pela IUPAC ao herbicida de nome comum Glifosato, apesar de ser conhecido também com o nome sistemático, ácido *N*-(fosfonometil)aminoacético ^{37, 11}.

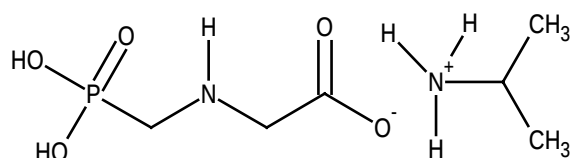


Figura 1. *N*-(fosfonometil) aminoacetato de isopropilamônio.

A Monsanto®, em 1973 introduziu no mercado os sais glifosato-isopropilamônio (Fig. 1) e glifosato-sesquisódio, e a Zeneca em 1989 (atual Syngenta®) introduziu o sal glifosato trimesium (trimetilsulfônio)³⁷. No Brasil atualmente, além das principais Monsanto® (Roundup®), Syngenta® (Touchdown®), Nortox® (Glifosato Nortox®) e Dupont® (Polaris®), tal herbicida é produzido, por várias empresas nacionais e multinacionais, conforme tabela 2.

Tabela 2. Empresas genéricas que comercializam o glifosato no Brasil¹³⁵⁻¹³⁷

Empresa	Nome Comercial
Agricur Defensivos Agrícolas Ltda	Gliphogan®
Agripec Química e Farmacêutica S/A	Glifosato 480 Agripec®
Alkagro do Brasil Ltda	Glifosato Alkagro® e Agrisato®
Cheminova Agro Brasil Ltda	Glifos®
Dow Agro Sciences Industrial Ltda	Gliz 480®
Fersol Indústria e Comércio Ltda	Glifosato Fersol 480 NA
Milênia Agro Ciências S/A	Trop®
Pilarquim BR Comercial Ltda	Pilarsato®

2.2.1.2. Propriedades Físico-Químicas

O aminoácido fosfonado, glifosato, tem fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (M.M. = 169,1 g mol⁻¹). Os seus sais isopropilamônio, sesquisódio e trimesium apresentam as seguintes fórmulas moleculares: $C_6H_{17}N_2O_5P$, $C_6H_{14}N_2Na_3O_{10}P_2$ e $C_6H_{16}NO_5PS$, respectivamente. Em condições ambientais, tanto glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos, muito solúveis em água (12 g L⁻¹ a 25 °C, para glifosato) e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol, entre outros. Glifosato funde a 200 °C, possui densidade aparente de 0,5 g cm⁻³ e se apresenta bastante estável em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60 °C³⁷. Os valores de pK encontrados na literatura para o glifosato são^{36, 142}: pK₁ < 2,0; pK₂ = 2,32; pK₃ = 5,86; pK₄ = 10,86. Tais constantes indicam o grau de dissociação do herbicida em função do pH. Sendo assim, as etapas de dissociação previstas são as apresentadas na Figura 2.

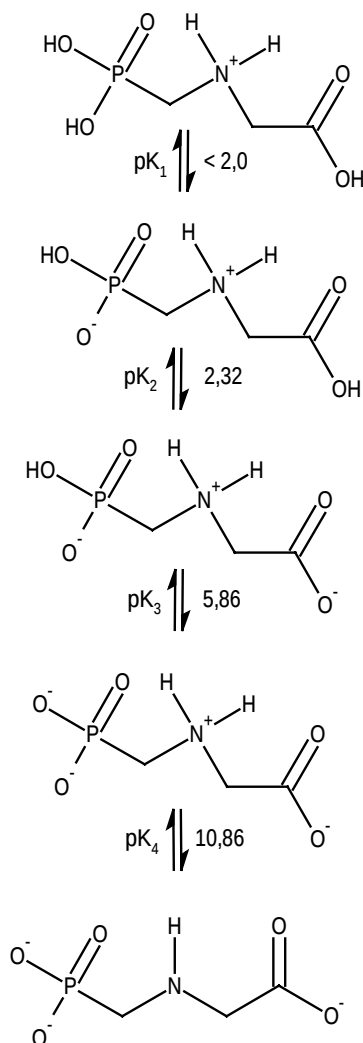


Figura 2. Dissociação do glifosato de acordo com seu comportamento zwitteriônico.

2.2.2. DEGRADAÇÃO, MOBILIZAÇÃO E DISPERSÃO

A rápida e completa degradação do glifosato parece ser essencialmente microbiana e pode ocorrer tanto no solo como na água^{39,40}. De qualquer modo, a razão da degradação do glifosato em diferentes solos pode variar consideravelmente dependendo da proporção da atividade microbiana nos mesmos. Certamente, a inativação através da adsorção pelo solo e a complexação com metais dissolvidos, reduz consideravelmente a razão de degradação⁴². A degradação química e a foto-decomposição parecem ser pouco importantes na decomposição química deste herbicida em solo, porém a fotólise pode ser importante em sistemas aquáticos⁴⁰.

Estudos indicam que a meia vida do glifosato nas águas naturais em condições de laboratório está entre 7 e 10 semanas. Em suspensão de solo o glifosato degrada rapidamente num período de 28 dias. O ácido aminometilfosfônico, AMPA, é o principal produto da degradação do glifosato nesta suspensão. O AMPA é também muito mais persistente que o glifosato; estudos encontraram que o tempo de meia-vida no solo ficou entre 119 e 958 dias⁴⁰.

Em água destilada e em água natural estéril, o glifosato é estável. A sua hidrólise não ocorre em suspensão de solo estéril durante um período de 7 dias, além disso, ele é fortemente adsorvido pelas partículas em suspensão nas águas utilizadas para irrigação⁴⁰.

Newton et al., (1984)⁴⁴, monitoraram o glifosato e o AMPA em águas de rios e sedimentos às margens de uma floresta tratada com o herbicida por aplicação aérea e mostrou que a concentração máxima de glifosato na água foi observada nas primeiras duas horas após o líquido ter sido pulverizado e o resíduo foi detectado na água por 8 dias. No sedimento dos rios, a concentração máxima de glifosato e AMPA foi detectada após 15 dias e ficou entre 0,055 e 0,1 mg kg⁻¹, respectivamente. Além disso, por 55 dias o glifosato atingiu concentrações superiores a 0,01 mg kg⁻¹.

Estas conclusões confirmam a forte afinidade do glifosato pelos sedimentos e pelos compartimentos do solo e seu equilíbrio com os mesmos, o que torna mais urgente seu monitoramento para evitar impactos mais sérios ao ecossistema.

2.2.3. INTERAÇÕES COM OS COMPARTIMENTOS DO SOLO

A habilidade do solo em remover solutos de soluções é bem conhecida. Entretanto, estudos mais precisos têm demonstrado que a remoção dos solutos não é completa, mas envolve processos reversíveis que produzem uma ampla distribuição entre o sólido e os

componentes líquidos. A condição de equilíbrio e a razão destas distribuições são fatores importantes que afetam a disponibilidade biológica e a química do solo³².

Devido aos diferentes métodos de aplicação e condições climáticas, uma quantidade significativa de herbicida alcança o solo. Herbicidas que entram no solo podem se ligar de várias maneiras aos seus constituintes, tais como minerais de argila, matéria orgânica, óxidos metálicos e substâncias húmicas⁴². Os componentes mais importantes do solo capazes de adsorver os herbicidas estão na fração coloidal, que é composta predominantemente de minerais de argila e matéria orgânica; os fenômenos de adsorção relacionados a este último, apresentam-se como sendo um dos mais importantes fatores que afetam o comportamento e destino dos pesticidas e metais pesados entre os componentes do solo⁴⁵.

Estudos sobre o comportamento do herbicida glifosato no ambiente tem demonstrado que este é rapidamente inativado para as plantas quando em contato com o solo^{36, 46, 47}. As interações do glifosato com os solos não estão relacionadas com sua capacidade de troca catiônica e o conteúdo dos minerais de argila, mas sim com o conteúdo de óxido de ferro e de alumínio amorfos e com a matéria orgânica⁴⁵, o que promove sua baixa atividade.

O glifosato apresenta-se em três grupos (amínico, carboxílico e fosfônico), que podem formar fortes ligações coordenadas com íons metálicos, particularmente com os íons dos metais de transição⁴⁸.

Visto que o destino dos herbicidas através do solo é geralmente mediado pela solubilidade em água; a complexação metálica e suas características são de grande importância em relação aos processos de transporte, além disso, o mecanismo de adsorção do glifosato nos compartimentos do solo^{45,46}, assim como a complexação com metais⁴⁹ em soluções aquosas, dependem diretamente dos valores de pH. Estudos feitos por McConnell and Hossner, (1985)⁵⁰, mostraram que a adsorção do glifosato pelas argilas varia com a mudança do pH e para as esmectitas com a mudança na saturação de cátions na solução. Geralmente, como o pH aumenta, a adsorção de glifosato diminui. Este efeito é devido à diminuição das interações entre, argila e glifosato, que se tornam mais negativamente carregados. A adsorção de glifosato na caulinita, na hematita e na goethita é também dependente do pH. O pH determina a carga da molécula e da superfície do mineral. A adsorção é máxima quando a atração eletrostática e interações são maximizadas.

Sprankle et al. (1975b)³⁹ propuseram que o glifosato pode se ligar ao solo de uma forma similar ao fosfato, através dos grupos fosfatados. Esta conclusão é confirmada pelo fato de o fosfato competir com o glifosato pelos locais de adsorção em argila e em solos em geral. As ligações não parecem ser relacionadas pela capacidade de troca catiônica das argilas, mas preferivelmente pelas valências dos cátions formados nas mesmas⁴⁶. Um outro

possível mecanismo de adsorção é a formação de ligações argila-cátion-glifosato, onde o íon metálico pode disputar por uma parte principal do adsorvente, que formam complexos estáveis com metais, através do qual o glifosato se liga ao solo⁴⁵. A habilidade do glifosato em formar fortes quelatos o coloca em uma classe única de herbicidas; e apesar de ser um agente fito-tóxico, pouco é conhecido sobre suas afinidades pelos íons metálicos divalentes e trivalentes que ocorrem em plantas, solos e água⁴⁵.

Estudos sobre a complexação de glifosato com cobre, mostraram que o herbicida contribui pela dessorção do Cu^{2+} já adsorvidos em argilas pela formação de complexos Cu-glifosato em solução através do deslocamento do equilíbrio, além disso, a adsorção do pesticida diminui em argila saturada com metais, quando comparada com a amostra original⁴⁵. Mas, ao mesmo tempo, um aumento do glifosato é também atribuído pela formação de complexo na solução. Os cátions ajudam na formação de novos locais para adsorção do herbicida em solução com minerais de argila³⁹, deixando um espaço no interior da camada do mineral, não apenas por troca catiônica de íons, mas também por formação de complexos com glifosato na solução externa, enquanto os prótons ocupam posições nas camadas internas (isto explica o valor do pH da solução final ser maior que o da solução inicial). Tais proposições concordam com outros trabalhos apresentados na literatura, que afirmam que com a formação do complexo Cu-glifosato há um aumento na adsorção do herbicida⁴⁵. Tal adsorção pode acontecer em locais onde o Cu^{2+} estava previamente adsorvido, enquanto agia como uma ponte entre o solo e o glifosato. Quando o Cu^{2+} estava presente na solução o pH diminuiu, e a adsorção de glifosato aumentou. Devido ao baixo pH, ocorreu a formação da espécie de glifosato com pouca carga negativa, a qual foi adsorvida mais facilmente nas superfícies do solo com carga negativa⁵¹.

O fato de a desorção de glifosato em montmorilonita (mineral de carga permanente) ser alta, pode confirmar ainda mais a proposta de que o glifosato se adsorve melhor em minerais de carga variável⁴⁵. McConnell and Hossner (1985)⁵⁰, sugerem a ocorrência de adsorção de glifosato em minerais com cargas dependentes do pH, tal como hematita e goethita.

Outros importantes componentes do solo, que adsorvem glifosato equivalentemente aos minerais de argila são os extratos húmicos. As interações com as substâncias húmicas tanto nas formas sólida ou dissolvida, são mais importantes que o previamente esperado. A adsorção é explicada por múltiplas ligações de hidrogênios que podem ocorrer entre os vários grupos ácidos e os que contêm oxigênio de ambas as moléculas, porém, a ordem de adsorção não segue simplesmente a ordem de acidez, mas preferivelmente o aumento alifático e o tamanho molecular das substâncias húmicas, além disso, materiais húmicos com

alto teor aromático e pequena dimensão molecular apresentam adsorção relativamente baixa. Este resultado revela que a extensão da adsorção do glifosato nas substâncias húmicas varia consideravelmente com sua estrutura macromolecular, com sua dimensão e é favorecida por alto grau de flexibilidade estereoquímica combinada com um extenso tamanho molecular⁵².

O glifosato foi encontrado, também, adsorvido em um complexo de ácido húmico-ferro em maior extensão do que a literatura relata para argilas e solos⁵³. Este grau de adsorção foi atribuído ao mecanismo de troca de ligantes pela qual uma ou mais hidroxilas da esfera de hidratação do ferro pode ser trocada pelo grupo fosfatado do glifosato⁵².

Estas suposições propõem que os componentes do solo além dos minerais de argila são importantes fatores responsáveis pela adsorção e pela baixa mobilidade deste pesticida no solo⁴⁵, além disso, estes tipos de interações químicas são responsáveis pela disponibilidade do herbicida livre, fazendo o resistir à biodegradação em águas naturais⁴².

2.2.4. TOXICIDADE

A toxicidade relativamente baixa do glifosato aos mamíferos, tornou-o um dos herbicidas mais amplamente usado no mundo⁵⁴. Porém, seu uso indiscriminado pode se tornar tóxico à fauna, à população microbiológica e ao homem, devido ao aumento das concentrações de seus resíduos no solo, na água e nos sedimentos.

O glifosato foi divulgado como tendo baixa toxicidade aguda para diferentes espécies de animais, com uma dose oral LD50 entre 0,7 a 11,0 g kg⁻¹ de massa corporal⁵⁵⁻⁵⁷, porém, é um irritante moderado para a pele e olhos⁵⁸, mas o Roundup® foi identificado como principal causador dos fenômenos de irritação ou dermatites, descrito por trabalhadores agrícolas⁵⁷, que parece ser mais tóxico que a combinação do componente ativo. Informações clínicas de acidentes por envenenamento agudos indicam que o pulmão pode ser considerado o órgão alvo da toxicidade do Roundup®⁵⁹. Este efeito foi atribuído aos ingredientes surfactantes ativos adicionados junto ao glifosato para torná-lo mais eficiente⁶⁰. Todavia, um estudo da interação entre glifosato e surfactantes revela um efeito antagonista da toxicidade do glifosato^{61,62}.

Em testes sistemáticos e de curta duração, o princípio ativo, glifosato, não obteve efeito mutagênico, porém, a formulação técnica, Roundup®, demonstrou algumas atividades genotóxicas. Desta forma, a alta atividade das formulações técnicas em induzir a toxicidade e o dano genotóxico em experimentos diferentes e sistemáticos indica o importante papel dos agentes surfactantes ativos e/ou co-formulações na potenciação destes efeitos no ingrediente ativo. Considerando o extenso uso deste herbicida na agricultura e fora dela, tal como

controle de ervas daninhas em sistemas aquáticos, parques e jardins, o risco no processo de avaliação da formulação técnica deve ser considerado de importância primária⁶².

Muito embora tal herbicida seja pouco tóxico para mamíferos, um estudo realizado em coelhos constatou uma queda no volume ejaculado de sêmen e na concentração de esperma após a inclusão de glifosato no regime alimentar destes animais. O pesticida foi dado oralmente por seis semanas, onde ocorreu a queda. Durante as próximas seis semanas de recuperação o efeito sobre a qualidade do sêmen continuou⁶³.

Estudos de impactos ambientais também indicam que o glifosato tem um efeito indireto na comunidade animal⁶⁴; entretanto, algumas espécies de pássaros podem apresentar queda na densidade populacional devido à destruição do habitat causado pelo uso do herbicida¹².

Peixes e invertebrados são mais sensíveis a este herbicida, especialmente para a formulação comercial. O aumento da toxicidade do glifosato é causado pelos surfactantes na formulação, que tem similar toxicidade aos organismos⁶⁴.

Estudos da toxicidade do glifosato na comunidade microbiana *in vivo* e *in vitro* mostraram que o mesmo é tóxico para bactérias e fungos em meio livre de solo (*in vitro*). Entretanto, esta mesma toxicidade não se expressou quando o glifosato foi adicionado diretamente ao solo (*in vivo*); certamente devido às suas interações com a argila e com a matéria orgânica do solo. A respiração microbiana não se alterou quando se utilizou concentração de campo (5-50 g g⁻¹), mas foi estimulada por altas concentrações. O aumento da atividade microbiana resultou da utilização de glifosato como substratos de carbono disponível. Em longo prazo, aplicações repedidas de glifosato não interferiram nas características microbianas sazonais, portanto os meios de ensaios artificiais são de relevância limitada no prognóstico da toxicidade do glifosato para os organismos no solo sendo que a taxa de aplicação de glifosato tivera pouco ou nenhum aumento na comunidade microbiana nas plantações de pinos⁶⁵.

O AMPA, principal metabólito do glifosato, apresenta baixa toxicidade aguda (LD 50: 8,3 mg kg⁻¹ de massa corpórea em ratos) e é levemente irritante para os olhos. Porém, estudos indicam que o mesmo causa uma variedade de problemas toxicológicos em mamíferos. Testes subcrônicos em ratos mostraram que o AMPA causou queda no peso das fêmeas, um aumento na acidez da urina de ambos os sexos, uma queda na massa do fígado dos machos em todas as doses testadas e excessiva divisão celular no revestimento da bexiga e em parte do rim de ambos os sexos²⁴.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁶⁶ estabeleceu o limite máximo de resíduo (LMR) do herbicida glifosato, que pode ser aceita em cada alimento destinado ao consumo humano, a ingestão diária aceitável (IDA), além do intervalo de segurança, também

conhecidos respectivamente como tolerância e carência (intervalo entre a aplicação do pesticida e a colheita). Seus valores são apresentados na tabela 3.

Não existe legislação brasileira que defina limites máximos de resíduos para qualquer pesticida em solos, entretanto, a legislação estabelece normas e critérios para a realização de testes preliminares para a avaliação ecotoxicológica de pesticidas. Estes testes consistem em estudos de biodegradabilidade, adsorção/dessorção e mobilidade³⁸.

Tabela 3. Limites de tolerância e carência para glifosato, em alimentos, estabelecidos pela ANVISA

Alimentos	LMR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Carência (dias)
Frutos		
Ameixa	0,2	17
Cítrus	0,2	30
Maçã	0,2	15
Nectarina	0,2	30
Pêra	0,2	15
Banana (sem casca)	0,05	30
Pêssego	0,2	30
Uva	0,2	17
Cereais		
Arroz (grão)	0,2	ND*
Arroz com casca	0,5	ND*
Arroz (farelo)	1,0	ND*
Milho	0,1	ND*
Trigo	0,05	ND*
Sementes oleaginosas		
Algodão	3,0	ND*
Soja	2,0	45
Outros produtos		
Café (grão)	1,0	15
Cacau	0,1	30
Cana-de-açúcar	1,0	ND*
Pastagens	0,2	ND*
Não Intencional		
Fígado e rim bovinos, caprinos e aves	0,1	-
IDA	0,042	-

ND* = intervalo de segurança não determinado devido à mobilidade de emprego, plantio direto e quebra de dormência.

Estudos que avaliem o comportamento e destino dos pesticidas em solos de regiões tropicais são limitados em relação àqueles efetuados em regiões de clima temperado. Alguns países definem valores de segurança para alguns ingredientes ativos, de modo que quando se possui concentrações superiores às estabelecidas é necessário tomar medidas corretivas³⁸.

Nos Estados Unidos, a agência de proteção ambiental (EPA)¹³⁸, estabelece um padrão federal para a água potável conhecido como nível de contaminação máximo (MCL). Isto é, a

dose que se considera segura para a saúde das pessoas se estas consumirem tal dose todos os dias de sua vida.

Para o glifosato, segundo a EPA-Water¹³⁹ o MCL do glifosato em água potável é de 700 $\mu\text{g L}^{-1}$, entretanto, a agência de proteção ambiental da Califórnia (EPA – Califórnia)¹⁴⁰ estabeleceu o nível de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para este herbicida.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)⁶⁷, órgão do Ministério do Meio Ambiente (MMA) estabelece limites máximos de resíduos para alguns pesticidas em água, porém não cita muitos de ampla utilização, dentre estes, o glifosato.

2.2.5. EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO

O significativo interesse na determinação de resíduos do herbicida glifosato e seu metabólito, resultado do aumento de seu uso agrícola e não agrícola, refletiu no desenvolvimento de metodologias analíticas para extrair e determinar tais compostos em amostras reais⁶⁸, tais como água, solo, vegetal, alimento e amostras fisiológicas.

O principal problema na análise do glifosato e seu metabólito, encontra-se porém, na sua recuperação em amostras biológicas e de campo⁶⁹. Estes problemas são causados pela natureza polar deste composto e a alta solubilidade em água, que o torna difícil de ser extraído.

Considerando a extração do glifosato do solo, pode-se generalizar que a eficiência da extração aumenta com o aumento do pH e com o aumento da força iônica, porém o efeito da força iônica é menos evidente que o efeito do pH⁷⁰.

O glifosato é zwitteriônico (Fig. 2) assim, abaixo de pH 2 ele apresenta carga positiva, de 2 a 2,32 ele está no ponto de carga zero e acima de 2,32 ele apresenta carga negativa, que aumenta com o aumento do pH. Muitos óxidos também são zwitteriônicos, o que os fazem em determinadas condições ter ora uma capacidade de troca aniônica, ora catiônica. Tomando como base estas propriedades, seria esperada uma menor troca iônica entre glifosato e os minerais de argila nos dois extremos de pH devido às condições de ambos, argila e glifosato, que em meio ácido seriam positivamente carregados e portanto se repeliriam, e em condições alcalinas estariam negativamente carregados e também se repeliriam. Em condições de pH intermediário seria esperado um máximo de atração, no entanto, esta tendência não foi observada e como previamente discutido, há uma relação direta entre o pH e a extração do glifosato para muitas argilas estudadas. Em valores de pH baixo, o glifosato seria retido pelas ligações de hidrogênio na superfície hidratada⁷⁰. Os complexos precipitados de Fe^{3+} e Al^{3+} também seriam a razão pelo aumento da adsorção em condições ácidas.

Como já citado, a desorção de glifosato aumenta com o aumento do pH, entretanto há a desvantagem de as soluções básicas serem os melhores extratores de substâncias húmicas, o que pode interferir em certas análises. Desta maneira, o sucesso da determinação de glifosato do solo e também de outras matrizes, requer primeiramente um bom extrator seguido de uma boa etapa de limpeza através de resinas trocadoras de íons⁷⁰.

Muitos tipos de soluções são empregadas na extração do glifosato, de acordo com a tabela 4.

Tabela 4. Soluções extratoras de glifosato do solo

Soluções extratoras e concentrações	Referência
NH ₄ OH 0,25 mol L ⁻¹ e KH ₂ PO ₄ 0,1 mol L ⁻¹	71
trietilamina 0,1 mol L ⁻¹	72
NaOH 1,0 mol L ⁻¹	18
KOH 0,5 mol L ⁻¹	73
H ₃ PO ₄ 0,35 mol L ⁻¹ com CaCl ₂ 0,09 mol L ⁻¹ , NaOH 0,1 mol L ⁻¹ , NH ₄ OH 0,5 mol L ⁻¹ , K ₂ HPO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , KH ₂ PO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ , HCl 0,1 mol L ⁻¹ , trietilamina 0,1 mol L ⁻¹ com CaCl ₂ , Ca(OH) ₂ , CaCl ₂ e CH ₃ CN	74
HF 0,1 mol L ⁻¹ , KOH 0,1 mol L ⁻¹ , NH ₄ OH 0,1 mol L ⁻¹ e KH ₂ PO ₄ 0,1 mol L ⁻¹	70

Albin e Smith (1992)⁷⁴, estudaram uma série de extratores e os melhores resultados foram encontrados com H₃PO₄ com CaCl₂, NaOH e NH₄OH. Miles e Moye (1988)⁷⁰, constataram que a melhor solução extratora de glifosato para solos arenosos é a de KH₂PO₄ 0,1 mol L⁻¹ e para solos argilosos, KOH 0,2 mol L⁻¹.

Muitos foram os estudos, mas ainda há uma incógnita de qual ou quais seriam as melhores soluções extratoras para os diferentes tipos de solo.

Freqüentemente, após a extração de amostras de solos, vegetais e biológicas a purificação da solução aquosa obtida requer a utilização de cromatografia de troca de ligantes e troca aniônica ou a utilização de métodos alternativos como a aplicação da extração com membrana de suporte líquida (MSL)⁶⁹.

Uma seqüência geralmente empregada na extração, purificação e determinação de amostras de águas, solos e vegetais, principalmente pelo método cromatográfico, é apresentada na figura 3.

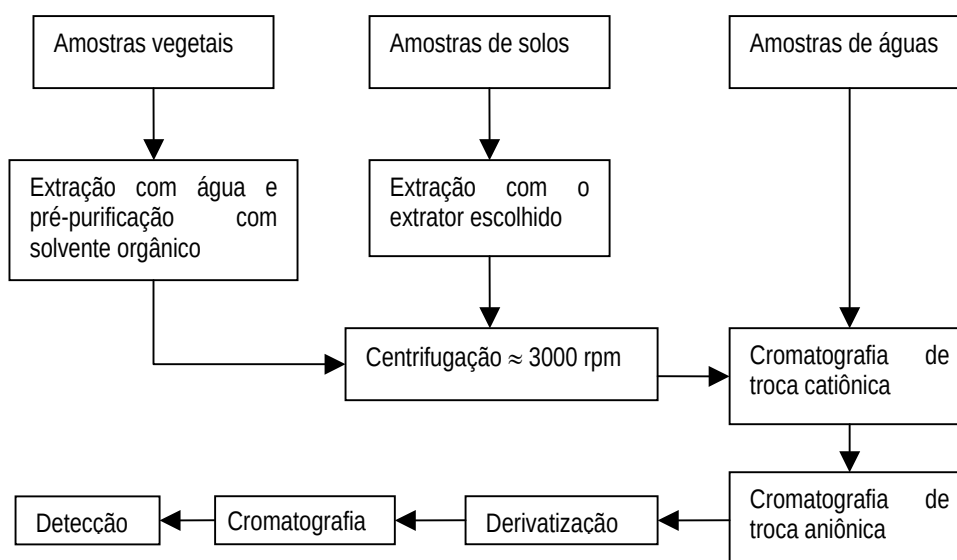


Figura 3. Etapas gerais empregadas na extração, limpeza e determinação do glifosato por cromatografia.

