



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**DETERMINAÇÃO DO PESTICIDA GLIFOSATO
EM SISTEMAS DE ÁGUAS NATURAIS:**

“Estudo de viabilidade da aplicação de um método de análise por
GC-MS”

(dissertação para a obtenção do grau de mestre em Química –
Especialização em Química Analítica e Ambiental)

ZÉLIA DE JESUS RODRIGUES RAMOS ROSÃO

FARO
2005

3554 T.

10 05 06 166088

543

ROS + Det

1

NOME: ZÉLIA DE JESUS RODRIGUES RAMOS ROSÃO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E DE BIOQUÍMICA DA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

ORIENTADORA: DOUTORA MARIA DA CONCEIÇÃO
DOMINGUES AMADO MATEUS

DATA: DEZEMBRO DE 2005

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

DETERMINAÇÃO DO PESTICIDA GLIFOSATO EM SISTEMAS DE
ÁGUAS NATURAIS: “Estudo de viabilidade de aplicação de um
método de análise por GC-MS”

JÚRI:

PRESIDENTE: DOUTOR JOÃO CARLOS PEREIRA PERES
BRANDÃO

VOGAIS:

DOUTOR JOSÉ MANUEL FLORÊNCIO NOGUEIRA
DOUTORA MARIA DA CONCEIÇÃO DOMINGUES AMADO
MATEUS
DOUTORA ISABEL MARIA PALMA ANTUNES CAVACO

Agradecimentos

Agradeço em especial à Professora Doutora Conceição Mateus, o apoio, coordenação e apreciação crítica da dissertação (Professora, obrigada por tudo, em particular pela sua presença constante).

Agradeço ao meu tio Eduardo a paciência, amizade e mão de obra na feitura dos blocos de alumínio utilizados na derivatização (Tio, tu és o maior).

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão as palavras e gestos de incentivo em todos os momentos da minha vida (Gosto muito de vocês).

Agradeço ao Fernando, ao Pedro Guerreiro e à Bertina toda a disponibilidade demonstrada mais do que uma vez. (Com amigos como vocês é mais fácil fazer uma tese)

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram sempre comigo (Não posso deixar de referir a Ana Cristina, a Ana Paula, a Bete, o João e o Pedro Rego)

Agradeço também ao meu querido, ao meu fofinho, ao meu mais que tudo, a ajuda preciosa na recta final desta dissertação (Vitor, eu Amo-te).

Agradeço por fim a todos os que merecem ser agradecidos, esperando, assim, não me ter esquecido de ninguém.

Bem hajam.

Resumo

No presente trabalho adaptou-se um método já descrito na literatura para determinar a presença de glifosato e do seu metabolito (ácido aminometilfosfónico) em sistemas de águas naturais. O método consistiu: i) na preparação de padrões de glifosato, e de ácido aminometilfosfónico, de diferentes concentrações conhecidas (0,44 µg/L, 1,11 µg/L, 1,55 µg/L e 2,22 µg/L); ii) na derivatização dos padrões de trabalho diário, dentro de vials, por forma a obter derivados voláteis de glifosato e de ácido aminometilfosfónico, para possibilitar a análise mediante cromatografia de fase gasosa; iii) na injeção de volumes iguais de diferentes concentrações mássicas dos derivados no cromatógrafo de fase gasosa para a obtenção das rectas de calibração. Para o ácido aminometilfosfónico foi observada uma elevada dispersão e uma fraca repetibilidade no traçado da recta de calibração. Para o glifosato também se observou alguma dispersão, mas em menor escala quando comparado com o metabolito, tendo-se obtido em alguns casos (dias) uma linearidade razoável (coeficientes de correlação entre $r^2=0,90$ e $r^2=0,992$). Efectuaram-se quatro ensaios de recuperação com amostras de concentração conhecida tendo-se obtido uma recuperação média de 80 ± 14 %. Foi realizado um estudo das incertezas associadas ao método aplicado tendo-se obtido uma incerteza relativa para a concentração da amostra que varia entre 16 % e 53 %. A incerteza padrão combinada foi calculada com recurso à média do valor de concentração obtida nos quatro ensaios de recuperação divididos pelo factor de recuperação médio, para um nível de confiança de 68 %, tendo-se obtido os valores de $0,10 \pm 0,02$ µg/L e de $0,10 \pm 0,05$ µg/L. Os limites de detecção e quantificação também foram calculados e os valores obtidos variaram para o caso do limite de detecção entre 0,27 e 0,99 µg/L ($k=3$) e para o limite de quantificação entre 0,90 e 3,30 µg/L ($k=10$). Por último, recolheu-se água em dois locais distintos, uma ribeira que passa por zonas agrícolas e um poço alimentado por uma ribeira, e não se obteve pico para o tempo de retenção relativo ao glifosato. Uma vez que o número de ensaios em sistemas naturais foram reduzidos, dois para cada local, consideraram-se estes resultados apenas como indicativos.

Palavras chave: Glifosato; Ácido Aminometilfosfónico; Pesticidas; Cromatografia de Fase Gasosa; Água.

Abstract

In this thesis a method already described in the scientific literature was adapted to determine the presence of glyphosate and its metabolite (aminomethylphosphonic acid) in natural water systems. The method consisted of: i) preparation of standard solutions of glyphosate and aminomethylphosphonic acid, of different known concentrations (0,44 µg/L, 1,11 µg/L, 1,55 µg/L e 2,22 µg/L); ii) derivatization of daily work standard solutions, in vials, in order to obtain volatiles derivatives of glyphosate and aminomethylphosphonic acid, to allow the analysis through gaseous chromatography; iii) injection of the derivatives of equal volumes and different mass concentrations in the gaseous chromatograph to obtain calibration curves. It was observed a high dispersion for the aminomethylphosphonic acid and a weak repeatability in calibration curves. It was also observed some dispersion but to a lesser extent for the glyphosate when compared to the metabolite, obtaining in certain cases (days) a reasonable linearity with linear coefficients between $r^2=0,90$ and $r^2=0,992$. Four recuperation tests were done with samples of known concentration, obtaining an average recuperation of 80 ± 14 %. It was performed an uncertainty test associated with the applied method, obtaining a relative uncertainty that varies from 16 % to 53 %. As an example the value of the expand uncertainty was calculated and set equal to $0,10 \pm 0,02$ µg/L and $0,10 \pm 0,05$ µg/L for the confidence level of 68 %. LOD = 0,27 to 0,99 µg/L ($k = 3$) and LOQ = 0,90 to 3,30 µg/L ($k=10$). Finally, water was collected from two different locations, a stream that goes through an agriculture area and a well fed by a stream, and it wasn't obtained the peak for the glyphosate retention time. Since the number of samples in natural systems was reduced, two for each location, these results are only considered to be indicative.

Key words: Glyphosate; AminomethylPhosphonic Acid; Pesticides; Gas Chromatography; Water.

Índice Geral

1. Introdução.....	1
1.1. Pesticidas	2
1.2. Glifosato	5
1.3. Análise do glifosato na literatura.....	9
1.4. Cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massa.....	18
1.4.1. Detectores.....	31
1.4.2. Quantificação.....	34
1.5. Incertezas	36
1.6. Limites de detecção e de quantificação.....	44
2. Materiais e Métodos.....	46
2.1. Problemas detectados e procedimentos adoptados	47
2.2. Instrumentação	54
2.3. Reagentes, e preparação de soluções	55
2.4. Preparação das soluções padrão	56
2.5. Ensaio de recuperação e análise de amostras de água	59
2.6. Derivatização.....	60
2.7. Análise GC.....	63
3. Resultados e discussão	65
3.1. Rectas de calibração	66
3.2. Ensaio de recuperação	75
3.3. Incertezas e limites de detecção e quantificação.....	78
3.3.1. Cálculo das Incertezas.....	79
3.3.1.1. Cálculo da incerteza da concentração obtida da recta de calibração.....	80
3.3.1.1.1. Cálculo $u(\text{padrão})$	80
3.3.1.1.2. Cálculo $u(\text{cal})$	85
3.3.1.2. Cálculo da incerteza associada ao factor de diluição	87
3.3.1.3. Cálculo da incerteza associada ao factor de recuperação	88
3.3.2. Limites de detecção e quantificação.....	90
3.4. Concentrações desconhecidas	92
4. Conclusões.....	97
4.1.1. Sugestões de trabalho futuro.....	98
5. Bibliografia	100

Índice de Figuras

Figura 1 – Fórmulas de estrutura do GLI (I) e do AAMF (II)	5
Figura 2 – Biodegradação do glifosato.....	9
Figura 3 – Afinidade com a fase estacionária dos diferentes analitos de uma amostra	19
Figura 4 – Exemplos de alguns cromatogramas obtidos por cromatografia de fase gasosa.....	20
Figura 5 – Esquema de um cromatógrafo de fase gasosa	21
Figura 6 – Cromatograma que ilustra tempo morto, t_M , e tempo de retenção, t_R	22
Figura 7 – Cálculo experimental da altura de um prato.....	25
Figura 8 – Cálculo gráfico do prato teórico.....	26
Figura 9 – Ilustração gráfica das variáveis de resolução	27
Figura 10 – Desenho esquemático das colunas de enchimento e capilares.....	30
Figura 11 – Fórmula estrutural de fases estacionárias.....	30
Figura 12 – Exemplo de cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM, do GLI, ilustrando o ruído ..	48
Figura 13 – Exemplo de cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM, AAMF, ilustrando a elevada abundância de um dos picos	48
Figura 14 – <i>Vials</i> , tampas e septos respectivos.....	49
Figura 15 – <i>Vial</i> de cor âmbar	50
Figura 16 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM, exemplificativo de derivatização efectuada no mesmo dia do padrão, do GLI que aparece com o tempo de retenção de 5,234 min.	51
Figura 17 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM, exemplificativo de derivatização efectuada uma semana depois do padrão, do GLI que aparece com o tempo de retenção de 5,234 min.	51
Figura 18 – Recipientes utilizados na preparação dos padrões diários.....	52

Figura 19 – Bloco de alumínio	53
Figura 20 – Cromatógrafo Gasoso	54
Figura 21 – Detector de espectroscopia de massa	54
Figura 22 – Vial de 4 mL com tampa	56
Figura 23 – Esquema de Preparação das soluções padrão	58
Figura 24 – Montagem para evaporação da amostra	59
Figura 25 – Esquema de preparação da amostra para derivatização	60
Figura 26 – Bloco de alumínio maciço	61
Figura 27 – Sistema multi saídas	62
Figura 28 – Fluxo de azoto	62
Figura 29 – Reacções de derivatização do GLI e do AAMF	66
Figura 30 – Análise espectral de massa por EI e estruturas para o derivado do GLI (A) e do AAMF (B)	67
Figura 31 – Gráficos das rectas de calibração obtidas para cada uma das 8 experiências com o AAMF	69
Figura 32 – Gráficos das rectas de calibração obtidas para cada uma das 8 experiências com o GLI	70
Figura 33 – Gráfico da recta de calibração para todas as 8 experiências com o AAMF	71
Figura 34 – Gráfico da recta de calibração para todas as 8 experiências com o GLI	71
Figura 35 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 0,44 µg/L correspondente à experiência 2 com tempo de retenção de 6,459 min.	73
Figura 36 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 1,11 µg/L correspondente à experiência 2 com tempo de retenção de 6,458 min.	73
Figura 37 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 1,55 µg/L correspondente à experiência 2 com tempo de retenção de 6,455 min.	74
Figura 38 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 2,22 µg/L correspondente à experiência 2 com tempo de retenção de 6,454 min.	74
Figura 39 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 0,44 µg/L correspondente ao Ensaio 2 com tempo de retenção de 7,914 min.	76
Figura 40 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para a amostra de concentração conhecida, 0,89 µg/L, correspondente ao Ensaio 2 com tempo de retenção de 7,903 min.	76
Figura 41 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 1,11 µg/L correspondente ao Ensaio 2 com tempo de retenção de 7,905 min.	77
Figura 42 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 1,55 µg/L correspondente ao Ensaio 2 com tempo de retenção de 7,903 min.	77
Figura 43 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 2,22 µg/L correspondente ao Ensaio 2 com tempo de retenção de 7,912 min.	78
Figura 44 – Gráfico da recta de calibração para amostras de concentração desconhecida	93
Figura 45 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o branco com tempo de retenção de 4,901 min que é o tempo de retenção do GLI.	94
Figura 46 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para a amostra de água de concentração desconhecida proveniente do Poço (ensaio I).	94
Figura 47 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para a amostra de água de concentração desconhecida proveniente do Poço (ensaio II).	95
Figura 48 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para a amostra de água de concentração desconhecida proveniente da Ribeira (ensaio I).	95
Figura 49 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para a amostra de água de concentração desconhecida proveniente da Ribeira (ensaio II).	96
Figura 50 – Gráficos das rectas de calibração obtidas para cada uma das 8 experiências com o AAMF	117
Figura 51 – Gráficos das rectas de calibração obtidas para cada uma das 8 experiências com o GLI	121
Figura 52 – Cromatograma relativo a uma injeção de solvente (acetato de etilo).	122
Figura 53 – Cromatograma para o branco tempo de retenção de 4,901 min que é o tempo de retenção do glifosato.	123
Figura 54 – Cromatograma para a concentração do padrão de 0,44 µg/L com tempo de retenção de 4,950 min.	124
Figura 55 – Cromatograma para a concentração do padrão de 1,11 µg/L com tempo de retenção de 4,904 min.	124
Figura 56 – Cromatograma para a concentração do padrão de 1,55 µg/L com tempo de retenção de 4,975 min.	125

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Propriedades físicas e químicas do glifosato	7
Tabela 2 – Produtos comerciais com base em glifosato	7
Tabela 3 – Extracção do GLI e do AAMF em amostras de água.....	10
Tabela 4 – Determinação do GLI e do AAMF por HPLC em matrizes aquosas	12
Tabela 5 – Determinação do GLI e do AAMF por HPLC em matrizes não aquosas	14
Tabela 6 – Determinação do GLI e do AAMF por GC em matrizes aquosas.....	16
Tabela 7 – Determinação do GLI e do AAMF por GC em matrizes não aquosas	17
Tabela 8: Rectas de calibração associadas aos ensaios de recuperação, respectivos valores do factor e da %de recuperação e valor da média de recuperação e respectivo desvio padrão	75
Tabela 9 – Valores das quatro concentrações dos padrões utilizados no traçado da recta de calibração. .	82
Tabela 10 – Valores da fontes de incerteza, respectiva incerteza padrão e incerteza relativa para o GLI e para o AAMF	84
Tabela 11 – Valores de concentração dos padrões, x_i , da respectiva área, y_i , respectivos valores médios, declive, m , e ordenada na origem, b , da recta de calibração, desvio padrão residual, $S_{y/x}$, e desvio padrão estimado, S_{x_0} , para uma concentração (EXP7)	85
Tabela 12 – Valores de concentração dos padrões, x_i , da respectiva área, y_i , respectivos valores médios, declive, m , e ordenada na origem, b , da recta de calibração, desvio padrão residual, $S_{y/x}$, e desvio padrão estimado, S_{x_0} , para uma concentração (EXP6).....	86
Tabela 13 – Valores da incerteza e da incerteza relativa para a concentração obtida da recta de calibração para a EXP7 e EXP6	86
Tabela 14 – Valores dos volumes, respectivos volumes e incertezas padrão, valor do factor de diluição e respectiva incerteza relativa	87
Tabela 15 – Valores das incertezas que se alteram com a utilização de uma pipeta Gilson P100 na medição dos volumes até 100 μ L.	89
Tabela 16 – Valores para a concentração da amostra apresentados com a respectiva incerteza padrão combinada.....	89
Tabela 17 – Valores dos limites de detecção e de quantificação para a EXP7 e para a EXP6.....	91
Tabela 18 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas obtidos por GC-MS em modo SIM, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato.....	93
Tabela 19 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP01.....	107
Tabela 20 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP02.....	108
Tabela 21 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP03.....	108
Tabela 22 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP04.....	108
Tabela 23 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP05.....	109
Tabela 24 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP06.....	109
Tabela 25 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP07.....	109
Tabela 26 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido amino metil fosfónico-EXP08.....	110
Tabela 27 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP01.....	111
Tabela 28 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP02.....	111
Tabela 29 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP03.....	111
Tabela 30 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP04.....	112
Tabela 31 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP05.....	112
Tabela 32 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP06.....	112

Determinação do Pesticida Glifosato em Sistemas de Águas Naturais

Tabela 33 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP07.....	113
Tabela 34 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP08.....	113
Tabela 35 – Valores relativos aos ensaios de recuperação.	122

1. Introdução

Apesar do mundo conter uma população humana em crescimento desenfreado, os valores veiculados pela carta dos direitos humanos fazem com que os seus apologistas continuem a tentar desenvolver formas de melhorar a qualidade e esperança de vida da espécie.

Tem-se verificado, ao longo da história da humanidade, que soluções milagrosas para a resolução desse eterno desiderato têm muitas vezes efeitos antagónicos a longo prazo.

Integra-se nesse quadro dicotómico a problemática dos pesticidas:

- por um lado permitem uma maior qualidade e esperança de vida, através da eliminação de pragas;
- por outro lado podem pôr em causa a sobrevivência da espécie, não só devido à sua toxicidade como também devido ao verificado aumento da resistência das pragas.

Interessa, assim, desenvolver metodologias científicas que permitam, por um lado, detectar a presença de pesticidas em diferentes sistemas e, por outro lado, estabelecer relações dose/efeito fundamentadas. Só assim se poderão estabelecer regras eficazes em que prevaleça o bom senso.

Pretende a presente dissertação, na linha de valores e preocupações da generalidade da comunidade científica actual, dar um pequeno contributo para a detecção, em sistemas de águas naturais, de um dos pesticidas mais utilizados a nível mundial [1-7], o glifosato (GLI), e do seu metabolito¹, o ácido aminometilfosfónico (AAMF), mediante

¹ Metabolito é o composto intermediário numa reacção.

o desenvolvimento de uma metodologia específica, baseada na Cromatografia de fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS).

1.1. Pesticidas

Entende-se por pesticidas, os produtos químicos destinados a matar, repelir, atrair ou impedir o crescimento de pragas no seu sentido mais amplo, ou seja, organismos nocivos que transmitem doenças, competem por alimento e/ou danificam bens económicos e culturas. O seu uso generalizado remonta à década de 1940, com a glorificação mundial do DDT (Dicloro-Difenil-Triclorometilmetano), por se ter revelado, durante a Segunda Guerra Mundial, a arma mais eficaz no combate às doenças transmitidas pelos insectos, em especial a Tifo (bastante usual em cenários de pós guerra ou de pós catástrofes), o que levou à atribuição do prémio Nobel da Fisiologia e Medicina, em 1948, ao descobridor do DDT, o Suíço Paul Müller [8].

Enquanto foi utilizado, o DDT salvou cerca de 25 milhões de vidas (segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, OMS [9]), e, em conjunto com outros pesticidas entretanto desenvolvidos, como os organoclorados, os organofosforados e os carbamatos, contribuiu para o aumento em mais de 30 % [10] da produção agrícola mundial.

Em 1962, Rachel Cason alertou, no seu livro *Silent Spring*, que os pesticidas e em especial o DDT, estavam a envenenar a vida selvagem e o ambiente, e a colocar em perigo a saúde humana, pois os insectos desenvolviam resistências que obrigavam à aplicação progressiva de maiores doses de DDT, e a sua fácil solubilização em solventes orgânicos, fazia com que ficasse depositado nos tecidos adiposos dos mamíferos, sendo

metabolizado lentamente com um tempo de meia-vida², $t_{1/2}$, de cerca de 8 anos, o que implicava a possibilidade de acumulação em quantidades elevadas com consequências muitas nocivas, inclusive para a saúde humana. Tais argumentos despertaram na opinião pública um espírito crítico nunca vistos, o que levou à criação dos modernos movimentos ambientalistas e à abolição imponderada do DDT. No Sri Lanka, por exemplo, o uso do DDT, através da pulverização nas casas dos residentes em áreas de risco, reduziu o número de casos de malária de cerca de 3 milhões, em 1948, para 17 casos, em 1963, e, após a abolição em 1964 do uso do DDT, o número de casos voltou a atingir cerca de 3 milhões em 1969 [9]. Pese embora o referido, o comércio dos pesticidas continua em crescimento [7], pois têm sido aperfeiçoados, não só no sentido de uma menor nocividade como também no sentido do alargamento do leque de aplicações: para além dos insecticidas orgânicos, existem hoje em dia herbicidas orgânicos, fungicidas orgânicos, nematocidas orgânicos, acaricidas orgânicos, algicidas orgânicos, rodenticidas orgânicos, controladores orgânicos de secreções viscosas, produtos afins nomeadamente, reguladores de crescimento, e seus metabolitos, produtos de degradação e de reacção importantes [11].