Muitas são as técnicas desenvolvidas, melhoradas e acopladas para a determinação do glifosato e seu metabólito, sendo a cromatografia a técnica de análise mais empregada e estudada atualmente⁷⁵, como é mostrado nas tabelas 5 e 6.

A escolha de uma robusta, simples e eficiente reação de derivatização é a primeira e mais crítica etapa para o sucesso da aplicação do método por Cromatografia Gasosa (CG). O objetivo da análise do glifosato requer uma derivatização primária de maneira que convenientemente produza um composto de baixa polaridade e seja volátil o suficiente para ser subsequentelemente cromatografado⁷⁵.

O glifosato pode ser considerado como um caso especial, devido à sua natureza polar e sua alta solubilidade em água, o que limita a possibilidade do uso de técnicas de derivatização padrões freqüentemente empregadas em análise por CG. Muitos esquemas de reações foram descobertos através dos anos na tentativa de derivatizá-lo. Os reagentes *N*-metil-*N*-(*tert*-butildimetilsilil)trifluoroacetamida (MTBSTFA), o anidrido heptafluorobutírico (HFBA), o anidrido trifluoroacético (TFAA) com trifluoroetanol (TFE), ou 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol (HFB) ou ácido trifluoroacético (TFA) e o trimetil ortoacetato (TMOA) com ácido acético, foram empregados com os mais diferentes detectores, tais como nitrogênio fósforo (NPD), fotométrico (FPD), captura de elétrons (ECD), ionização por chama (FID), além do espectrômetro de massa (MS) com “íon trap” e impacto de elétrons (EI), como mostrado na tabela 5.

Tabela 5. Análise por cromatografia gasosa do herbicida glifosato

Derivatização	Deteção	LDQ	Referência
HFBA	ECD, MS(EI)	-	77
MTBSTFA	FPD	-	78
TFAA-TFE	NPD	0,05 mg kg ⁻¹	79
TFAA-TFE	NPD	0,03 mg kg ⁻¹	80
TFAA-TFE	ECD	-	72
MTBSTFA	MS (íon trap)	-	82
TFAA-HFB	MS	0,01 mg kg ⁻¹	71
Isopropilcloroformatodiazometano	FPD	2,0 mg kg ⁻¹	81
TFAA-HFB	MS-MS (íon trap)	0,05 µg L ⁻¹	83
Ácido acético -TMOA	MS(EI)	0,65 µg L ⁻¹	84
TFAA-TFE	MS(EI)	0,05 µg L ⁻¹	18
TFA -TFAA-TMOA	MS, FID	0,01 µmol L ⁻¹	87
TFAA	FID	0,10 µg mL ⁻¹	88

Um método alternativo à CG é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise do glifosato é usualmente executada em uma coluna de troca aniônica devido à sua alta polaridade⁶.

A ausência de um cromóforo ou fluoróforo faz, também necessário, a derivatização do glifosato para sua determinação por CLAE. A maioria dos métodos (Tab.6) incluem principalmente a derivatização pós-coluna com orto-ftalaldeído (OPA) na presença de 2-mercaptoetanol (ME); outro reagente bastante empregado é o 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl), além do cloreto de p-toluenosulfonila, do 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno e do hidrato de Morin com Al(NO₃)₃ (Al³⁺ - Morin). A detecção é executada normalmente tanto por espectrofotometria no ultravioleta (UV) quanto por fluorescência (FL), sendo esta última mais sensível.

Tabela 6. Análise por cromatografia líquida do herbicida glifosato

Derivatização	Deteção	LDQ	Referência
Cloreto de p-toluenosulfonil	UV (240 ou 280 nm)	10 µg L ⁻¹	89
FMOC-Cl	FL (254, 313 nm)	0,1 mg kg ⁻¹	90
1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno	UV (405 nm)	0,1 mg Kg ⁻¹	91
FMOC-Cl	FL (254, 313 nm)	10 µg L ⁻¹	92
OPA-ME	FL (230, 418 nm)	0,05 mg kg ⁻¹	93
(Ru(bpy) ₃) ²⁺	ECL	1,7 µg L ⁻¹	94
Cloreto de p-toluenosulfonil	UV (240 nm)	0,2 µg mL ⁻¹	95
OPA-ME	FL(340, 455 nm)	2,0 µg L ⁻¹	96
FMOC-Cl	ESI/ MS	0,2 µg L ⁻¹	97
Hipoclorito de cálcio OPA	FL (340, 455 nm)	0,05 µg mL ⁻¹	68
FMOC-Cl	FL (263, 317 nm)	0,5 mg kg ⁻¹	98
OPA-ME	FL (330, 465 nm)	2,0 µg L ⁻¹	99
Al ³⁺ -morin	FL (400, 480 nm)	1,4 mg L ⁻¹	100
FMOC-Cl	FL (263, 317 nm)	1,0 µg L ⁻¹	101
OPA-ME	FL (340, 455 nm)	0,05 µg mL ⁻¹	102
FMOC-Cl	FL (270, 315 nm)	0,5 µg mL ⁻¹	70

Outras metodologias de análise pouco divulgadas e utilizadas vem sendo desenvolvidas na determinação do herbicida glifosato de maneira a tornar as análises mais simples, rápidas e viáveis economicamente, como mostra a tabela 7.

A cromatografia de troca iônica apresenta a vantagem de não necessitar da derivatização do glifosato devido às detecções condutimétricas¹⁷ e amperométricas¹⁶, esta última de maneira indireta. A eletroforese capilar tem se tornado também uma boa proposta analítica e sua etapa de derivatização utiliza o cloreto de p-toluenosulfonila antes da separação.

A “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) é um recente método analítico para análise do glifosato em água, sendo bastante sensível, de baixo custo e rápido, contrário às dispendiosas técnicas por CLAE e CG.

A espectrofotometria foi a técnica utilizada nas primeiras análises de rotina de resíduos de pesticidas, sendo o glifosato também determinado pela mesma.

O método analítico para a determinação do glifosato por polarografia data de 1976, sendo um dos primeiros métodos a serem citados na literatura na determinação de tal herbicida em água. A segunda citação ocorreu em 1985, apresentando uma melhoria do último método, que incluiu sua análise em solo e produtos agrícolas. Infelizmente, devido ao aumento rápido do uso e ampliação das aplicações das técnicas de separação nos anos 70, o uso das técnicas eletroanalíticas diminuiu¹⁰³. No entanto, com os recentes avanços eletroanalíticos¹⁰⁴, que trazem entre outras, as vantagens do baixo custo, da velocidade de análise e a sensibilidade frente a maioria das técnicas citadas, a voltametria retorna como uma importante e alternativa ferramenta para análises de compostos orgânicos diversos, o que inclui a análise do herbicida glifosato com maior sensibilidade e simplicidade de análise.

Tabela 7. Outras técnicas analíticas

Método	Deteção	LDQ	Referência
Cromatografia de troca iônica	Condutimétrica	0,042 $\mu\text{g mL}^{-1}$	17
Cromatografia de troca iônica	Amperométrica	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	16
Eletroforese capilar	UV (240 nm)	0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	105
ELISA	UV (405 nm)	0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	106
Espectrofotometria	UV (830 nm)		107
Polarografia	DME	1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	20 e 73

2.3. TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

A voltametria compreende um grupo de métodos eletroanalíticos nos quais as informações sobre o analito se baseiam na medida da corrente resultante de uma oxidação ou redução na superfície de um eletrodo indicador ou de trabalho durante a aplicação de uma diferença de potencial na célula eletroquímica. Tal técnica pode determinar espécies eletroativas orgânicas, inorgânicas e organometálicas, além de espécies que reajam com íons Hg_n^{2+} , espécies que são cataliticamente ativas ou, de uma maneira indireta, analitos que reajam com uma espécie eletroativa ou que possam ser derivatizados à eletroatividade^{103, 108}.

Desde sua invenção em 1922 pelo professor Jaroslav Heyrovsky, a polarografia, que é um tipo particular de voltametria, chegou a ser a primeira técnica a ser utilizada em análise química e, nos anos trinta e no início dos anos quarenta a única técnica automática¹⁰³.

Os métodos eletroanalíticos representado pela voltametria têm assumido uma importante posição na identificação e determinação de concentrações traço de muitas moléculas de importância biológica e ambiental. Técnicas como voltametria e polarografia de pulso diferencial (DPV e DPP), voltametria de onda quadrada (SWV), voltametria de redissolução anódica (ASV), catódica (CSV) e adsortiva (AdSV), detecção eletroquímica acoplada com análise de injeção em fluxo (FIA-ED), com cromatografia iônica (IC-ED) e com cromatografia líquida de alta performance (CLAE-ED), imunoenaios e a aplicação de biossensores amperométricos, são particularmente importantes nestas considerações¹⁰⁹.

Moléculas como poluentes, drogas, pesticidas, aditivos e contaminantes de alimentos, neurotransmissores, etc., estão presentes em uma variedade de matrizes complexas como ar, água, solo, vegetais, plasma e tecidos celulares, e podem ser determinadas por estas técnicas voltamétricas em concentrações traço, usualmente depois da aplicação de procedimento de pré-concentração e certamente, técnicas de separação. Em alguns casos, é possível determinar a molécula diretamente na matriz quando a reação eletroquímica é particularmente seletiva na presença de interferentes potenciais¹⁰⁹.

Para alcançar alta sensibilidade nas técnicas voltamétricas baseadas na medida da corrente faradaica, foi necessário minimizar o papel das correntes capacitivas. Isto foi efetuado com sucesso por Gerofrey Barker, com a introdução das técnicas de onda quadrada e pulso diferencial em eletroanálise^{85, 86}.

Sua implementação em análise de rotina tem encontrado entretanto até aqui, limitados defensores, apesar do baixo custo próprio em instrumentação eletroquímica, particularmente quando comparada com sistemas espectroscópicos e cromatográficos¹¹⁰. As noções de baixa sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade, obtidas nas análises de amostras reais, que

foram enraizadas no passado tem sido freqüentemente justificadas. O desenvolvimento no uso de um grande número de métodos voltamétricos tem liderado recentemente o seu ressurgimento¹⁰⁴.

2.3.1. VOLTAMETRIA COM ONDA QUADRADA

Técnicas com pulso são amplamente adotadas em química eletroanalítica para a determinação de espécies eletroativas devido às altas sensibilidades obtidas, particularmente na presença de correntes com ruídos de fundo, tal como aquelas que podem resultar da redução do oxigênio dissolvido.

A técnica de voltametria com onda quadrada (SWV) é uma técnica de pequena amplitude com potencial controlado e tem recebido muita atenção nos recentes anos. Ela envolve a aplicação de um potencial na forma de uma onda definida na figura 4, e as correntes $I(1)$ e $I(2)$ em cada ciclo da onda nos pontos mostrados, são medidas. A corrente é amostrada perto do fim de cada meio ciclo da onda quadrada, para minimizar os efeitos de carga de dupla camada¹¹¹.

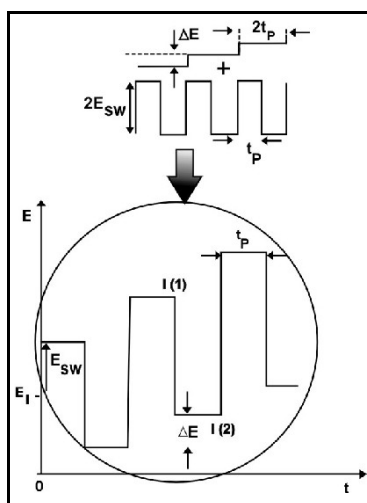


Figura 4. Representação esquemática dos pulsos da varredura com onda quadrada.

A diferença na corrente $\Delta I = I(1) - I(2)$, é usada para gerar o voltamograma, quando disposta em um gráfico contra o potencial aplicado, E , apresentando a elevação de um pico simétrico em forma de curva.

Do ponto de vista analítico, a principal vantagem da SWV encontra-se na sua habilidade em executar uma varredura completa do potencial em poucos segundos, ao contrário de outras técnicas com pulso. Ela também apresenta ao analista a opção de reduzir o ruído de fundo por repetidas varreduras e cálculo da média. Na gravação do voltamograma da onda quadrada, a corrente de ambos os pulsos avançado e reverso são medidas, de tal

modo que a informação cinética é similar a obtida na voltametria cíclica; tal informação de similar qualidade não pode ser obtida por outra técnica de pulso tal como a com pulso diferencial. Correntes para SWV são calculadas para serem significativamente maiores que aquelas obtidas por voltametria com pulso diferencial. Este aumento na sensibilidade depende da reversibilidade e elevação, pela razão de o sinal ser a diferença entre a corrente avançada e a reversa. Esta diferença de corrente produz um valor de pico que é maior em magnitude que a corrente que avançou ou da que reverteu, fornecido pelas duas que são opostas no sinal¹¹².

2.3.2. VOLTAMETRIA COM PULSO DIFERENCIAL

A voltametria com pulso diferencial (DPV), técnica que foi primeiramente proposta por Barker⁸⁵ em 1960, é o modo de medida voltamétrico de pequena amplitude mais usado freqüentemente em todo o mundo. Ela é igualmente bem apropriada para sistemas reversíveis e irreversíveis e oferece uma alta sensibilidade¹¹⁴.

Quando o eletrodo empregado é um eletrodo gotejante de mercúrio (DME), a técnica é chamada de polarografia com pulso diferencial e a gota é liberada apenas depois do tempo em que se faz a segunda leitura de corrente. Quando outro eletrodo diferente do DME é empregado, a técnica é conhecida como voltametria com pulso diferencial¹¹³.

A técnica combina uma rampa de voltagem linear com pulsos de magnitudes fixas como mostrado na figura 5.

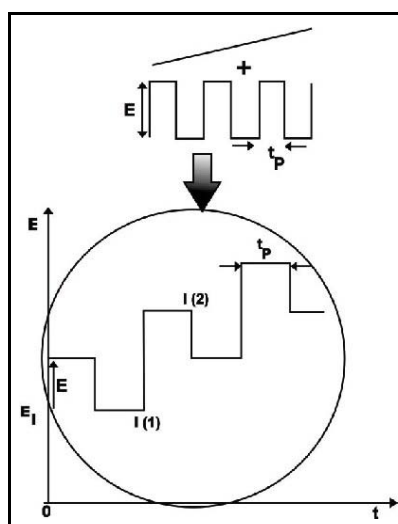


Figura 5. Representação esquemática dos pulsos diferenciais durante a varredura.

Os pulsos em um eletrodo gotejante são repetidos uma vez durante cada vida da gota. Em um eletrodo diferente do DME, os pulsos são aplicados repetidas vezes durante a varredura em intervalos de tempo pré-estabelecidos. A corrente é medida duas vezes em

cada pulso: uma antes da aplicação do pulso I(1) e outra nos últimos milissegundos do pulso I(2). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda corrente.

O voltamograma com pulso diferencial é desta maneira um gráfico da corrente diferenciada *versus* o potencial aplicado. O uso do pulso minimiza o efeito da corrente de carga ou capacitiva. Quando ambos os potenciais antes e depois do pulso é aplicado, não é observada nenhuma carga na medida da corrente Faradaica nem antes nem depois da porção da subida da onda voltamétrica. Entretanto, quando o menor destes potenciais é colocado na porção de subida da onda, uma significativa corrente faradaica será medida usando a técnica com pulso diferencial. A medida da diferença da corrente apresenta um polarograma em forma de pico¹¹⁴.

2.3.3. VOLTAMETRIA DO HERBICIDA GLIFOSATO

A molécula do herbicida glifosato não é eletroativa e portanto, não é detectada voltametricamente com sua estrutura básica, seja ela molecular ou iônica. No entanto, o glifosato apresenta em sua estrutura um grupo amino secundário, que pode sofrer uma *N*-nitrosação na presença do ânion nitrito em meio ácido, formando o composto *N*-nitroso estável (Fig. 6), também chamado de nitrosamina¹⁹, ao contrário da grande maioria das aminas secundárias que são sensíveis ao procedimento de nitrosação¹⁰⁹.

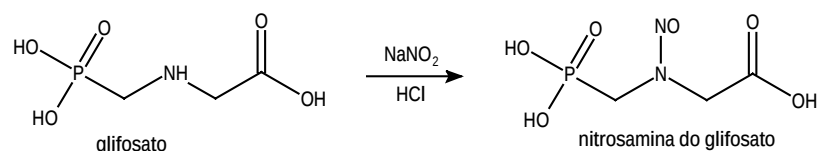


Figura 6. Equação da reação de nitroação da amina secundária na molécula do glifosato.

As *N*-nitrosaminas, geralmente exibem uma redução irreversível em solução ácida produzindo a correspondente hidrazina e uma irreversível redução em solução alcalina produzindo N_2O e a amina precursora (Fig. 7). As melhores ondas ou picos para determinação do traço analítico por eletroanálise, são conseqüentemente encontrados em meio ácido²¹.

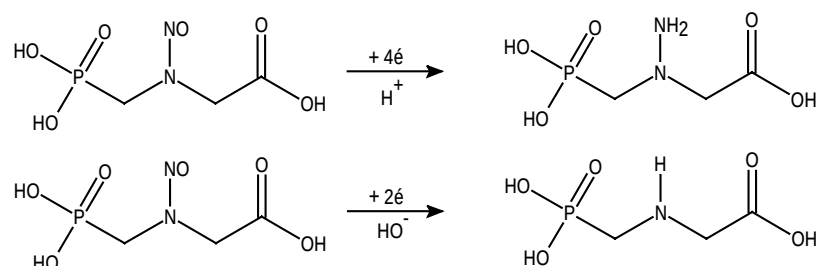


Figura 7. Equação da reação de redução da nitrosamina do herbicida glifosato nos meios ácido e básico.

O voltamograma apresentado na figura 8, mostra mais claramente a redução irreversível da nitrosamina do herbicida glifosato.

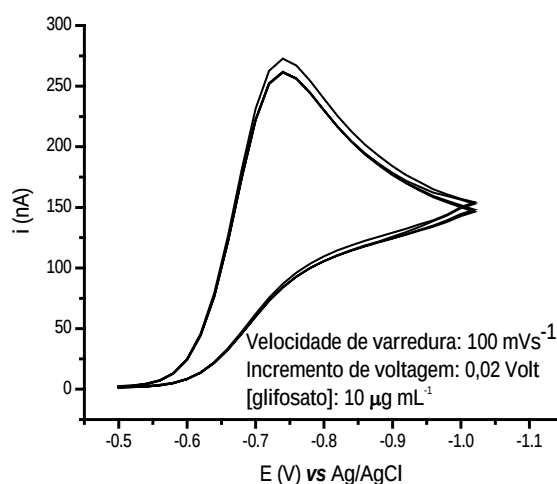


Figura 8. Voltamogramas cíclicos da nitrosamina do glifosato em meio ácido*.

Bronstad e Friestad (1976 e 1985)^{20, 73}, apresentaram uma metodologia de determinação deste herbicida em água, solo e produtos agrícolas através da nitrosação da molécula seguido da análise por polarografia com pulso diferencial. O método analítico envolveu limpeza total da amostra e a pré-concentração do analito numa coluna trocadora de ânions, seguida de nitrosação diretamente no eluato. O limite de detecção utilizando a polarografia com pulso diferencial na determinação do glifosato foi citado em $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ no trabalho mais recente, sendo inadequado para a maioria das análises de amostra real.

O principal metabólito do glifosato, o AMPA, por ser uma amina primária, não pode ser nitrosado e, portanto, não é possível determiná-lo pela metodologia eletroanalítica citada; porém, em muitos casos dificilmente será uma séria negligência⁷³.

2.4. QUIMIOMETRIA

A quimiometria é uma área da química que se refere à aplicação da matemática, da estatística e de outros métodos que utilizam a lógica formal, com o objetivo de planejar ou selecionar os procedimentos de medidas experimentais ótimos e para fornecer a informação de máxima relevância pela análise dos dados, a problemas de origem química¹¹⁶.

Com a sofisticação crescente das técnicas instrumentais, impulsionada pela invasão de microprocessadores e microcomputadores no laboratório químico, tornaram-se necessários tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de relacionar os sinais obtidos (intensidades, por exemplo) com os resultados desejados (concentrações)¹¹⁷.

*Experimento realizado em laboratório pelo autor (2002).

De todos os ramos da química clássica, talvez a química analítica tenha sido a mais afetada pelo desenvolvimento recente da instrumentação química associada a computadores. Aplicações rotineiras de métodos quimiométricos afluem da literatura em química analítica, mas apenas uma pequena fração desta literatura está sendo dedicada ao campo da eletroquímica e eletroanalítica. Embora o número de grupos que empregam métodos quimiométricos em eletroquímica e eletroanalítica seja limitado, progressos tem sido verificados¹¹⁸.

2.4.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Experimentos são executados freqüentemente por pesquisadores em praticamente todos os campos de pesquisa, para descobrir algo sobre um processo particular ou sobre o sistema. Literalmente, um experimento é um teste. Um planejamento experimental é uma série de testes pré-estabelecidos em que determinadas mudanças são feitas nas variáveis de entrada de um processo ou sistema, de tal modo que se possa observar e identificar os fatores que modificaram a resposta¹¹⁹. A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de maneira que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que procuramos. Assim, a atividade estatística mais importante não está na análise de dados, e sim no planejamento dos experimentos em que estes dados devem ser obtidos¹²⁰.

A extração de relevantes informações de dados químicos é importante, mas é igualmente importante a aplicação de planejamentos experimentais sensatos aos dados obtidos, além disso, métodos de otimização podem ser facilmente aplicados a problemas de planejamentos experimentais¹¹⁸.

Experimentos com planejamentos estatísticos são de alta eficiência desde que forneçam uma quantidade fixa de informações com menos esforço, além das informações adicionais sobre interações¹²¹.

Metodologias aplicando planejamento experimental têm encontrado ampla aplicação em muitas áreas. De fato, pode se visualizar a experimentação como parte de um processo científico e como uma das maneiras de descrever sobre como os sistemas e processos se comportam¹¹⁹.

2.4.2. PLANEJAMENTO FATORIAL

Um tipo particular de planejamento experimental, conhecido como planejamento fatorial, é de grande utilidade em investigações preliminares quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta desejada, e não se está preocupado ainda com uma descrição muito rigorosa dessa influência¹²⁰. Neste contexto, chamamos de fatores, as variáveis de interesse; tempo de deposição e eletrólito de suporte por exemplo e, chamamos de níveis as suas variações; por exemplo, 60 e 100 segundos, níveis quantitativos para o fator tempo de deposição e HCl e H₂SO₄ níveis qualitativos para o fator eletrólito de suporte. No exemplo citado tem-se portanto, um planejamento fatorial com dois fatores e dois níveis.

Um planejamento fatorial em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis é o mais simples de todos os planejamentos. Havendo k fatores, o planejamento de dois níveis irá requerer a realização de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes, sendo chamado por isso de fatorial 2^k ¹²⁰.

Quando o efeito de uma variável depende do nível de outra, pode-se dizer que as duas variáveis interagem e é possível calcular o valor do efeito de interação entre elas. Muitos experimentos envolvem o estudo dos efeitos de dois ou mais fatores. Em geral, planejamentos fatoriais são mais eficientes para este tipo de experimento. Através de um planejamento fatorial, nós dizemos que em cada repetição do experimento, todas as possíveis combinações dos níveis de fatores são investigadas.

O efeito de um fator é definido como sendo a mudança na resposta produzida no nível do outro fator. Este é freqüentemente chamado de efeito principal, pois ele se refere aos fatores primários de interesse do experimento.

Em alguns experimentos, é possível encontrar que a diferença na resposta entre os níveis de um fator não é igual a todos os níveis de outros fatores. Quando isto ocorre, há uma possível interação entre os fatores¹¹⁹.

Informação sobre interações é uma pista importante na procura das condições ótimas, desde que sua existência implique que o valor assumido por um dos fatores tenha influência no efeito da resposta de outro fator. Com esta técnica, a experimentação evolui em estágios pré-planejados e quando uma triagem prévia da investigação se completa, o aumento sobre conhecimento do sistema permite executar um estudo mais detalhado e uma superfície de resposta que descreve o problema pode ser obtida²⁸.

2.4.3. METODOLOGIA PARA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A Metodologia para Superfície de Resposta (MSR) é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais introduzida por G. E. P. Box na década de 1950 e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais¹²⁰.

Uma superfície de resposta é um gráfico que mostra o comportamento da resposta como função de dois ou mais fatores. A superfície de resposta oferece uma conveniente maneira de visualizar como vários fatores afetam as medidas do sistema.

A coleção de técnicas matemáticas e estatísticas introduzida pela MSR é útil para o desenvolvimento, aproveitamento e otimização de processos. Ela também tem importante aplicação no planejamento, desenvolvimento e formulação de novos produtos, assim como no aperfeiçoamento de produtos existentes que tenham sido planejados. As mais extensivas aplicações da MSR estão no mundo industrial, particularmente em situações onde várias variáveis de entrada potenciais influenciam algum desempenho da medida ou uma qualidade característica do produto ou processo¹²².

O uso de quimiometria registra o planejamento experimental desejado que pode ser de grande benefício na otimização e construção sistemática da superfície de resposta^{123, 124}.

Muitos sistemas exibem respostas que são funções não de um, mas de dois ou mais fatores. A aplicação de modelos empíricos para o caso de dois fatores são os mais simples, além de ser possível mostrá-los em um gráfico em três dimensões¹²².

Em muitos casos um modelo de primeira ou de segunda ordem é usado. Em geral, o modelo de primeira ordem é representado pela seguinte equação:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k$$

e o modelo de segunda ordem é representado pela equação abaixo:

$$y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j} b_{ij} x_i x_j$$

Para o caso particular de um modelo de segunda ordem completo para dois fatores, a equação é representada da seguinte maneira:

$$y_1 = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

E o modelo de segunda ordem completo para três fatores, é representada da seguinte maneira:

$$y_1 = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

O modelo de segunda ordem é amplamente usado na metodologia para superfície de resposta por várias razões. Entre muitas, podem-se relacionar as seguintes:

1. O modelo de segunda ordem é muito flexível. Ele pode assumir uma variedade ampla de formas funcionais.
2. Os valores dos coeficientes (b) são facilmente estimados.
3. Há uma considerável experiência prática que indicam que o modelo de segunda ordem trabalha bem na resolução de problemas de superfície de resposta real¹²².

Para obter os dados que devem ser empregados no modelo, os planejamentos centrais múltiplos (CCD - *Central Composite Design*) são muito convenientes para ajustar o modelo polinomial completo de segunda ordem¹¹⁶.

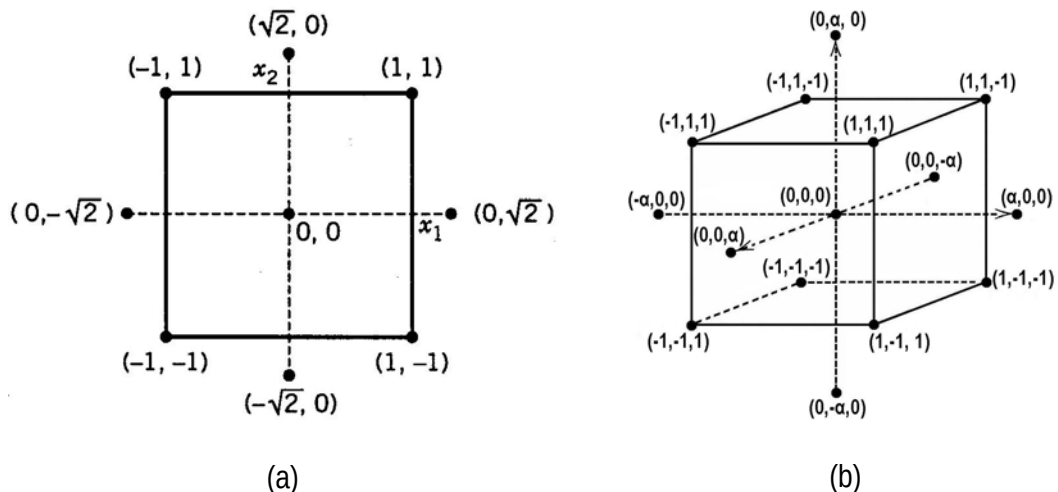


Figura 9. (a) planejamento central múltiplo para dois fatores ($k=2$ e $\alpha=\sqrt{2}$). (b) planejamento central múltiplo para três fatores ($k=3$ e $\alpha=\sqrt{3}$) (Response surface Methodology, 1995)¹²².

O CCD, introduzido por Box e Wilson no início da década de 1950, são construções sem o correspondente planejamento fatorial completo (níveis baixos e altos) e apresenta uma grande sobreposição do planejamento estrela (Fig. 9.a) dando a ele uma forma esférica (Fig. 9.b). O planejamento estrela é feito fora de duas combinações de tratamento axial nos níveis baixo e alto para cada fator, mantendo todos os outros fixados nos pontos centrais, acrescidos de um ponto unitário no nível central para todos os fatores¹²⁵.

A análise estatística do planejamento central múltiplo é mais elaborada que as análises de um planejamento fatorial. Por outro lado, o central múltiplo é um planejamento especialmente eficiente, pois suas análises permitem detectar alguma impropriedade do modelo que está sendo testado (falta de ajuste). O CCD apresenta grande superioridade sobre o planejamento fatorial para se estimar os parâmetros do modelo, proporciona o teste para a variância da estabilidade e além disso, o modelo de segunda ordem completo pode ser ajustado com o número de graus de liberdade fornecido pela combinação de tratamentos do CCD¹²⁵.

PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. OTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA VOLTAMÉTRICA

3.1.1. INSTRUMENTAÇÃO

As medidas voltamétricas foram executadas em um analisador polarográfico 757 VA Computrace Stand (Metrohm® Ltd. CH-9101 Herisau Switzerland) operando com um eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE) como eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência Ag/AgCl e um eletrodo auxiliar de platina, como mostrado na figura 10.

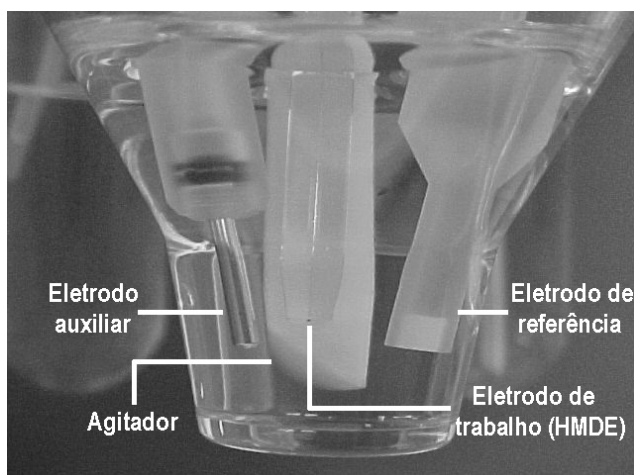


Figura 10. Célula voltamétrica do analisador polarográfico 757 VA Computrace Stand, destacando os três eletrodos e o agitador não magnético.

A manipulação dos dados, o armazenamento e a saída para visualização dos resultados foram controlados pelo “software” VA Computrace 1.0¹³⁴, instalado a um microcomputador pessoal (PC) que se conecta ao VA Computrace Stand através de uma interface serial.

3.1.2. MATERIAIS

Todos os produtos e reagentes químicos utilizados foram de qualidade analítica sem nenhuma purificação adicional. O padrão de glifosato de pureza 99,9% foi obtido da Monsanto Co.®. O ácido clorídrico 37% foi adquirido da Merck®. O nitrito de sódio e o sulfamato de amônio foram comprados da Synth® e da Sigma®, respectivamente. A água ultrapura utilizada para o preparo de todas as soluções foi desionizada pelo aparelho da BAUMER® (Druckfester Mischbett- Wasservollentsalzer DI 800). O aparelho de Ultra-som empregado no preparo das soluções foi o THORNTON® – T7.

3.1.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

A solução estoque de glifosato $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foi preparada com 0,1 g do herbicida, diluído em balão volumétrico de 100 mL com água desionizada. O balão foi colocado no aparelho de ultra-som para dissolver o restante do glifosato. A solução é estável por anos à temperatura ambiente⁷³.

A solução de nitrito de sódio $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foi preparada com 0,25 g de NaNO_2 diluído em balão volumétrico de 25,0 mL com água desionizada. A solução deve ser preparada diariamente devido à sua fácil oxidação.

A solução de sulfamato de amônio $0,10 \text{ g mL}^{-1}$ foi preparada com 10,0 g de $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$ em balão volumétrico de 100,0 mL com água desionizada. A solução é estável por meses à temperatura ambiente⁷³.

3.1.4. DERIVATIZAÇÃO

A solução padrão de glifosato $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$, derivatizada, foi preparada da seguinte maneira: foram transferidos com pipeta volumétrica 50,0 mL da solução estoque para um balão volumétrico de 100,0 mL. Adicionaram-se 20,0 mL de $\text{HCl } 5,0 \text{ mol L}^{-1}$ e em seguida, 5,0 mL de nitrito de sódio $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Esperou-se 15 minutos para que a reação de nitrosação ocorresse completamente. Após este tempo, adicionaram-se 5,0 mL de sulfamato de amônio $0,10 \text{ g mL}^{-1}$ para consumir o excesso de nitrito de sódio. Completou-se o volume com água desionizada. A solução é estável por aproximadamente dois meses à temperatura ambiente.

3.1.5. PROCEDIMENTO PARA A OTIMIZAÇÃO E TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO

O seguinte procedimento foi executado em todos os experimentos realizados para a otimização da resposta voltamétrica: 10 mL do eletrólito de suporte foram transferidos para uma célula voltamétrica e desoxigenado por borbulhamento com nitrogênio livre de oxigênio por 300 segundos em uma primeira etapa e por 30 segundos nas etapas sucessivas; o fluxo de nitrogênio foi então mantido fora da solução. Depois do tempo de equilíbrio (10 s), uma varredura catódica foi aplicada entre -0,5 e -0,9 volts. A adição de 100 μL da solução da nitrosamina do glifosato $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foi realizada após a execução do voltamograma do branco. O instrumento foi programado para realizar três varreduras em cada experimento, sendo a média das correntes de pico máxima no potencial de determinação do glifosato anotadas, seja para o estudo dos níveis dos fatores a serem empregados no planejamento,

seja para posterior tratamento quimiométrico. Cada ensaio, no planejamento fatorial, foi realizado em triplicata e de maneira aleatória.

A partir do “software” VA Computrace 1.0¹³⁴, foram extraídos os resultados. O “software” MatLab 5.3 foi utilizado para se encontrar os valores dos efeitos e coeficientes, enquanto o “software” Statística 5.0 foi utilizado para se obter a superfície de resposta.

3.1.6. PARÂMETROS ELETROANALÍTICOS

A primeira etapa de um planejamento experimental é conhecer os fatores que supostamente influenciam a resposta. Em análise voltamétrica, um fator que certamente interferirá na resposta é a natureza do eletrólito de suporte e/ou sua concentração. A escolha de um eletrólito de suporte em voltametria exige uma seleção entre muitas soluções, portanto este fator não pode ser incluído, em um planejamento experimental, sem um prévio conhecimento. O método qualitativo porém, é uma opção para selecionar bons eletrólitos a serem incluídos em um planejamento experimental.

Para a situação em questão, estudos anteriores realizados com nitrosaminas^{21, 130-133}, mostraram ser o meio ácido o melhor meio para análise deste tipo de composto. Além disso, estudos realizados por Friestad and Bronstad^{20, 73} nas décadas de 1970 e 1980 mostraram ser o ácido clorídrico o melhor meio para se analisar o herbicida glifosato. Desta maneira, o eletrólito de suporte escolhido para ser incluído no planejamento fatorial deste estudo foi o ácido clorídrico sendo porém, avaliado no planejamento, qual a melhor concentração do mesmo, para se obter a melhor resposta.

Os parâmetros instrumentais a serem empregados no planejamento foram também escolhidos baseando-se em estudos recentes^{27,28,30}. Entretanto, os níveis para a maioria dos fatores escolhidos foram estudados previamente antes da execução do planejamento, conforme item 3.1.5.

3.1.7. VOLTAMETRIA COM ONDA QUADRADA

Normalmente, a voltametria com onda quadrada, é sugerida para analitos eletroativos que apresentem reação redox reversível no eletrodo. Entretanto, como já foi apresentado, a nitrosamina do herbicida glifosato apresenta reação redox irreversível (Fig. 8) e, além de não poder ser analisada por voltametria de redissolução adsortiva (AdSV), não desfrutará de todas as vantagens da SWV. No entanto, não se exclui a possibilidade do estudo desta técnica para análise de espécies eletroativas com reação redox irreversível, além disso, um estudo realizado Souza e colaboradores, (1999)⁷, mostrou ser viável a análise do herbicida glifosato por SWV.

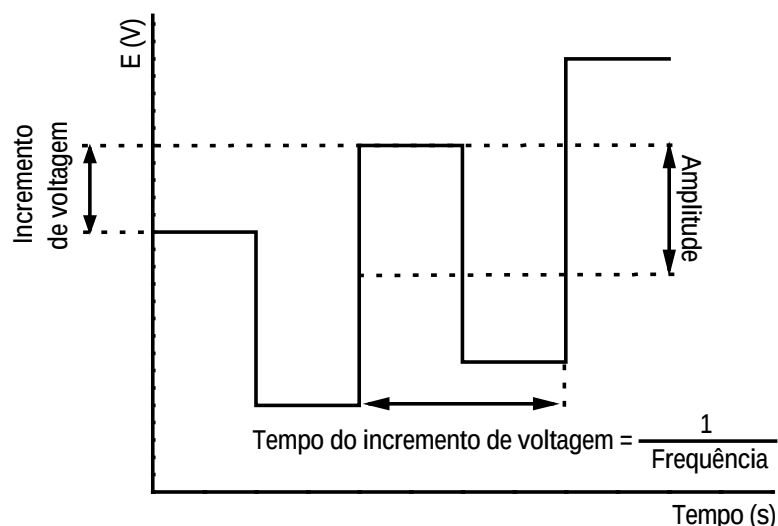


Figura 11. Parâmetros voltamétricos da SWV escolhidos para serem estudados no planejamento fatorial.

Os parâmetros disponibilizados pelo “software” VA Computrace 1.0¹³⁴, selecionados para um estudo prévio dos níveis a serem utilizados no planejamento fatorial, foram o incremento de voltagem (volts), a frequência (Hz) e a amplitude (volts), conforme figura 11.

O parâmetro incremento do tempo de voltagem (s) é exatamente o inverso da frequência, enquanto a velocidade de varredura é o resultado do produto entre o incremento de voltagem e a frequência.

A área da gota de mercúrio a ser formada (mm²) e a concentração do eletrólito de suporte (mol L⁻¹) também foram escolhidos como parâmetros a serem analisados no planejamento fatorial, enquanto os parâmetros tempo de purga inicial, tempo de purga adicional e tempo de equilíbrio, foram fixados em 300, 30 e 15 segundos, respectivamente.

O planejamento fatorial completo para a voltametria com onda quadrada incluiu, portanto, cinco fatores com dois níveis para cada fator, logo, um planejamento 2⁵.

3.1.8. VOLTAMETRIA COM PULSO DIFERENCIAL

Na literatura, não há registro da utilização da voltametria com pulso diferencial na determinação do herbicida glifosato, porém a utilização da polarografia utilizando a varredura com pulso diferencial já foi divulgada^{20,73}.

Os parâmetros disponibilizados pelo “software” VA Computrace¹³⁴, selecionados para um estudo prévio dos níveis a serem utilizados no planejamento fatorial, foram o incremento de voltagem (volts), a amplitude do pulso (volts), o tempo de pulso (s) e o incremento do tempo de voltagem (s), conforme figura 12. A velocidade de varredura é o resultado da divisão entre o incremento de voltagem e o tempo de incremento de voltagem.

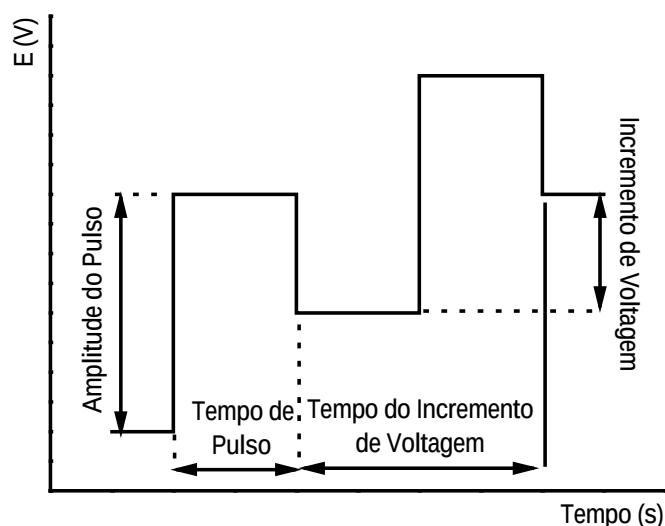


Figura 12. Parâmetros voltamétricos da DPV escolhidos para serem estudados no planejamento fatorial.

A concentração do eletrólito de suporte (mol L^{-1}) foi incluída também neste planejamento, enquanto a área da gota de mercúrio foi fixado no valor otimizado para a SWV. Os parâmetros tempo de purga inicial, tempo de purga adicional e tempo de equilíbrio, foram fixados em 300, 30 e 15 segundos, respectivamente.

O planejamento fatorial completo para a voltametria com pulso diferencial incluiu, portanto, cinco fatores com dois níveis para cada fator, logo, um planejamento 2^5 .

3.2. APLICAÇÃO DA TÉCNICA OTIMIZADA

3.2.1. INSTRUMENTAÇÃO

Colunas cromatográficas 500 X 25 mm com válvula de teflon, centrífuga Excelsa Baby II – Modelo 206-R, bomba de vácuo, triturador de vegetais FRITSH® – pulverisette 14, potenciômetro Procyon® – PHD10, com eletrodo de vidro ANALION®-620V, agitador de mesa CERTOMAT® MO, bomba peristáltica Gilson® – Minipuls 3, peneira de 80 mesh e analisador polarográfico 757 VA Computrace Stand (Metrohm® Ltd. CH-9101 Herisau Switzerland).

3.2.2. MATERIAIS

Papel de filtro QUANTY® - JP42-Faixa Azul (poros $\approx 8 \mu\text{m}$), lã de vidro da Reagen®, resina trocadora de ânions fortemente básica Aldrich® Dowex 1-X8 -100 (chloride form), resina trocadora de cátions fortemente ácida Sigma® Dowex 50W X8 -200 (hydrogen form).

Os reagentes utilizados nesta etapa foram o hidróxido de potássio obtido da Carlo Erba®, o cloreto de metileno ou diclorometano, obtido da ECIBRA®, o ácido clorídrico

Merck® 97%, o carvão ativo da Nuclear®, água desionizada obtida no deionizador da BAUMER®, além daqueles utilizados na etapa de derivatização do glifosato.

3.2.3. LINEARIDADE

Além das diversas vantagens que um método analítico quantitativo deve possuir, tais como simplicidade, facilidade de execução, baixo custo, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), seletividade e sensibilidade, existe uma propriedade que é inerente a uma metodologia analítica quantitativa: a linearidade. Um método analítico que não responde a uma função de calibração linear ou não linear quando estudado com padrões puros não pode ser empregado na quantificação de uma certa espécie em estudo. Portanto, um estudo da linearidade do método analítico proposto foi realizado tanto para a voltametria com onda quadrada quanto para a voltametria com pulso diferencial nas condições otimizadas, tendo como objetivo deixar o método apto a ser utilizado em uma análise química real do herbicida glifosato.

Para o estudo da linearidade utilizaram-se os parâmetros otimizados para cada técnica e elaborou-se uma solução para o eletrólito de suporte a ser usada como o branco, contendo ácido clorídrico na concentração otimizada, além de nitrito de sódio $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e sulfamato de amônio $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Escolheram-se duas faixas de estudo, a primeira definida entre 0,01 a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e outra entre 1,0 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e partiu-se de soluções padrão de glifosato derivatizadas com concentrações de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Todas as análises foram executadas após a medida do branco.

3.2.4. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção normalmente é determinado apenas para estabelecer o limite inferior à faixa de operação prática do método. O uso mais importante do limite de detecção é mostrar quando a performance do método se torna insuficiente para uma determinação aceitável. O ideal, entretanto, é que as medições quantitativas não sejam feitas nessa região, mas realizadas em uma região em que a resposta seja mais estável e que responda à linearidade. O limite que garante a faixa de operação prática do método é chamado de limite de quantificação.

A determinação destes limites foi realizada segundo Morrison et al. (1980)¹¹⁵. Utilizaram-se os parâmetros otimizados para cada técnica e elaborou-se uma solução para o

eletrólito de suporte a ser usada como o branco, contendo ácido clorídrico na concentração otimizada, além de nitrito de sódio $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e sulfamato de amônio $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Fizeram-se dez repetições do branco, livre de qualquer resíduo de glifosato, para cada técnica otimizada, sendo que após cada medida a célula era retirada, lavada e em seguida era novamente adicionado um novo volume do branco. Coletou-se o valor da corrente obtida no potencial de meia onda do glifosato em cada medida.

Sobre os valores das dez repetições, calculou-se o desvio padrão. O valor do desvio padrão multiplicado por três e em seguida por dez, quando adicionados, separadamente, na equação linear da curva analítica, substituindo o termo y da equação, fornecem as concentrações dos limites de detecção e de quantificação, respectivamente.

3.2.5. TRATAMENTO DAS RESINAS E PREPARAÇÃO DA COLUNA

A resina de troca aniônica Dowex 1-X 8 na forma cloreto foi convertida a hidróxido com a adição de um excesso de KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. A resina imersa na solução alcalina foi deixada por uma noite em frasco plástico. Após este tempo a pasta fluida foi transferida para um filtro de vidro sinterizado onde foi lavada com água desionizada até a completa neutralização. A pasta fluida foi estocada com água para posterior utilização.

A resina de troca catiônica foi utilizada sem nenhum tratamento prévio.

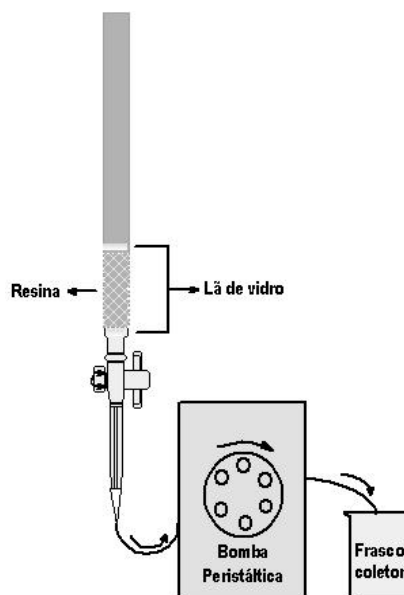


Figura 13. Sistema de coluna e bomba peristáltica, utilizado na limpeza e pré-concentração do herbicida na resina de troca aniônica.

A coluna foi preparada utilizando 20 mL da resina de troca aniônica e a lâ de vidro foi utilizada como suporte e também no topo da resina para evitar turbilhonamento.

Para controlar a vazão de saída do eluato no sistema cromatográfico utilizou-se uma bomba peristáltica, como mostrado nas figuras 13 e 14.

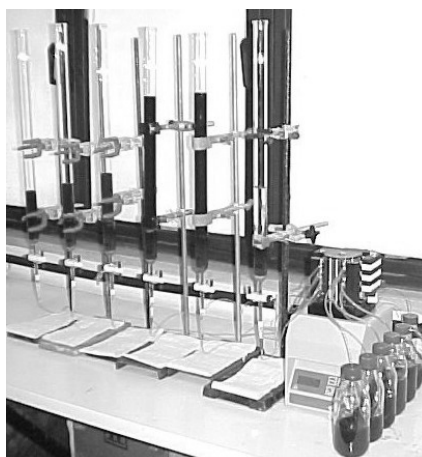


Figura 14. Colunas cromatográficas dispostas no laboratório.

3.2.6. ORIGEM E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas no campo experimental Prof. Diogo Alves de Mello, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa, onde havia um histórico da utilização do herbicida glifosato. Foram coletados a parte aérea das forrageiras e o solo do mesmo local, sendo escolhido cinco pontos em cada uma das duas regiões distintas.

As amostras de solo e forrageiras foram secas ao ar, trituradas, misturadas e quarteadas. Para a amostra de forrageira utilizou-se o triturador de vegetais, enquanto que para a amostra de solo, utilizou-se um gral para quebrar as maiores estruturas, e peneirando-se o mesmo em uma peneira de 80 mesh.

Uma amostra de água foi coletada na lagoa próxima ao campo experimental.

As amostras de vegetal foram fortificadas com 50 μL da solução estoque ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) do glifosato para 25 g de amostra, antes da extração.

As amostras de solo foram fortificadas com 500 μL da solução estoque do glifosato para 50,0 g de amostra, antes da extração.

A amostra de água foi fortificada com 50 μL da solução estoque para 500 mL de amostra.

3.2.6.1. Amostra de Referência Preparada

Três amostras de água desionizada foram preparadas com uma concentração conhecida do herbicida para o estudo da fração a ser coletada com o analito.

As amostras foram preparadas transferindo 1,0 mL da solução estoque de glifosato para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água desionizada.

O pH da amostra foi elevado até 10 com o objetivo de retirar todos os hidrogênios ionizáveis da molécula, tornando-a carregada negativamente e potencialmente capaz de ser retida na resina de troca aniônica. Em seguida, todo o volume da amostra foi transferido para a coluna, onde percolou a resina a uma vazão controlada em 1,5 mL min⁻¹.

3.2.6.2. Água

Foram transferidos 500 mL da amostra de água para um frasco de plástico onde se elevou o pH para 10 com solução de KOH 5,0 mol L⁻¹.

Adicionou-se a amostra em seguida na coluna para percolar a resina a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹.

3.2.6.3. Vegetais

Transferiram-se 25,0 g de amostra de forrageira para um frasco de Erlenmeyer de 500 mL, adicionaram-se ao frasco 200 mL de água e 80 mL de diclorometano. O frasco foi levado para o agitador de mesa, onde foi agitado por 10,0 min a uma velocidade de 200 rpm. Todo o volume foi transferido aos frascos da centrífuga e foram centrifugados a uma velocidade de 4000 rpm durante 20 min.

O sobrenadante foi filtrado por sucção em filtro de filtração lenta e em seguida transferido para um copo de Becker de 500 mL contendo 30 g de resina trocadora de cátion. O béquer foi levado para um banho de ultra-som por 10 min e em seguida a mistura foi filtrada por sucção através do papel de filtro. A resina foi lavada com 200 mL de água desionizada e o pH do filtrado ajustado com auxílio de um pHmetro para 10 com solução de KOH 5,0 mol L⁻¹.

Adicionou-se a amostra em seguida na coluna para percolar a resina a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹.

3.2.6.4. Solo

Transferiram-se 50 g de solo homogeneizado e 125 mL de KOH 0,2 mol L⁻¹ para um frasco de erlenmeyer de 250 mL e fechou-se com rolha de borracha. Agitou-se mecanicamente no agitador de mesa por 15 min. O volume foi transferido completamente para os frascos da centrífuga e centrifugou-se por 20 min a 4000 rpm e em seguida transferiu-se o sobrenadante para um frasco de plástico. Um adicional de 125 mL de KOH 0,2 mol L⁻¹ foi colocado no frasco da centrífuga com o solo centrifugado. Misturou-se com bastão de vidro o solo com a solução e transferiu para o erlenmeyer de 250 mL e agitou-se novamente por 15 min. A mistura foi centrifugada e em seguida o sobrenadante foi transferido

à primeira porção extraída. O volume coletado foi filtrado por sucção com papel de filtro e o volume completado com água desionizada para 400 mL. Este volume foi percolado pela coluna a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹.