Continua a existir, actualmente, muita controvérsia relativamente aos efeitos tóxicos dos pesticidas nos seres humanos, mesmo quando consumidos em baixas doses, pelo que se têm tentado criar alternativas ao uso dos pesticidas, sobretudo na agricultura, designadamente através da produção de alimentos transgénicos, resistentes por si só a algumas pragas, os quais têm sido alvo de idêntica controvérsia. Uma vez que os alimentos transgénicos não impedem o crescimento de ervas daninhas, o seu advento não implicou a redução dos herbicidas.

² Tempo de meia vida, $t_{1/2}$, corresponde ao tempo necessário para que a concentração de uma substância diminua para metade do seu valor inicial.

A preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos por pesticidas tem crescido no meio científico. Esta preocupação aumenta, principalmente, quando a água é usada para o consumo humano. No Jornal Oficial das Comunidades Europeias, na Directiva 98/83/CE do Conselho de 3 de Novembro de 1998 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, estabelece-se 0,1 µg/L [11] para a concentração máxima admissível de qualquer pesticida individual (excepção feita à aldrina, dialdrina, heptacloro e epóxido de heptacloro cujo valor é 0,03 µg/L [11]) em águas destinadas para o consumo humano, considerando também os seus metabolitos, produtos de degradação e de reacção importantes. Esta mesma directiva estabelece também um valor de pesticida total³ igual a 0,5 µg/L [11]. Estes limites têm sido motivo de questionamento uma vez que não consideram a toxicidade de cada produto, e ainda, as metodologias analíticas disponíveis para alguns compostos não atingem limites de detecção desta ordem de grandeza. Por outro lado a Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelecem níveis máximos para pesticidas individuais em água destinada ao consumo humano, baseados em estudos toxicológicos e epidemiológicos. É importante enfatizar que existe, ainda hoje, muita controvérsia em relação aos efeitos tóxicos crónicos dos pesticidas para o ser humano, principalmente quando consumidos em baixas doses ao longo de toda uma vida. Tal controvérsia indicia a premente necessidade de desenvolvimento de estudos sobre a presença de resíduos no ambiente e seus efeitos sobre a saúde [12].

³ Pesticida Total significa a soma de todos os pesticidas detectados e quantificados no processo de controlo.

glifosato no solo o que indica um potencial mínimo para a contaminação das águas subterrâneas. Mas o glifosato pode, no entanto, entrar nas águas superficiais e subsuperficiais devido ao uso directo perto de ambientes aquáticos, devido a escorrências (perdas acidentais) ou fugas (resíduos após lavagem) das aplicações terrestres. Mais ainda, existe a possibilidade de contaminação aquática por arraste via água ou ar durante as aplicações agrícolas. Dependendo, dos sólidos em suspensão e da actividade microbiana da água corrente, o glifosato pode ser transportado vários quilómetros a jusante do local onde foi pulverizado. Não se espera que o glifosato se acumule na cadeia alimentar devido à sua alta solubilidade na água e ao seu carácter iónico. No entanto, foram detectados resíduos de glifosato em peixes, crustáceos e moluscos após exposição a água contendo glifosato [13].

A pureza do glifosato de qualidade técnica pode ser superior a 90 %. Este é um pó cristalino branco e inodoro com uma massa específica de 1,704, uma pressão de vapor muito baixa e uma alta solubilidade em água. O glifosato é anfotérico e pode-se encontrar formando diversos compostos iónicos, em função do pH do meio [14].

Em Portugal são comercializados três tipos de glifosato [17]: sal de amónio, sal de isopropilamonio e sal de trimetilsulfónio. O glifosato é um herbicida organofosforado que não afecta o sistema nervoso da mesma maneira que outros organofosforados (em geral insecticidas, inibidores da enzima colinesterase).

Apresenta-se, na Tabela 1, as propriedades físicas e químicas do glifosato [18].

⁵ Kow é a razão da concentração de uma substância química em octanol e água em equilíbrio a uma temperatura específica. Este parâmetro é usado em muitos estudos ambientais para ajudar na

Tabela 1 – Propriedades físicas e químicas do glifosato

		Notas
Estado Físico	Pó cristalino	
Cor	Branco	
Cheiro	Nenhum	
Ponto de fusão ^a	184,5°C	
Ponto de ebulição	n.a.	decompõe-se a 187°C
Massa molar	169,1 g/mol	
Densidade ^b	1,704	20°C
Pressão de vapor	1×10 ⁻⁵ Pa	25°C
Solubilidade em água ^{a,d}	10,1 g/L	20°C
Lei Henry constante	7×10 ⁻¹¹	
(log K _{ow}) ^c	-2,8	
Tensão superficial ^c	0,072 N/m	0,5% (w/v) a aprox. 25°C
Valores de pKa ^{c,e}	0,8; 2,16; 5,46; 10,14	[7]
Absortividade molar ^b	0,086 L/mol por cm	a 295 nm
Inflamabilidade ^c	não inflamável	
Explosividade ^c	não explosivo	
pH ^c	2,5	1% solução

^a pureza 96%^b pureza 100%^c pureza não mencionada^d para o glifosato puro foi mencionada uma solubilidade em água de 11 600 mg/L a 25 °C^e ácido livre

n. a. = não aplicável

O glifosato aplica-se em numerosas culturas com as diferentes formulações comerciais constantes na Tabela 2 [19].

Tabela 2 – Produtos comerciais com base em glifosato

Nome Comercial	Empresa
BUGGY	INAGRA
COSMIC	AGRIPRAZA
ERRANCA	HERBEX
GLIFOS	CHEMINOVA
GLYPHOGAN480 SL	MAKHTESHIM-AGAN
MONTANA	SAPEC
ROUNDUP	AGROQUISA
ROUNDUP	SAPEC
ROUNDUP 360	MONSANTO
ROUNDUP SEC	MONSANTO
ROUNDUP ULTRA	BAYER

determinação do destino das substâncias químicas no ambiente.

Em diversos tipos de cultivo, o glifosato costuma ser pulverizado sendo, em geral, absorvido na planta (erva daninha) através das suas folhas e dos caulículos novos. O herbicida é, então, transportado por toda a planta, actuando nos vários sistemas enzimáticos, inibindo o metabolismo de aminoácidos. As plantas pulverizadas com glifosato morrem lentamente, em poucos dias ou semanas e, devido ao transporte por todo o sistema, nenhuma parte da planta sobrevive [7].

Produtos com base em glifosato estão autorizados em Portugal para as culturas de arroz, faveira, amendoeira, aveleira, bananeira, damasqueiro, cerejeira, citrinos, macieira, oliveira, pereira, pessegueiro, cereais (pré sementeira), ornamentais (arbustos, árvores e sebes), pousio, renovação de pastagens, terrenos não cultivados, valas, canais e vinha [19].

As mais importantes vias de dissipação do glifosato após a sua aplicação, são a formação na água de complexos com iões, por exemplo com o Ca^{2+} e com o Mg^{2+} , a adsorção ao sedimento, a fixação nas plantas e a biodegradação, conforme foi referido na página 11 e se ilustra na Figura 2 [18]. O glifosato apresenta tempos de meia vida, $t_{1/2}$, na água que oscilam entre vários dias e mais de 91 dias. Está provado que se deposita em especial nas partículas de sedimento [14].

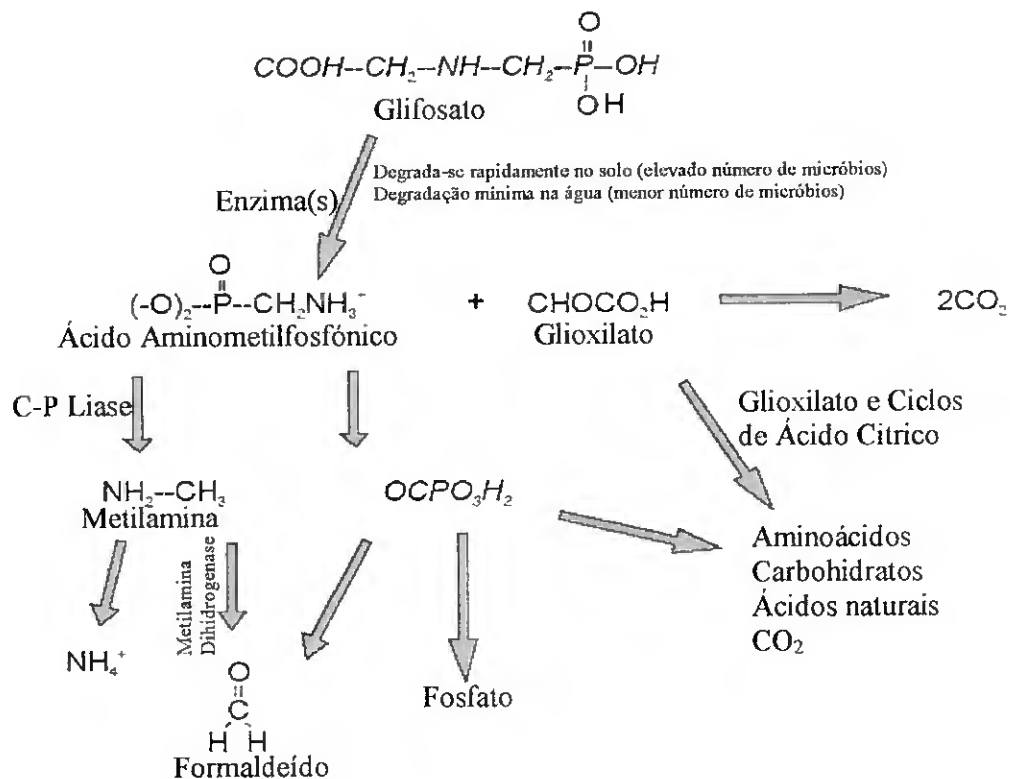


Figura 2 – Biodegradação do glifosato

Em função da ampla utilização do glifosato em todo o mundo, o desenvolvimento de métodos de extração e análise que permitam a detecção e quantificação do herbicida em amostras naturais são de grande importância.

1.3. Análise do glifosato na literatura

Apresenta-se, em seguida, resumo dos resultados da pesquisa bibliográfica efectuada, no que concerne à extração do glifosato em amostras de água e aos métodos de análise baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia de fase gasosa (GC).

O glifosato é um composto polar, e os valores de pK encontrados na literatura [7] são: $pK_1=0,8$; $pK_2=2,16$; $pK_3=5,46$; $pK_4=10,14$. As extracções do glifosato e do seu principal metabolito em amostras de água são feitas, em geral, utilizando-se resinas de permuta iónica ou, ainda, utilizando derivatização prévia e transformação em compostos apolares que podem ser, em função do agente derivatizante, extraídos com maior facilidade. Nalguns estudos, nas amostras de águas filtradas, é feito apenas o ajuste de pH, seguido de evaporação.

A Tabela 3 apresenta métodos de extracção do glifosato e do ácido aminometilfosfónico em amostras de água [1].

Tabela 3 – Extracção do GLI e do AAMF em amostras de água

Extracção	Purificação	Recuperação	Ref.
Triclorometano (extracção dos interferentes e eliminação da fase orgânica)	Resina de permuta catiónica (Fe^{3+}) seguida de permuta aniónica (Cl)	80,9 % (GLI) 79,2 % (AAMF)	[20]
Diclorometano (extracção de interferentes)	Resina de permuta aniónica (AG 1-X8)	89,3 % (GLI) 86,3 % (AAMF)	[21]
Diclorometano (extracção de interferentes)	Resina de permuta aniónica (OH)	~85 % (GLI)	[22]
Extracção em fase sólida EFS	Resina de permuta aniónica (OH)	67-81 % (GLI)	[23]
Extracção em fase sólida EFS (após derivatização)	não indicado	> 94 % (GLI)	[24]
Extracção em fase sólida EFS	Resina de permuta catiónica e aniónica	não especificado	[2]

A polaridade da molécula do glifosato e do seu metabolito tem levado ao desenvolvimento de muitos métodos de análise baseados em cromatografia líquida de alta eficiência, de modo que a maioria das investigações relatadas na literatura para este

herbicida referem-se a esta técnica analítica. A dificuldade desta análise prende-se com a forma de detecção dos compostos, visto que ambos não possuem grupos cromóforos que possam ser detectados directamente por detectores colorimétricos ou de UV, acima de 200 nm. É necessário, portanto, o uso de reacções de derivatização, geralmente pós-coluna, a fim de se obter um derivado que responda a estes detectores.

A Tabela 4 apresenta métodos de determinação do GLI e do AAMF por HPLC em matrizes aquosas e na Tabela 5 para matrizes não aquosas (solo, frutos e vegetais).

A técnica de cromatografia de fase gasosa é a segunda mais amplamente empregue para a determinação do glifosato. Para a determinação do herbicida por cromatografia de fase gasosa, faz-se necessariamente uma derivatização prévia para a obtenção de um composto volátil.

A Tabela 6 [1, 25] apresenta métodos de determinação de GLI e de AAMF por cromatografia de fase gasosa para matrizes aquosas e na Tabela 7 [1, 25] em matrizes não aquosas (solo, plantas e frutos).

Existem métodos baseados noutras técnicas, além das cromatográficas, que têm sido desenvolvidos para a determinação do glifosato e do seu principal metabolito, embora ainda sejam de pouca utilização. Estas técnicas incluem ressonância magnética nuclear de fósforo 31 (RMN³¹P), espectrofotometria, polarografia e electroforese [1].

Tabela 4 – Determinação do GLI e do AAMF por HPLC em matrizes aquosas

Detecção	Condições analíticas	Reagente de derivatização	Tempo de retenção (min)	Limite de detecção	Ref.
ECL	Coluna: 250×4,1mm I.D., PRP-X100 permuta aniônica FM: solução de Ru(tris-(2,2'-bipiridil) ₃ ²⁺ em acetonitrilo-0,01M fosfato, pH 9,8 (1:9) Fluxo: 1 mL/min Derivatização pós-coluna	Tris(2,2'-bipiridil)rutenio II	19,3 (GLI)	0,1 µM (GLI)	[26]
FL (263nm, 317nm)	Coluna: 240×4,1mm I.D., PRP-X400 permuta catiônica FM: KH ₂ PO ₄ 0,005M em 4% MeOH, pH 2,1 Fluxo: 0,5 mL/min Derivatização pós-coluna	Hipoclorito, o-ftalaldeído, Mercaptoetanol	13 (GLI) 17 (AAMF)	2µg/L (GLI e AAMF)	[22]
MS	Coluna: 250×4,6mm I.D., Inertsil ODS-2 FM: acetato de amônia 5mM-acetonitrilo (90:10) (46:54) em 20min Fluxo: 1 mL/min Derivatização pré-coluna	Cloreto de 9-fluorenil metoxicarbonil	13,2 (GLI) 18 (AAMF)	0,1µg/L (GLI e AAMF)	[24]
FL (340nm, 455nm)	Coluna: 300×4,6mm I.D., Animex A-9 FM: KH ₂ PO ₄ 0,005M em 4% MeOH, pH 1,9 Fluxo: 0,5 mL/min Derivatização pós-coluna	Hipoclorito, o-ftalaldeído, Mercaptoetanol	não indicado	0,05mg/kg (GLI e AAMF)	[20]
FL (263nm, 317nm)	Coluna: 30×4,6mm I.D., Spherisorb ODS-2 (C-1) e, 250×4,6mm I.D., Adsorbosphere NH ₂ (C-2) FM: fosfato 0,05M, pH 5,5-acetonitrilo (65:35, v/v)	Cloreto de p-toluenosulfonilo	7,9 (GLI) 18,6 (AAMF)	0,1µg/L (GLI e AAMF)	[27]

Detecção	Condições analíticas	Reagente de derivatização	Tempo de retenção (min)	Limite de detecção	Ref.
	Fluxo: 1 mL/min Derivatização pré-coluna				
FL (330nm, 465nm)	Coluna: 150×4mm I.D., permuta catiónica, K ⁺ FM: KH ₂ PO ₄ 0,005 M, pH 2-2,5% KOH (100:0, v/v) 15min-(0:100) 17 min Fluxo: não indicado Derivatização pós-coluna	o-ftalaldeido, Mercaptoetanol	6,8 (GLI) 12 (AAMF)	2µg/L (GLI) 4µg/L (AAMF)	[28]
UV (254nm)	Coluna: C18 FM: acetoneitrilo em tampão acetato e ACN/água/MeOH Fluxo: 0,7 mL/min Derivatização pré-coluna	MeOH/fenilsocianato /trietilamina/água (7:1:1:1)	-	-	[29]
MS	Coluna: Troca aniónica FM: solução de Na ₂ CO ₃ e NaHCO ₃ (pH 10,3; isocrática) ou de Na ₂ CO ₃ e NaHCO ₃ (pH 10,3) (eluyente A) e os mesmos sais em pH 10,08 (gradiente) Fluxo: não indicado	-	7 (GLI) 12 (AAMF)	0,05µg/mL	[30]
FL (270nm, 315nm)	Coluna: 0,4×25cm µNH ₂ FM: 75% (v/v) mistura de KH ₂ PO ₄ 0,05M (pH 6 com KOH) em acetoneitrilo Fluxo: 1mL/min Derivatização pré-coluna	9-fluorenilmetil cloroformato	-	10ng/mL (GLI) 5ng/mL (AAMF)	[31]

ECL – Quimiluminescência em inglês *Electrogenerated chemiluminescence*;

FL – Fluorescência;

C-1 – Coluna 1; C-2 – Coluna 2

MS – Espectrometria de massa;

FM – Fase móvel.

Tabela 5 – Determinação do GLI e do AAMF por HPLC em matrizes não aquosas

Amostra	Deteção	Condições analíticas	Reagente de derivatização	Tempo de retenção (min)	Limite de deteção	Ref.
Roundup	UV (195 nm)	Coluna: 25cm×4,6mm I.D. Partisil-10 SAX FM: tampão fosfato 0,0062 M (pH 1,9); Fluxo: 2,3 mL/min	-	-	-	[32]
Solo	VIS (405nm)	Coluna: 100×0,8mm I.D., Mova-Pak C18 FM: brometo de tetraetilamónia 0,02 M e tampão NaH ₂ PO ₄ 0,05 M (pH 3,2) – acetoneitrilo (5:1) 5 min e (1:5) 8 min Fluxo: 1 mL/min Derivatização pré-coluna	1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno/ etanol/ NaBH ₄	5,8 (GLI) 10,1 (AAMF)	0,05mg/kg (GLI) 0,1mgkg (AAMF)	[33]
Solo	VIS (570nm)	Coluna: 10×0,46cm I.D., Aminex A-9 permuta catiónica FM: tampão fosfato (pH 1,9) Fluxo: 0,5 mL/min Derivatização pós-coluna	Ninidrina	-	0,01µg/g ^a 0,10 µg/g	[34]
Solo	FL (270nm, 315nm)	Coluna: 0,4×25cm µNH ₂ (Alltech) FM: 75 % (v/v) de KH ₂ PO ₄ 0,05 M (pH 6 com KOH) e acetoneitrilo Fluxo: 0,5 mL/min Derivatização pré coluna	9-fluorenilmetil cloroformato	-	-	[35]
Solo	FL (400nm, 480nm)	Coluna: 150cm×4,1mm I.D. PRP-X100 (C1) ou 250cm×4,1mm I.D. PRP-X400 (C2) FM: NaNO ₃ 25 mM (pH 9,5) (C1) ou HNO ₃ 10 mM (pH 2,0)(C2) Fluxo: 1 mL/min (C1) ou 0,5 mL/min (C2)	AL ³⁺ -morin	24,7 (GLI) 7 (AAMF) ou 9,2 (GLI)		[36]

Amostra	Deteção	Condições analíticas	Reagente de derivatização	Tempo de retenção (min)	Limite de deteção	Ref.
		Derivatização pós-coluna		18,5 (AAMF)		
Frutos Vegetais	DFC	Coluna: 25cmx4,6mm I.D. Partisil-10 SAX FM: solução de Na ₂ CO ₃ e NaHCO ₃ (pH 10,30) ou de Na ₂ CO ₃ e NaHCO ₃ (pH 10,30) (eluente A) e os mesmos sais em pH 10,08 (gradiente) Fluxo: 1mL/min Derivatização pré coluna	TFAA / diazometano		0,10 ppm	[37]

FL – Fluorescência;
 UV – Ultra violeta,
 VIS – Visível;
 DFC – Detector fotométrico de chama;
 FM – Fase móvel;
 TFAA – Ácido trifluoracético anidro.