3.2.7. COLETA DO GLIFOSATO E DERIVATIZAÇÃO

Após todo volume da amostra ser percolado, passaram-se 50 mL de solução de KOH 0,25 mol L⁻¹ e após a passagem deste volume, passaram-se 50 mL de água. Descartaram-se todos os volumes anteriores e eluiu-se a coluna com 80 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹ a uma vazão de 1,0 mL min. Durante a eluição houve formação de bolhas e para diminuir este inconveniente, empurrou-se, com auxílio de um bastão de vidro, um chumaço de lã de vidro sobre a resina.

Os volumes foram coletados na seguinte seqüência: 20,0 mL; 40,0 mL; 20,0 mL. Os volumes de 20 mL foram coletados apenas para controle enquanto o volume de 40 mL continha o analito.

Aos volumes de 20 mL foram adicionados 2 mL de HCl concentrado, enquanto que para o volume de 40 mL adicionaram-se 4 mL.

Foram adicionadas aos volumes de 20 e 40 mL as massas de 0,25 g e 0,5 g de carvão ativado respectivamente. Aguardaram-se 5 min e em seguida filtraram-se as misturas por sucção com o papel de filtro. Os filtrados de 20 e 40 mL foram transferidos para os balões volumétricos de 25 e 50 mL respectivamente onde se executou a etapa de derivatização.

A derivatização foi executada da seguinte maneira: adicionou-se 1,0 mL de nitrito de sódio 10,0 mg mL⁻¹ a amostra. Esperou-se 15 minutos para que a reação de nitrosação ocorresse completamente. Após este tempo, adicionou-se 1,0 mL de sulfamato de amônio 0,10 g mL⁻¹ para eliminar o excesso de nitrito de sódio. Completou-se o volume com água desionizada.

Os volumes de nitrito de sódio e sulfamato de amônio foram aumentados quando a concentração de glifosato utilizada foi superior a 100 µg mL⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA VOLTAMÉTRICA

4.1.1. VOLTAMETRIA COM ONDA QUADRADA

4.1.1.1. Estudo dos Parâmetros Voltamétricos

Os parâmetros escolhidos para o estudo foram o incremento de voltagem - VS (volt), a frequência - Fr (Hz) e a amplitude - A (volt). O estudo foi realizado fixando um valor pré-estabelecido para dois fatores e variando-se os valores para o fator em estudo.

Os estudos realizados com os parâmetros voltamétricos para a varredura com onda quadrada apresentaram os resultados mostrados nas figuras 15, 16 e 17.

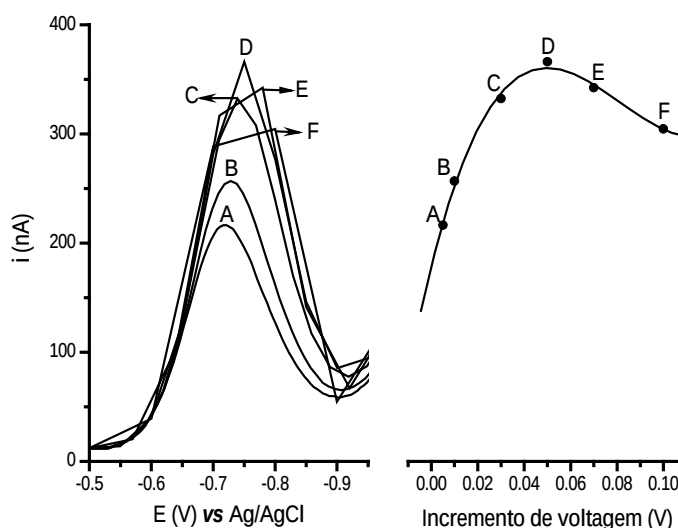


Figura 15. Estudo do parâmetro incremento de voltagem (VS) na SWV, com os parâmetros A e Fr fixados em 0,05 volt e 50 hertz, respectivamente.

De acordo com a figura 15, o aumento no valor do incremento de voltagem (VS) contribui para o aumento na resposta voltamétrica, no entanto a partir do incremento 0,03 volt o pico perde a simetria, além disso, o valor da corrente para valores acima de 0,05 volt diminui, portanto, para evitar qualquer perda de simetria, os níveis escolhidos para o fator incremento de voltagem (VS), foram 0,01 e 0,02 volts.

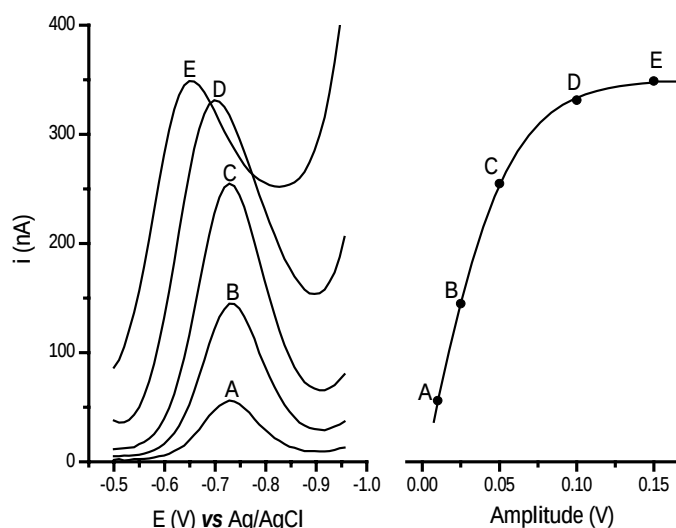


Figura 16. Estudo do parâmetro amplitude (A) na SWV, com os parâmetros VS e Fr fixados em 0,01 volt e 50 hertz, respectivamente.

O aumento da amplitude (A), de acordo com a figura 16, mostrou ter grande influência sobre o aumento da corrente; no entanto, para valores acima de 0,10 volt há deslocamento no potencial de pico para valores mais positivos e além disso, para valores acima de 0,15 volt não há aparecimento de pico. Portanto, os níveis escolhidos para o estudo para este fator foram 0,05 e 0,1 volt.

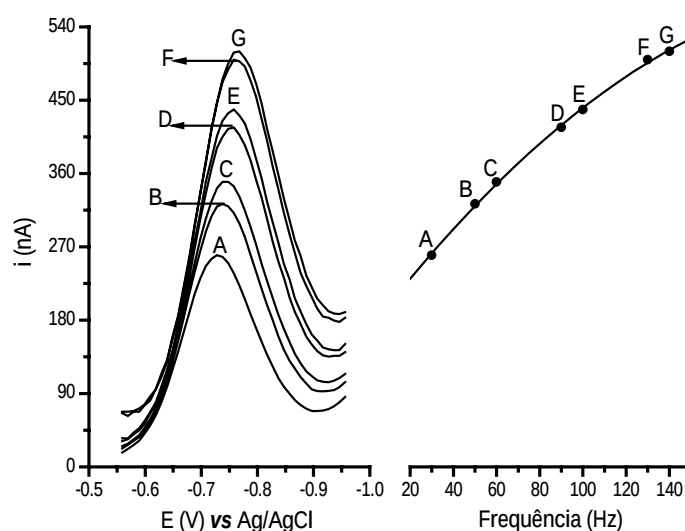


Figura 17. Estudo do parâmetro frequência (Fr) na SWV, com os parâmetros VS e A fixados em 0,01 volt e 0,05 volt, respectivamente.

Na figura 17 a frequência (Fr) mostrou ser diretamente proporcional ao aumento da corrente, no entanto, para valores acima de 90 Hz ocorre uma incompatibilidade instrumental com os melhores níveis escolhidos para os outros fatores (A e VS), sendo assim, os níveis escolhidos para este fator foram 50 e 90 Hertz.

4.1.1.2. Planejamento Fatorial – Triagem dos Fatores

A tabela 8 mostra os fatores escolhidos e seus respectivos níveis.

Um planejamento fatorial completo (Tab.9) foi executado tendo como principal objetivo a realização de uma triagem dos fatores que apresentam influência sobre a resposta voltamétrica na varredura com onda quadrada, que será otimizada.

Tabela 8. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial para a SWV

Fatores	Níveis	
	-	+
Incremento de voltagem - VS (V)	0,01	0,02
Amplitude - A (V)	0,05	0,10
Frequência - Fr (Hz)	50	90
Concentração do eletrólito - H (mol L ⁻¹)	0,5	1,0
Área da gota - G (mm ²)	0,27	0,60

Tabela 9. Planejamento fatorial completo e respectivas respostas para a SWV

Experimento*	Fatores					Resposta $\bar{X}$
	VS	A	Fr	H	G	
01	-	-	-	-	-	179,73
02	+	-	-	-	-	186,73
03	-	+	-	-	-	203,27
04	+	+	-	-	-	298,97
05	-	-	+	-	-	201,83
06	+	-	+	-	-	262,43
07	-	+	+	-	-	277,97
08	+	+	+	-	-	324,10
09	-	-	-	+	-	177,70
10	+	-	-	+	-	224,16
11	-	+	-	+	-	234,87
12	+	+	-	+	-	283,29
13	-	-	+	+	-	207,38
14	+	-	+	+	-	303,17
15	-	+	+	+	-	294,00
16	+	+	+	+	-	378,40
17	-	-	-	-	+	286,10
18	+	-	-	-	+	369,10
19	-	+	-	-	+	406,14
20	+	+	-	-	+	509,07
21	-	-	+	-	+	417,80
22	+	-	+	-	+	448,87
23	-	+	+	-	+	529,57
24	+	+	+	-	+	655,77
25	-	-	-	+	+	354,33
26	+	-	-	+	+	399,73
27	-	+	-	+	+	415,70
28	+	+	-	+	+	587,10
29	-	-	+	+	+	460,87
30	+	-	+	+	+	473,67
31	-	+	+	+	+	584,33
32	+	+	+	+	+	656,50

Os dados referentes à tabela 9 foram processados pelo “software” MatLab, onde se realizaram os cálculos para obter os efeitos das variáveis (Apêndice A1). Para o cálculo dos erros dos efeitos foi utilizado o “software” Microsoft Excel XP (Apêndice A1.1).

Tabela 10. Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial para a SWV

	Estimativa dos efeitos $\pm$ erro padrão	Relação t^{**}
Média	$362,27 \pm 2,20$	164,30
Principais*		
VS	$70,59 \pm 4,41$	16,00
A	$105,34 \pm 4,41$	23,88
Fr	$85,04 \pm 4,41$	19,28
H	$29,86 \pm 4,41$	6,77
G	$219,79 \pm 4,41$	49,84
Interação 2ª ordem*		
VS x A	$22,83 \pm 4,41$	5,17
VS x Fr	$-4,45 \pm 4,41$	-1,00
VS x H	$-1,51 \pm 4,41$	0,34
VS x G	$10,03 \pm 4,41$	2,27
A x Fr	$10,24 \pm 4,41$	2,32
A x H	$-1,19 \pm 4,41$	-0,27
A x G	$36,37 \pm 4,41$	8,25
Fr x H	$0,14 \pm 4,41$	0,03
Fr x G	$27,47 \pm 4,41$	6,23
H x G	$8,87 \pm 4,41$	2,01
Interação 3ª ordem*		
VSxAxFr	$-6,75 \pm 4,41$	-1,53
VSxAxH	$-0,83 \pm 4,41$	-0,20
VSxAxG	$14,73 \pm 4,41$	3,34
VSxFrxH	$-1,37 \pm 4,41$	-0,31
VSxFrxG	$-15,61 \pm 4,41$	-3,54
VSxHxG	$-6,69 \pm 4,41$	-1,52
VSxFrxH	$2,65 \pm 4,41$	0,60
AxFrxG	$4,30 \pm 4,41$	0,97
AxHxG	$-1,76 \pm 4,41$	-0,40
FrHxG	$-8,024 \pm 4,41$	-1,82
Interação 4ª ordem*		
VSxAxFrxH	$-3,25 \pm 4,41$	-0,74
VSxAxFrxG	$7,82 \pm 4,41$	1,77
VSxAxHxG	$9,62 \pm 4,41$	2,18
VSxFrxHxG	$-11,52 \pm 4,41$	-2,61
AxFrxHxG	$-2,79 \pm 4,41$	-0,63
Interação 5ª ordem*		
VSxAxFrxHxG	$-14,48 \pm 4,41$	-3,28

*Os efeitos destacados foram significativos pelo teste t.

** $t_{\text{tab}} = t_{v,\alpha} = 1,998$ (com $v = 64$ e $\alpha = 0,05$).

De acordo com os resultados mostrados na tabela 10, todos os efeitos principais foram significativamente positivos, mostrando que os fatores escolhidos interferem diretamente na resposta voltamétrica, nos níveis estudados.

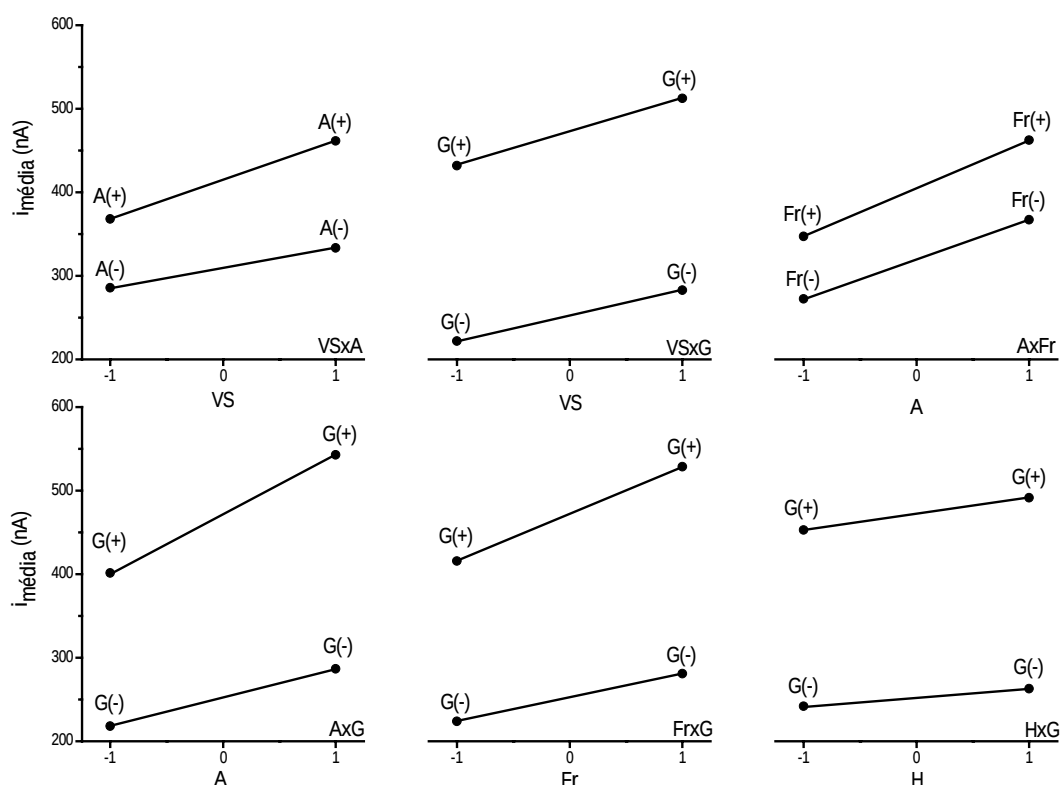


Figura 18. Representação gráfica dos efeitos de segunda ordem.

A figura 18 mostra a representação gráfica dos efeitos de interação de segunda ordem significativos destacados na tabela 10. A interação VSxA mostrada na figura 18, menciona que ao variar os níveis do fator amplitude (A) para o maior valor, dentro do nível negativo do fator incremento de voltagem (VS) a média das respostas é menor que a mesma variação dos níveis de A, dentro do nível positivo de VS. Certamente este aumento na resposta, quando se deslocam os dois fatores para níveis positivos, ocorre devido ao aumento total no valor do pulso aplicado o que contribui para a polarização brusca do eletrodo e por uma troca efetiva de elétrons com as moléculas do glifosato.

A interação AxFr mostrada na figura 18, faz referência à maior média das respostas quando se desloca o fator frequência (Fr) para o maior valor de seus níveis, dentro do nível positivo do fator A, que a média obtida desta mesma variação dentro do nível negativo deste último fator. Este aumento na resposta provavelmente se deve ao aumento na polarização do eletrodo com a diminuição entre os tempos de leitura da corrente, no entanto, o tempo necessário para que a corrente capacitiva diminua não é suficiente e a corrente interpretada é a combinação entre as correntes faradaica e capacitiva, o que contribui para o aumento na resposta, porém, diminui a simetria do pico, que é algo indesejado.

A área da gota (G) foi o fator estatisticamente mais importante, seja entre os efeitos principais, onde apresentou o maior valor, seja nas interações de segunda, terceira, quarta e quinta ordem, onde esteve presente na maioria das interações significativas. As interações VSxG, AxG, FrxG e HxG destacam a importância da área da gota para efetivar as reações de redução da nitrosamina do glifosato com maior eficiência. Em todas estas interações, o aumento na área do eletrodo, dentro do nível positivo dos outros fatores em questão, apresentou uma resposta média maior que a média obtida no nível mais baixo destes mesmos fatores. Entretanto, um maior aumento na área da gota contribui não só para o aumento da corrente faradaica, mas também para o aumento da corrente capacitiva e portanto, se a área for aumentada ainda mais, espera-se uma queda na resposta.

A interação negativa VSxFrxG, destaca a incompatibilidade do aumento da velocidade de varredura com o aumento na polarização em uma gota com grande área, nos níveis estudados. Certamente, apesar do aumento na velocidade de varredura, não ocorre uma boa transferência de elétrons na superfície do eletrodo, devido possivelmente ao aumento na densidade de corrente (capacitiva e faradaica) e portanto, na sobrevoltagem. Esta mesma discussão pode ser transferida para as interações VSxFrxHxG e VSxAxFrxHxG.

Tendo em vista todas as discussões, o fator área da gota (G) foi fixado em seu valor máximo devido à impossibilidade instrumental de se fazer um estudo para valores ainda maiores, sendo este o mesmo valor de maior magnitude utilizado no planejamento. O fator frequência (Fr) foi fixado em um valor médio entre o nível mais alto e o mais baixo, portanto, 70 Hz, devido a sua influência negativa sobre a simetria dos picos para o valor de 90 Hz. Portanto, os fatores escolhidos para o planejamento para a superfície de resposta foram o incremento de voltagem, a amplitude e a concentração do eletrólito de suporte.

4.1.1.3. Metodologia para a Superfície de Resposta

Para a elaboração do planejamento CCD, os níveis -1 e +1 foram os mesmos utilizados no planejamento fatorial, já os outros níveis (Tab. 11) foram calculados a partir da equação:

$$Z = \frac{X_i - \bar{X}}{\frac{\Delta X}{2}}$$

Onde Z é o valor codificado do planejamento CCD, X_i o valor procurado para o nível, $\bar{X}$ o valor médio entre os níveis 1 e -1, que é o próprio valor para o nível 0 e ΔX é o valor da diferença entre o nível 1 e -1.

O planejamento múltiplo central (com $\alpha = 1,682$) foi construído (Tab.12) utilizando três variáveis: Incremento de voltagem (VS), amplitude (A) e concentração do eletrólito de suporte – HCl (H).

Tabela 11. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento CCD para a SWV

Fatores	Níveis				
	-1,682	-1	0	1	1,682
VS (V)	0,0066	0,01	0,015	0,02	0,023
A (V)	0,033	0,05	0,075	0,1	0,117
	-1,6*	-1	0	1	1,8*
H (mol L ⁻¹)	0,35	0,5	0,75	1	1,2

*Valores calculados de maneira a se adaptar a um volume inteiro.

Tabela 12. Resultado do Planejamento CCD com k=3, para a SWV

Ensaio	VS (X ₁)	A (X ₂)	H (X ₃)	VS (V)	A (V)	H (mol L ⁻¹)	Resposta
01	-1	-1	-1	0,01	0,05	0,5	294,10
02	1	-1	-1	0,02	0,05	0,5	350,30
03	-1	1	-1	0,01	0,1	0,5	398,10
04	1	1	-1	0,02	0,1	0,5	506,00
05	-1	-1	1	0,01	0,05	1,0	294,00
06	1	-1	1	0,02	0,05	1,0	380,10
07	-1	1	1	0,02	0,1	1,0	500,35
08	1	1	1	0,02	0,1	1,0	540,00
09	-1,682	0	0	0,0066	0,075	0,75	337,30
10	1,682	0	0	0,023	0,075	0,75	477,50
11	0	-1,682	0	0,015	0,033	0,75	236,30
12	0	1,682	0	0,015	0,117	0,75	484,70
13	0	0	-1,6	0,015	0,075	0,35	392,80
14	0	0	1,8	0,015	0,075	1,2	445,40
15	0	0	0	0,015	0,075	0,75	441,70
16	0	0	0	0,015	0,075	0,75	400,17
17	0	0	0	0,015	0,075	0,75	413,70
18	0	0	0	0,015	0,075	0,75	429,10

A análise de variância (ANOVA) foi significativa para a regressão, enquanto a falta de ajuste não, o que garante um modelo de segunda ordem bem ajustado para o planejamento proposto (Tab. 13).

Tabela 13. ANOVA do planejamento CCD, para a SWV

	SQ	GL	QM	F	F _{tab}
Regressão		9	12028,96	29,6498	*(3,39)
Resíduos	325,6090	8	405,7012		
Falta de ajuste	2264,4430	5	452,8886	1,3847	** (9,01)
Erro puro	981,1665	3	327,0555		
Total		17			
% da variância explicada			97,0893		
% Máxima da variância explicável			99,1201		

*F_{tab} = F_{9,8} = 3,39 α = 0,05

**F_{tab} = F_{5,3} = 9,01

Os coeficientes do modelo (Apêndice A2) e seus erros (Apêndice A2.1) foram determinados utilizando o “software” MatLab 5.3. e são apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Coeficientes e erros para o modelo da superfície de resposta para a SWV

	Coeficientes ± Erro*	Relação t	**t _{tab}
b ₀	420,87 ± 9,0150	46,685	3,18
b ₁	38,50 ± 4,89	7,8685	
b ₂	76,42 ± 4,89	15,619	
b ₃	18,31 ± 4,90	3,7371	
b ₁₁	-1,82 ± 5,09	-0,357	
b ₂₂	-18,40 ± 5,09	-3,615	
b ₃₃	1,34 ± 4,97	0,2695	
b ₁₂	0,65 ± 6,40	0,1017	
b ₁₃	-4,79 ± 6,40	-0,749	
b ₂₃	13,32 ± 6,40	2,0832	

** Os coeficientes em destaque foram significativos pelo teste t

*t_{tab} com 3 graus de liberdade e 5% de probabilidade

A equação do modelo ajustada para os coeficientes significativos (Apêndice A2.2) e seus respectivos erros são apresentados abaixo.

$$z = 420,45 \pm 5,65 + 38,50 \pm 4,89 x_1 + 76,42 \pm 4,89 x_2 + 18,48 \pm 4,87 x_3 - 18,32 \pm 4,89 x_2^2$$

De acordo com o modelo obtido para a voltametria com onda quadrada, o fator amplitude se destaca com dois termos, sendo portanto o fator de maior impacto sobre a resposta voltamétrica. A superfície de resposta não pode ser obtida diretamente do modelo, pois o mesmo apresenta três fatores independentes e um fator dependente, neste caso fixou-se um dos fatores independentes em dois valores, um correspondendo ao nível mais alto do planejamento e outro ao nível mais baixo e obtiveram-se portanto, duas superfícies de resposta para cada fator fixado.

4.1.1.4. Superfície de Resposta - SWV

Quando se fixou o valor do incremento de voltagem (VS) em seu nível mais baixo do planejamento obteve-se o seguinte modelo:

$$z = 355,69 + 76,42x_2 + 18,48x_3 - 18,32x_2^2$$

A superfície de resposta do modelo é apresentada na figura 19.

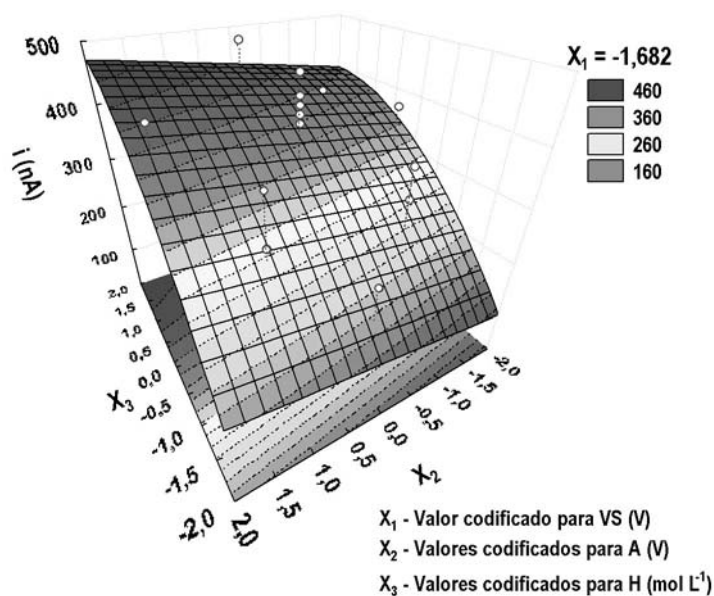


Figura 19. Superfície de resposta com incremento de voltagem fixo em -1,682.

Quando se fixou o valor do incremento de voltagem (VS) em seu nível mais alto do planejamento obteve-se o seguinte modelo:

$$z = 485,21 + 76,42x_2 + 18,48x_3 - 18,32x_2^2$$

A superfície de resposta do modelo é apresentada na figura 20.