Tabela 6 – Determinação do GLI e do AAMF por GC em matrizes aquosas

Detecção	Condições analíticas	Reagente de derivatização	Tempo de retenção (min)	Limite de detecção	Ref.
DFC	Coluna: 1,8m×2mm I.D., Ultra-Bond SE-20	N-metil-N-(t-butildimetilsilil)-trifluoroacetoamina	4,0 (GLI)	-	[38]
	Tc: 200°C para GLI Tc: 170°C para AAMF		3,1 (AAMF)		
MS	Coluna: 30m×0,24mm I.D. (0,25µm), DB-1	N-metil-N-(t-butildimetilsilil)-trifluoroacetoamina	11,9 (GLI)	-	[39]
	Tc: 100°C – 8°C/min – 300°C (5min)		9,8 (AAMF)		
MS (EI)	Coluna: 30m×0,25mm I.D. (0,25µm), Durabond 5,625	TFAA-HBF	6,2 (GLI)	0,01mg/kg (GLI e AAMF)	[40]
MS (CI)	Tc: 90°C (2min) – 30°C/min – 290°C (3min)		5,3 (AAMF)		
DFC	Coluna: 15m×0,53mm I.D. (1,0µm), DB-17	Cloroformato de isopropil diazometano	5,8 (GLI)	0,8mg/kg (GLI) 1,2mg/kg (AAMF)	[41]
	Tc: 170°C – 10°C/min – 270°C		3,5 (AAMF)		
MS (EI)	Coluna: 30m×0,25mm I.D. (0,25µm), OV-5	Ácido acético – trimetil o-acetato	26,8 (GLI)	0,65µg/L (GLI) 0,29µg/L (AAMF)	[42]
	Tc: 60°C (2min) – 5°C/min – 180°C – 15°C/min – 280°C (5min)		16 (AAMF)		
MS (EI)	Coluna: 30m×0,32mm I.D. (0,25µm), HP5-MS	TFAA-TFE	5,09 (GLI)	0,05µg/L (GLI e AAMF)	[2]
	Tc: 70°C (2min) – 30°C/min – 170°C – 120°C/min – 270°C		4,2 (AAMF)		

DFC – Detector fotométrico de chama;
MS – Espectrometria massa;
TFAA – Ácido trifluoroacético anidro;
TFE – Trifluoretanol;
HBF – 2,2,3,3,4,4,4-heptafluor-1-butanol;
Tc – Temperatura coluna;
CI – Ionização química;
EI – Ionização por impacto de electrões.

Tabela 7 – Determinação do GLI e do AAMF por GC em matrizes não aquosas

Amostra	Deteção	Condições analíticas	Reagente de derivatização	Tempo de retenção (min)	Limite de deteção	Ref.
Solo	MS	Coluna: 30m×0,25mm I.D. (0,50 µm), XTI-5 Tc: 90 °C (1,5 min) – 30 °C/min – 300 °C (4 min) ou 60 °C (1,5 min) – 10°C/min – 120 °C (1 min) – 30 °C/min – 300 °C (4 min)	TFAA-HBF	-	não indicado	[43]
Solo	DNP	Coluna: 1,8×2mm I.D., Ultra-Bond SE-20 Tc: 150 °C	TFAA-TFE	11 (GLI) 8 (AAMF)	0,05mg/kg (GLI) 0,01mgkg (AAMF)	[44]
Solos	DCE	Coluna: 2,2m×4,4mm I.D., 1,5 % OV-17+1,95 % QF1 Chromosorb WHP Tc: 160 °C	TFAA-TFE	4,6 (GLI) 2,8 (AAMF)	-	[45]
Plantas	DNP	Coluna: 1,8×2mm I.D., Ultra-Bond SE-20 Tc: 200 °C (GLI) Tc: 200 °C (AAMF)	TFAA-TFE	10 (GLI) 6,3 (AAMF)	0,03mg/kg (GLI) 0,01mgkg (AAMF)	[46]
Frutos	DCE MS (EI)	Coluna: 3,27×4mm I.D., 10% DC-200 Gas-Chroma Q Tc: 220 °C	Tricloreto de boro – 2-cloroetanol – HFBA	14,3 (GLI) 2,6 (AAMF)	-	[47]

HBF – 2,2,3,3,4,4,4-heptafluor-1-butanol;

DNP – Detector azoto/fosfóro;

MS – Espectrometria massa;

TFAA – Ácido trifluoracético anidro; TFE – Trifluoretanol; HFBA – Heptafluorobutírico anidro

Tc – Temperatura coluna

DCE – Detector de captura de electrões; EI – ionização por impacto de electrões.

1.4. Cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massa

A cromatografia de fase gasosa é uma técnica de separação que utiliza um grupo diversificado de métodos para separar componentes em misturas complexas. Durante a separação cromatográfica gasosa, a amostra é transportada via um gás inerte a que se dá o nome de fase móvel. A fase móvel arrasta a amostra através de uma coluna tubular enrolada onde o analito interage com o material denominado por fase estacionária. Para a separação ocorrer, a fase estacionária deve ter alguma afinidade para os analitos existentes na amostra. A fase móvel, ao contrário da fase estacionária é inerte e não interage quimicamente com os analitos. A única função da fase móvel é arrastar a mistura ao longo de toda a coluna [48].

A fase estacionária é escolhida de forma que os componentes da amostra se distribuam entre a fase móvel e a fase estacionária em diferentes graus. Os componentes que são mais retidos pela fase estacionária movem-se lentamente relativamente ao fluxo da fase móvel. Em contrapartida, os componentes que têm uma menor afinidade para a fase estacionária atravessam a coluna mais rapidamente. Como consequência das diferentes mobilidades, os componentes da amostra são separados em bandas discretas que podem ser analisadas qualitativamente e/ou quantitativamente. A cromatografia de fase gasosa é a técnica cromatográfica mais utilizada em análises ambientais. Na Figura 3 representa-se esquematicamente as diferentes afinidades dos analitos de uma amostra ao longo da coluna [49].

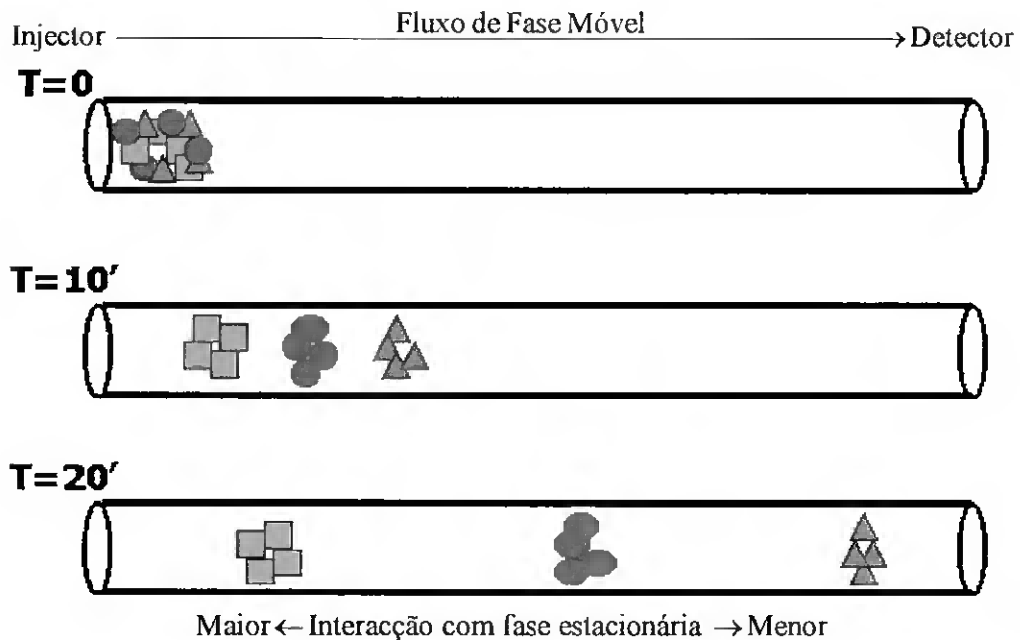


Figura 3 – Afinidade com a fase estacionária dos diferentes analitos de uma amostra

Os componentes da mistura são arrastados pela fase móvel até ao detector. O detector gera um sinal eléctrico mensurável, referido como pico, que é proporcional à quantidade de analito presente. A resposta do detector é transposta como uma função do tempo que cada analito leva desde a injeção até ao detector. Ao resultado obtido chama-se cromatograma. Apresenta-se, na Figura 4 [50], exemplos de vários cromatogramas obtidos por cromatografia de fase gasosa.

Os principais componentes de um sistema cromatográfico são a câmara de injeção, a coluna, o forno, o detector e o sistema de aquisição de dados. A amostra, líquida ou gasosa, é introduzida na câmara de injeção que é atravessada pelo gás de arrastamento (fase móvel), mediante uma agulha que se espeta num septo de borracha. A câmara de injeção é aquecida a uma temperatura superior à do ponto de ebulição do componente

menos volátil, de modo a que a sua vaporização seja instantânea, seguindo para a coluna o gás resultante (a analisar) misturado com o gás arrastador.

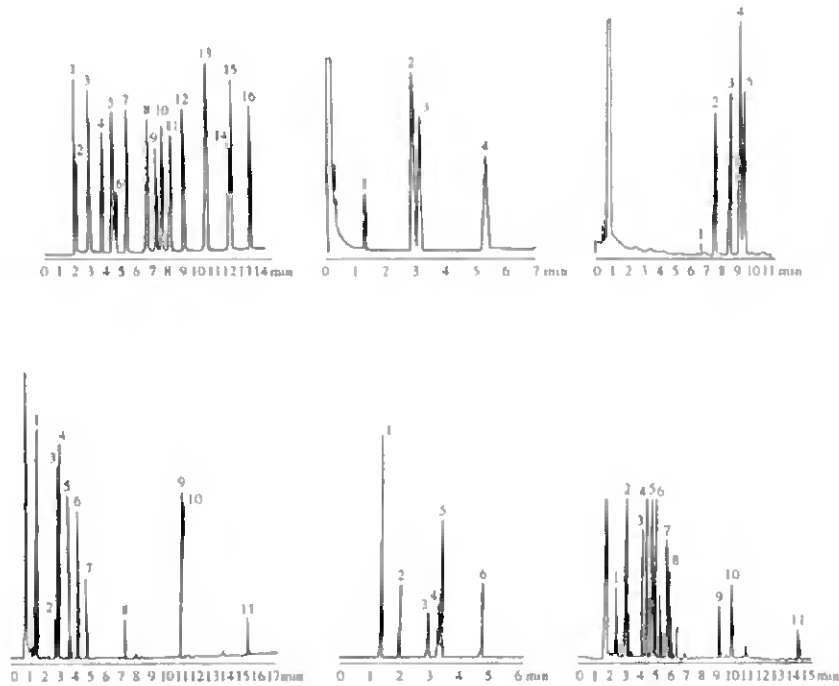


Figura 4 – Exemplos de alguns cromatogramas obtidos por cromatografia de fase gasosa

Uma vez que o comportamento da separação depende da programação da temperatura, a coluna é usualmente colocada num forno termostaticamente controlado. A mistura fase móvel/amostra entra então no detector onde são identificados os componentes. O sinal do detector é amplificado e registado no sistema de aquisição de dados. Na Figura 5 representa-se esquematicamente os principais constituintes de um cromatógrafo de fase gasosa [51].

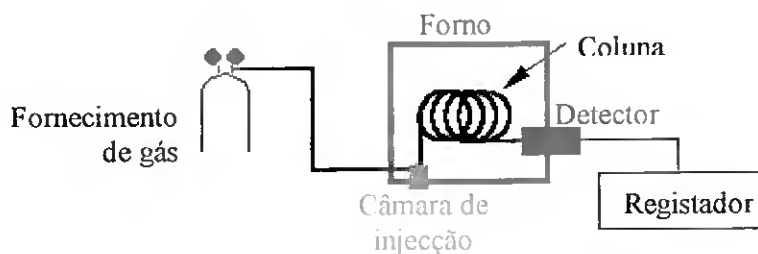


Figura 5 – Esquema de um cromatógrafo de fase gasosa

O injetor pode ser do tipo *split/splitless* e operar num ou noutro modo. No modo *split* uma fracção significativa da amostra injectada flui através da purga do injetor. Apenas uma pequena fracção de amostra é analisada pela coluna. No modo *splitless* toda (ou quase toda) a amostra injectada flui para a coluna de forma a que todos os componentes da amostra são cromatografados.

A coluna capilar é um tubo aberto feito de sílica fundida com um revestimento exterior de plástico resistente e um revestimento interior de material de fase estacionária. A eficiência de uma coluna capilar na separação de analitos depende de determinadas variáveis. As variáveis a ter em atenção incluem constantes de equilíbrio de distribuição, tempo de retenção, factores de retenção e factores de selectividade.

O equilíbrio da distribuição em cromatografia define a transferência do analito entre as fases móvel e estacionária. A constante de equilíbrio, referida em cromatografia como constante de distribuição ou razão de partição, K , é a razão entre a concentração molar do soluto na fase estacionária e a sua concentração molar na fase móvel. A expressão matemática é a seguinte:

$$K = \frac{C_e}{C_M} \quad (1.4-1)$$

Se a constante de distribuição, K , for constante numa vasta gama de concentrações de soluto, então C_e (concentração do soluto na fase estacionária) é directamente proporcional a C_M (concentração do soluto na fase móvel). Quando esta premissa se mantém verdadeira, os picos cromatográficos são simétricos, e os tempos de retenção serão independentes da quantidade de analito injectado.

O tempo de retenção, t_R , de um analito define-se como o tempo que o analito leva, após a injeção da amostra, a alcançar o detector. O tempo que as espécies não retidas levam a alcançar o detector é o tempo morto, t_M . Na Figura 6 ilustra-se, num cromatograma, o tempo retenção e o tempo morto [50].

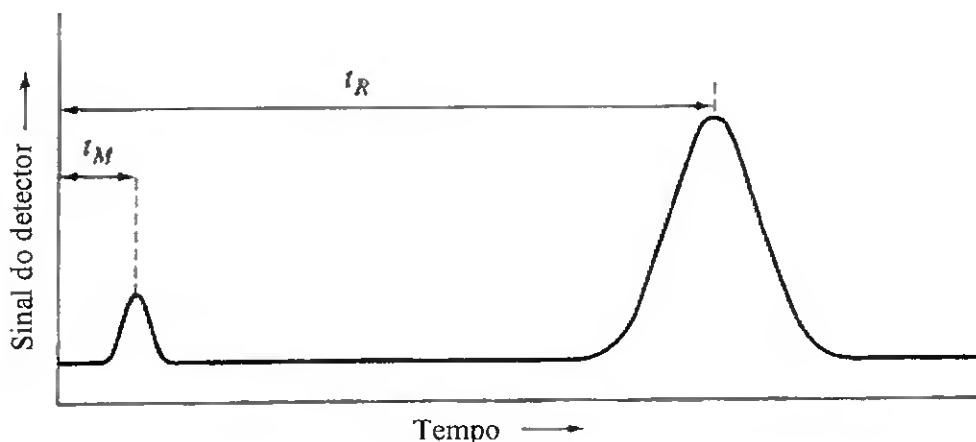


Figura 6 – Cromatograma que ilustra tempo morto, t_M , e tempo de retenção, t_R .

A taxa de migração de uma espécie não retida é a mesma que o fluxo da fase móvel. A velocidade média do soluto (v) é definida como a razão entre o comprimento da coluna, L , e o tempo de retenção, t_R :

$$v = \frac{L}{t_R} \quad (1.4-2)$$

A velocidade média da fase móvel (u) é calculada dividindo o comprimento da coluna, L , pelo tempo morto, t_M .

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (1.4-3)$$

Obviamente, a distribuição do soluto entre as fases estacionária e móvel afectará directamente a migração linear do soluto na fase móvel e consequentemente o seu tempo de retenção. A velocidade média do soluto, v , é expressa por $v = u \times$ fracção de tempo que o soluto gasta na fase móvel. Assim quanto menor for o tempo que o soluto gasta na fase móvel, menor será a fracção que multiplica por u , e consequentemente menor a razão de migração. Quanto menor a velocidade média do soluto, v , maior o tempo de retenção, t_R . A fracção também pode ser expressa como moles de soluto na fase móvel dividido pelo número total de moles. O número de moles de soluto na fase móvel é equivalente à concentração de soluto vezes o volume de fase móvel. Da mesma maneira, o número total de moles de soluto é igual à soma do número de moles na fase móvel e na fase estacionária. A velocidade média do soluto vem expressa pela expressão:

$$v = \frac{u \times (C_M \cdot V_M)}{(C_M \cdot V_M) + (C_e \cdot V_e)} \quad (1.4-4)$$

ou

$$v = u \times \frac{1}{1 + \frac{(C_e \cdot V_e)}{(C_M \cdot V_M)}} \quad (1.4-5)$$

onde V_M e V_e correspondem, respectivamente, ao volume da fase móvel e ao volume da fase estacionária.

Substituindo na constante de equilíbrio resulta que:

$$v = u \times \frac{1}{1 + \frac{K \cdot V_e}{V_M}} \quad (1.4-6)$$

fórmula que expressa a razão de migração do soluto em função da constante de distribuição.

Outro parâmetro usado para descrever as razões de migração do soluto em cromatografia de fase gasosa é o factor de retenção, também referido como factor de capacidade. Matematicamente, o factor de retenção, k' , escreve-se da forma:

$$k' = \frac{K \cdot V_e}{V_M} \quad (1.4-7)$$

Substituindo a expressão anterior na expressão da razão de migração (1.4-6) obtém-se uma relação entre a capacidade da coluna e a razão de migração estabelecida. Matematicamente expressa-se da seguinte forma:

$$v = u \times \frac{1}{1 + k'} \quad (1.4-8)$$

Quando a razão de migração, para um dado soluto, na fase móvel, é substituída por valores medidos num cromatograma chega-se a uma nova expressão para o factor de retenção:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1.4-9)$$

A habilidade da coluna para reter um analito mais fortemente do que outro é uma função da selectividade da coluna. O factor de selectividade, α , da coluna para duas espécies, A e B é dado pela expressão matemática:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (1.4-10)$$

Por definição a espécie mais retida é a que aparece no numerador. Substituindo na constante de distribuição obtém-se uma equação que permite determinar o factor α experimentalmente a partir dos dados do cromatograma:

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad (1.4-11)$$

Enquanto que os movimentos dos solutos através da coluna cromatográfica são descritos por constantes de distribuição, tempos de retenção, factores de retenção (capacidade) e factores de selectividade, a eficiência da coluna para uma dada substância é descrita por uma medida quantitativa denominada prato teórico. O número de pratos teóricos, N , é calculado dividindo a altura da coluna, L , pela altura equivalente a um prato teórico, H .

$$N = \frac{L}{H} \quad (1.4-12)$$

A altura de um prato é calculada experimentalmente dividindo a variância de um pico com forma idêntica a uma curva Gaussiana pelo comprimento da coluna, L . Apresenta-se ilustrado graficamente na Figura 7 [50]

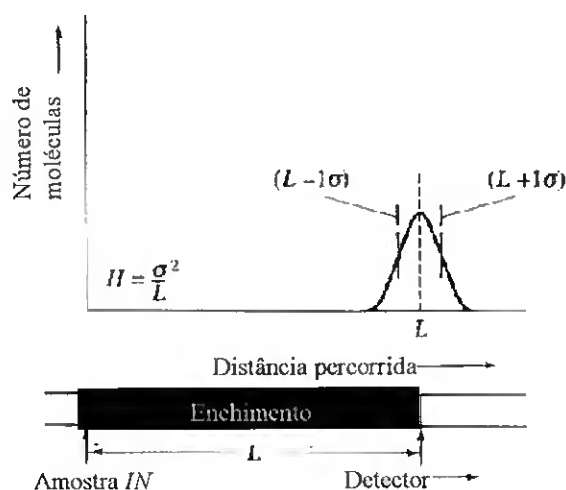


Figura 7 – Cálculo experimental da altura de um prato

Pode-se obter uma outra equação para o número de pratos teóricos, N , e que se ilustra graficamente na Figura 8 [50]:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (1.4-13)$$

onde W é uma medida da largura da base do pico em unidades de tempo.

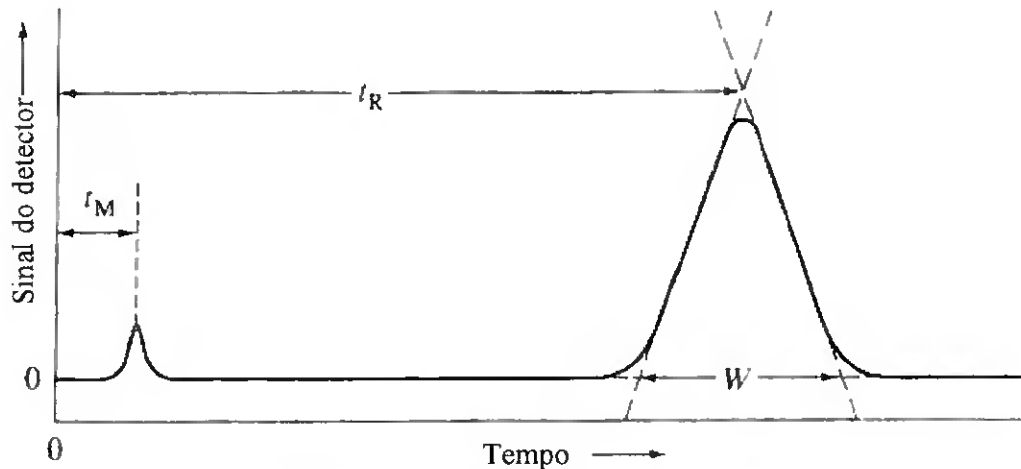


Figura 8 – Cálculo gráfico do prato teórico

A capacidade da coluna para separar uma mistura de compostos denomina-se resolução.

A expressão matemática para a resolução, R_s , é:

$$R_s = \frac{2 \cdot \Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2 \cdot [(t_R)_A - (t_R)_B]}{W_A + W_B} \quad (1.4-14)$$

Onde ΔZ é a diferença no tempo entre dois picos cromatográficos, W_A e W_B são as distâncias da base do pico do composto A e do pico do composto B, respectivamente, em unidades de tempo. Na Figura 9 [50] ilustra-se graficamente as variáveis da expressão anterior (1.4-14). Quanto maior a separação entre os compostos maior a resolução da coluna.

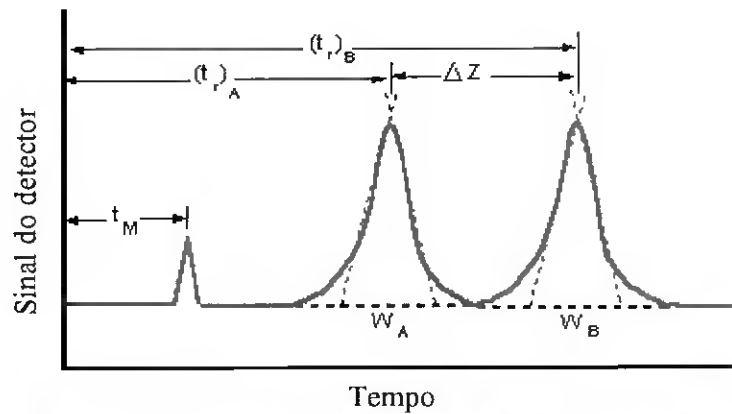


Figura 9 – Ilustração gráfica das variáveis de resolução

A resolução também pode ser calculada utilizando o factor de retenção k' para dois solutos, o factor de selectividade e o número de pratos teóricos. A equação seguinte (1.4-15) pode ser usada para calcular a resolução, ou através de um arranjo simples, para calcular o número de pratos teóricos necessários para obter uma resolução pretendida.

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right) \sqrt{\frac{L}{H}} \quad (1.4-15)$$

$$N = 16 \cdot R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2 \quad (1.4-16)$$

A resolução expressa a partir da equação (1.4-15) é uma função de três factores de separação: (1) o factor de selectividade da coluna que varia com α , (2) a razão de migração ou o factor de capacidade que varia com k'_B e (3) o factor de eficiência que depende de L/H . Cada um dos factores pode ser calculado directamente a partir do cromatograma registado e podem ser ajustados mais ou menos de forma independente. Os dois primeiros factores são essencialmente termodinâmicos e o L/H está associado principalmente com a cinética da cromatografia. Alterações no α e no k'_B são conseguidas escolhendo diferentes fases estacionária e móvel, ou variando a

temperatura e em menor escala a pressão. Adicionalmente, k'_B pode ser alterado mudando a quantidade relativa de fases móvel e estacionária dentro da coluna. Quando se tenta otimizar uma separação particular o primeiro factor a ter em conta deve ser o k'_B . Infelizmente, em misturas complexas de vários componentes, é apenas possível otimizar as condições de separação para apenas um par de componentes. A única solução eficaz para este problema quando se trabalha com amostras reais complexas é “programação de k'_B ”. Na cromatografia de fase gasosa um valor óptimo para k'_B pode ser alcançado através de uma variação programada da temperatura [48].

A temperatura de porta do injector em cromatografia de fase gasosa deve ser suficientemente alta para vaporizar o líquido injectado instantaneamente. Se a temperatura for baixa, a separação é pobre e os picos que resultam são rombos ou não existem picos. Se a temperatura do injector for muito elevada a espécie a analisar pode decompor-se ou alterar a sua estrutura. Se isto ocorre, os resultados obtidos irão indicar a presença de compostos que não são o composto original. Para um trabalho preciso, a temperatura da coluna deve ser controlada de 10 em 10 °C. A temperatura da coluna óptima está dependente do ponto de ebulição da amostra. Como regra empírica a temperatura ligeiramente acima do valor médio do pontos de ebulição da amostra deve resultar num tempo de eluição entre 2 a 30 minutos. Utilizando a temperatura mínima obtém-se uma melhor resolução, mas aumenta o tempo de eluição. Se a amostra apresentar uma vasta gama de temperaturas de ebulição a programação da temperatura é muito útil. A temperatura da coluna é aumentada (quer continuamente quer em degraus) à medida que a separação ocorre.

Em cromatografia de fase gasosa pode-se usar colunas de enchimento ou colunas capilares (ver Figura 10 [52]). As colunas de enchimento são tubo de vidro ou metal com 2-4 mm de diâmetro interno, I. D., e 1-6 m de comprimento. Estão cheios com partículas porosas, que agem como suporte da fase estacionária, que reveste o material poroso. As colunas capilares são tubos com 0,1-0,5 mm I. D. cujo comprimento varia entre 5 a 100 metros, apresentam uma configuração enrolada para caber no forno do cromatógrafo. Para análises ambientais, são usadas usualmente colunas de 30 a 60 metros. Diminuindo o comprimento da coluna diminui-se o tempo de análise, no entanto, a resolução (separação) pode ficar comprometida. Originalmente as colunas capilares eram feitas de metal ou vidro; mas na última década a sílica fundida substituiu estes materiais. A sílica fundida tem a vantagem de ter uma superfície interior inactiva, o que evita interações entre analitos (especialmente quando estes são polares) e centros de adsorção, apresenta ainda a vantagem de grande estabilidade mecânica o que torna as colunas menos quebradiças. A fase estacionária é revestida como uma fina camada (com 0,1-5 μm de espessura do filme) na parede interior do tubo. Normalmente esta fase é líquida e deve abranger uma vasta gama de polaridades uma vez que a polaridade dos analitos ditam a escolha da fase estacionária, onde se aplica a regra “igual dissolve igual”. Na Figura 11 [52] apresenta-se a fórmula estrutural de algumas fases estacionárias: a A) representa uma fase estacionária de polisiloxano e a B) uma fase estacionária de polietilenoglicol.

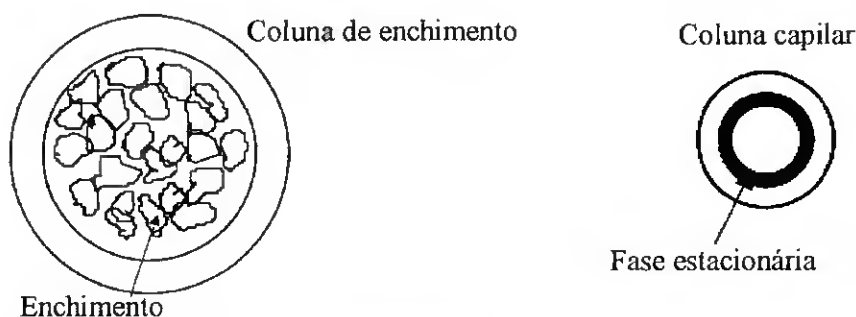


Figura 10 – Desenho esquemático das colunas de enchimento e capilares

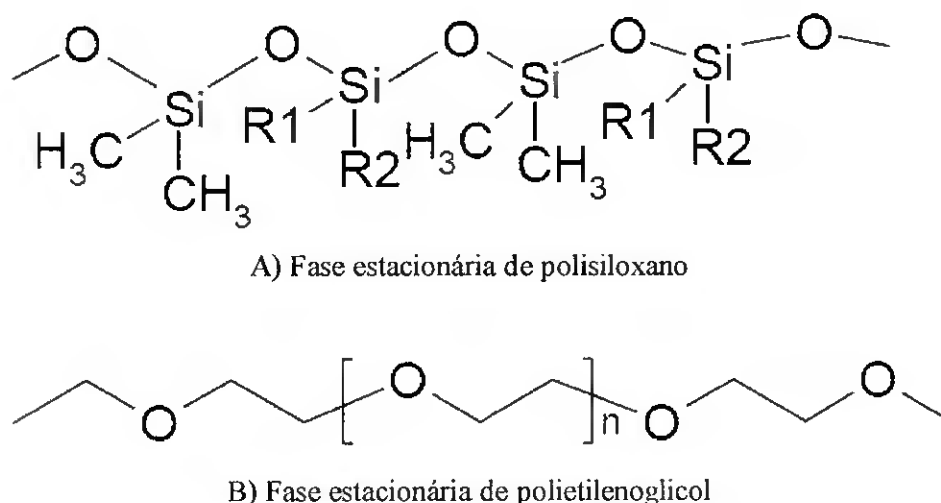


Figura 11 – Fórmula estrutural de fases estacionárias

A fase móvel deve ser um gás inerte, que é normalmente fornecido ao sistema por um gerador de gás ou por uma garrafa (cilindro) de gás. Os gases de arraste mais utilizados em cromatografia de fase gasosa são o hidrogénio (H₂), o azoto (N₂) e o hélio (He). Estes gases devem ser de elevada pureza, resíduos de água ou oxigénio podem decompor a fase estacionária com conseqüente destruição da coluna. Para prevenir a entrada de impurezas arrastadas pela fase móvel podem-se instalar filtros para a sua purificação antes de esta entrar no cromatógrafo de fase gasosa. A escolha do gás de arraste depende de vários aspectos: condições de operação específicas do detector (por

exemplo na combinação da cromatografia de fase gasosa com a espectrometria de massa é necessário He); segurança (o H₂ é explosivo); preço (o N₂ é o mais barato); eficiência da separação e velocidade de separação.

1.4.1. Detectores

Existem uma variedade de detectores para cromatografia de fase gasosa. No geral, cada detector aproveita-se de uma dada característica da molécula a analisar e utiliza essa característica para gerar um sinal eléctrico mensurável. São exemplos de detectores utilizados em cromatografia de fase gasosa: detector de ionização de árgon, detector de ionização de chama, detector de emissão de chama, detector de condutividade térmica, detector de captura de electrões, detector azoto-fósforo, detector de fotoionização, espectrómetro de massa, etc. O detector ideal deve [53]:

1. Não interferir na resolução cromatográfica, o que significa não produzir no detector uma mistura de produtos separados antes da detecção.
2. Ter a maior sensibilidade possível ou seja detectar pequenas quantidades de analito.
3. Ser universal, o que significa detectar todos os produtos eluídos.
4. Fornecer o máximo de informação estrutural possível, o ideal para permitir identificação positiva de todos os compostos eluídos.
5. Ser selectivo, isto é, permitir a identificação de produtos alvos na mistura. Esta característica é verificada automaticamente se se verificar o ponto 4.
6. Fornecer um sinal proporcional à concentração.
7. Ter um factor de resposta constante ou pelo menos previsível (linearidade).
8. Ter uma razão custo/performance o mais baixo possível.
9. Não ser nocivo ao analito ou seja não reagir com ele.

Acoplar a espectrometria de massa à cromatografia fase gasosa permite a associação em série de duas poderosas técnicas analíticas, sendo a sua elevada popularidade justificada pelas importantes vantagens que apresenta, nomeadamente as seguintes: obtenção simples, por cromatografia de fase gasosa, de amostras puras próprias para análise por espectrometria de massa e possibilidade de aplicação a amostras em quantidades muito baixas. Esta técnica permite ainda a separação e subsequente determinação dos componentes de misturas altamente complexas com um elevado grau de certeza. É a técnica mais utilizada hoje em dia para a análise de poluentes orgânicos voláteis e análises ambientais [54]. O elevado número de aplicações é resultado da eficiente separação da cromatografia de fase gasosa associada à boa informação qualitativa e elevada sensibilidade providenciada pelo espectrómetro de massa. Um espectrómetro de massa consiste em quatro componentes básicos: um sistema de entrada da amostra, uma fonte de iões, um analisador de massas e um transductor.

O ponto de partida para uma análise por espectrometria de massa é a formação de iões gasosos de analito. São utilizadas várias técnicas para ionizar o analito em GC-MS. Entre elas encontram-se a ionização por impacto de electrões (EI – *electron ionisation*) e a ionização química (CI – *chemical ionisation*). Na EI, as moléculas de analito gasosas são bombardeadas com electrões energéticos o que leva à formação de um radical molecular (M^+) que pode subsequentemente gerar fragmentos ionizados. Esta técnica geralmente permite a determinação de massas moleculares relativas e da estrutura da molécula. Um facto importante dos espectros obtidos por EI é que estes são altamente reprodutíveis, o que significa que as bibliotecas de massas espectrais podem ser utilizadas para a identificação de substâncias desconhecidas. No entanto, em alguns

casos, a EI não providencia a sensibilidade requerida na análise de quantidades muito pequenas de compostos em amostras ambientais. Isto deve-se principalmente à sua fragmentação extensiva uma vez que o sinal é função da eficiência de ionização. Para resolver este problema, devem aplicar-se técnicas de ionização mais suaves como a ionização química. Na CI dão-se reacções ião-molécula entre reagente gás-ião e as moléculas da amostra. Como resultado são obtidos, iões moleculares, iões aducto e iões fragmento. No entanto o grau de fragmentação é muito menor do que na EI.

Independentemente da técnica ou do método cromatográfico usado, existem três modos de aquisição: *full scanning*, *selected-ion monitoring (SIM)* e *selected-reaction monitoring (SRM)*. No presente trabalho utilizou-se o modo SIM onde o detector de massa selectivo analisa repetidamente apenas os iões seleccionados em vez de todo o espectro. Neste modo pode-se alterar a selecção de iões de forma a detectar o composto desejado. Se o objectivo do estudo for a detecção de compostos alvo, como era o caso, com características espectrais conhecidas com a máxima sensibilidade, é útil o modo SIM. Deste modo, se escolhermos detectar um dado composto monitorizando três fragmentos característicos, o analisador muda rapidamente de uma massa para outra. O ganho na sensibilidade é enorme.

A cromatografia de fase gasosa apresenta algumas limitações tais como: exigência usual de amostras voláteis (ponto de ebulição inferior à temperatura de operação) e termicamente estáveis (ou, pelo menos, de derivados convenientes com estas propriedades); dificuldade de aplicação em escala preparativa. Em especial a primeira destas limitações não é sentida pela cromatografia líquida, a qual é de aplicação possível a espécies de elevado peso molecular e termicamente sensíveis. O enorme sucesso da

cromatografia de fase gasosa reside na versatilidade de análise de misturas complexas, rapidamente e com resolução e sensibilidade elevadas, sendo adaptável a aplicações automáticas de rotina [55]. A cromatografia de fase gasosa pode ser em algumas situações mais rápida (note-se que os coeficientes de difusividade em líquidos são, em geral, cerca de 10^5 vezes inferiores aos obtidos em gases [55]) e apresenta maior selectividade do que a líquida. De um modo geral a detecção por espectrometria de massa em cromatografia de fase gasosa é mais simples e mais sensível do que em cromatografia líquida, dada a maior facilidade de ionização de moléculas na fase gasosa do que na líquida e a maior sensibilidade da medida de propriedades de iões do que de moléculas neutras. Neste tipo de cromatografia os custos de utilização são menores uma vez que não é necessário recorrer ao uso de solventes, e não há produção de resíduos. A cromatografia de fase gasosa pode também ser estendida, em alguns casos, à análise de amostras pouco voláteis, após conversão destas numa forma volátil, por tratamento químico (formação de derivados voláteis).

1.4.2. Quantificação

A quantificação pode ser efectuada através do método da calibração absoluta. Esta técnica quantitativa pode ser considerada simplesmente do modo seguinte. Prepara-se um conjunto de soluções com quantidades ou concentrações (C_i) conhecidas do composto em estudo, injecta-se um volume conhecido (v_i) de cada solução e mede-se a área, A_i , do pico correspondente, traçando-se então a curva de calibração. Em seguida injecta-se um volume conhecido de solução em estudo, de concentração desconhecida, e mede-se a área, A_i , do pico do composto a dosear, a qual corresponde a uma quantidade (ou concentração) deste, dada pelo gráfico. Neste processo cada componente a dosear deve ter a sua curva de calibração própria. O método de calibração absoluta é de

aplicação bastante geral, sendo utilizável em condições de não aplicabilidade de outros métodos, devido, por exemplo, à impossibilidade de adição à amostra de um padrão estranho ou à presença, na amostra, de compostos não identificáveis ou não detectáveis porque não são voláteis. Apresenta, as desvantagens da exigência do conhecimento das quantidades injectadas e da conservação das condições experimentais de ensaio para ensaio [55].

No método do padrão interno (uma outra técnica de quantificação) é adicionada à amostra uma porção de substância padrão, ambas em quantidades conhecidas, sendo a mistura resultante cromatografada. Alternativamente pode recorrer-se à preparação de um conjunto de soluções com quantidade variável do componente i a dosear e com quantidades conhecidas de uma substância padrão p . Estas soluções são então cromatografadas e, em seguida, traça-se a curva de calibração que represente a quantidade de componente i a dosear, N_i , em função de $N_p \cdot A_i/A_p$; ou, mais geralmente, a concentração molar C_i , em função de $A_i \cdot N_p/(A_p \cdot v_i)$, ou a fracção mássica, F_i , em função de $A_i \cdot N_p/(A_p \cdot m_i)$. Elas são válidas apenas para o par de compostos i e p : a sua extensão a outros pares exigiria a correcção conveniente das áreas dos picos. Se a concentração do padrão, N_p/v_i , na amostra, for mantida constante em todas as soluções de calibração, a razão das áreas A_i/A_p não necessita da correcção pelo factor N_p/v_i , bastando o traçado gráfico da curva de calibração que represente, por exemplo, a concentração de componente i em função da razão A_i/A_p ; porém, a aplicação desta linha de calibração exige que a mesma concentração de padrão seja mantida na amostra a analisar [55].

O padrão escolhido não deve estar presente originariamente na mistura em estudo, deve gerar um pico simétrico bem resolvido dos restantes, ter um tempo de retenção próximo do apresentado do composto a dosear, ter uma volatilidade próxima da deste, e a sua quantidade ser comparável à do componente a dosear. O método do padrão interno é trabalhoso: requer, em geral, uma curva de calibração para cada componente a dosear e exige a adição de uma quantidade conhecida de padrão a cada toma a analisar. Apresenta, porém, algumas vantagens importantes: o componente a dosear e o padrão são cromatografados em condições idênticas (nos mesmos ensaios), não sendo o método sensível a alterações de quantidade da amostra (as quais, usualmente, ocorrem de ensaio para ensaio) nem a pequenas alterações das condições de operação; é ainda dispensável o conhecimento da quantidade absoluta da amostra injectada.