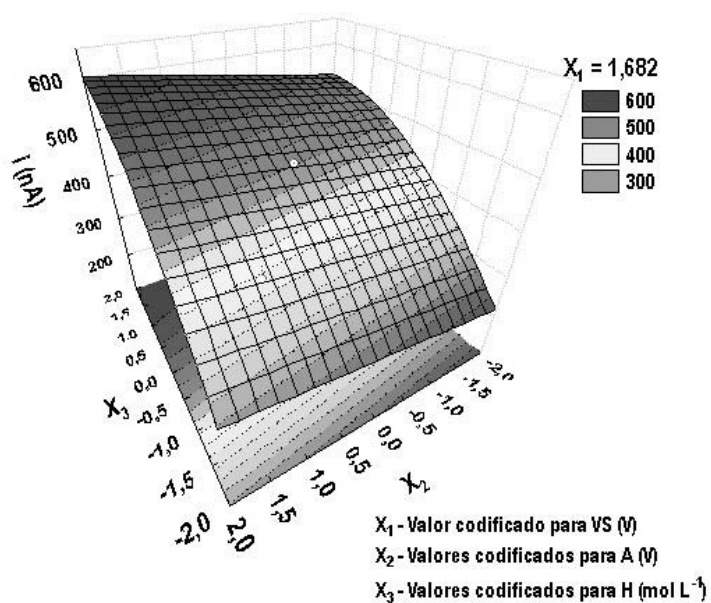


Figura 20. Superfície de resposta com incremento de voltagem fixo em +1,682.

Quando se fixou o valor da amplitude (A) em seu nível mais baixo do planejamento obteve-se o seguinte modelo:

$$z = 240,08 + 38,50x_1 + 18,48x_3$$

A superfície de resposta do modelo é apresentada na figura 21.

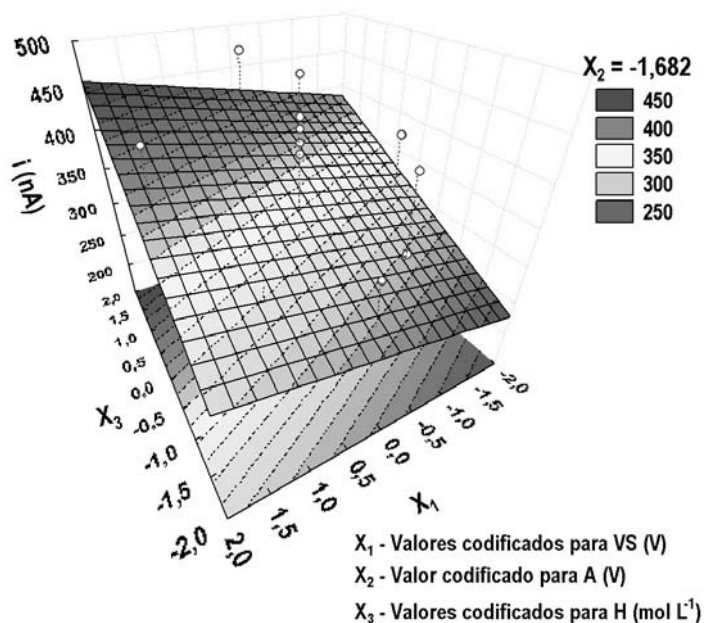


Figura 21. Superfície de resposta com a amplitude fixa em -1,682.

Quando se fixou o valor da amplitude (A) em seu nível mais alto do planejamento obteve-se o seguinte modelo:

$$z = 497,16 + 38,50x_1 + 18,48x_3$$

A superfície de resposta do modelo é apresentada na figura 22.

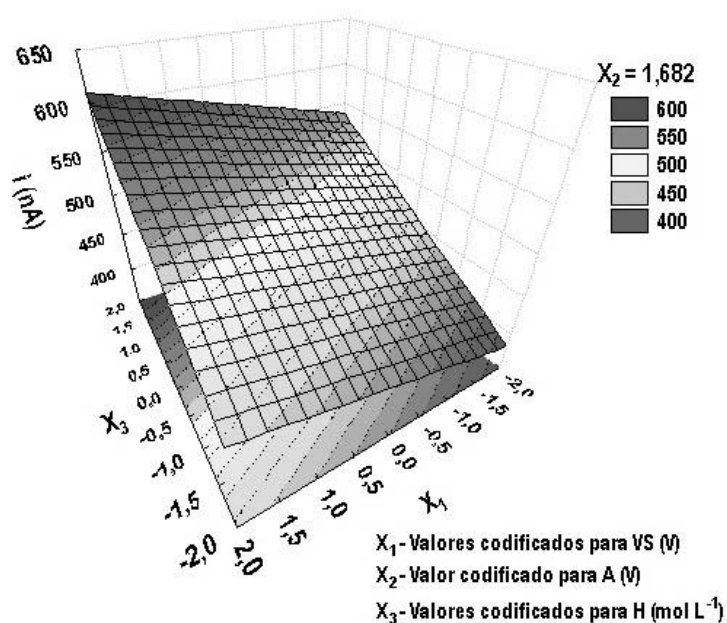


Figura 22. Superfície de resposta com a amplitude fixa em +1,682.

Quando se fixou o valor da concentração do eletrólito de suporte (H) em seu nível mais baixo do planejamento obteve-se o seguinte modelo:

$$z = 390,88 + 38,50x_1 + 76,42x_2 - 18,32x_2^2$$

A superfície de resposta do modelo é apresentada na figura 23.

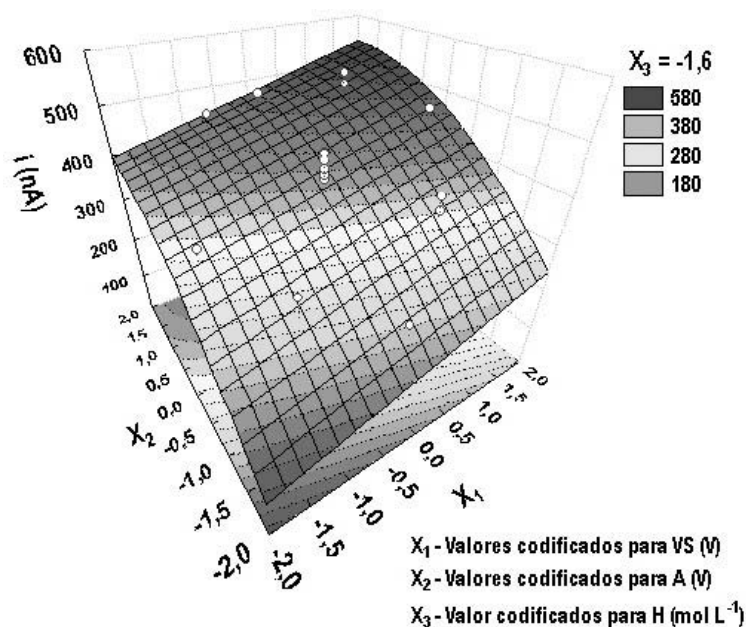


Figura 23. Superfície de resposta com o eletrólito de suporte fixo em -1,6.

Quando se fixou o valor da concentração do eletrólito de suporte (H) em seu nível mais alto do planejamento obteve-se o seguinte modelo:

$$z = 453,71 + 38,50x_1 + 76,42x_2 - 18,32x_2^2$$

A superfície de resposta do modelo é apresentada na figura 24.

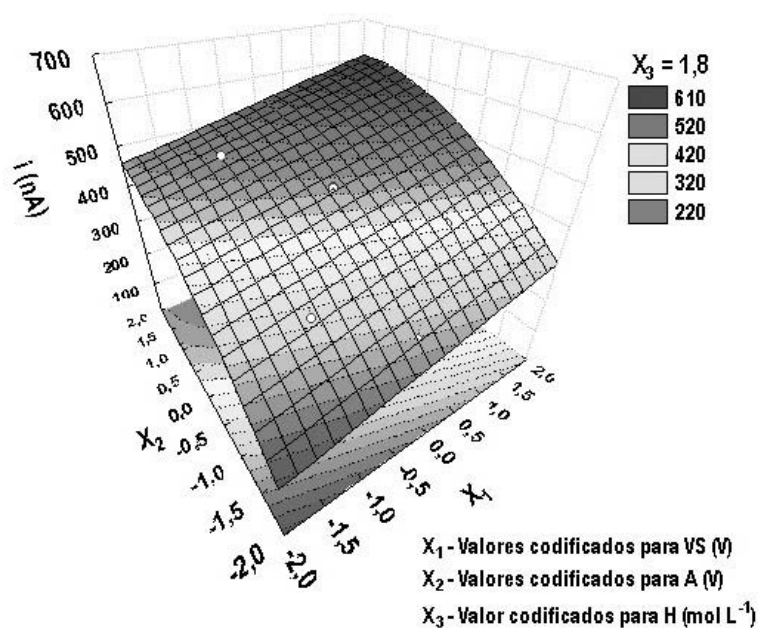


Figura 24. Superfície de resposta com o eletrólito de suporte fixo em +1,8.

Os resultados da superfície de resposta mostram que os fatores utilizados no planejamento são potencialmente capazes de aumentar a resposta voltamétrica quando estes são aumentados na faixa estudada. Infelizmente, o fator amplitude e incremento de voltagem não são instrumentalmente viáveis de serem aumentados para valores maiores que aqueles estudados, devido ao aparecimento de picos largos ou assimétricos. O fator que apresentou grande influência sobre a resposta foi a amplitude, que mostrou uma modificação brusca em sua superfície de resposta quando seu nível foi trocado do nível mais baixo para o mais alto dos valores codificados na superfície de resposta (Fig. 21 e 22).

Para todos os modelos, ao nível mais alto dos valores codificados na superfície de resposta, a maior corrente prevista foi praticamente a mesma, mostrando que o modelo foi bem ajustado e que os parâmetros não se interagem neste nível do estudo.

Tabela 15. Parâmetros otimizados para a análise do herbicida glifosato por voltametria com onda quadrada

Parâmetros	Valores ótimos	Corrente estimada*
Potencial Inicial	-0,5 V	600 nA
Potencial Final	-1,05 V	
Incremento de voltagem	0,025 V	
Amplitude	0,125 V	Corrente observada*
Frequência	70 Hz	593,72 nA
Velocidade de varredura	1,752 Vs ⁻¹	
Área da gota	0,60 mm ²	
[HCl]	1,25 mol L ⁻¹	*Erro relativo: -1,06 %

A tabela 15 apresenta os parâmetros otimizados para o aparelho em estudo nas condições de trabalho em que foram executados, além do erro relativo referente às correntes estimada e observada nas mesmas condições estabelecidas. Tal erro mostra o quanto o modelo matemático foi bem ajustado ao sistema voltamétrico e o quanto foi valiosa a contribuição deste modelo para o aumento da corrente para uma mesma concentração da nitrosamina do glifosato (5,0 µg mL⁻¹) na célula voltamétrica.

4.1.2. VOLTAMETRIA COM PULSO DIFERENCIAL

4.1.2.1. Estudo dos Parâmetros Voltamétricos

Escolheu-se os parâmetros incremento de voltagem-VS (volts), amplitude do pulso-AP (volts), tempo de pulso-TP (s) e tempo do incremento de voltagem-VT (s). O estudo foi realizado fixando um valor pré-estabelecido (Tab.16) para os fatores não observados e variando-se os valores para o fator em estudo. A área da gota foi fixado em seu valor máximo, conforme resultado da otimização realizada para a SWV.

Os estudos realizados com os parâmetros voltamétricos para a varredura com pulso diferencial apresentaram os resultados mostrados nas figuras 25, 26, 27 e 28.

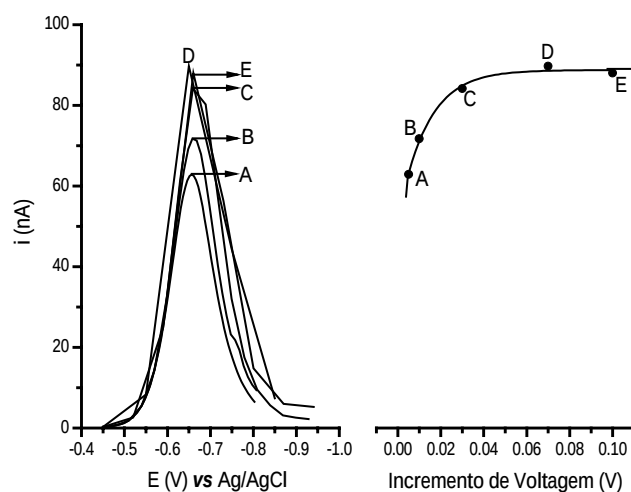


Figura 25. Estudo do parâmetro incremento de voltagem (VS) para a DPV, com os parâmetros AP, TP e VT fixados em 0,05 volt, 0,05 s e 0,50 s, respectivamente.

De acordo com o gráfico mostrado na figura 25, o aumento no valor do incremento de voltagem (VS) contribui para o aumento na resposta voltamétrica, no entanto a partir do incremento 0,03 volt o pico perde a simetria, além disso, o valor da corrente para valores acima de 0,07 volt diminui, portanto, para evitar qualquer perda de simetria, os níveis escolhidos para o fator incremento de voltagem (VS) foram 0,01 e 0,02 volts.

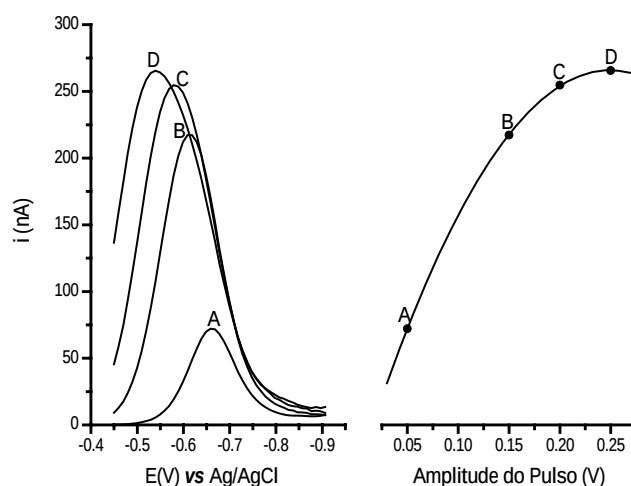


Figura 26. Estudo do parâmetro amplitude do pulso (AP) para a DPV, com os parâmetros VS, TP e VT fixados em 0,01 volt, 0,05 s e 0,50 s, respectivamente.

O aumento da amplitude do pulso (AP), de acordo com o gráfico mostrado na figura 26, mostrou ser responsável, até certo valor, para o aumento da corrente; no entanto, para valores acima de 0,20 volt há deslocamento no potencial de meia onda para valores mais

positivos e acima de 0,25 volt não há aparecimento de pico. Portanto, os níveis escolhidos para o estudo do fator amplitude do pulso (AP) foram 0,10 e 0,15 volt.

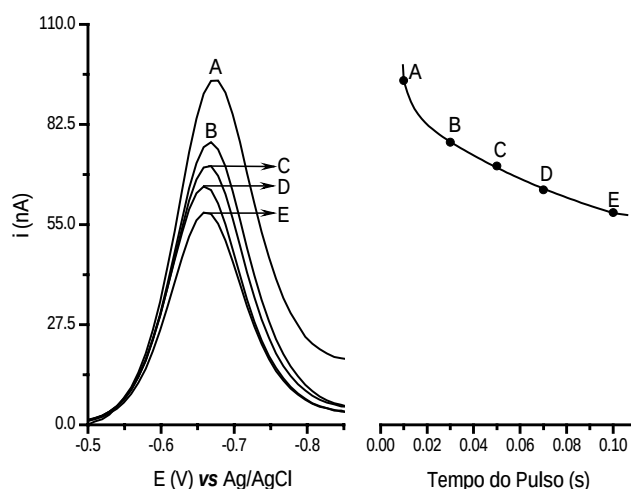


Figura 27. Estudo do parâmetro tempo de pulso (TP) para a DPV, com os parâmetros VS, AP e VT fixados em 0,01 volt, 0,05 volt e 0,50 s, respectivamente.

O tempo de pulso (TP), como mostra a figura 27, mostrou ser inverso ao aumento da corrente, o que destaca a importância de uma varredura rápida. Para este parâmetro o pico desaparece para valores acima de 0,15 s e não há pico com 0,005 s e nem para valores abaixo deste. Os valores escolhidos para este fator foram 0,01 e 0,03 s.

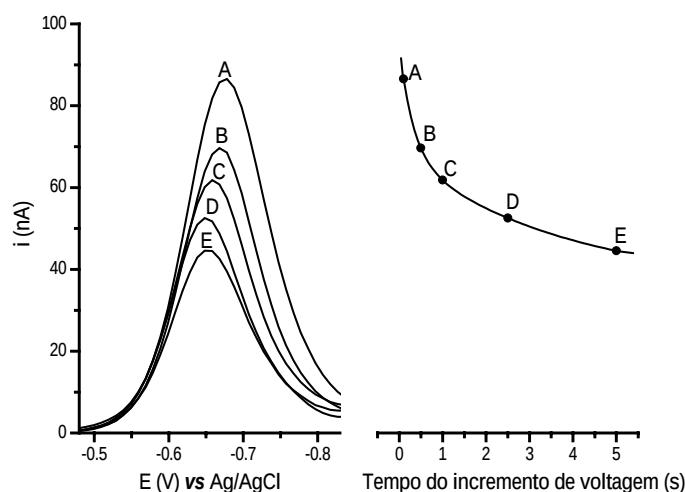


Figura 28. Estudo do parâmetro tempo do incremento de voltagem (VT) para a DPV, com os parâmetros VS, AP e TP fixados em 0,01 volt, 0,05 volt e 0,05 s, respectivamente.

O tempo do incremento de voltagem (VT), como mostra a figura 28, mostrou também ser inverso ao aumento da corrente, o que destaca novamente a importância de uma varredura rápida. Para este parâmetro o pico desaparece para valores acima de 7,0 s e não há pico com 0,05 s e nem para valores abaixo deste. Os valores escolhidos para este fator foram 0,1 e 0,5 s.

4.1.2.2. Planejamento Fatorial – Triagem dos Fatores

A tabela 16 mostra os fatores escolhidos e seus respectivos níveis.

Um planejamento fatorial completo (Tab.17) foi executado tendo como principal objetivo a realização de uma triagem dos fatores que apresentam influência sobre a resposta voltamétrica na varredura com pulso diferencial, que será otimizada.

Tabela 16. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial para a DPV

Fatores	Níveis	
	-	+
Incremento de voltagem - VS (V)	0,01	0,02
Amplitude do pulso - AP (V)	0,10	0,15
Tempo do pulso - TP (s)	0,01	0,03
Tempo do incremento de voltagem - VT (s)	0,1	0,5
Concentração do eletrólito - H (mol L ⁻¹)	1,0	1,5

Tabela 17. Planejamento fatorial completo e respectivas respostas para a DPV

Experimento*	Fatores					Resposta $\bar{X}$
	VS	AP	TP	VT	H	
01	-	-	-	-	-	273,23
02	+	-	-	-	-	328,40
03	-	+	-	-	-	399,77
04	+	+	-	-	-	473,93
05	-	-	+	-	-	191,37
06	+	-	+	-	-	196,10
07	-	+	+	-	-	232,33
08	+	+	+	-	-	292,03
09	-	-	-	+	-	220,20
10	+	-	-	+	-	266,87
11	-	+	-	+	-	382,07
12	+	+	-	+	-	480,27
13	-	-	+	+	-	189,00
14	+	-	+	+	-	206,37
15	-	+	+	+	-	283,17
16	+	+	+	+	-	319,10
17	-	-	-	-	+	286,87
18	+	-	-	-	+	360,37
19	-	+	-	-	+	404,70
20	+	+	-	-	+	474,07
21	-	-	+	-	+	199,63
22	+	-	+	-	+	219,20
23	-	+	+	-	+	240,27
24	+	+	+	-	+	261,20
25	-	-	-	+	+	273,23
26	+	-	-	+	+	267,10
27	-	+	-	+	+	429,20
28	+	+	-	+	+	496,63
29	-	-	+	+	+	183,97
30	+	-	+	+	+	213,07
31	-	+	+	+	+	268,03
32	+	+	+	+	+	321,30

Os dados referentes às respostas, foram processados pelo “software” MatLab, onde se realizaram cálculos para a obtenção dos efeitos das variáveis (Apêndice A1). Os resultados são mostrados na tabela 18.

Tabela 18. Efeitos e erros para do planejamento fatorial para a DPV

	Estimativa dos efeitos $\pm$ erro padrão	Relação t^{**}
Média	<i>301,03 $\pm$ 4,07</i>	73,95
Principais*		
VS	<i>44,93 $\pm$ 8,14</i>	5,52
AP	<i>117,70 $\pm$ 8,14</i>	14,46
TP	<i>-125,05 $\pm$ 8,14</i>	-15,36
VT	-2,12 $\pm$ 8,14	-0,26
H	10,29 $\pm$ 8,14	1,26
Interação 2ª ordem*		
VSxAP	14,94 $\pm$ 8,14	1,83
VSxTP	-14,86 $\pm$ 8,14	-1,82
VSxVT	-2,206 $\pm$ 8,14	-0,27
VSxH	-4,06 $\pm$ 8,14	-0,50
APxTP	<i>-40,35 $\pm$ 8,14</i>	-4,96
APxVT	<i>27,30 $\pm$ 8,14</i>	3,35
APxH	-6,20 $\pm$ 8,14	-0,76
TPxVT	<i>21,10 $\pm$ 8,14</i>	2,59
TPxH	-10,64 $\pm$ 8,14	-1,31
VTxH	2,90 $\pm$ 8,14	0,35
Interação 3ª ordem*		
VSxAPxTP	-2,56 $\pm$ 8,14	-0,31
VSxAPxVT	6,04 $\pm$ 8,14	0,74
VSxAPxH	-3,07 $\pm$ 8,14	-0,38
VSxTPxVT	6,05 $\pm$ 8,14	0,74
VSxTPxH	4,70 $\pm$ 8,14	0,58
VSxVTxH	-2,76 $\pm$ 8,14	-0,34
APxTPxVT	-4,84 $\pm$ 8,14	-0,59
APxTPxH	-2,41 $\pm$ 8,14	-0,29
APxVTxH	5,65 $\pm$ 8,14	0,69
TPxVTxH	-5,36 $\pm$ 8,14	-0,66
Interação 4ª ordem*		
VSxAPxTPx	-7,74 $\pm$ 8,14	-0,95
VSxAPxTPx	-2,93 $\pm$ 8,14	-0,36
VSxAPxVTx	6,52 $\pm$ 8,14	0,80
VSxTPxVTx	9,38 $\pm$ 8,14	1,15
APxTPxVTx	-0,69 $\pm$ 8,14	-0,08
Interação 5ª ordem*		
VSxAPxTPxVTxH	0,88 $\pm$ 8,14	0,11

*Os efeitos destacados foram significativos pelo teste t.

** $t_{\text{tab}} = t_{v,\alpha} = 1,998$ (com $v = 64$ e $\alpha = 0,05$)

De acordo com os resultados, o efeito da média e os efeitos principais, incremento de voltagem e amplitude do pulso, foram significativamente positivos, já o efeito principal tempo de pulso foi o mais importante e significativamente negativo, isto confirma o resultado mostrado na figura 27. Os efeitos principais dos fatores tempo do incremento de voltagem e concentração do eletrólito de suporte não foram estatisticamente significativos, nos níveis estudados.

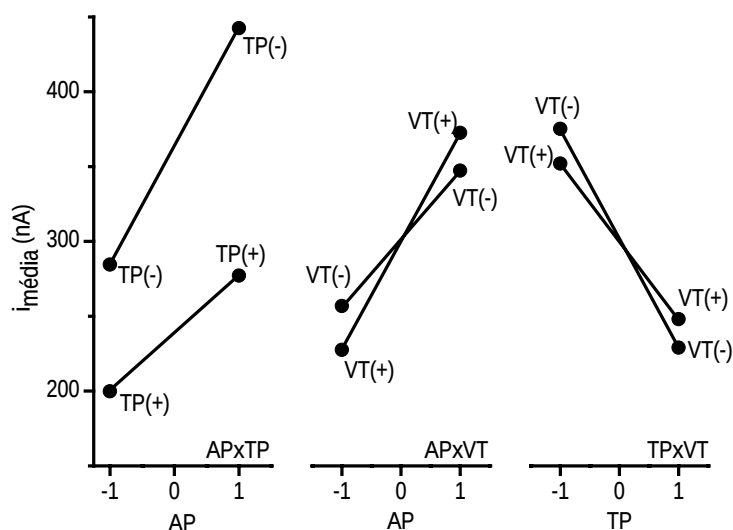


Figura 29. Representação gráfica dos efeitos de segunda ordem.

As únicas interações que mostraram serem estatisticamente significativas foram as interações de segunda ordem.

Na figura 29, a interação APxTP indica que a variação nos níveis do fator tempo de pulso (TP) dentro do nível negativo do fator amplitude do pulso é menor em módulo, que a mesma variação dentro do nível positivo do fator AP. Além disso, como o fator TP apresentou maior valor nas respostas quando estudado em seu nível negativo, o efeito total é negativo, o que confirma sua grande influência mesmo interagindo com o fator AP, que teve efeito principal positivo. Este aumento na resposta dentro dos níveis estudados, provavelmente é devido a alta polarização do eletrodo e do curto tempo em que esta polarização é mantida constante no patamar do pulso. Desta maneira, com a alta polarização há uma troca de elétrons efetiva na superfície do eletrodo e o curto tempo do pulso, certamente diminui a influência da corrente capacitiva, garantindo uma maior eficiência na leitura da corrente faradaica.

Pode-se inferir através da interação APxVT mostrada na figura 29, que os níveis do fator tempo do incremento de voltagem (VT) quando estudados dentro do nível negativo do fator AP, produziram uma variação entre as respostas com valor negativo e maior em módulo, que a mesma variação dentro do nível positivo do fator AP, que por sua vez apresentou uma

variação positiva entre as respostas. Isto mostra que há um antagonismo nos níveis negativos destes fatores. Uma análise criteriosa desta interação indica que o nível positivo do fator VT dentro do nível negativo do fator AP, contribui para uma queda na corrente, ao contrário, o mesmo fator VT em seu nível positivo contribui para o aumento da corrente dentro nível positivo do fator AP. Provavelmente, dentro dos níveis estudados, para uma maior polarização dos pulsos um maior tempo no incremento de voltagem é necessário, ou seja, uma maior tempo entre a aplicação destes pulsos, que estaria intrinsecamente ligado com as cargas de camada duplas produzidas com a polarização.