1.5. Incertezas

O termo incerteza (associada a uma medição) pode ser definido da seguinte forma: “É um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos de forma aceitável ao valor medido [56, 57]”. Este parâmetro pode ser, por exemplo, um desvio padrão (ou um múltiplo) ou a largura de um intervalo de confiança. É importante distinguir entre erros e incertezas. Erro define-se como a diferença entre um resultado individual e o valor verdadeiro da medição. Assim erro é um único valor. Incerteza, por outro lado, toma a forma de uma gama de valores. Na prática, a incerteza do resultado pode resultar de muitas fontes possíveis, incluindo exemplos tais como definição insuficiente, amostragem, efeitos da matriz e interferências, condições experimentais, incertezas de equipamento de avaliação de massas e de volume, valores de referência, aproximações e convenções incorporadas no método de medição e no procedimento e no erro aleatório.

A estimativa da incerteza é, em princípio, simples. Os parágrafos a seguir resumem as tarefas que têm que ser executadas de modo a obter uma estimativa da incerteza associada ao resultado de uma medição [56, 57]:

- Especificação do valor medido – escrever de forma clara o que se pretende medir, incluindo a relação entre o mensurado e as quantidades fornecidas (por exemplo quantidades medidas, constantes, valores de referência da calibração, etc) e das quais depende. Quando possível, tal inclui correcções para efeitos sistemáticos conhecidos.
- Identificação das fontes de incerteza – listar as fontes possíveis de incerteza. Isto inclui fontes que contribuem para a incerteza dos parâmetros da relação especificada no ponto anterior, mas pode incluir outras fontes e deve incluir outras fontes resultantes de pressupostos de natureza química.
- Quantificação dos componentes da incerteza – medir ou estimar o tamanho da componente de incerteza associada com cada fonte potencial de incerteza identificada. É, muitas vezes, possível estimar ou determinar uma só contribuição para a incerteza, associada a um certo número de fontes separadas. Também é importante tomar em consideração se a informação existente leva suficientemente em conta todas as fontes de incerteza e planejar cuidadosamente experiências e estudos adicionais de modo a garantir que todas as fontes de incerteza são devidamente contabilizadas.
- Cálculo da incerteza combinada – a informação obtida no ponto anterior consistirá num certo número de contribuições quantificadas, para a incerteza total, quer elas sejam associadas a fontes individuais ou a efeitos combinados de várias fontes. As contribuições têm de ser expressas como desvios padrão e

combinadas em conformidade com as devidas regras, para dar uma incerteza expandida, deve aplicar-se o factor de expansão adequado.

Antes da combinação, todas as contribuições das incertezas devem ser expressas como incertezas padrão, ou seja, desvios padrão. Isto é, podem envolver conversão de uma outra forma de medida da dispersão. As regras a seguir dão orientações para converter uma componente da incerteza em desvio padrão:

- Quando a incerteza tiver sido avaliada experimentalmente a partir da dispersão de medições repetidas, pode ser expressa como desvio padrão. Relativamente a contribuições para a incerteza em medições singulares, a incerteza padrão é simplesmente o desvio padrão observado; para médias de resultados usa-se a incerteza padrão média.
- Quando uma estimativa da incerteza deriva de resultados e informação anterior, ela pode ser logo expressa como desvio padrão. Contudo quando se apresenta um intervalo de confiança com um nível de confiança (na forma de $\pm a$ a p%) então, para calcular o desvio padrão, divide-se o valor a pela percentagem de pontos da distribuição Normal, a esse nível de confiança.
- Se os limites de $\pm a$ são dados sem nível de confiança e há razão para esperar os valores extremos, é normalmente apropriado assumir uma distribuição rectangular, com um desvio padrão de $\frac{a}{\sqrt{3}}$.
- Se os limites de $\pm a$ são dados sem o nível de confiança, mas não há razão para esperar os valores extremos, é normalmente apropriado assumir uma distribuição triangular, com um desvio padrão de $\frac{a}{\sqrt{6}}$.

Depois de se ter estimado incertezas individuais ou grupos de incertezas e de as representar como incertezas padrão, o passo seguinte é calcular a incerteza padrão combinada usando um dos procedimentos descritos.

A relação geral entre a incerteza padrão combinada $u_c(y)$ de um valor y e a incerteza dos parâmetros independentes x_1, x_2, \dots, x_n dos quais depende, é:

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1}^N C_i^2 \cdot u(x_i)^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^N u(y, x_i)^2} \quad (1.5-1)$$

onde $y(x_1, x_2, \dots)$ é uma função de vários parâmetros x_1, x_2, \dots , c_i é um coeficiente de

sensibilidade calculado como $c_i = \frac{\partial y}{\partial x_i}$, a derivada parcial de y em relação a x_i e $u(y, x_i)$

indica a incerteza de y resultante da incerteza de x_i . A contribuição de cada variável $u(y, x_i)$ é o quadrado da incerteza associada, expressa como um desvio padrão multiplicado pelo quadrado do coeficiente de sensibilidade relevante.

Quando as variáveis não são independentes, a relação é mais complexa:

$$u(y(x_{i,j})) = \sqrt{\sum_{i=1}^N C_i^2 \cdot u(x_i)^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq k}}^N C_i \cdot C_k \cdot u(x_i, x_k)} \quad (1.5-2)$$

onde $u(x_i, x_k)$ é a covariância entre x_i e x_k e C_i, C_k são os coeficientes de sensibilidade.

Nalguns casos, as expressões para combinar incertezas reduzem-se a formas muito mais simples, aplicáveis às situações em que as variáveis são independentes. Apresentam-se duas regras muito simples para combinar incertezas padrão. Para modelos envolvendo só uma soma ou uma diferença, $y=(p+q+r+\dots)$, a incerteza padrão combinada $u_c(y)$ é dada por:

$$u_c(y(p, q, \dots)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots} \quad (1.5-3)$$

Para modelos envolvendo só um produto ou um quociente, $y(p \cdot q \cdot r \dots)$ ou $y=p/(q \cdot r \dots)$, a incerteza padrão combinada $u_c(y)$ é dada por:

$$u_c(y) = y \cdot \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \dots} \quad (1.5-4)$$

onde $\frac{u(p)}{p}$, $\frac{u(q)}{q}$, são as incertezas dos parâmetros, expressas como desvios padrão relativos.

Com o objectivo de combinar as componentes da incerteza, é mais conveniente quebrar o modelo matemático original em expressões que consistam somente em operações abrangidas por um dos procedimentos anteriores. Por exemplo, a expressão:

$$\frac{(o + p)}{(q + r)} \quad (1.5-5)$$

deve ser dividida em dois elementos $(o+p)$ e $(q+r)$. Aplicando-se posteriormente as regras expressas em (1.5-3) e (1.5-4).

O último passo é multiplicar a incerteza padrão combinada pelo factor de expansão seleccionado de modo a obter a incerteza expandida ou alargada $U(x)$. A incerteza expandida é necessária para fornecer um intervalo no qual se possa esperar que há uma grande fracção da distribuição dos valores que podem ser atribuídos com razoabilidade ao valor medido. Ao escolher um valor para o factor de expansão, k , devem ser tomados em consideração vários aspectos, incluindo: o nível de confiança exigido; algum conhecimento das distribuições e algum conhecimento do número de valores usados na estimativa dos valores aleatórios. Na maior parte dos casos recomenda-se que k seja

igual a 2. Quando a incerteza padrão combinada é dominada por uma única contribuição com menos de 6 graus de liberdade, recomenda-se que k seja igual ao valor de t de *Student* para o número de graus de liberdade associados a essa contribuição e para o nível de confiança requerido (normalmente 95 %). As incertezas relativas obtêm-se a partir das expressões seguintes:

$$U_{rel}(x) = \frac{U(x)}{x} \quad (1.5-6)$$

$$u_{rel}(x) = \frac{u(x)}{x} \quad (1.5-7)$$

Em análises quantitativas, a calibração indica um processo pelo qual a resposta dum sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Em métodos instrumentais de análise, a calibração analítica do equipamento processa-se geralmente do seguinte modo [58]: o analista prepara uma série de soluções padrão em que a concentração do parâmetro a dosear é conhecida; estas soluções padrão de calibração são medidas num equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar; estabelece-se um gráfico de calibração (sinal do equipamento em função da concentração) e determina-se a concentração do parâmetro nas amostras, por interpolação.

A forma algébrica da equação de uma recta é dada por:

$$y = m \cdot x + b \quad (1.5-8)$$

Para um conjunto de N (número de pontos) valores (x_i, y_i) , sendo m e b , respectivamente, o declive e a ordenada na origem da melhor recta que se adapta a esses pontos, o valor do declive, m , é obtido através da seguinte expressão [59]:

$$m = \frac{N \cdot \sum_{i=1}^N x_i \cdot y_i - \sum_{i=1}^N x_i \cdot \sum_{i=1}^N y_i}{N \cdot \sum_{i=1}^N x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N x_i \right)^2} \quad (1.5-9)$$

a ordenada na origem, b , é obtida através da seguinte expressão:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N x_i^2 \cdot \sum_{i=1}^N y_i - \sum_{i=1}^N x_i \cdot \sum_{i=1}^N y_i}{N \cdot \sum_{i=1}^N x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N x_i \right)^2} \quad (1.5-10)$$

o coeficiente de correlação r desta distribuição relativamente à regressão linear vem dado por:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}} \quad (1.5-11)$$

onde \bar{x} corresponde ao valor médio de todos os x_i e \bar{y} ao valor médio de todos os y_i .

Os coeficientes m e b dão uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão inevitável do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual $\left(S_{y/x} \right)$ da recta de regressão [58]:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (b + m \cdot x_i)]^2}{N - 2}} \quad (1.5-12)$$

Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração. Os desvios padrão do declive m e da ordenada na origem b , são dados por [58]:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1.5-13)$$

$$S_b = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \cdot \sum_{i=0}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1.5-14)$$

e podem ser usados para calcular os limites de confiança de m e b:

$$m \pm t \cdot S_m \text{ e } b \pm t \cdot S_b \quad (1.5-15)$$

sendo t o valor da variável de *Student* para o nível de confiança desejado e (N – 2) graus de liberdade.

A concentração de analito na amostra (x_0) pode ser obtida a partir das equações seguintes [58]:

a) Valor obtido a partir de um sinal instrumental y_0 :

$$\bar{x} = \frac{y_0 - b}{m} \quad (1.5-16)$$

b) Valor médio obtido a partir de uma série de replicados⁶, independentes, \bar{y}_0 sobre uma mesma amostra:

$$\bar{x} = \frac{\bar{y}_0 - b}{m} \quad (1.5-17)$$

A incerteza do valor interpolado de uma concentração x_0 qualquer, é a combinação da incerteza da determinação do valor medido e a incerteza da estimativa dos coeficientes de regressão. Da propagação dos erros, segue-se que para cada valor de concentração x_0 , existe um intervalo de confiança do verdadeiro valor de y_0 , cujos limites descrevem

⁶ Replicados – Número de ensaios independentes efectuados para a amostra.

duas hipérboles que envolvem a recta de calibração. Assim, o desvio padrão estimado para uma concentração qualquer x_0 é dado por [58]:

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{m} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_0 - \bar{y})^2}{m^2 \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1.5-18)$$

sendo n os replicados efectuados para a amostra. Os limites de confiança de x_0 podem ser calculados pela equação:

$$x_0 \pm t \cdot S_{x_0} \quad (1.5-19)$$

Em que t representa a variável de *Student* para (N - 2) graus de liberdade, a determinado nível de confiança.

1.6. Limites de detecção e de quantificação

Na bibliografia consultada [56-58, 60, 61] existem várias definições recomendadas para limite de detecção e para limite de quantificação. Apresenta em seguida uma dessas definições:

Limite de Detecção – Teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detectada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exacto [58].

Limite de Quantificação – Corresponde à menor pequena concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exactidão⁷ e precisão⁸ [58].

⁷ Resultado ou média do conjunto de resultados o mais próximo possível do valor verdadeiro ou do valor aceite.

⁸ Conjunto de resultados replicados o mais próximo possível uns dos outros.

Existindo literatura [61-66] que aborda o tema de forma relativamente aprofundada – explicitando as diferentes metodologias existentes para a determinação dos limites de detecção e quantificação –, o mesmo não será alvo de idêntica abordagem na presente dissertação (por não ser esse o objectivo fundamental da tese), sendo apenas seleccionada uma das metodologias descritas na literatura e efectuados os cálculos para essa metodologia no capítulo 3.3.2 pág. 90.

2. Materiais e Métodos

A conjugação de questões operacionais do Laboratório de Cromatografia da Universidade do Algarve com a revisão da literatura efectuada e explicitada no capítulo 1.3 pág. 9, levou a que se tivesse seleccionado como método geral de análise a cromatografia gasosa, acoplada à espectroscopia de massa.

Dada a não volatilidade do glifosato e do seu metabolito, foi necessário seleccionar um processo de derivatização eficiente, capaz de transformar os mesmos em derivados voláteis, possibilitando assim a sua análise por cromatografia de fase gasosa.

Ainda que fosse preferível a utilização de um padrão interno (ver capítulo 1.4 pág. 18), uma vez que se trabalhou com volumes injectados muito pequenos (da ordem do 2 μ L), a maioria da bibliografia disponível (por exemplo [38, 40, 43]) não o utiliza e, aquela que o utiliza [41], recorre a um processo de derivatização que usa diazometano, o qual é um produto altamente tóxico, cancerígeno e explosivo. Nestas circunstâncias, optou-se pela não utilização de padrão interno, ou seja, recorreu-se ao método da calibração absoluta (ver subcapítulo 1.4.2 pág. 34).

Em suma, a metodologia seleccionada, corresponde a:

- a) Preparação de padrões de glifosato e de ácido aminometilfosfónico de diferentes concentrações conhecidas;
- b) Derivatização dos padrões de trabalho diário, dentro de *vials*, por forma a obter derivados voláteis de glifosato e de ácido aminometilfosfónico, para possibilitar a análise mediante cromatografia gasosa;

- c) Injecção de volumes iguais de diferentes concentrações molares dos derivados no cromatógrafo para obtenção das rectas de calibração;
- d) Extracção e análise de amostras.

2.1. Problemas detectados e procedimentos adoptados

Aquando da utilização da metodologia seleccionada, baseada na bibliografia disponível, ocorreram alguns problemas que se afigura adequado explicitar, para obviar a sua repetição por alguém que se interesse pelo tema, assim como pormenorizar a metodologia final encontrada.

- a) Em primeiro lugar é necessário vedar adequadamente os *vials*, para que não ocorra perda de volume. De principio julgou-se que o vedar dos *vials* significaria o rebentar dos mesmos, quando expostos a uma temperatura elevada para derivatização, contudo tal situação apenas ocorreu duas vezes em centenas de derivatizações. A perda de volume associada à inadequada vedação dos *vials* (não apertar da rosca) fazia com que não aparecessem picos no cromatograma relativos ao glifosato e ao seu metabolito.
- b) Para além do problema do não apertar da rosca, detectou-se que havia também perda de volume quando ocorria degradação dos septos de vedação dos *vials* (sobretudo as zonas de silicone e/ou de *red-rubber*), devido aos vapores libertados durante a derivatização, assim como contaminação da amostra que se traduzia num elevado número de picos (ruído) no cromatograma (ver Figura 12) ou num pico de abundância elevada (ver Figura 13). Esta abundância perto do tempo de retenção do analito vai ocultar o pico de interesse.

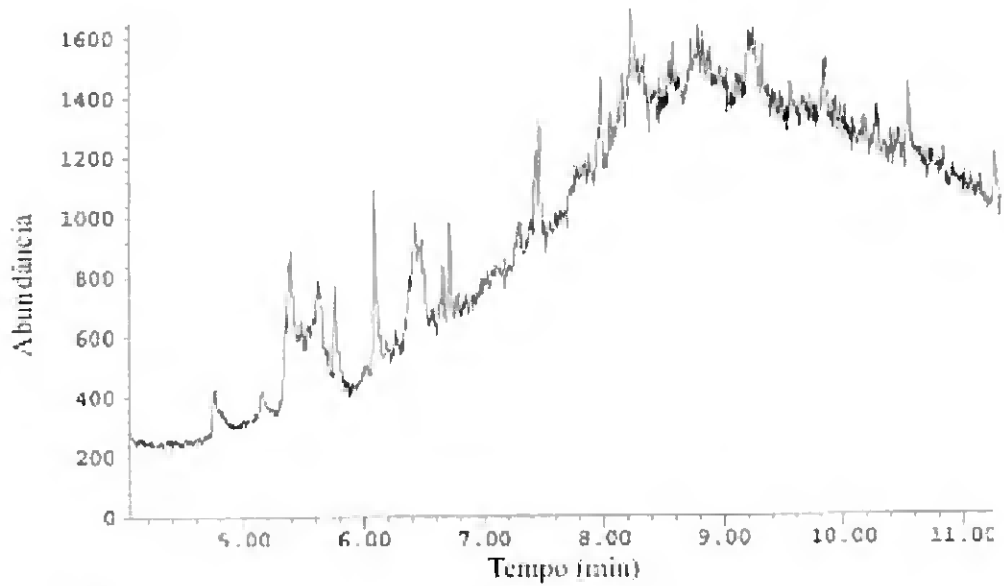


Figura 12 – Exemplo de cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM, do GLI, ilustrando o ruído

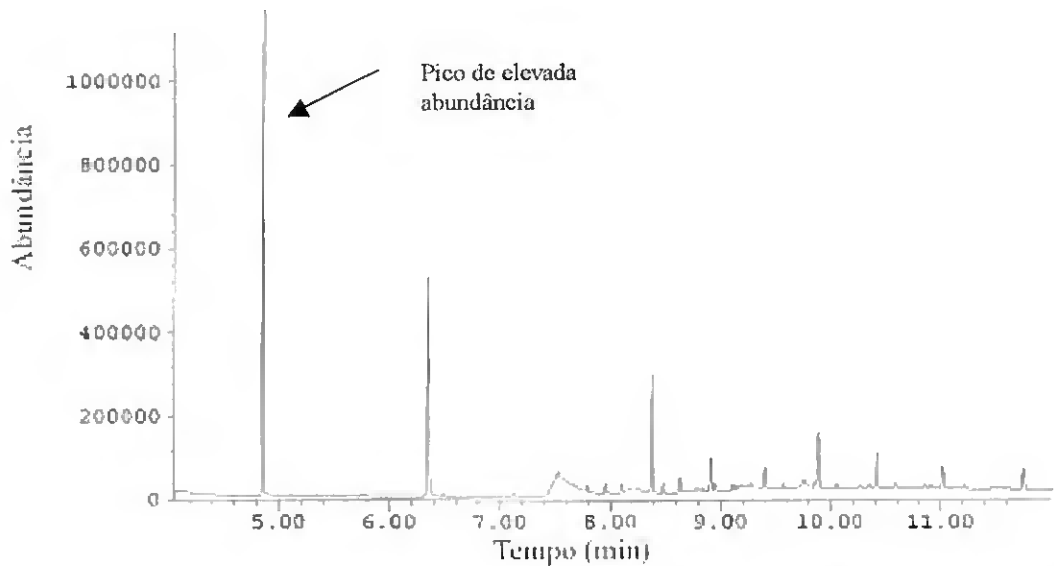


Figura 13 – Exemplo de cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM, AAMF, ilustrando a elevada abundância de um dos picos

Optou-se, assim, pela utilização de septos de *teflon* que se mostraram mais imunes aos vapores libertados durante a derivatização e *vials* de maior dimensão. Tal sistema foi conjugado com tampas sem orifícios e mostrou-se mais eficaz (ver Figura 14).



Figura 14 – Vials, tampas e septos respectivos

- c) Apesar de se diminuir o “ruído” no cromatograma, através do sistema referido anteriormente, constatou-se que, após utilizações sucessivas dos mesmos *vials*, se obtinham picos de metabolito no cromatograma quando a amostra apenas continha, glifosato. Considerou-se que tal situação poderia ocorrer devido a lavagem imperfeita dos *vials* e/ou limpeza imperfeita da coluna (o procedimento de limpeza consistia na injeção de acetato de etilo na coluna, sempre que se passava dum padrão mais concentrado para um padrão menos concentrado, ou quando se injectava outra série de padrões). Nestas circunstâncias optou-se por utilizar sempre *vials* novos em cada derivatização e substituir a coluna já utilizada em diversas experiências por uma coluna nova (manteve-se o procedimento de limpeza descrito anteriormente, acrescido de uma limpeza a fundo, quando a coluna era utilizada por outros técnicos, que consistiu em injeções consecutivas de metanol, acetonitrilo, acetato de etilo e hexano). Também foi colocada a hipótese de a contaminação ter origem na coluna que com o tempo se estivesse a degradar, acontece que o problema não surgia quando se injectava apenas solvente.

Suspeitou-se que o aparecimento do metabolito se pudesse dever à degradação do glifosato sob o efeito da luz, pelo que se experimentou a utilização de *vials* de cor âmbar (ver Figura 15) e o revestimento de todo o



material onde estavam os padrões com papel de alumínio para protecção da luz, contudo concluiu-se que tal sistema não produzia qualquer benefício. Nestas circunstâncias sempre que se derivatizava uma série de padrões derivatizava-se também um branco onde o pico com tempo de retenção igual ao do glifosato e/ou de metabolito era subtraído ao respectivo pico da amostra. Face ao atrás exposto verifica-se que o ruído no cromatograma é independente dos *vials* utilizados (novos ou lavados), do tipo de coluna utilizada na separação ou degradação do glifosato na presença da luz e pode admitir-se que as contaminações ocorridas devem-se ao processo de derivatização e/ou a outro factor que não foi possível determinar em tempo útil.

- d) Apesar do trabalho de Alferness, Philip L. e Iwata, Yutaka [40] referir que os padrões eram estáveis durante cerca de 6 meses, verificou-se que para derivatizações realizadas passado uma semana do padrão ter sido feito, o sinal no cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM diminuía substancialmente (na Figura 16 e na Figura 17 exemplifica-se para o modo GLI a referida diminuição). De referir que essa diminuição era contínua, ou seja, quanto mais passavam as semanas maior era a diminuição. Na observação das figuras referidas anteriormente verifica-se que a abundância diminui de cerca de 3 vezes quando

se derivatiza um padrão com uma semana (diminui de uma abundância de cerca de 1300 para uma abundância de cerca de 400).

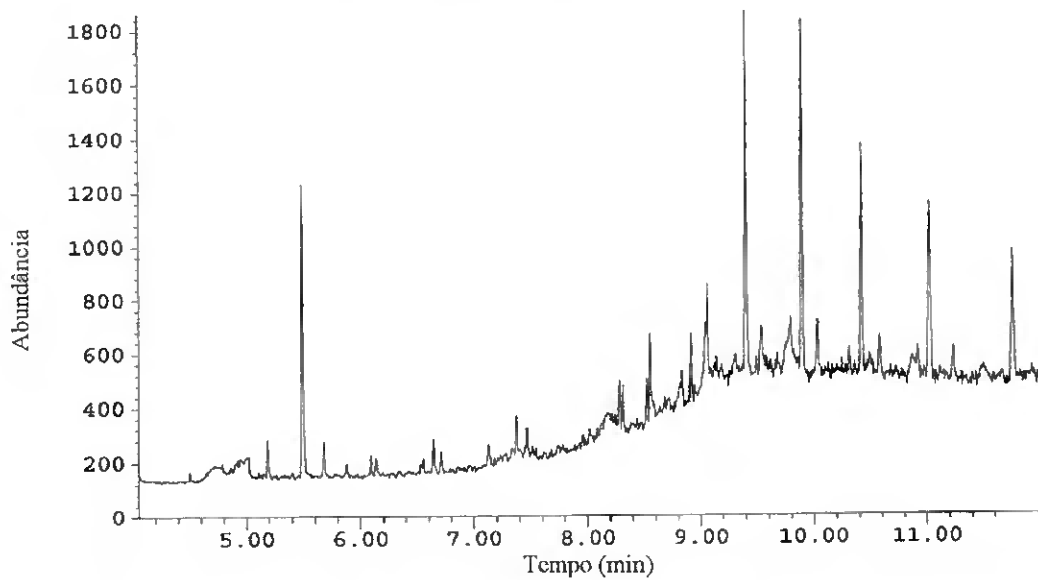


Figura 16 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM, exemplificativo de derivatização efectuada no mesmo dia do padrão, do GLI que aparece com o tempo de retenção de 5,234 min.

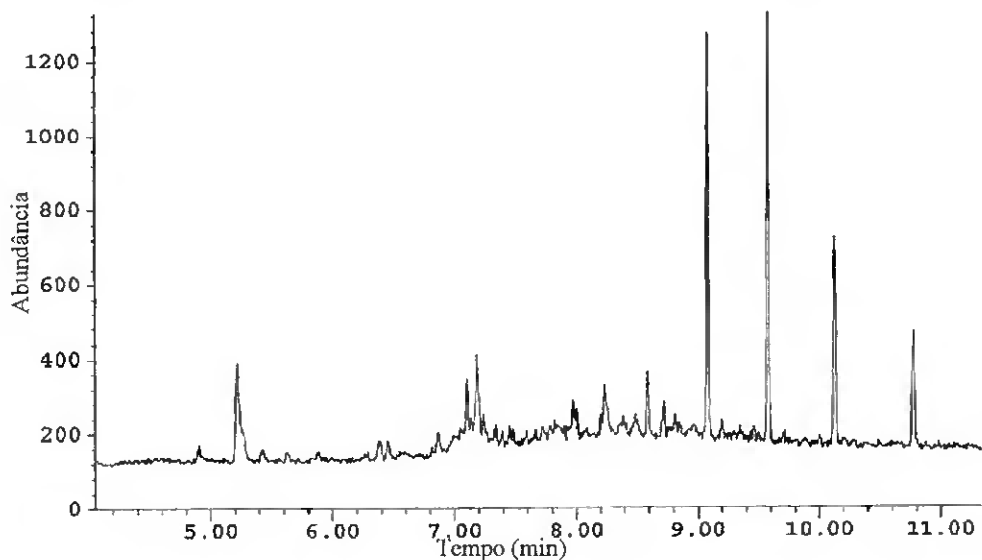


Figura 17 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM, exemplificativo de derivatização efectuada uma semana depois do padrão, do GLI que aparece com o tempo de retenção de 5,234 min.

Especulou-se que tal situação se devia a adsorção dos analitos ao vidro. Uma vez que era necessário efectuar rigorosamente os padrões, através de balões volumétricos de vidro, optou-se de início por tentar verificar se existia um ponto de saturação do vidro relativamente à adsorção de analitos que permitisse a sua utilização com confiança no valor que se obterá. Fizeram-se várias experiências que permitiram concluir que o processo de

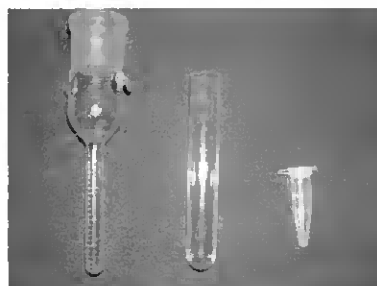


Figura 18 – Recipientes utilizados na preparação dos padrões diários

saturação do vidro era muito moroso. Assim optou-se, em seguida, por efectuar os padrões no balão volumétrico de vidro e passar o mais rapidamente possível para garrafas de plástico. Para além disso, efectuaram-se experiências com diferentes recipientes utilizados na preparação do padrão diário tendo-se optado pela utilização do recipiente de plástico tipo *Eppendorf*. Na Figura 18 ilustram-se os três tipos de recipientes utilizados na preparação dos padrões de trabalho diários. Tal sistema permitiu melhorias substanciais. Posteriormente encontrou-se o trabalho de Alferness, Philip L. e Wiebe, Lawrence A [43], o qual estipula a preparação de padrões através de pesagens sem recorrer a balões volumétricos de vidro. Este sistema passou a ser utilizado e produziu melhorias ligeiras relativamente ao sistema anterior.

- e) Apesar dos autores mencionados anteriormente [40, 43], referirem que o método é reprodutível⁹, verificou-se existir uma grande variação de valores para o

⁹ A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efectuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como: diferentes laboratórios, diferentes operadores; diferentes equipamentos; e/ou épocas diferentes [51].

mesmo padrão, conforme se explicita no capítulo 3, pág. 65. Verificou-se, inclusive, que a variação/dispersão era maior para o ácido aminometilfosfónico do que para o glifosato. Constatou-se ainda

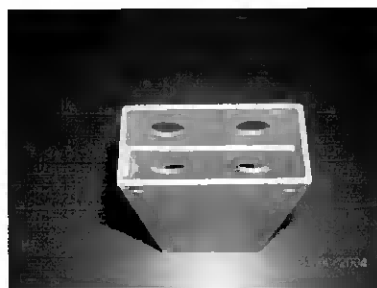


Figura 19 – Bloco de alumínio

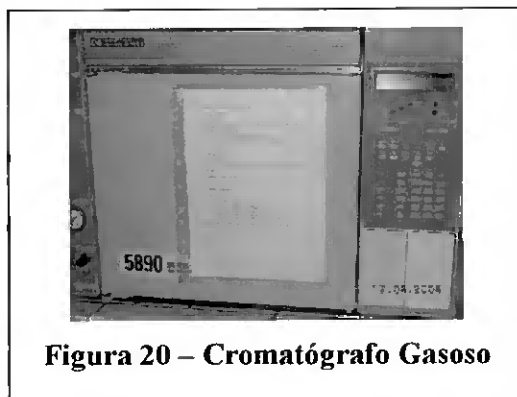
que em cada derivatização o glifosato apresentava uma linearidade razoável entre as concentrações e as áreas dos picos no cromatograma enquanto o metabolito não apresentava, aparentemente, qualquer relação constante. Nestas circunstâncias, optou-se por abandonar a determinação do metabolito e cingir o trabalho à determinação do glifosato em sistemas de águas naturais, uma vez que se conseguia obter num conjunto de padrões uma relação linear.

- f) Inicialmente o bloco utilizado para a derivatização não era maciço (ver ilustração na Figura 19) e a mesma era efectuada numa estufa onde era difícil saber a temperatura do sistema. Assim optou-se por utilizar um bloco de alumínio maciço e proceder ao aquecimento da mistura a derivatizar num banho de água e controlar a temperatura num dos buracos do bloco.

Em suma, iniciou-se o trabalho recorrendo a uma 1ª metodologia, baseada, no essencial, no artigo [40] e terminou-se o trabalho recorrendo a uma 2ª metodologia, baseada na conjugação dos procedimentos adoptados, face aos problemas detectados, com os artigos [40, 43].

2.2. Instrumentação

O sistema analítico utilizado consistiu num cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard (HP) 5890 Série II, equipado com um detector de espectrometria de massa (MSD) HP 5971, HP UNIX Chem Station para aquisição de dados, conforme se ilustra, respectivamente, na Figura 20 e na Figura 21. O cromatógrafo foi instalado com sistema de entrada *split-splitless* operando no modo *splitless*.



Colunas analíticas e programa de temperatura:

- a) 0,25 mm id × 30 m, de sílica fundida com 0,50 µm de espessura de filme *cross-linked*, 5 % fenil/95 % dimetil polysiloxane [Restek XTI-5]. Programa de temperatura: temperatura inicial 90 °C (manteve-se 1,5 min), aumentar até 300 °C à razão de 30 °C/min até 300 °C (manteve-se 4 min). Um programa alternativo para aumentar a resolução consistiu em: temperatura inicial 60 °C (manteve-se 1,5 min), aumentar até 120 °C à razão de 10 °C/min (manteve-se 1 min), aumentar até 300 °C à razão de 30 °C/min (manteve-se 4 min).
- b) 0,18 mm id × 40 m, 0,20 µm de espessura de filme *cross-linked*, 100 % dimetilsiloxano [Restek RTX-1]. Programa de temperatura: temperatura inicial

90 °C (manteve-se 1,5 min) aumentar à razão de 30 °C/min até 300 °C (manteve-se 4 min).

- c) 0,18 mm id × 20 m, 0,20 µm de espessura de filme, 80 % dimetil – 20 % difenil polisiloxano [Restek RTX-20]. Programa de temperatura: temperatura inicial 90 °C (manteve-se 1,5 min), aumentar à razão de 25 °C/min até 300 °C (manteve-se 2 min).

Nota: a utilização de três colunas prende-se com o facto de a primeira se ter danificado acidentalmente e as outras duas por questões operacionais do laboratório. Ou seja utilizou-se em alturas diferentes as colunas descritas em b) e c) porque também tinham características que permitiam a separação do herbicida em estudo.

2.3. Reagentes, e preparação de soluções

Glifosato de 99,9 % de pureza, ácido aminometil fosfónico de 99 % de pureza, trifluoroacético anidro de 99 % de pureza, 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol de 98 % de pureza, 3,7 – dimetil – 2,6 – octadienal (cital) de 95 % de pureza, foram adquiridos à Sigma-Aldrich. Todos os solventes (acetato de etilo e metanol da Merck Lichrosolv) foram de alta pureza para análise de resíduos de pesticidas. Água *millipore*. Uma solução contendo 160 mL de água (A), 40 mL de metanol (M) e 2,7 mL de HCl, p.a., (AC) concentrado (AMAC). Pipeta da Gilson Pipetman (P1000) de volume variável (0,2 a 1000 µL) com pontas de plástico descartáveis, usada para o manuseamento dos padrões aquosos antes da derivatização, das amostras, dos analitos derivatizados e dos padrões de trabalho. Tubos descartáveis tipo *Eppendorf* de capacidade 1 mL para preparação dos padrões de trabalho diários.

O citral deve ser mantido no frigorífico pois degrada-se com alguma facilidade (tempo de vida de 6 meses) adquirindo coloração amarelada. Preparou-se uma solução 0,2 % de citral em acetato de etilo (adicionou-se 50 µL citral a 25 mL de acetato de etilo). O preparo foi efectuado mensalmente.

Vials de vidro incolor de 4 mL com rosca no topo da Supelco, ilustrado na Figura 22. Tampas fechadas, para os *vials*, de plástico fenólico com septo de *teflon* da Supelco. (As tampas feitas de material não fenólico, como por exemplo polipropileno, são mais suaves e podem implicar perdas durante e derivatização).



2.4. Preparação das soluções padrão

Solução mãe de glifosato – Pesou-se em balança analítica Precisa 125 A SCS 50 mg ($\pm 0,1$ mg) de glifosato e colocou-se num frasco de polietileno de capacidade 150 mL. Adicionou-se ao frasco uma quantidade conhecida de água de forma a obter uma solução em que o glifosato esteja na concentração de 1000 µg/mL. Calculou-se a massa de água, m_a , necessária (em g) utilizando a seguinte fórmula:

$$m_a = \frac{m_p \times P_p \times d_a}{C_p} \quad (2.3-1)$$

C_p = concentração do analito na solução final (1 mg/mL); m_p = massa do padrão (mg);
 P_p = pureza do padrão (100 % = 1,00) e d_a = densidade da água (assumiu-se 1,00 g/mL).

Solução mãe de ácido aminometilfosfónico – 1000 µg/mL. Preparou-se como descrito no ponto anterior, mas usou-se AAMF como padrão.

Soluções padrão intermédias – 100, 10,0, 1,00, 0,10 µg de cada analito/mL. Preparou-se uma única solução padrão intermédia contendo ambos os analitos, cada um deles na concentração de 100 µg/mL. Recorrendo a pontas de pipetas de polipropileno descartáveis, transferiu-se 5 g de cada padrão da solução mãe para um frasco de polipropileno (PP). Diluiu-se com água até obter a massa de 50,0 g. De um modo similar, diluições em série permitiram a obtenção dos padrões de 10,0, 1,00 e 0,10 µg/mL. Adicionou-se 2 a 3 gotas de HCl a todas as soluções mãe e intermédias como conservante. Guardou-se no frigorífico.

Soluções padrão de trabalho diário – utilizando a solução padrão intermédia de 0,10 µg/mL prepararam-se diariamente as soluções padrão de trabalho. Num *Eppendorf* e recorrendo a uma pipeta da *Gilson* com ponta de plástico descartável prepararam-se 4 padrões de trabalho diários, retirou-se 20 µL, 50 µL, 70 µL e 100 µL até perfazer 1 mL de solução utilizando solução AMAC como solvente. Preparou-se também um branco onde se usou apenas 1 mL da solução AMAC. Estes padrões e o respectivo branco foram derivatizados.

Apresenta-se, na Figura 23, o esquema de preparação das soluções padrão.

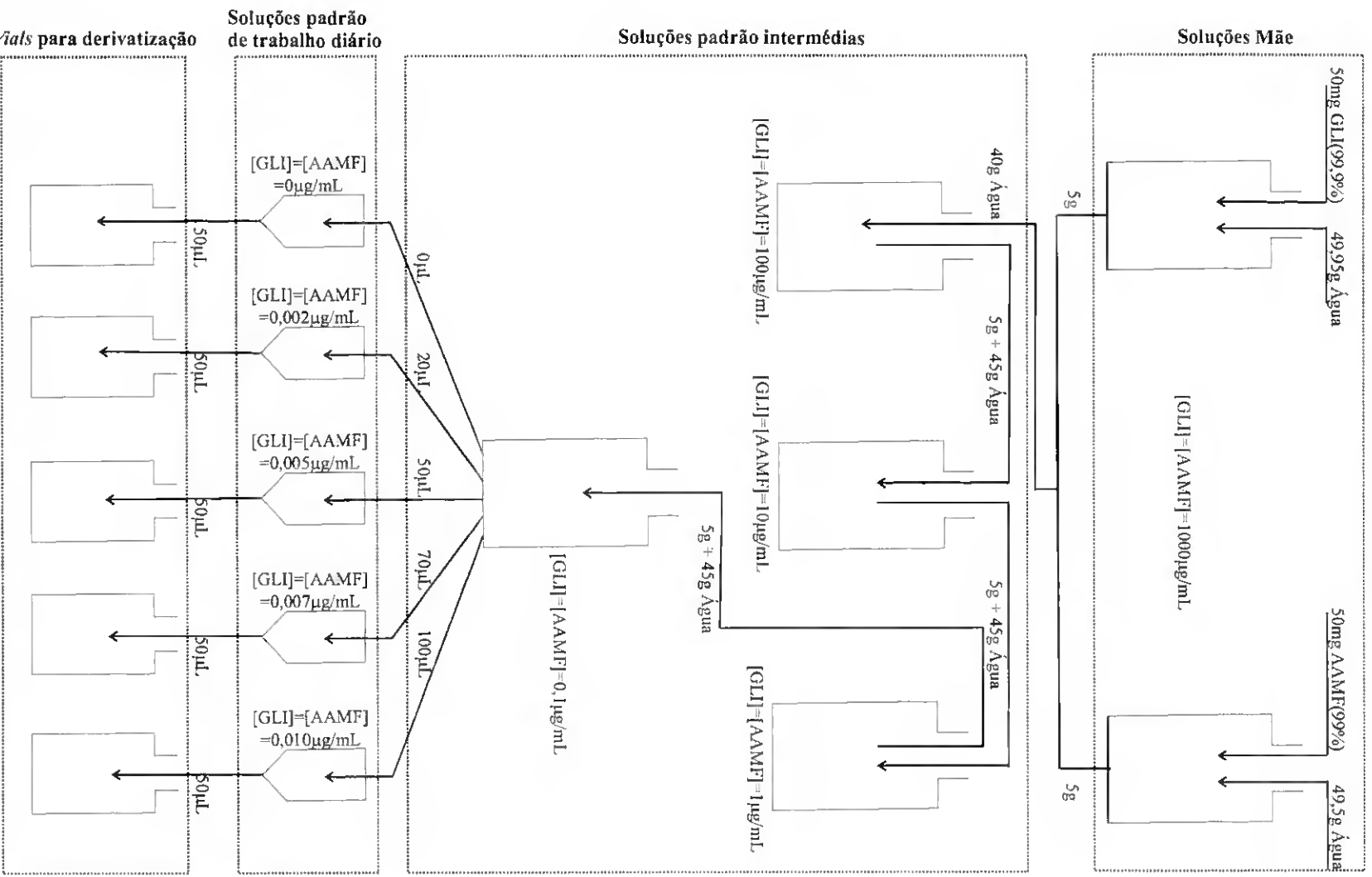
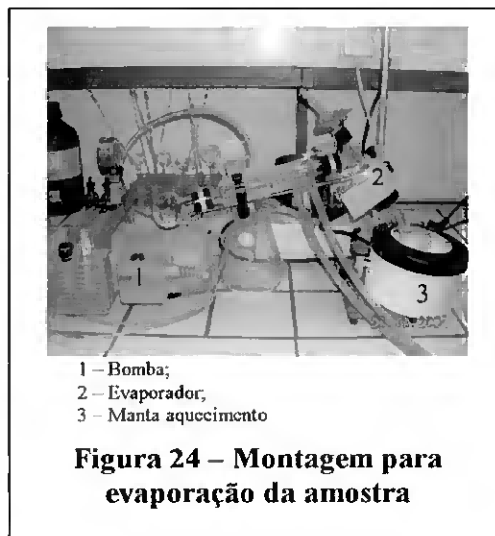


Figura 23 – Esquema de Preparação das soluções padrão

Nota: o glifosato (e numa menor extensão o ácido aminometilfosfónico) adsorvem-se em superfícies de vidro. Este fenómeno é especialmente pronunciado em soluções padrão, mas menos pronunciado após derivatização. Material de vidro volumétrico não deve ser utilizado para a preparação dos padrões pois não se consegue lavar o material de maneira adequada. As soluções padrão foram preparadas por medida da massa utilizando uma balança analítica. Utilizou-se pipeta da *Gilson* com pontas de plástico descartáveis para manuseamento dos padrões.