A interação TPxVT mostrada na figura 29, indica que a variação dos níveis do fator VT dentro do nível negativo do fator TP, apresenta um valor negativo e maior em módulo, que o valor da mesma variação do fator VT dentro do nível positivo do fator TP. Além disso, o valor desta última variação é positivo, ou seja, o fator VT, estando em seu nível positivo auxilia no aumento da resposta quando estudado no nível positivo do fator TP, ao contrário, o mesmo fator VT, estando em seu nível positivo e estudado no nível negativo do fator TP contribui para a queda na resposta. Entretanto, os dois fatores, estudados em seus níveis negativos, tiveram grande contribuição para o aumento da resposta. A conclusão sobre esta discussão, dentro dos níveis estudados, é que quando se trabalha com um baixo tempo no patamar do pulso, o tempo do incremento de voltagem também deve ser curto; da mesma maneira, quando se aumenta o valor do tempo do pulso, os melhores resultados se observarão para valores do tempo do incremento de voltagem para valores mais altos, ou seja, estes dois fatores trabalham em sintonia e contribuem efetivamente para o aumento da resposta.

O fator tempo do incremento de voltagem, por não ter apresentado efeito principal significativo e ter apresentado interação de segunda ordem positiva e mais significativa com a amplitude do pulso que com o tempo de pulso, será fixado em seu valor máximo no planejamento.

O fator concentração do eletrólito de suporte não apresentou nem efeito principal, nem interações significativas, e para estudos posteriores será fixado em seu nível mais baixo tendo em vista a economia de reagente.

Os fatores escolhidos portanto, para a metodologia de superfície de resposta foram o incremento de voltagem, a amplitude do pulso e tempo de pulso.

4.1.2.3. Metodologia para a Superfície de Resposta

Para a elaboração do planejamento CCD para a DPV, os fatores incremento de voltagem (VS), amplitude do pulso (AP) e tempo de pulso (TP) foram escolhidos. Para o fator incremento de voltagem (VS) o nível -1 escolhido para o planejamento CCD foi igual ao nível mais alto do planejamento fatorial, enquanto que para o nível +1 foi escolhido um valor maior, igual a 0,025 volt, com o objetivo de ampliar o estudo deste fator para valores mais altos. Os níveis -1 e +1 para o fator amplitude do pulso (AP) foram os mesmos utilizados no planejamento fatorial. Já para o fator tempo de pulso, o valor para o nível +1 foi diminuído de 0,03 s (planejamento fatorial) para 0,015 s, tendo em vista o estudo da diminuição deste tempo, visto que seu efeito foi significativo e negativo. Todos os outros níveis (Tab.19) foram calculados tendo como base os níveis -1 e +1 de cada fator, a partir da equação apresentada no item 4.1.1.3.

A tabela 20 mostra o planejamento múltiplo central (com $\alpha = 1,682$) construído para os três fatores nas condições descritas.

Tabela 19. Fatores e níveis escolhidos para o planejamento CCD para a DPV

Fatores	Níveis				
	-1,682	-1	0	1	1,682
VS (V)	0,0183	0,020	0,0225	0,025	0,0267
AP (V)	0,083	0,100	0,125	0,150	0,167
TP (s)	0,0083	0,010	0,0125	0,015	0,0167

Tabela 20. Resultado do Planejamento CCD com $k=3$ e $\alpha = 1,682$ para a DPV

Ensaio	VS (X_1)	AP (X_2)	TP (X_3)	VS (V)	AP (V)	TP (s)	Resposta
01	-1	-1	-1	0,020	0,100	0,010	287,0
02	1	-1	-1	0,025	0,100	0,010	286,8
03	-1	1	-1	0,020	0,150	0,010	481,0
04	1	1	-1	0,025	0,150	0,010	491,0
05	-1	-1	1	0,020	0,100	0,015	255,4
06	1	-1	1	0,025	0,100	0,015	263,9
07	-1	1	1	0,025	0,150	0,015	427,1
08	1	1	1	0,025	0,150	0,015	440,0
09	-1,682	0	0	0,0183	0,125	0,0125	344,4
10	1,682	0	0	0,0267	0,125	0,0125	360,0
11	0	-1,682	0	0,0225	0,083	0,0125	234,84
12	0	1,682	0	0,0225	0,167	0,0125	530,19
13	0	0	-1,682	0,0225	0,125	0,0083	408,1
14	0	0	1,682	0,0225	0,125	0,0167	328,1
15	0	0	0	0,0225	0,125	0,0125	368,0
16	0	0	0	0,0225	0,125	0,0125	365,2
17	0	0	0	0,0225	0,125	0,0125	367,4
18	0	0	0	0,0225	0,125	0,0125	367,5

A análise de variância (ANOVA) mostra que a regressão e a falta de ajuste foram significativos para o planejamento (Tab. 21).

Tabela 21. ANOVA do planejamento CCD para a DPV

	SQ	GL	QM	F	F _{tab}
Regressão		9	13436,77	663,6722	*(3,39)
Resíduos	161,9688	8	20,2461		
Falta de ajuste	157,3213	5	31,4643	20,3107	** (9,01)
Erro puro	4,6475	3	1,5492		
Total		17			
% da variância explicada			99,8662		
% Máxima da variância explicável			99,9962		

*F_{tab} = F_{9,8} = 3,39

**F_{tab} = F_{5,3} = 9,01

Os coeficientes do modelo (Apêndice A2) e seus erros (Apêndice A2.1) foram determinados utilizando o “software” MatLab e estão apresentados na tabela 22.

Tabela 22. Coeficientes e erros para o modelo para a superfície de resposta para a DPV

	Coeficientes ± Erro	Relação t	*t _{tab}
b ₀	367,08 ± 0,62	592,06	3,18
b ₁	4,21 ± 0,34	12,38	
b ₂	90,99 ± 0,34	267,62	
b ₃	-21,52 ± 0,34	-63,30	
b ₁₁	-5,48 ± 0,35	-15,66	
b ₂₂	5,23 ± 0,35	14,94	
b ₃₃	0,14 ± 0,35	0,40	
b ₁₂	1,82 ± 0,44	4,14	
b ₁₃	1,45 ± 0,44	3,29	
b ₂₃	-6,30 ± 0,44	-14,32	

*t_{tab} com 3 graus de liberdade e 5% de probabilidade

A equação do modelo ajustada para os coeficientes significativos (Apêndice A2.2) e seus respectivos erros são mostrados abaixo.

$$z = 367,23 \pm 0,49 + 4,20x_1 \pm 0,34 + 90,99x_2 \pm 0,34 - 21,52x_3 \pm 0,34 - 5,51x_1^2 \pm 0,34 + 5,20x_2^2 \pm 0,34 + 1,82x_1x_2 \pm 0,44 + 1,45x_1x_3 \pm 0,44 - 6,30x_2x_3 \pm 0,44$$

A equação do modelo para a voltametria com pulso diferencial destaca o grande número de coeficientes significativos e a presença de dois coeficientes de segunda ordem, ao contrário do modelo para a voltametria com onda quadrada. A superfície do modelo não pode ser obtida diretamente devido à presença de três fatores independentes e do fator dependente, desta maneira, fixou-se um dos fatores independentes em dois valores, um correspondendo ao nível mais alto do planejamento e outro ao nível mais baixo e obtiveram-se portanto, duas superfícies de resposta para cada fator fixado.

4.1.2.4. Superfície de Resposta - DPV

Quando se fixou o valor do incremento de voltagem em seu nível mais baixo do planejamento obteve-se o seguinte modelo:

$$z = 344,58 + 87,92x_2 - 23,96x_3 + 5,20x_2^2 - 6,30x_2x_3$$

A superfície de resposta do modelo é apresentada na figura 30.

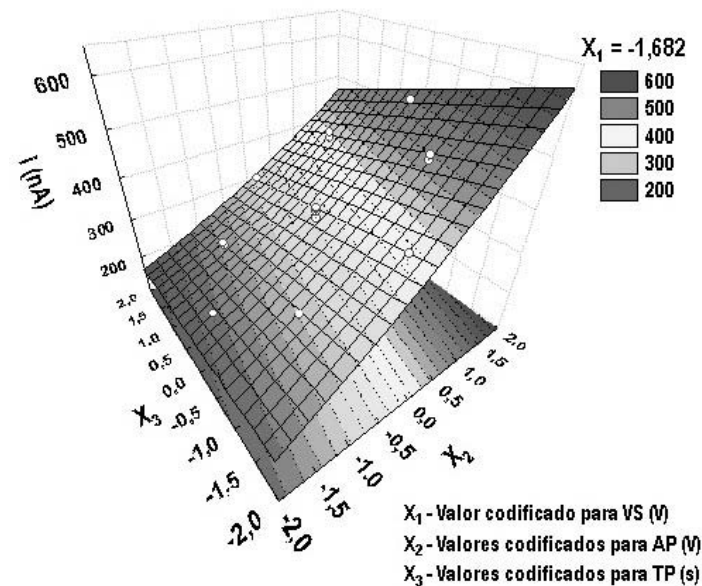


Figura 30. Superfície de resposta com incremento de voltagem fixo em -1,682.

Quando se fixou o valor do incremento de voltagem em seu nível mais alto do planejamento obteve-se o seguinte modelo:

$$z = 358,71 + 94,06x_2 - 19,08x_3 + 5,20x_2^2 - 6,30x_2x_3$$

A superfície de resposta do modelo é apresentada na figura 31.

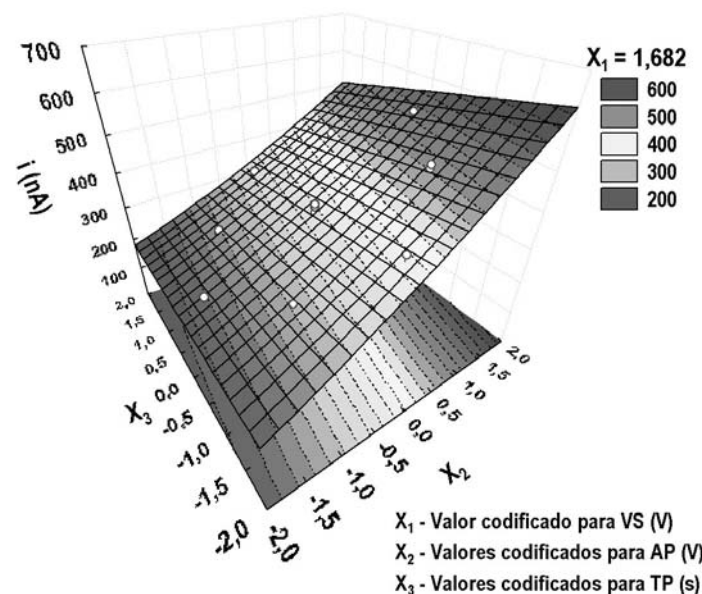


Figura 31. Superfície de resposta com incremento de voltagem fixo em +1,682.

Quando se fixou o valor da amplitude em seu nível mais baixo do planejamento obteve-se o seguinte modelo:

$$z = 198,60 + 1,13x_1 - 10,92x_3 - 5,51x_1^2 + 1,45x_1x_3$$

A superfície de resposta do modelo é apresentada na figura 32.

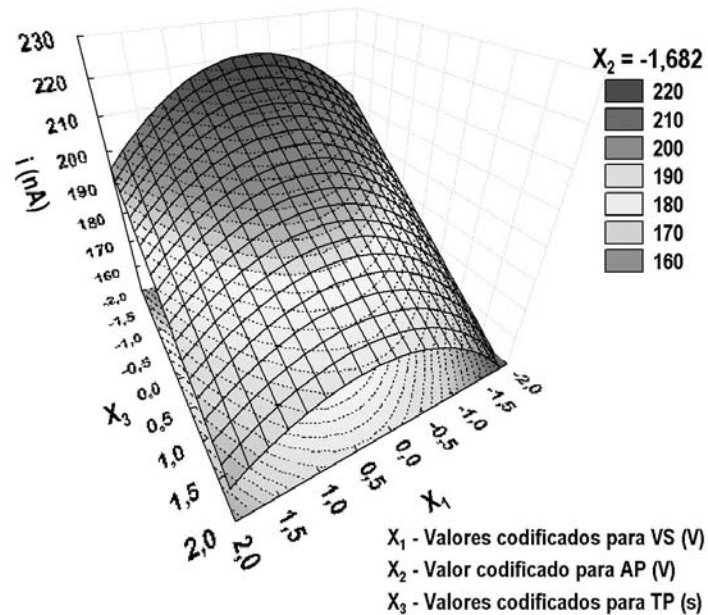


Figura 32. Superfície de resposta com a amplitude do pulso fixa em -1,682.

Quando se fixou o valor da amplitude em seu nível mais alto do planejamento obteve-se o seguinte modelo:

$$z = 504,69 + 7,27x_1 - 32,12x_3 - 5,51x_1^2 + 1,45x_1x_3$$

A superfície de resposta do modelo é apresentada na figura 33.

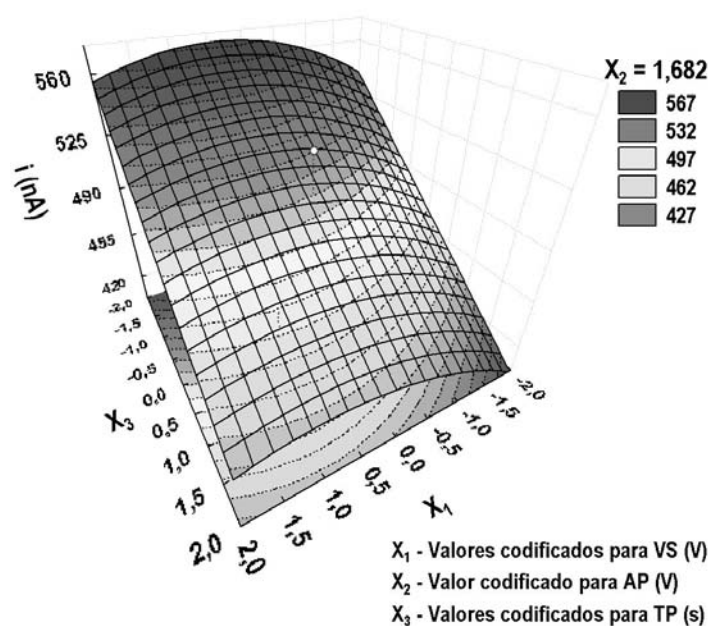


Figura 33. Superfície de resposta com a amplitude do pulso fixa em +1,682.

Quando se fixou o valor do tempo de pulso em seu nível mais baixo do planejamento obteve-se o seguinte modelo:

$$z = 403,43 + 1,76x_1 + 101,60x_2 - 5,51x_1^2 + 5,20x_2^2 + 1,82x_1x_2$$

A superfície de resposta do modelo é apresentada na figura 34.

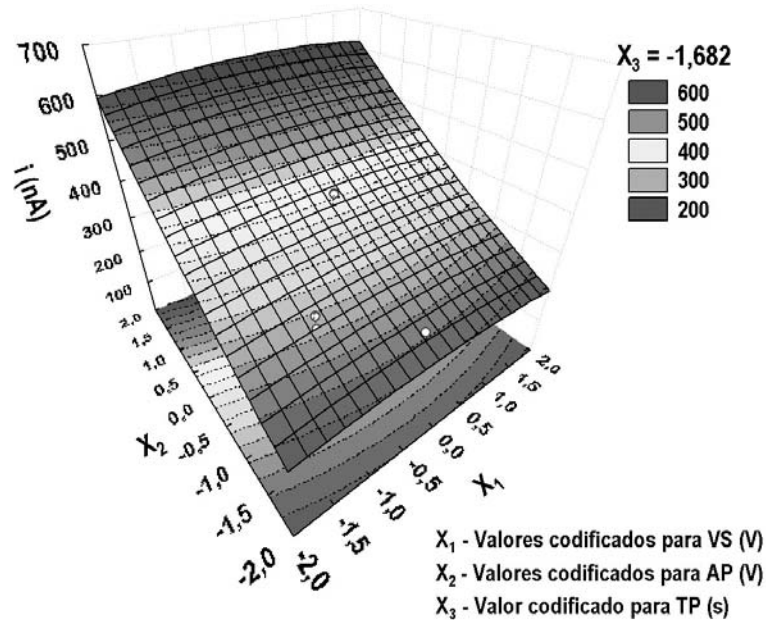


Figura 34. Superfície de resposta com o tempo de pulso fixo em -1,682.

Quando se fixou o valor do tempo de pulso em seu nível mais alto do planejamento obteve-se o seguinte modelo:

$$z = 331,04 + 6,64x_1 + 80,39x_2 - 5,51x_1^2 + 5,20x_2^2 + 1,82x_1x_2$$

A superfície de resposta do modelo é apresentada na figura 35.

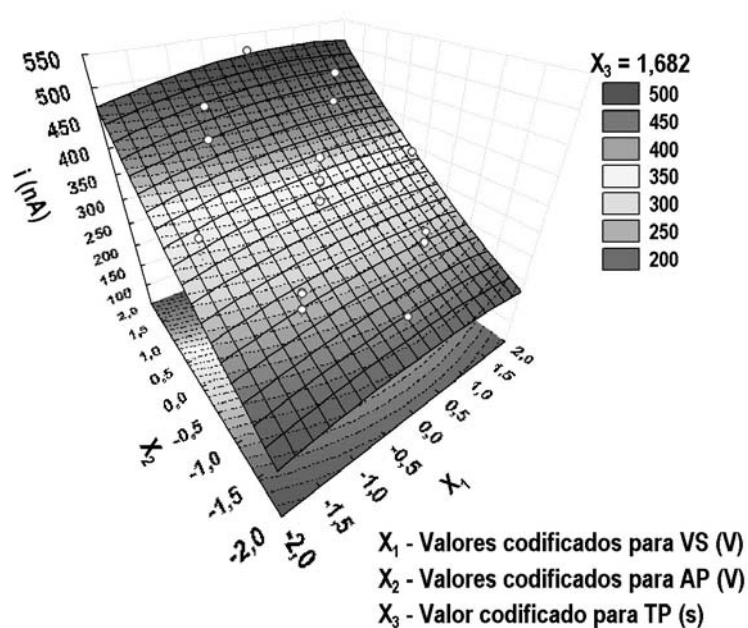


Figura 35. Superfície de resposta com o tempo de pulso fixo em +1,682.

Os resultados da superfície de resposta mostram que os fatores utilizados no planejamento são potencialmente capazes de aumentar a resposta voltamétrica nos níveis estudados.

O fator tempo de pulso mostrou em todas as superfícies que ao ser usado no nível mais baixo dos valores codificados na superfície de resposta, contribui para a maior resposta voltamétrica. O fator incremento de voltagem, de acordo com as superfícies, não apresentou grande influência sobre a resposta quando estudado em seus níveis baixo e alto dos valores codificados na superfície de resposta (Fig. 30 e 31). Entretanto, quando o fator amplitude do pulso foi fixado em seu nível mais alto (Fig. 33), o fator incremento de voltagem, em seu nível mais alto apresentou uma leve queda, ao contrário da brusca queda observada na figura 32. Portanto, o valor ótimo codificado escolhido para o fator incremento de voltagem foi 1,5.

A amplitude do pulso, em todas as superfícies, mostrou que deve ser usada em seu nível mais alto dos valores codificados para se obter a melhor resposta.

Tabela 23. Parâmetros otimizados para a análise do herbicida glifosato por voltametria com pulso diferencial

Parâmetros	Valores ótimos	Corrente estimada
Potencial Inicial	-0,50 Volt	600 nA
Potencial Final	-0,10 Volt	
Incremento de Voltagem	0,026 Volt	
Amplitude do Pulso	0,175 Volt	Corrente observada
Tempo de Pulso	0,0075 seg.	623,90 nA
Tempo do Incremento de Voltagem	0,5 seg.	
Velocidade de Varredura	0,052 Vs ⁻¹	
Área da Gota	0,60 mm ²	Erro relativo: 3,98 %
[HCl]	1,0 mol L ⁻¹	

A tabela 23 apresenta os parâmetros otimizados para o aparelho em estudo nas condições de trabalho em que foram executados, além do erro relativo referente às correntes estimada e observada nas mesmas condições estabelecidas. Assim como ocorreu para a voltametria com onda quadrada, tal erro mostra o quanto o modelo matemático foi bem ajustado ao sistema voltamétrico e o quanto foi valiosa a contribuição deste modelo para o aumento da corrente para uma mesma concentração da nitrosamina do glifosato (5,0 µg mL⁻¹) na célula voltamétrica.

4.2. APLICAÇÃO DA TÉCNICA OTIMIZADA

4.2.1. LINEARIDADE

As condições voltamétricas empregadas para o estudo da linearidade para as voltametrias com onda quadrada e pulso diferencial estão descritas nas tabelas 15 e 23, respectivamente.

4.2.1.1. Linearidade da Voltametria com Onda Quadrada

A metodologia para a determinação do glifosato utilizando a voltametria com onda quadrada foi estudada em duas porções de linearidade (Fig. 36 e 37), uma entre $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $1,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ e outra entre $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os voltamogramas obtidos para concentrações abaixo de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentaram-se mais largos que aqueles obtidos para concentrações acima deste valor. O potencial de meia onda para o glifosato, utilizando os parâmetros otimizados para a SWV (Tab. 15) foi de $-0,70 \text{ Volt}$.

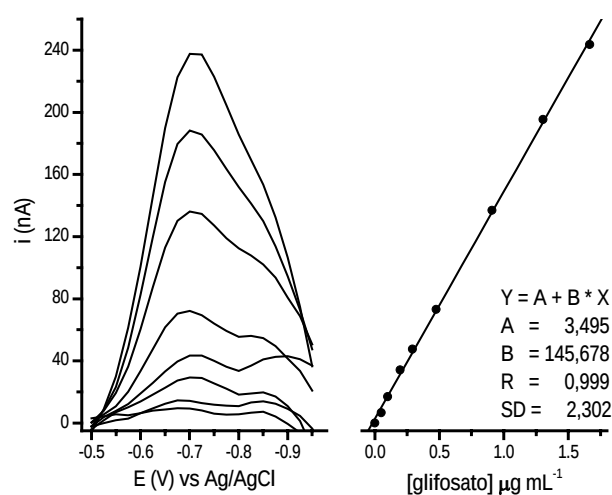


Figura 36. Curva analítica linear para a determinação do herbicida glifosato por SWV, na faixa de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $1,75 \mu\text{g mL}^{-1}$.

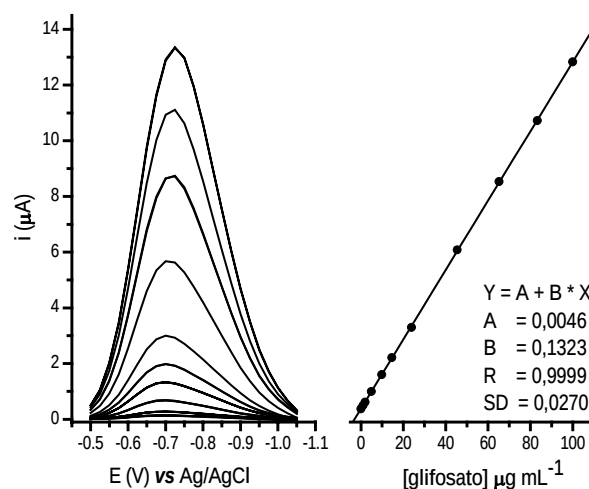


Figura 37. Curva analítica linear para a determinação do herbicida glifosato por SWV, na faixa de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.1.2. Linearidade da Voltametria com Pulso Diferencial

Como para a SWV, a metodologia para a determinação do glifosato utilizando a voltametria com pulso diferencial foi estudada em duas porções de linearidade (Fig. 38 e 39), uma entre $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $1,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ e outra entre $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os voltamogramas obtidos foram bastante simétricos para toda a faixa de concentração estudada. O potencial de meia onda para o glifosato, utilizando os parâmetros otimizados para a DPV (Tab. 23) foram de 0,65 Volt para concentrações abaixo de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e de -0,70 Volt para concentrações acima deste valor, ou seja, há um deslocamento para potenciais mais positivos quando se trabalha em concentrações muito baixa deste herbicida.

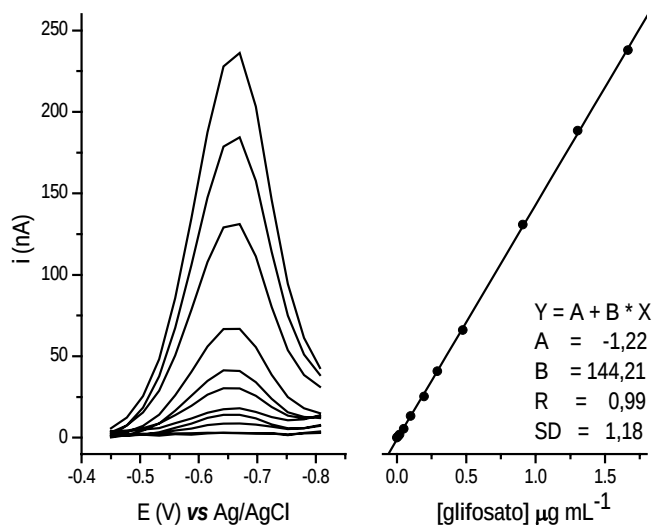


Figura 38. Curva analítica linear para a determinação do herbicida glifosato por DPV, na faixa de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $1,75 \mu\text{g mL}^{-1}$.

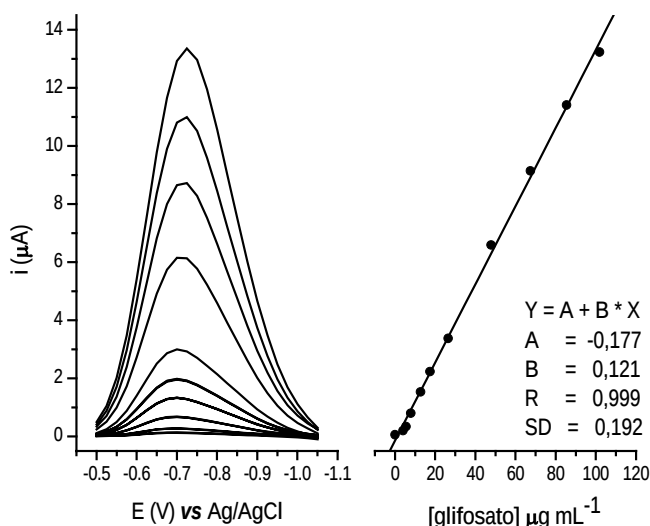


Figura 39. Curva analítica linear para a determinação do herbicida glifosato por DPV, na faixa de $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.2. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

A tabela 24 destaca as regiões de não detecção, detecção e de quantificação obtidas a partir do desvio padrão (σ), calculado sobre os valores dos potenciais medidos através das dez repetições.

Tabela 24. Estimativas das regiões de detecção e quantificação

Sinal analítico	Interpretação
$<3 \sigma$	Sinal confunde com ruído
3σ a 10σ	Região de detecção
$>10 \sigma$	Região de quantificação

Os valores dos limites de detecção e de quantificação foram obtidas respectivamente, substituindo o valor dos produtos 3σ e 10σ (item 3.2.4) na equação linear da curva analítica para baixas concentrações determinadas para cada técnica.

Tabela 25. Limites de detecção e quantificação na análise do glifosato

Técnica	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	
	LD	LQ
SWV	1,2	60,0
DPV	22,0	53,8

Os resultados apresentados na tabela 25 mostram que a metodologia sugerida para uma maior sensibilidade é a voltametria com onda quadrada, enquanto a melhor para a quantificação é voltametria com pulso diferencial. A voltametria com pulso diferencial apresentou voltamogramas mais simétricos que a voltametria com onda quadrada, principalmente a baixas concentrações, apesar de oferecer um limite de detecção menor. Entretanto, as duas técnicas mostraram-se viáveis para a determinação da nitrosamina do glifosato e de certa maneira, mais viáveis que as cromatografias líquida e gasosa, que apresentam custo e morosidade muito superior e um limite de detecção, para a grande maioria das metodologias citadas (Tab. 5, 6 e 7), na mesma ordem de grandeza ou inferior às metodologias voltamétricas otimizadas neste trabalho.

Na tabela 26 são apresentados os limites de detecção de algumas técnicas voltamétricas para simples comparação. Observa-se que, de maneira geral, o limite de detecção mais baixo esperado para as técnicas SWV e DPV, sem redissolução, está na ordem de $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Normalmente porém, técnicas de redissolução adsorbtiva (AdSV) são empregadas a sistemas reversíveis com varreduras com pulso diferencial (DPAdSV) e/ou onda quadrada (SWAdSV) encontrando-se limites na ordem de $10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$, o que não foi

possível de se obter para as análises voltamétricas otimizadas, empregas na determinação da nimensulida e da rifamicina. A determinação de *N*-nitrosaminas empregando CLAE com detector eletroquímico (DE) baseado na varredura com onda quadrada, encontrou uma sensibilidade na ordem de 10^{-7} mol L⁻¹, que está na ordem das análises realizadas com o glifosato empregando a polarografia com pulso diferencial (DPP), embora um dos trabalhos referenciados (Ref. 20) não tenha atingindo alta sensibilidade.

Este trabalho, obteve excelentes resultados, chegando a um limite de detecção, tanto para a SWV quanto para a DPV na ordem mínima divulgada pela literatura.

Tabela 26. Sensibilidades de algumas técnicas voltamétricas

Técnica voltamétrica	LD (mol L ⁻¹)	Analito	Referência
DPV e SWV	$\sim 10^{-3}$ a $\sim 10^{-8}$	Geral	114 e 143
AdSV	$\sim 10^{-7}$ a $\sim 10^{-12}$	Geral	143 e 144
DPAdSV	$1,33 \times 10^{-9}$	Nimensulida	28
DPAdSV	$3,11 \times 10^{-8}$	Rifamicina	27
SWAdSV	$1,23 \times 10^{-8}$	Rifamicina	27
CLAE-DE (SWV)	$6,0 \times 10^{-7}$	<i>N</i> -nitrosaminas	133
SWV	$4,55 \times 10^{-8}$	Picloram	145
DPP	$1,24 \times 10^{-6}$	Glifosato	20
DPP	$5,91 \times 10^{-7}$	Glifosato	73
SWV	$7,10 \times 10^{-8}$	Glifosato	Este trabalho
DPV	$13,0 \times 10^{-8}$	Glifosato	Este trabalho

4.2.3. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

A técnica escolhida para a análise das amostras foi a voltametria com pulso diferencial com as condições descritas na tabela 23, tendo em vista os resultados apresentados nos itens 4.2.1 e 4.2.2.

4.2.3.1. Amostra Referência Preparada

A amostra referência preparada, após ser percolada pela resina, foi coletada em três alíquotas: 20,0 mL, 40,0 mL e 20,0 mL, nesta ordem. Receberam, em seguida, o tratamento com carvão ativado e a alíquota de 40,0 mL foi transferido para balão de 50 mL e as de 20,0 mL para balões de 25 mL, onde receberam o tratamento de derivatização.

Dez mililitros de cada volume foram transferidos para a célula voltamétrica para serem analisados.

Apenas na alíquota de 40,0 mL foi encontrado o herbicida. E neste caso, para quantificá-lo, adicionaram-se 500 µL do padrão do glifosato de concentração igual a 100 µg mL⁻¹, ou seja, executou-se o método analítico quantitativo de adição de padrões.

Os resultados para as três repetições das amostras estão dispostos nas figuras 40,41,42.

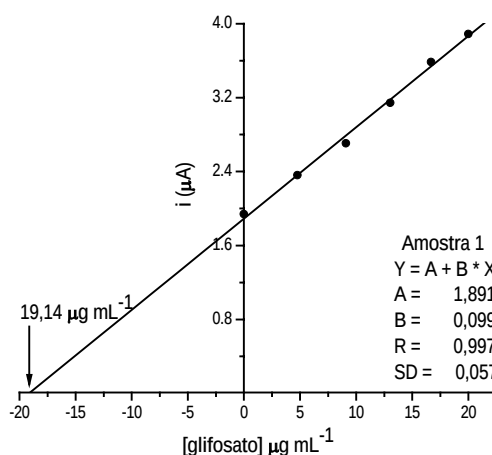


Figura 40. Análise por adição de padrão da amostra referência 1.

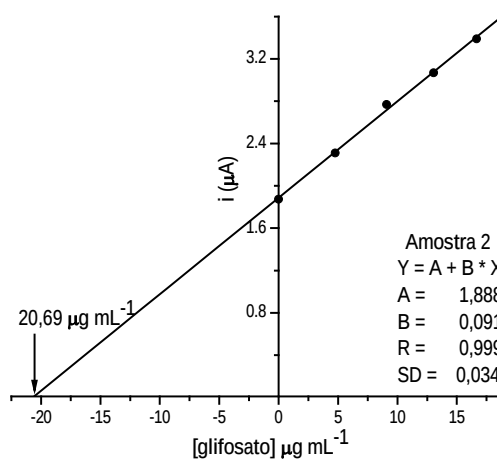


Figura 41. Análise por adição de padrão da amostra referência 2

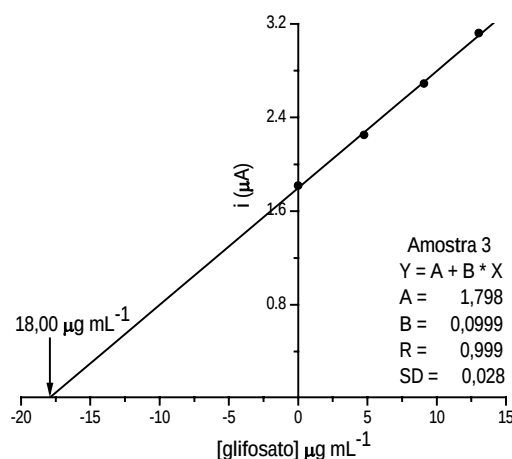


Figura 42. Análise por adição de padrão da amostra referência 3

A concentração prevista a ser encontrada na célula era de $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a concentração média encontrada foi de $19,28 \pm 1,345 \mu\text{g mL}^{-1}$. Portanto, uma recuperação de 96,4% com um erro relativo de -3,6%, o que garante um sistema de limpeza e pré-concentração bastante confiável e eficiente.

4.2.3.2. Água

Em nenhuma amostra de água natural foi encontrado o herbicida, porém o glifosato foi encontrado na amostra de água natural fortificada, além disso, como era de se esperar, apenas nas alíquotas transferidas para o balão de 50 mL foi encontrado o herbicida. E neste caso, para quantificá-lo, adicionaram-se 100 μL do padrão do glifosato de concentração igual a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados para as duas repetições das amostras estão dispostos nas figuras 43 e 44.

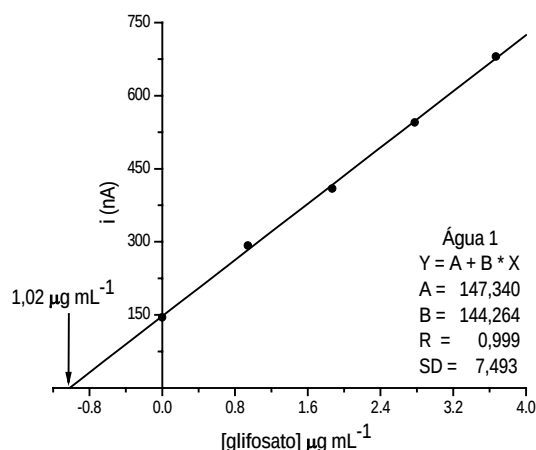


Figura 43. Análise por adição de padrão da amostra de água natural 1.

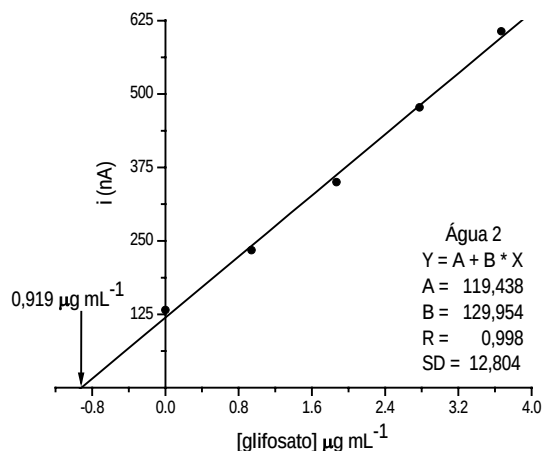


Figura 44. Análise por adição de padrão da amostra de água natural 2.

A concentração prevista para a amostra de água natural fortificada, na célula, era de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a concentração média encontrada foi de $0,97 \pm 0,07 \mu\text{g mL}^{-1}$. Portanto, uma recuperação de 97,0% com um erro relativo de -3,0%.

4.2.3.3. Vegetais

As amostras de forrageira foram nomeadas de acordo com o local onde foram coletadas, ou seja, aquelas que estavam na região próxima às palmeiras receberam o nome

de VPA e aquelas que foram coletadas próximas ao cafezal, receberam o nome de VCF. As amostras fortificadas foram nomeadas de VPAF e VCFF.

O glifosato foi encontrado novamente, apenas na amostra da alíquota de 50,0 mL. Os resultados são mostrados nas figuras 45, 46, 47 e 48.

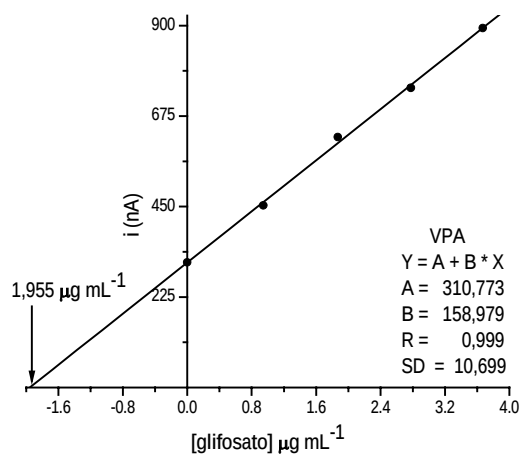


Figura 45. Análise por adição de padrão da amostra de forrageira VPA.

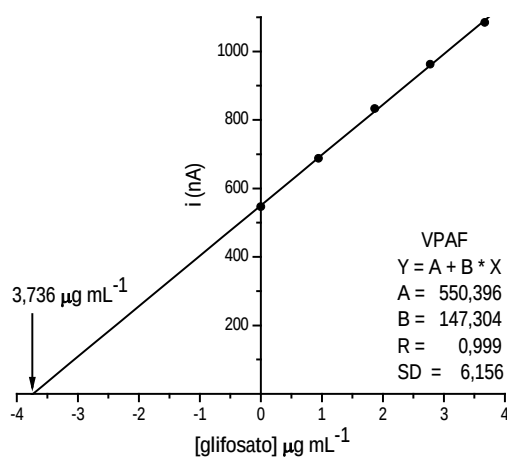


Figura 46. Análise por adição de padrão da amostra de forrageira VPA fortificada.

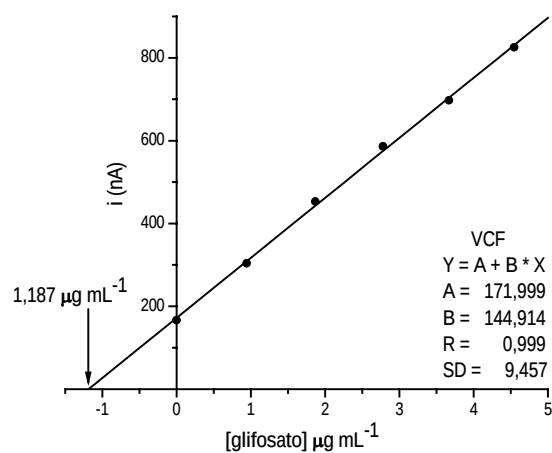


Figura 47. Análise por adição de padrão da amostra de forrageira VCF.

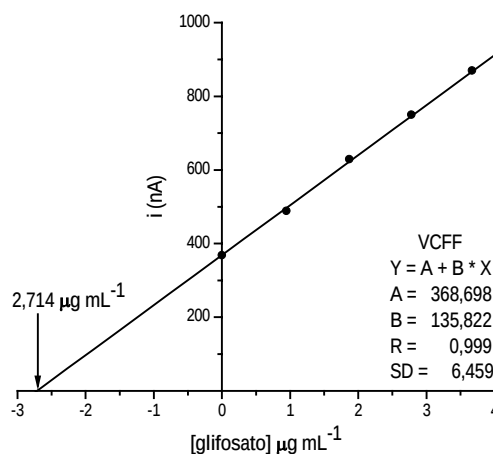


Figura 48. Análise por adição de padrão da amostra de forrageira VCF fortificada.

As amostras de forrageiras, sem fortificação, estão contaminadas. As amostras fortificadas não podem ser avaliadas quanto à recuperação, devido à presença do glifosato na amostra natural, no entanto, seus valores estão coerentes com o esperado. Se subtrairmos da concentração encontrada na amostra fortificada o valor esperado da recuperação, chegaremos a um valor próximo ao valor encontrado na amostra natural.

As concentrações de glifosato nas amostras VPA e VCF são de $3,91 \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,37 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

4.2.3.4. Solo

As amostras de solo foram nomeadas de acordo com o local onde foram coletadas. Aquelas que estavam na região próxima às palmeiras receberam o nome de SPA e aquelas que foram coletadas próximas à região ao cafezal, receberam o nome de SCF. As amostras fortificadas foram nomeadas de SPAF e SCFF.

O glifosato foi encontrado novamente, apenas na amostra da alíquota de 50,0 mL. Os resultados são mostrados nas figuras 49, 50, 51 e 52.

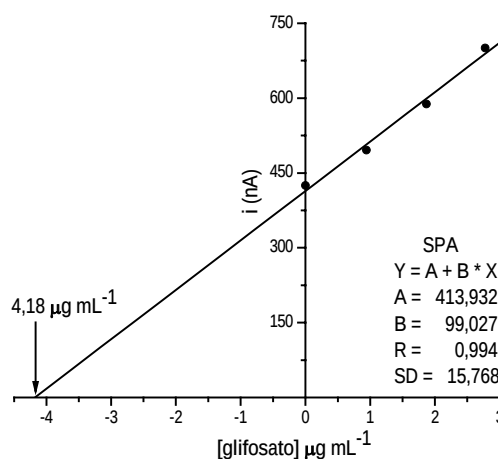


Figura 49. Análise por adição de padrão da amostra de solo SPA.

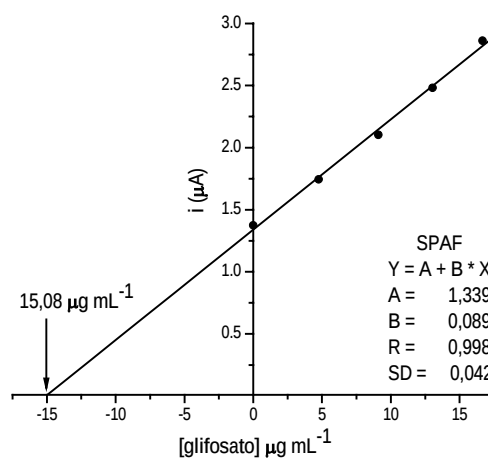


Figura 50. Análise por adição de padrão da amostra de solo SPA fortificado.

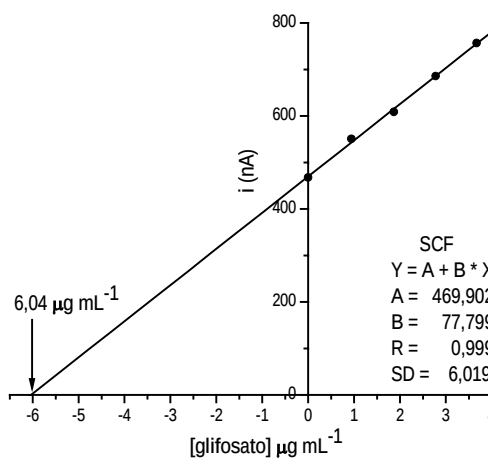


Figura 51. Análise por adição de padrão da amostra de solo SCF.

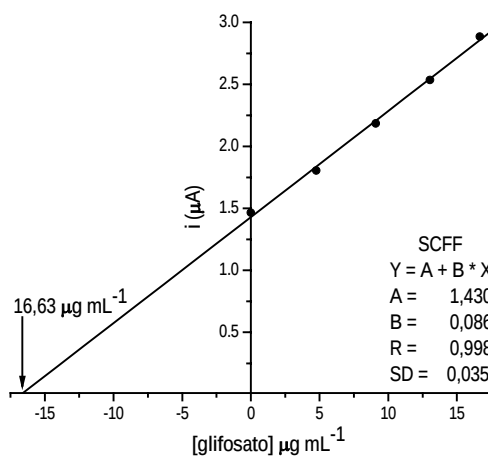


Figura 52. Análise por adição de padrão da amostra de solo SCF fortificado.

As amostras de solos, sem fortificação, estão contaminadas. As amostras fortificadas não podem ser avaliadas quanto à recuperação, devido à presença do glifosato na amostra natural, no entanto, seus valores estão coerentes com o esperado. Se subtrairmos da concentração encontrada na amostra fortificada o valor esperado da recuperação, chegaremos a um valor próximo ao valor encontrado na amostra natural.

As concentrações de glifosato nas amostras SPA e SCF são de $8,36 \mu\text{g g}^{-1}$ e $12,08 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o estudo dos parâmetros voltamétricos na determinação do herbicida glifosato, pelas voltametrias com onda quadrada e pulso diferencial, indicam que:

1. A utilização de planejamentos experimentais como ferramenta quimiométrica, tendo como objetivo a otimização dos parâmetros, foi potencialmente efetivo na melhoria da resposta e, como consequência, no aumento da sensibilidade da técnica eletroanalítica;
2. Alguns parâmetros se interagem, sejam sinergicamente, sejam antagonicamente;
3. Tanto a voltametria com onda quadrada quanto a voltametria com pulso diferencial podem ser aplicadas na análise do herbicida glifosato em solo, água e vegetais, sendo que a técnica com pulso diferencial produziu picos mais simétricos e apresentou um limite de quantificação menor que a com onda quadrada;
4. A curva analítica do glifosato é linear em uma ampla faixa de concentração;
5. A sensibilidade da técnica aumentou, ficando na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, comparável à sensibilidade cromatográfica;
6. As etapas de limpeza, pré-concentração e derivatização são mais simples e rápidas que as equivalentes, para a análise cromatográfica;
7. Os custos da instrumentação e reagentes são relativamente inferiores aos das cromatografias gasosa ou líquida de alta eficiência.

5.1. RECOMENDAÇÕES FUTURAS

Tendo em vista os resultados do estudo, recomendam-se os seguintes trabalhos:

1. A validação do método;
 2. Um estudo de planejamento com misturas para encontrar a melhor solução extratora do glifosato em solos;
 3. A substituição do eletrodo de mercúrio, por outro, como o de carbono.
 4. O estudo de uma reação de derivatização para a análise voltamétrica do AMPA.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kerney, P.C., Kaufman, D.D., *Herbicides: Chemistry, degradation and mode of action*. New York, Marcel Dekker, 1975, Vol.I.
2. Roberts, D.H.; Hutson, T.R. (Eds.) 1987. In: Tadeo, J.L.; Sanchez-Brunete, C.; Pérez, R.A.; Fernández, M.D. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*. 2000, 882, 175–191.
3. Amarante Júnior, O.P. de; Santos, T.C.R. dos, Brito, N.M.; Ribeiro, M.L., Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. *Quim. Nova*, 2002, 25(3), 420-428.
4. Amarante Júnior, O.P. de; Santos, T.C.R. dos, Brito, N.M.; Ribeiro, M.L., Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova*. 2002, 25(4), 589-593.
5. Souza, A. P. *Movimento e degradação do glyphosate e do imazapyr em solos com diferentes texturas e composição química*. Viçosa, UFV, 1998. 95p. (Tese D.S.).
6. Tadeo, J.L.; Sánchez-Brunete, C.; Pérez, R.A.; Fernández, M.D. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*. 2000, 882, 175–191.
7. Souza, A. P., Prates, H. T., Ferreira, F. A., Reis, E. L. e Jordão, C. P. Lixiviação do glyphosate e do imazapyr em solos com diferentes texturas e composição química. II. Método analítico. *Planta Daninha*. 1999, 17, 245-261.
8. Baird, D.D.; Upchurch, R.P.; Homesley, W.B.; Franz, J.E.: 1971. In: Carlisle, S.M.; Trevors, J.T. *Glyphosate in the environment. Water, air and soil pollution*. 1988, 39, 409-420.
9. Mendelson J. *Roundup, o herbicida mais vendido no mundo*. *The ecologist*, 1998, 28(5), 24-27.
10. Mídio, A.F.; Martins, D.I., *Herbicidas em alimentos*. Livraria Varela, 1ª ed. São Paulo, 1997.
11. Camargo, P.M. *Herbicidas orgânicos: Fundamentos químicos-estruturais*. Editora Manole, 1ª ed. São Paulo, 1986.
12. Morrison, M.L.; Meslow, E.C. Effects of the herbicide glyphosate on bird community structure, western Oregon. *For. Sci.*, 1984, 30, 95-97.
13. Folmar, L.C.; Sanders, H.O.; Julin, A.M.: 1979. In: Carlisle, S.M.; Trevors, J.T. *Glyphosate in the environment. Water, air and soil pollution*. 1988, 39, 409-420.
14. Rueppel, M. L.; Brightwell, B.B.; Schaeffer, J.; Marvel, J.T.: 1977. In: Carlisle, S.M.; Trevors, J.T. *Glyphosate in the environment. Water, air and soil pollution*. 1988, 39, 409-420.
15. Marsh, J. A. P.; Davies, H. A.; Grossbard, E.: 1977. In: Carlisle, S.M.; Trevors, J.T. *Glyphosate in the environment. Water, air and soil pollution*. 1988, 39, 409-420.
16. Sato, K., Jin, J., Takeuchi, T., Miwa, T., Suenami, K., Takekoshi, Y., Kanno, S. Integrated pulsed amperometric detection of glufosinate, bialaphos and glyphosate at

- gold electrodes in anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2001, 919, 313–320.
17. Zhu, Y., Zhang, F., Tong, C., Liu, W., Determination of glyphosate by ion chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1999, 850, 297–301.
18. Borjesson, E., Torstensson, L., New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. *J. Chromatogr. A*, 2000, 886, 207–216.
19. Marsh, J. *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure*. New York, John Wiley & Sons, 1992, 4^a edition.
20. Bronstad, J.O. and Friestad, H.O. Method for determination of glyphosate residues in natural waters based on polarography of the *N*-nitroso derivative. *Analyst*, 1976, 101, 820-824.
21. Smyth, W.F.; Watkiss P.; Burmicz J. S.; Hanley, H. O. A polarographic and spectral study of some C- and N- nitroso compounds. *Anal. Chem. Acta*. 1975, 78, 81-92.
22. Brezina, M; Zuman, P.: 1958a. In. Rupp, E. B. and Zuman, P., Polarographic determination of some pesticides. Application to a study of their adsorption on lignin. *J. Agric. Food chem.* 1992, 40, 2016-2021.
23. Nangniot, P.: 1970. In. Rupp, E. B. and Zuman, P., Polarographic determination of some pesticides. Application to a study of their adsorption on lignin. *J. Agric. Food chem.* 1992, 40, 2016-2021.
24. http://www.usfumigation.org/Literature/Scientific%20Papers/glyphosate_fact_sheets.htm, - Acessada em junho de 2003.
25. Rupp, E. B.; Zuman, P., Polarographic determination of some pesticides. Application to a study of their adsorption on lignin. *J. Agric. Food chem.* 1992, 40, 2016-2021.
26. Copeland, T.R., Christie, J.H., Osteryoung, R.A. and Skogerboe, R.K., Analytical Applications of pulsed voltammetric stripping at thin film mercury electrodes. *Anal. Chem.*, 1973, 45, 2171-2174.
27. Alonso, M. A.; Sanllorente, S.; Sarabia, L.A.; Arcos, M.J. Optimization of the experimental parameters in the determination of rifamycin SV by adsorptive stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta*, 2000, 405, 123-133.
28. Furlanetto, S.; Orlandini, S., Aldini, G., Gotti, R., Dreassi, E., Pinzauti, S., Designing experiments to optimise and validate the adsorptive stripping voltammetric determination of nimesulide. *Anal. Chim. Acta*, 2000, 413, 229–239.
29. Teófilo, R. F., Reis, C., Reis, E. L. e Custódio, G. Otimização da resposta voltamétrica na determinação de cobre (II) por DPASV. In: Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Uberlândia, 2000. p.105.
30. Oduoza, C.F. Simplex optimization of electroanalytical experiments. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1992, 17, 243-248.
-