2.5. Ensaios de recuperação e análise de amostras de água

Evaporou-se, num evaporador rotativo da Heidolph, com manta de aquecimento JP Selecta SA, 50 mL de solução de concentração conhecida igual a 0,1 µg/L ou de amostras de águas naturais recolhidas, até à secura e dissolveu-se o resíduo em 1,25 mL de solução AMAC. Na Figura 24 ilustra-se a montagem experimental utilizada na evaporação da



amostra de água a analisar e, na Figura 25 apresenta-se de forma esquemática os procedimentos necessários de preparação da amostra para derivatização. As amostras de água foram recolhidas para garrafas de plástico três de cada para controlo.

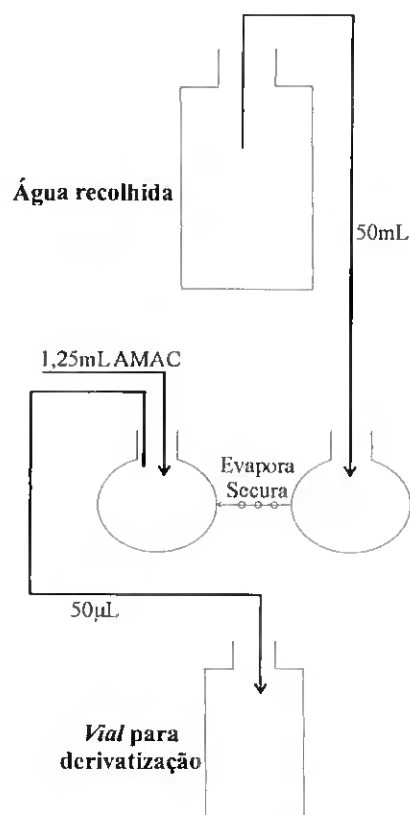


Figura 25 – Esquema de preparação da amostra para derivatização

2.6. Derivatização

Preparação do reagente de derivatização frio – Preparou-se o reagente de derivatização num recipiente de vidro de tamanho adequado com tampa em PTFE (politetrafluoroetileno) adicionando 1 volume de HBF a 2 volumes de TFAA. Não se encheu o recipiente mais de 75 % da sua capacidade. Fechou-se o recipiente e inverteu-se o mesmo 3 a 4 vezes. Abriu-se a tampa cuidadosamente para libertar pressão. Preparou-se diariamente a mistura do reagente de derivatização. Usou-se uma pipeta graduada de vidro para medir 1,6 mL e transferiu-se para um *vial* de 4 mL de capacidade com tampa de rosca. Tapou-se o *vial*. Colocaram-se os *vials* num bloco de alumínio maciço para arrefecimento/aquecimento com buracos de cerca de 16 mm de diâmetro,

ilustrado na Figura 26. Colocou-se o bloco na arca frigorífica a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Arrefeceu-se o bloco a uma temperatura de -40 a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e antes de prosseguir confirmou-se a temperatura colocando um termómetro num dos buracos do bloco de alumínio. A necessidade de arrefecimento da mistura derivatizante prende-se com o facto de a mesma reagir violentamente na presença de

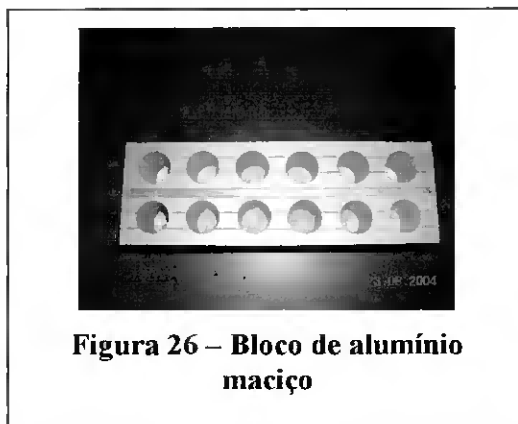


Figura 26 – Bloco de alumínio maciço

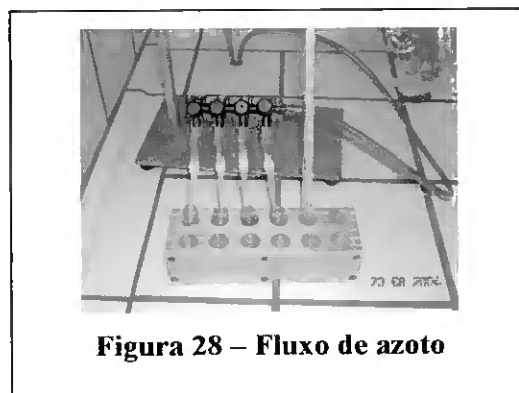
soluções aquosas uma vez que um dos reagentes se encontra na forma anidra.

Derivatização do analito –Com uma pipeta da *Gilson*, com pontas de plástico descartáveis, adicionou-se $50\ \mu\text{L}$ da amostra ou dos padrões de trabalho diários ao reagente de derivatização pré arrefecido. O volume de amostra ou de padrão de trabalho manteve-se constante para todas as derivatizações dentro dum mesmo conjunto.

Nota: tomou-se especial cuidado aquando do manuseamento durante a preparação da mistura derivatizante e no manuseamento dos *vials* gelados, por isso usaram-se luvas.

Taparam-se os *vials*, e voltou-se a colocá-los no bloco de alumínio. Retiraram-se todos os *vials* do bloco e deixou-se atingir a temperatura ambiente, verificando se as tampas estavam fechadas convenientemente. Colocou-se os *vials* 1 hora no bloco de alumínio num banho e manteve-se o bloco à temperatura de 85 a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 5 min de aquecimento, verificou-se as tampas para assegurar que estavam correctamente fechadas. Agitou-se os *vials* de 15 em 15 min; verificou-se também que não tinha ocorrido evaporação por análise do volume de reagente no *vial*. Após aquecimento,

retirou-se os *vials* do bloco de alumínio, e deixou-se atingir a temperatura ambiente. Evaporou-se o excesso de reagente de derivatização sob um fluxo suave de azoto (ver Figura 27 que ilustra pormenor das multi-saídas de azoto o que permitia uma evaporação simultânea de 4 *vials* e Figura 28 que ilustra montagem utilizada para o fluxo de azoto) colocando o bloco de alumínio com os *vials* a evaporar num banho à temperatura de 40 a 50 °C. O tubo de evaporação colocou-se junto à entrada do *vial* (pescoço). Após secura aparente manteve-se o fluxo de azoto e a temperatura por mais 30 min, devido a possíveis resíduos do reagente de derivatização ou sub produtos que podiam afectar a análise cromatográfica. Após evaporação, fechou-se os *vials*, e deixou-se atingir a temperatura ambiente. Adicionou-se em seguida 225 µL de acetato de etilo contendo 0,2 % de citral. Minimizou-se a exposição ao ar. Fechou-se o *vial* e agitou-se vigorosamente durante 20 s. Usou-se uma seringa da Hamilton de 10 µL para injectar 2 µL na câmara de injeção do cromatógrafo de fase gasosa.



2.7. Análise GC

A velocidade do gás de arraste (Hélio), medida à temperatura de 180 °C, consoante o tipo de coluna utilizado efectuava-se através do ajuste da pressão à cabeça da coluna. A temperatura da porta de injeção foi 250 °C. As injeções foram conduzidas no modo *splitless* com a purga a 1,25 min após injeção. O volume injectado foi de 2 µL com seringa Hamilton. O detector de espectrometria de massa foi calibrado manualmente usando perfluortributilamina (PFTBA) como composto de calibração. As massas calibradas manualmente foram m/z 414, 502 e 614. A calibração foi efectuada numa gama de m/z entre 300 e 650. Após a calibração sob estes parâmetros a sensibilidade do MSD foi melhorada aumentando a largura do pico (largura a meia altura) dos iões de calibração para aproximadamente 2,6 u.m.a..

O MSD foi operado no modo SIM. Podem ser monitorizados até dois iões (m/z 584 e 611) para a detecção do derivado do GLI e até três iões (m/z 372, 446 e 502) para a detecção do derivado do AAMF. Na monitorização de cada analito o *dwell time* foi colocado a 135s [40]. No entanto monitorizou-se o derivado AAMF a m/z 446 e o derivado do GLI a m/z 611, pois obtém-se uma melhor resposta; nesta monitorização o *dwell time*: foi colocado a 100s [43]. A monitorização de dois iões para o derivado do GLI e de três iões para o derivado do AAMF pode ser utilizada para uma confirmação no caso de existirem dúvidas na substância em análise, este tipo de monitorização também pode ser útil para eliminar ou reduzir interferências indesejáveis.

Nota: a resolução pode ser otimizada por ajuste da temperatura inicial do forno entre os 60 °C e os 90 °C. Pode também ser útil ajustar outras variáveis programáveis como temperaturas intermédias e o tempo a que se mantém essa temperatura.

3. Resultados e discussão

Conforme descrito anteriormente, o método utilizado consistiu na preparação de diferentes padrões de glifosato e de ácido aminometilfosfónico, de concentrações conhecidas, na preparação de um branco para controlo, na derivatização desses padrões e do branco, para obtenção de derivados voláteis, na injeção de volumes constantes dos derivados, de concentração diferenciada, na câmara de injeção do cromatógrafo de fase gasosa, e na determinação da área dos picos correspondentes ao tempo de retenção do glifosato e do ácido aminometilfosfónico, para obtenção de uma recta de calibração da área versus concentração. Após a obtenção da recta de calibração, o método consistiu na preparação de amostras de concentração conhecida [igual ao limite máximo permitido por lei para pesticidas em águas para consumo ($0,1 \mu\text{g/L}$), sendo de $0,5 \mu\text{g/L}$ o valor para pesticida total [11]], para testar a capacidade de recuperação do método, e de amostras desconhecidas, para determinação da concentração associada com base na recta de calibração obtida.

Apresentam-se, nos subcapítulos seguintes, os resultados da determinação das rectas de calibração, os resultados de ensaios de recuperação, as incertezas associadas à metodologia e os resultados de ensaios com amostras de concentração desconhecida.

Salienta-se que é assumido que a derivatização tem rendimento 100 % e que a sua estequiometria é 1:1, conforme se ilustra na Figura 29 [67].

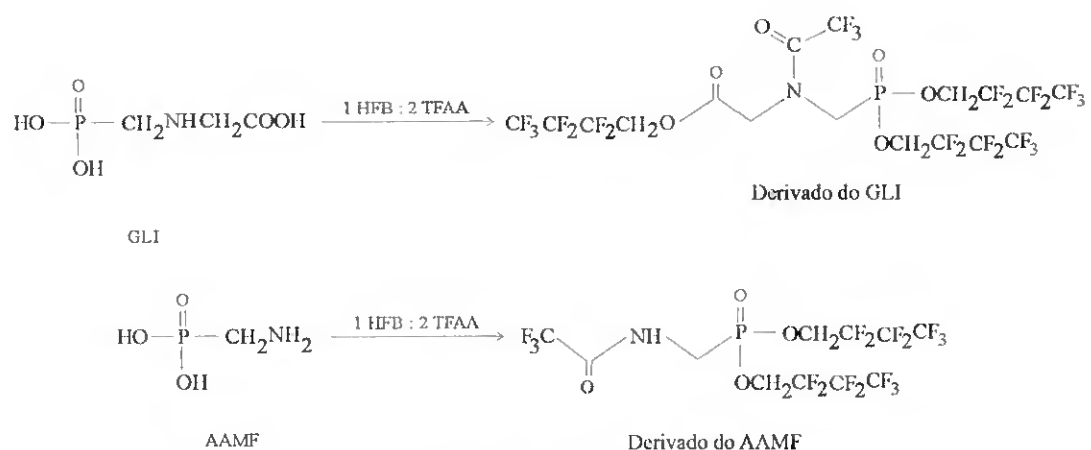


Figura 29 – Reacções de derivatização do GLI e do AAMF

3.1. Rectas de calibração

No artigo de Philip L. Alferness e de Yutaka Iwata [40], as estruturas esperadas para os derivados do GLI e do AAMF foram confirmadas através da obtenção dos espectros de massa dos compostos por EI com o detector de massa no modo *full scan*. No mesmo artigo foi efectuada confirmação adicional da estrutura dos derivados do GLI e do AAMF através dos espectros de EI (ver Figura 30) utilizando um espectrómetro de massa da marca Finnigan. Nestas circunstancias limitou-se o estudo aos iões de maior abundância: m/z 584 e 611 para o derivado do GLI e m/z 372, 446 e 502 para o derivado do AAMF. Por condicionalismos do equipamento não se detectaram os iões superiores a m/z 700.

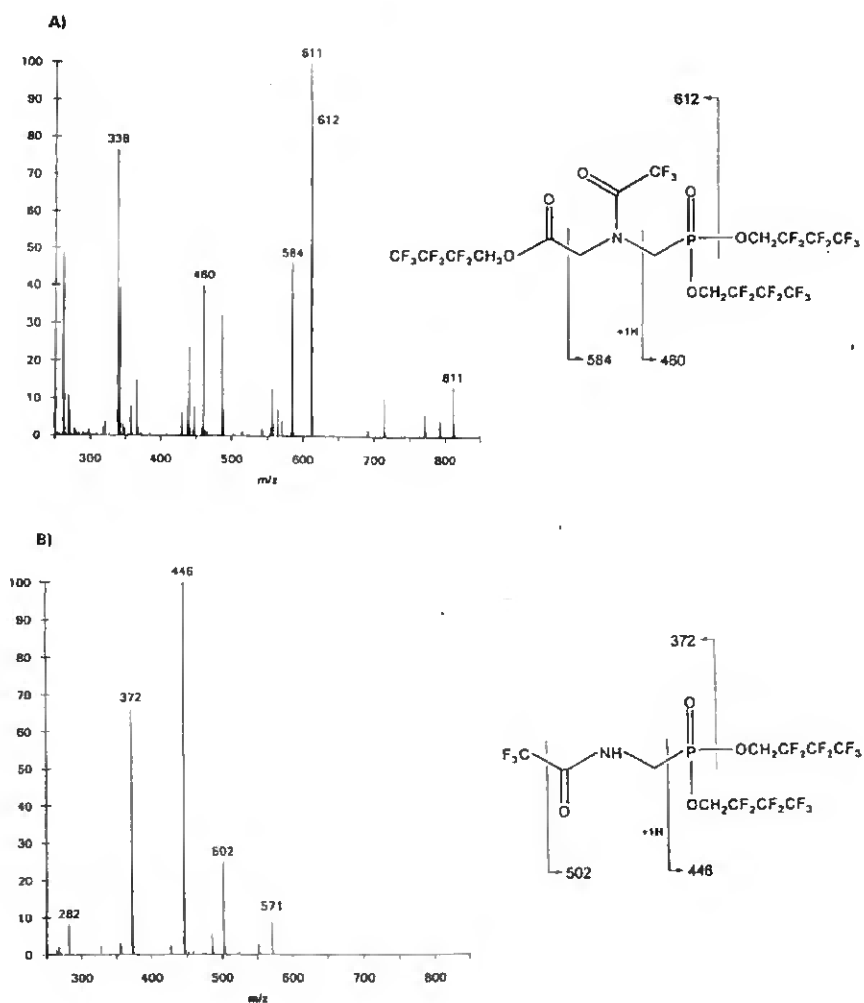


Figura 30 – Análise espectral de massa por EI e estruturas para o derivado do GLI (A) e do AAMF (B)

Apresentam-se, nos gráficos seguintes, Figura 31 para o AAMF e Figura 32 para o GLI, as rectas de calibração obtidas para cada derivatização, após o corrigir dos problemas detectados (ver capítulo 2.1 pág. 47). Estes gráficos representam a concentração dos padrões em função da respectiva área, obtida no cromatógrafo, sendo explicitados em cada gráfico a equação da recta de calibração, o coeficiente de correlação e as barras de erro (desvio padrão dos residuais). Na Figura 33 e na Figura 34 expõe-se o conjunto de todos os resultados obtidos, para o AAMF e para o GLI, respectivamente. No Apêndice A, descreve-se sob a forma de tabela, os valores das áreas obtidas em função da

concentração, respectivo tempo de retenção, coluna analítica utilizada e programa de temperatura das experiências realizadas para traçar as rectas de calibração para o AAMF e para o GLI.

O Apêndice B, é composto pelos gráficos da Figura 31 e da Figura 32 em tamanho maior para uma melhor visualização dos pontos da recta de calibração.