31. Deuber, R., *Ciência das plantas daninhas: Fundamentos*. Jaboticabal, FUNEP. 1992, Vol.1.
 32. Grover, R., *Environmental chemistry of herbicides*. Boca Raton, CRC press, 1988, Vol.I, 207p.
 33. Franz, J. E.: 1985. In. Carlisle, S.M.; Trevors, J.T. *Glyphosate in the environment. Water, air and soil pollution*. 1988, 39, 409-420.
 34. Rubin, J.L.; Gaines, C.G.; Jensen, R.A. Glyphosate inhibition of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from suspension-cultured cells of *micotiana silvestris*. *Pl. Physiol.* 1984, 75, 839-842.
 35. Amrhein, N.; Deus, B.; Gehrke, P.; Steinrucken, H.C.: 1980. In. Carlisle, S.M.; Trevors, J.T. *Glyphosate in the environment. Water, air and soil pollution*. 1988, 39, 409-420.
 36. Sprankle, P.; Meggitt, W. F.; Penner, D. Rapid Inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.* 1975a, 23, 224-228.
 37. Clive Tomlin (Ed.). *A word compendium: The pesticide manual – Incorporating the agrochemicals handbook*. Surrey, U.K. Crop protection publications, 1994, 10^a ed.
 38. Polese, L.:2001. In. Amarante Júnior, O.P. de; Santos, T.C.R. dos, Brito, N.M.; Ribeiro, M.L., Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova*. 2002, 25(4), 589-593.
 39. Sprankle, P.; Meggitt, W. F.; Penner, D. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.* 1975b, 23, 229-234.
 40. Muir, D.C.G. Dissipation and transformations in water and sediment. In. Grover, R. and Cessna, A.J. (Eds.), *Environmental chemistry of herbicides*. Boca Raton, CRC press, 1991, Vol.2, pp. 73-75.
 41. Sprankle, P., Meggitt, W.F. and Penner, D., Absorption, action, and translocation of glyphosate. *Weed Sci.* 1975c, 23, 235-240.
 42. Barja, B.C.; Afonso, M. S., An ATR-FTIR study of glyphosate and its Fe(III) complex in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 1998, 32, 3331-3335.
 43. Ware, G.W., *The pesticide book*. San Francisco: W.H. Freeman, 1988.
 44. Newton, M., Howard, K.M., Kelpsa, B.R., Danhaus, R., Lottman, C.M., and Dubelman, S., Fate of glyphosate in an Oregon forest ecosystem, *J.Agric. Food Chem.*, 1984, 32, 1144.
 45. Morillo, E., Undabeytia T., and Maqueda C., Adsorption of glyphosate on the clay mineral montmorillonite: Effect of Cu(II) in solution and adsorbed on the mineral. *Environ. Sci. Technol.* 1997, 31, 3588-3592.
 46. Glass, R.L., Adsorption of glyphosate by soil and clay minerals, *J. Agric. Food Chem.*, 1987, 35, 497-500.
-

47. Newton, M.; Horner, L.M.; Cowell, J.E. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in North American Forests. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42(8), 1795-1802.
 48. Subramaniam, V. and Hoggard, P.E., Metal complexes of Glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* 1988, 36, 1326-1329.
 49. McBride, M.; Kung, K.: 1989. In: Barja, B.C.; Afonso, M. S., An ATR-FTIR study of glyphosate and its Fe(III) complex in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 1998, 32, 3331-3335.
 50. McConnell, J.S., Hossner, L.R., pH-Dependent adsorption isotherms of glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* 1985, 33, 1075-1078.
 51. Morillo, E., Undabeytia, T., Maqueda C., Ramos, A., Glyphosate adsorption on soils of different characteristics. Influence of copper addition, *Chemosphere*, 2000, 40, 103-107.
 52. Piccolo, A., Celano, G., and conte, P., Adsorption of Glyphosate by Humic Substances, *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2442-2446.
 53. Piccolo, A., Gatta, L., Campanella, L. Interactions of glyphosate herbicide with a humic acid and its iron complex. *Ann. Chim. (Rome)*, 1995, 85, 31-40.
 54. Rios, C., Salvado, V., Hidalgo M. Facilitated transport and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA through a solid supported liquid-membrane, *J. Membr. Sci.*, 2002, 83, 5231.
 55. Worthing, C. R.; Hance, R. J. *The Pesticide Manual. A World Compendium*, Surrey, U.K., British Crop Protection Council: Farnham, 1991. 9^a ed.
 56. EPA (Environmental Protection Agency). Glyphosate; tolerance and exemptions from tolerances for pesticide chemicals in or on raw agricultural commodities. *Fed. Regist.* 1982, 47 (241), 56136-56138.
 57. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1986.: In: Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggieri, P. and Abbondandolo, A., Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, 1957-1962
 58. Maibach, H. I. Irritation, sensitization, photoirradiation and photosensitization assay with a glyphosate herbicide. *Contact Dermatitis*. 1986, 15, 152-156.
 59. Martinez, T. T.; Brown, K. Oral and pulmonary toxicology of the surfactant used in Roundup herbicide. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1991, 34, 43-46.
 60. Sawada, Y.; Nagai, Y.; Ueyama, M.; Yamamoto, I. Probable toxicity of surface-active agent in commercial herbicide containing glyphosate. *Lancet*, 1988, 299.
 61. Baba, Y.; Takeda, M.; Yosino, K.; Sagara, E.; Tai, T.; Yamasita, M. Acute toxicity of the herbicide "Roundup" in the rat. *Jpn. J. Toxicol.* 1989, 2, 397-400.
-

62. Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggieri, P. and Abbondandolo, A., Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, 1957-1962.
 63. Yousef, M.I.; Salem, M.H.; Ibrahim, H.Z.; Helmi, S.; Seehy, M.A.; Bertheussen, K. Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. *J. Environ. Sci. Health*, 1995, B30(4), 513-534.
 64. Sullivan, T.P.; Sullivan, D.S.: 1979. In: Carlisle, S.M.; Trevors, J.T. *Glyphosate in the environment. Water, air and soil pollution*. 1988, 39, 409-420.
 65. Busse, M. D., Ratcliff, A. W., Shestak, C. J. and Powers, R. F., Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil biology & Biochemistry*, 2001, 33, 1777-1789.
 66. <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/g01.htm>, acessada em junho de 2003.
 67. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>, acessada em junho de 2003.
 68. Cowell, J.E.; Kunstman, J.L.; Nord, P.J.; Steinmetz, J.R.; Wilson, G.R. Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite: An interlaboratory study. *J. Agric. Food Chem.*, 1986, 34, 955-960.
 69. Dzygiel, P.; Wieczorek, P. Extraction of glyphosate by a supported liquid membrane technique. *J. Chromatogr. A*, 2000, 889, 93-98.
 70. Miles, C. J.; Moye, H. A., Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. *J. Agric. Food Chem.* 1988, 36, 486-491.
 71. 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. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 2751-2759.
 72. Eberbach, P.L.; Douglas, L.A., Method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil using electron capture gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1991, 39, 1776-1780.
 73. Friestad, H.O. and Bronstad, J.O. Improved polarographic method for determination of glyphosate herbicide in crops, soil and water, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1985, 68, 76-79.
 74. Albin A. J.; Smith, A. E. Extraction of [¹⁴C] glyphosate from Saskatchewan soils. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 1163-1165.
 75. Stalikas, D.C.; Konidari, C.N. Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *J. Chromatogr. A*. 2001, 907, 1-19.
 76. Marquis, J.K. General toxicology of pesticides. In: Marquis, J.K., ed. *A guide to general toxicology*. 2^a ed. Basel, Karger, 1989.
-

-
77. Guinivan, R. A.; Thompson, N. P.; Wheeler, W. B. Verification of Structures of Chloroethyl N-heptafluorobutyl derivatives of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid by chemical ionization and electron impact mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 1982, 30, 977-982.
 78. Moye, H. A.; Deyrup C. L. A Simple Single-Step Derivatization Method for the Gas Chromatographic Analysis of the Herbicide Glyphosate and Its Metabolite. *J. Agric. Food Chem.* 1984, 32, 192-195.
 79. Roy, D. N.; Konar, S. K. Development of an analytical method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid residues in soils by nitrogen-selective gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1989, 37, 441-443.
 80. Konar, S.K.; Roy, D.N. Method for the determination of residues of the herbicide glyphosate and its principal metabolite, aminomethylphosphonic acid, in plant materials by nitrogen-selective gas chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 1990, 229, 277-280.
 81. Tsunoda, N., Simultaneous determination of the herbicides glyphosate, glufosinate and bialaphos and their metabolites by capillary gas chromatography-ion-trap mass spectrometry. *J. of chromatogr.*, 1993. 637, 167-173.
 82. 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. *J. Chromatogr. A.* 1996, 726, 253-258.
 83. Royer, A.; Tabet, J.C.; Hulot, S.; Reding, M.A.; Communal P.Y. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in water by gas chromatography with tandem mass spectrometry after exchange ion resin purification and derivatization. Application on vegetable matrixes. *Anal. Chem.* 2000, 72, 3826-3832
 84. Stalikas, C. D., Pilidis, G. A. Development of a method for the simultaneous determination of phosphoric and amino acid group containing pesticides by gas chromatography with mass-selective detection optimization of the derivatization procedure using an experimental design approach. *J. Chromatogr. A*, 2000, 872, 215-225.
 85. Barker, G.C.; Jenkins, I.L., Square-Wave Polarography. *Analyst*, 1952, 77, 685-696.
 86. Barker, G.C.; Gardner, A.W., Pulse Polarography. *Z. Anal. Chem.*, 1960, 173, 79-83.
 87. Kudzin, Z. H.; Gralak, D. K.; Drabowicz, J.; Luczak, J. Novel approach for the simultaneous analysis of glyphosate and its metabolites. *J. Chromatogr. A*, 2002, 974, 129-141.
 88. Seiber, J. N., McChesney, M. M., Leavitt, R. A. Analysis of glyphosate residues in kiwi fruit and asparagus using high-performance liquid chromatography of derivatized glyphosate as a cleanup step. *J. Agric. Food Chem.* 1984, 32, 678-681.
 89. Kawai, S; Uno, B.; Tomita, M. Determination of glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid by high-performance liquid chromatography after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. *J. Chromatogr. A*, 1991, 540, 411-415.
-

90. Roseboom, H.; Berkhoff, C.J. Determination of the herbicide glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid by high-performance liquid chromatography after fluorescence labeling. *Anal. Chim. Acta*, 1960, 135, 373-377.
 91. Lundgren, L. N. A new method for the determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid residues in soils. *J. Agric. Food Chem.* 1986, 34, 535-538.
 92. Glass, R. L. Liquid chromatographic determination of glyphosate in fortified soil and water. *Anal. Chem.* 1983, 31, 280-282
 93. Archer, T. E.; Stokes, J. D. Residue analysis of glyphosate in blackberries by high-performance liquid chromatography and postcolumn reaction detection. *J. Agric. Food Chem.* 1984, 32, 586-588
 94. Ridlen J. S., Klopff, G. J., Nieman, T.A. Determination of glyphosate and related compounds using CLAE with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium (II) electrogenerated chemiluminescence detection. *Anal. Chem. Acta.* 1997, 341, 195-204.
 95. Tomita, M.; Okuyama, T.; Watanabe, S.; Uno, B.; Kawai, S. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in human serum after conversion into *p*-toluenesulphonyl derivatives. *J. Chromatogr. B*, 1991, 566, 239-243.
 96. Abdullah, M.P.; Daud, J.; Hong, K.S.; Yew, C.H. Improved method for the determination of glyphosate in water. *J. Chromatogr. A*, 1995, 697, 363-369
 97. Vreeken, R.J.; Speksnijder, P.; Bobeldijk-Pastorova, I; Noij, Th. H. M. Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1998, 794, 187-199.
 98. Hogendoorn, E.A.; Ossendrijver, F. M.; Dijkman E.; Baumann, R.A. Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 1999, 833, 67-73.
 99. Mallat, E.; Barcelo, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 1998, 823, 129-136.
 100. Lovdahl, M. J.; Pietrzyk, D. J. Liquid chromatography and postcolumn indirect detection of glyphosate. *J. Chromatogr. A*. 1992, 602, 197-204.
 101. Sancho, J.V.; Hernández, F.; López, F.J.; Hogendoorn E.A.; Dijkman, E.; Zoonen, P.v. Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1996, 737, 75-83.
 102. Moye, H. A.; Miles, C. J.; Scherer, S. J. A simplified high-performance liquid chromatographic residue procedure for the determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl)phosphonic acid in fruits and vegetables employing postcolumn fluorogenic labeling. *J. Agric. Food Chem.* 1983, 31, 69-72.
-

103. Zuman, P. Role of mercury electrodes in contemporary analytical chemistry. *Electroanal.* 2000, 12(15), 1187-1194.
 104. Lawrence, N.S.; Beckett, E. L.; Davis, J.; Compton, R. G. Advances in the voltammetric analysis of small biologically relevant compounds. *Anal. Biochem.*, 2002, 303, 1-16.
 105. Tomita, M.; Okuyama, T.; Nigo, Y.; Uno, B.; Kawai, S. Determination of glyphosate and its metabolite, (aminomethyl)phosphonic acid, in serum using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B*, 1991, 571, 324-330.
 106. Clegg, B. S.; Stephenson, G.R.; Hall, J. C. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 5031-5037.
 107. Glass, R. L. Colorimetric determination of glyphosate in water after oxidation to orthophosphate. *Anal. Chem.* 1981, 53, 921-923.
 108. Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. *Principles of instrumental analysis*. New York, Wiley, 1998, 5^oed.
 109. Smyth, W. F. *Voltammetryc determination of molecules of biological significance*. Chichester, Wiley, 1992.
 110. Stulík, K. Challenges and promises of electrochemical detection and sensing. *Electroanal.* 1999, 11(4), 1001-1004.
 111. <http://www.electrochem.net/> - acessada em junho de 2003.
 112. Zachowski, E. J.; Wojciechowskib, M.; Osteryoung, J. The analytical application of square-wave voltammetry. *Anal. Chim. Acta.* 1986, 183, 47-57.
 113. Kissinger, T.P.; Ridgway, T.H. In. *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*, New York, Marcel Dekker, Inc. 1996, 2^o ed. Edited by Peter T. Kissinger and Willian R. Heineman.
 114. EG & G Princeton applied research. *Basics of voltammetry and polarography*. Application Note P-2. 1984.
 115. Morrison, G. H. (ed.), Accuracy and precision revisited. *Anal. Chem.*, 1980, 52, 2241-2249.
 116. D.L. Massart; B.G.M. Vandegindted; S.N. Deming; Y. Michotte; L. Kaufman; *Chemometrics: a textbook*, Elsevier, NY, 1990 3^o ed., v.2.
 117. <http://www.laqua.unicamp.br/> - acessada em junho de 2003.
 118. Brown, S.D.; Bear, Jr. R.S. Chemometric techniques in electrochemistry: A critical Review. *Critical Reviews in anal. Chem.*, 1993, 24(2), 99-131.
 119. Montgomery, D. C. *Design and analysis of experiments*, John Wiley, NY, 1991, 3^o ed.
 120. Neto, B.B., Scarminio, I.S. e Bruns, R.E., *Planejamento e otimização de experimentos*, Campinas, UNICAMP, 1995.
-

121. Carlson, R., *Design and optimization in organic synthesis*, Elsevier, Amsterdam, 1992.
 122. Myers, R. H., Montgomery, D. C., *Response surface methodology*, John Wiley, NY, 1995.
 123. Havel, J., Pena, E.M., Hernandez, A. J., Doucet, J.-P., Panaye, A., Neural networks for optimization of high-performance capillary zone electrophoresis methods. A new method using a combination of experimental design and artificial neural networks. *J. Chromatogr. A*. 1998, 793, 317-329.
 124. Suliman, F.O., Sultan, S.M., Sequential injection technique employed for stoichiometric studies, optimization and quantitative determination of some fluoroquinolone antibiotics complexed with iron (III) in sulfuric acid media. *Talanta*, 1996, 43, 559-568.
 125. Olivero, R. A.; Nocerino J. M.; Deming, S. N. In. *Chemometrics in environmental chemistry*. Springer, Bayreuth (Germany), 1995, V2 part G, edited por J. Einax.
 126. Jarger, G. Herbicides. In: Buchel, K. H., (ed.). *Chemistry of pesticides*. New York, Wiley, 1983.
 127. Dalgaard-Mikkelsen, S. V.; Poulsen, E., Toxicology of herbicides. *Pharmacol. Rev.*, 1962, 14, 225-250.
 128. Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas (SINDAG): 1994. In. Mídio, A.F.; Martins, D.I., *Herbicidas em alimentos*. Livraria Varela, 1ª ed. São Paulo, 1997.
 129. Ecobichon, D. J.:1991. In. Mídio, A.F.; Martins, D.I., *Herbicidas em alimentos*. Livraria Varela, 1ª ed. São Paulo, 1997.
 130. Vohra, S. K., N-nitrosamines and differential pulse polarography. *Trends Anal. Chem.*, 1982, 1(6), 145-149.
 131. Samuelsson, R., Pulse polarographic determinations of nitrosamines: Part I. Determination of N-nitrosodiethanolamines in grindings fluids. *Anal. Chem. Acta*, 1978, 102, 133-140.
 132. Samuelsson, R., Pulse polarographic determinations of nitrosamines: Part II. Methods for determination of N-nitrosodiphenylamine and N-nitrosodibutylamine. *Anal. Chem. Acta*, 1979, 108, 213-219.
 133. Samuelsson, R.; O'Dea, J.; Osteryoung, J., Rapid scan square wave voltammetric detector for high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 1980, 52, 2215-2216.
 134. Metrodata, *Software Manual – 757 VA Computrace*, Switzerland, 1998.
 135. Site da Secretaria de agricultura, irrigação e reforma agrária do Estado da Bahia: <http://200.223.123.15/catalogo> - acessada em junho de 2003.
 136. <http://www.aenda.org.br> – acessada em junho de 2003.
 137. <http://www.inpev.org.br> – acessada em junho de 2003.
-

-
138. <http://www.epa.gov> – acessada em julho de 2003
 139. <http://www.epa.gov/OGWDW/dwh/tsoc/glyphosa.html>– acessada em julho de 2003
 140. California EPA. *Public health goal for glyphosate in drinking water*. Pesticide and environmental toxicology section, office of environmental health hazard assessment, California Environmental Protection Agency, 1997.
 141. Vieira, P.F; Ribeiro, M.A. *Ecologia humana, ética e educação: a mensagem de Pierre Dansereau*. Editora Pallotti, Porto Alegre, 1999.
 142. Wauchope, D. Acid dissociation constants of arsenic acid, methylarsonic acid (MAA), dimethylarsinic acid (cacodylic acid), and N-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate). *J. Agric. Food Chem.*, 1976, 24 (4), 717-721.
 143. Barek, J.; Fogg A.G.; Muck, A.; Zima, J. Polarography and voltammetry at mercury electrodes. *Critical Reviews in Anal. Chem.*, 2001, 31(4), 291-309.
 144. EG & G Princeton applied research. *Adsorptive stripping voltammetry*. Application Note A-7. 1985.
 145. Massaroppi, M.R.C.; Machado, S.A.S.; Avaca, L.A. Eletroanalytical determination of the herbicide picloram in natural waters by square wave voltammetry. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003, 14(1), 113-119.
-

APÊNDICE

A. APÊNDICE

A1- CÁLCULO DOS EFEITOS

Os coeficientes de contraste para o fatorial 2^5 (Tab. A1.1) foram convertidos à matriz $[X]$ (32×32) conforme tabela A1.2. A matriz $[X]$ foi transposta $[X']$ (32×32) e multiplicada pela matriz de respostas $[Y]$ (32×1), que são os resultados obtidos pelos experimentos do planejamento para a SWV e DPV, que estão nas tabelas 9 e 18, respectivamente. A matriz obtida $[A]$ (32×1) teve seu primeiro termo dividido por 32 (2^5) e os termos restantes dividido por 16 (2^{5-1}). Obtiveram-se portanto, as matrizes dos efeitos para os planejamentos da SWV e da DPV quando utilizado as respostas de cada experimento.

Tabela A1.1. Planejamento fatorial 2^5

1	2	3	4	5
-	-	-	-	-
+	-	-	-	-
-	+	-	-	-
+	+	-	-	-
-	-	+	-	-
+	-	+	-	-
-	+	+	-	-
+	+	+	-	-
-	-	-	+	-
+	-	-	+	-
-	+	-	+	-
+	+	-	+	-
-	-	+	+	-
+	-	+	+	-
-	+	+	+	-
+	+	+	+	-
-	-	-	-	+
+	-	-	-	+
-	+	-	-	+
+	+	-	-	+
-	-	+	-	+
+	-	+	-	+
-	+	+	-	+
+	+	+	-	+
-	-	-	+	+
+	-	-	+	+
-	+	-	+	+
+	+	-	+	+
-	-	+	+	+
+	-	+	+	+
-	+	+	+	+
+	+	+	+	+

A1.1. CÁLCULO DOS ERROS DOS EFEITOS

Cada ensaio para os dois planejamentos fatoriais (SWV e DPV) foram realizados três vezes e por isso fornece uma estimativa da variância com dois graus de liberdade. Em um caso como este, em que o número de repetições é o mesmo em todos os ensaios, a estimativa da variância experimental é simplesmente a média aritmética das variâncias observadas nos ensaios individuais. No caso geral, se cada ensaio for repetido n_i vezes e houver m ensaios diferentes, a estimativa conjunta da variância experimental será dada por

$$s^2 = \frac{v_1 S_1 + v_2 S_2 + \dots + v_m S_m}{v_1 + v_2 + \dots + v_m}$$

Onde $v_i = n_i - 1$ é o número de graus de liberdade de s_i^2 , a estimativa da variância do i -ésimo ensaio.

Cada um dos efeitos calculados nas equações é uma combinação linear de 32 valores $\bar{y}_i$, com coeficientes a_i iguais a $+1/2$ ou $-1/2$. Se admitirmos que, graças à autenticidade das repetições e à aleatoriedade da ordem de realização dos ensaios, esses valores são independentes e também de mesma variância σ_y^2 , podemos aplicar a equação,

$\sigma_y^2 = \sum_i a_i^2 \sigma_i^2$, com $a_i^2 = 1/4$, para calcular a variância de um efeito:

$$V(\text{efeito}) = \frac{4}{N} s_y^2, \text{ onde } N \text{ é igual a } 64, \text{ número total de ensaios.}$$

O erro padrão de um efeito é calculado por,

$$s(\text{efeito}) = \sqrt{\frac{4}{N} s_y^2}. \text{ O erro da média é calculado como sendo metade deste valor.}$$

Para saber se os efeitos são significativamente diferentes de zero, empregou-se o teste t . O valor da relação t é igual ao valor do efeito dividido pelo seu erro. Os valores encontrados, quando maiores que o nível de confiança do teste, indicam a significância do efeito.

A2. CÁLCULO DOS COEFICIENTES

A partir do planejamento CCD (Tab. A2.1), obtém-se a matriz de coeficientes de contrastes $[X]$, conforme tabela A2.2.

O algoritmo utilizado para o cálculo dos coeficientes foi: $b = [(X'X)]^{-1}X'Y$. Onde $[X']$ (10x18) é a transposta da matriz $[X]$ (18x10) e $[Y]$ (18x1) é a matriz de resposta para cada planejamento, encontrada nas tabelas 12 e 21 para os planejamentos das SWV e DPV,

respectivamente. O termo $[(X'X)]^{-1}$, é a matriz inversa do produto das matrizes $[X']$ e $[X]$. O resultado obtido é a matriz $[b]$ (10x1), que contém os coeficientes do modelo.

Tabela A2.1. Planejamento CCD

1	2	3
-1	-1	-1
1	-1	-1
-1	1	-1
1	1	-1
-1	-1	1
1	-1	1
-1	1	1
1	1	1
$-\alpha$	0	0
α	0	0
0	$-\alpha$	0
0	α	0
0	0	$-\alpha$
0	0	α
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0

Tabela A2.2. Coeficientes de contraste para o planejamento CCD

Média	1	2	3	11	22	33	12	13	23
1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1
1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1
1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1
1	1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1
1	1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1
1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	$-\alpha$	0	0	$-\alpha^*-\alpha$	0	0	0	0	0
1	α	0	0	$\alpha^*\alpha$	0	0	0	0	0
1	0	$-\alpha$	0	0	$-\alpha^*-\alpha$	0	0	0	0
1	0	α	0	0	$\alpha^*\alpha$	0	0	0	0
1	0	0	$-\alpha$	0	0	$-\alpha^*-\alpha$	0	0	0
1	0	0	α	0	0	$\alpha^*\alpha$	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A2.1. CÁLCULO DOS ERROS DOS COEFICIENTES

Os erros dos coeficientes foram determinados através da raiz quadrada do produto dos termos da diagonal da matriz $[X'X]^{-1}$, multiplicada pela variância das repetições no ponto

central do planejamento 'var(rep)', ou seja: $\sqrt{\text{diag}[(X'X)^{-1}]\text{var(rep)}}$. A diagonal da matriz $[X'X]^{-1}$ é uma matriz 10x1.

Para saber se os coeficientes são significativamente diferentes de zero, empregou-se o teste t. O valor da relação t é igual ao valor do coeficiente dividido pelo seu erro. Os valores encontrados, quando maiores que o nível de confiança do teste, indicam a significância do efeito.

A2.2. AJUSTE DOS COEFICIENTES SIGNIFICATIVOS

Os coeficientes significativos podem ser recalculados para serem ajustados mais corretamente ao modelo, para isto, basta eliminar na matriz de coeficientes de contraste (Tab.A2.2) os termos que não foram significativos e realizar, novamente os cálculos dos coeficientes e erros. Note que a matriz de resposta [Y], permanece a mesma.