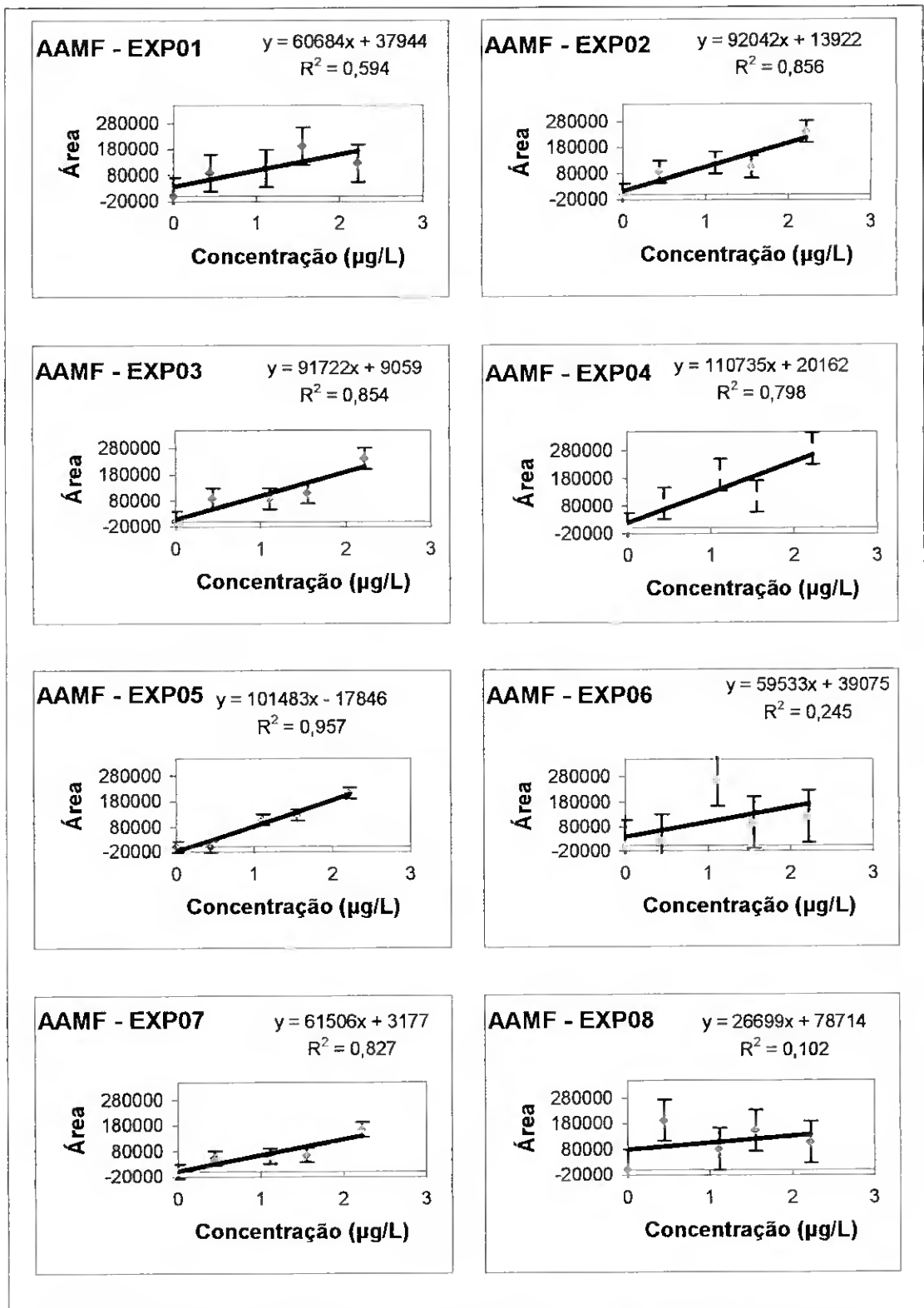


Figura 31 – Gráficos das rectas de calibração obtidas para cada uma das 8 experiências com o AAMF

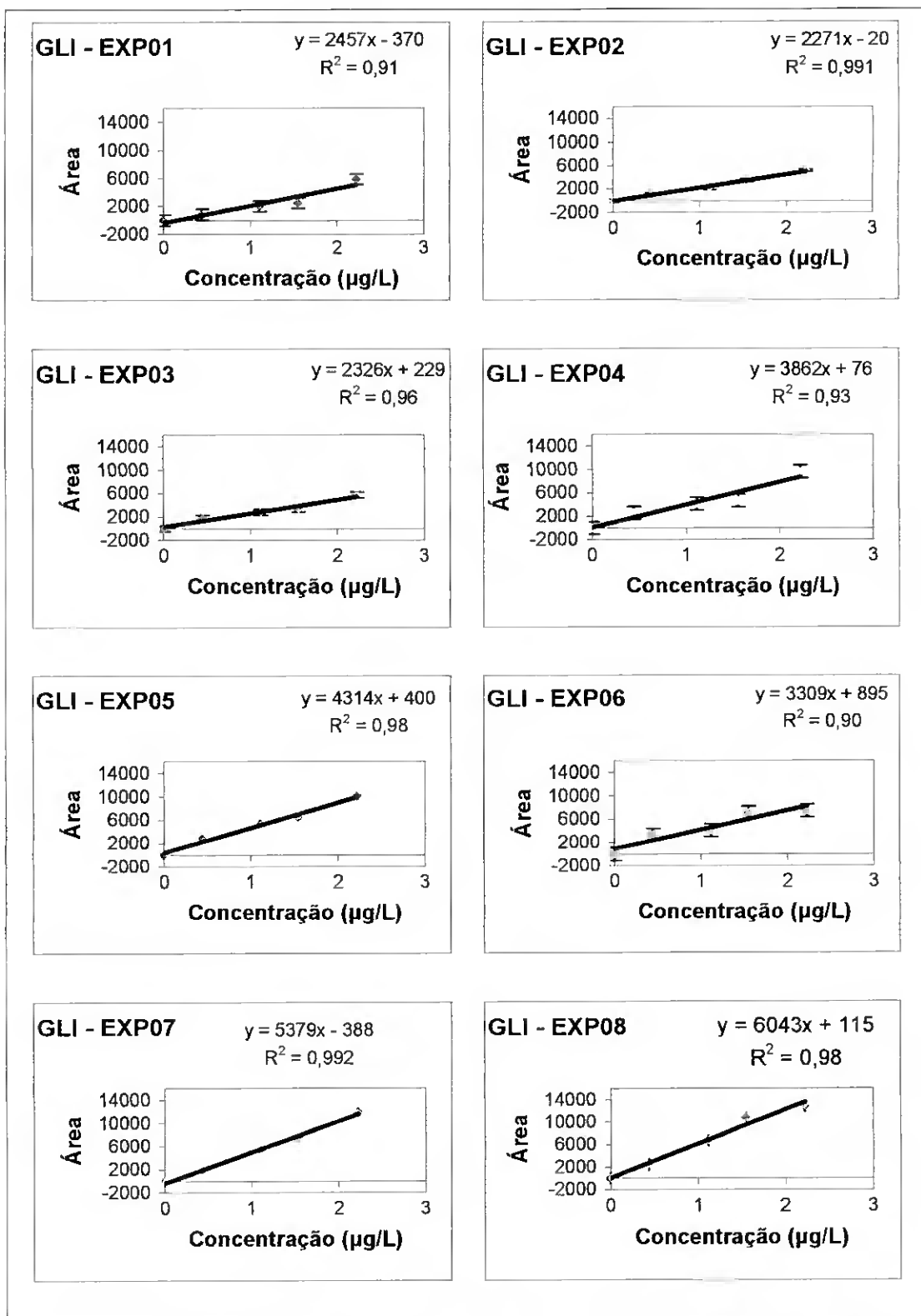


Figura 32 – Gráficos das rectas de calibração obtidas para cada uma das 8 experiências com o GLI

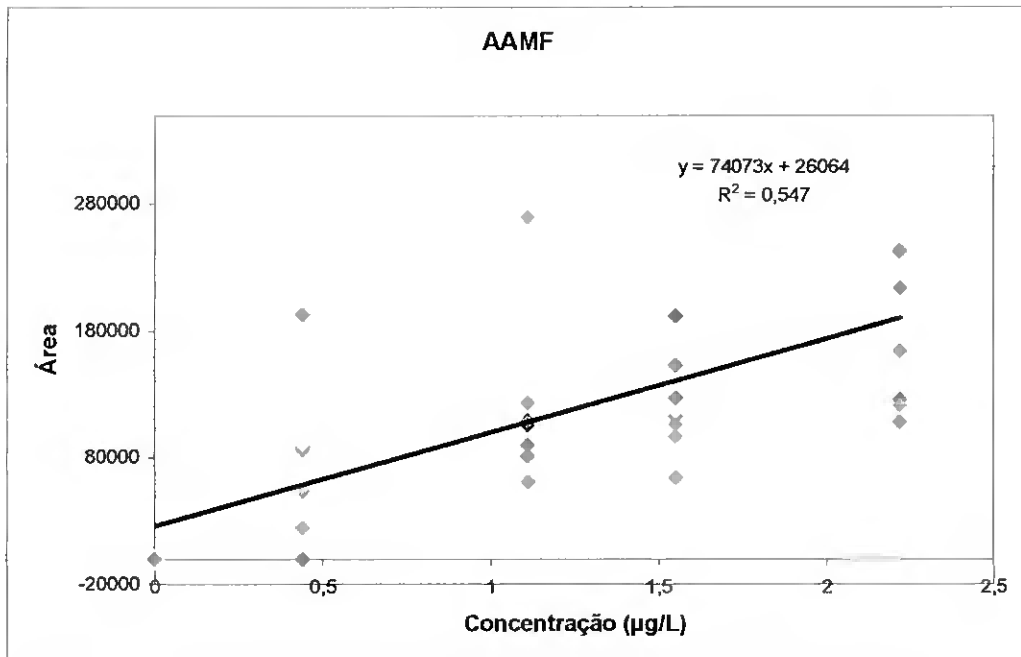


Figura 33 – Gráfico da recta de calibração para todas as 8 experiências com o AAMF

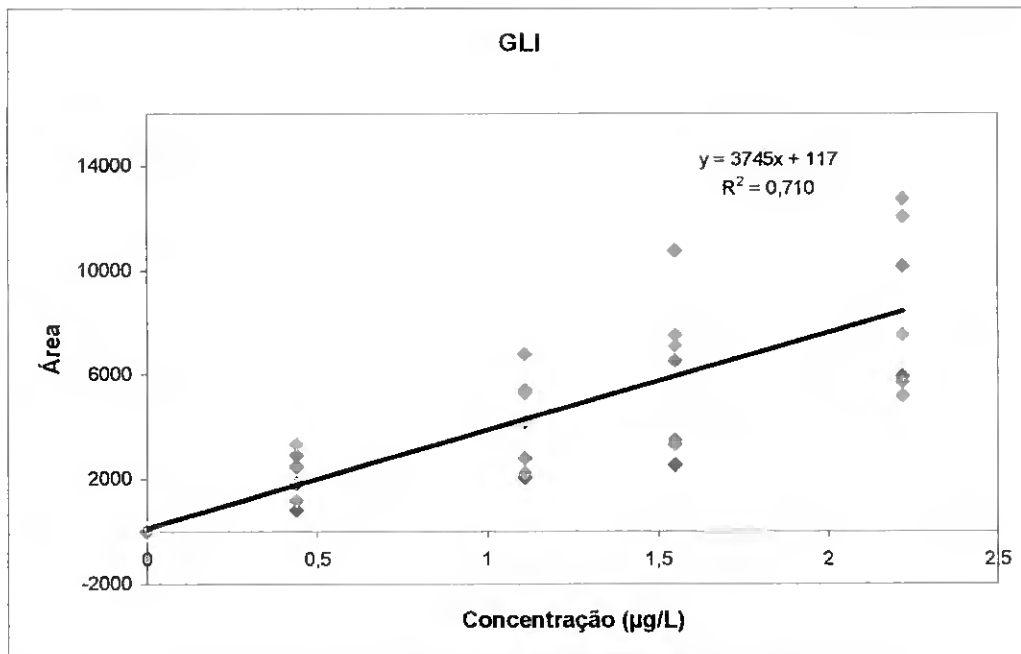


Figura 34 – Gráfico da recta de calibração para todas as 8 experiências com o GLI

Da análise dos gráficos anteriores, Figura 31 e Figura 33, constata-se que a relação entre a concentração mássica do produto da derivatização do ácido aminometilfosfónico e a área do respectivo pico do cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM aparenta não ser linear, mas sim aleatória. Nestas circunstâncias, considera-se inviável aplicar esta metodologia para determinação do ácido aminometilfosfónico com base em rectas de calibração.

Para o glifosato, Figura 32 e Figura 34, constata-se que a relação entre a concentração mássica do produto da derivatização e a área do respectivo pico do cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM aparenta ter uma linearidade razoável em cada derivatização, mas com alguma dispersão para diferentes derivatizações. Esta dispersão não se deve à mudança de coluna, pois verificou-se através das experiências realizadas que a dispersão existe mesmo quando se usa a mesma coluna. Nestas circunstâncias, optou-se por efectuar a determinação exclusiva do glifosato, com base nesta metodologia, sendo necessário efectuar sempre uma nova recta de calibração em cada derivatização.

Apresentam-se em seguida, na Figura 35, Figura 36, Figura 37 e Figura 38, a título exemplificativo, os cromatogramas obtidos por GC-MS em modo SIM da EXP02, cuja equação da recta de calibração é $y = 2271 \pm 166 \cdot x - 20 \pm 2$ com o valor da variável de *Student* para o nível de confiança de 95% e 3 graus de liberdade, para o glifosato (ilustram-se no Apêndice A, em forma de tabela, os valores das áreas obtidas em função da concentração, respectivo tempo de retenção, coluna analítica utilizada e programa de temperatura das outras experiências). A coluna analítica e o programa de temperatura para a obtenção dos seguintes cromatogramas obtidos por GC-MS em modo SIM são as descritas no capítulo 2.2 Instrumentação alínea a) pág. 54.

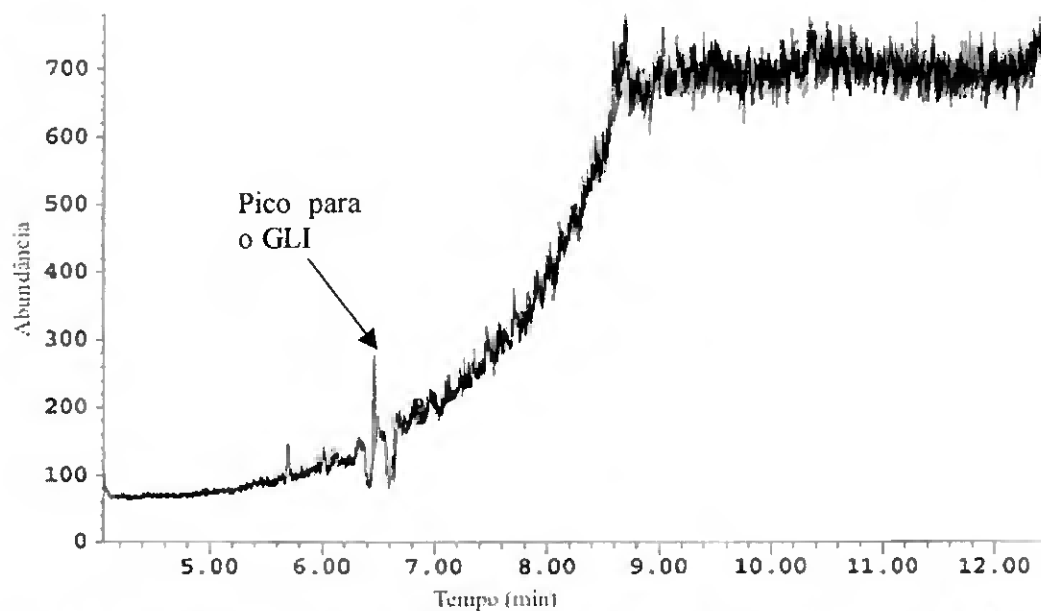


Figura 35 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 0,44 µg/L correspondente à experiência 2 com tempo de retenção de 6,459 min.

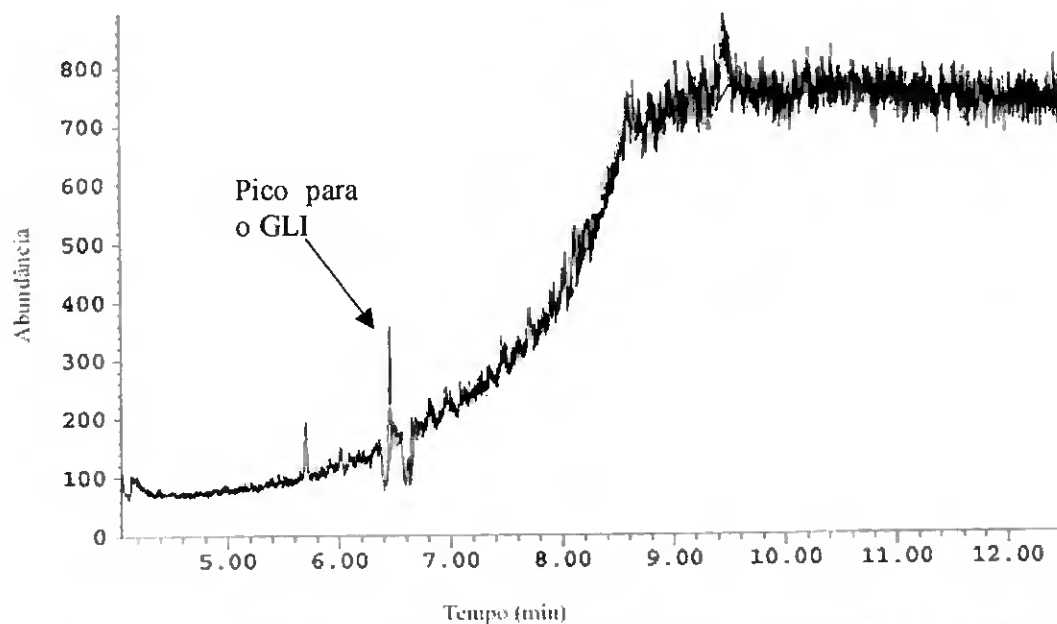


Figura 36 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 1,11 µg/L correspondente à experiência 2 com tempo de retenção de 6,458 min.

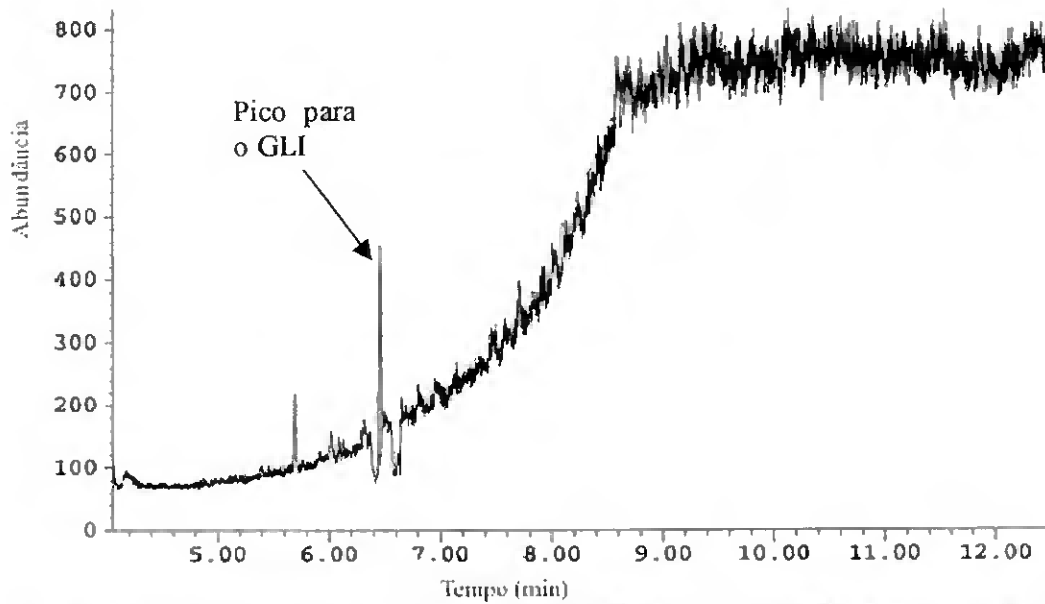


Figura 37 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 1,55 µg/L correspondente à experiência 2 com tempo de retenção de 6,455 min.

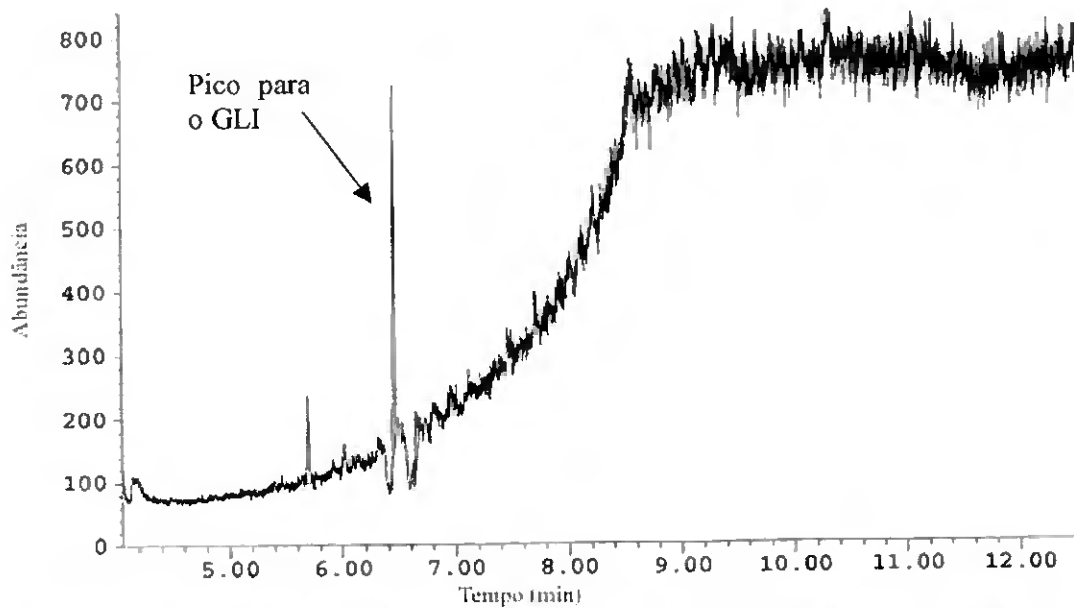


Figura 38 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 2,22 µg/L correspondente à experiência 2 com tempo de retenção de 6,454 min.

3.2. Ensaio de recuperação

Para verificação da aplicabilidade do método seguido, efectuaram-se 4 experiências com uma amostra de concentração conhecida (0,1 µg/L), tendo-se recuperado os valores que se apresentam na Tabela 8. O valor de 0,1 µg/L é a concentração na amostra de água recolhida, após o tratamento da amostra a concentração do analito a injectar no GC-MS é igual a 0,89 µg/L.

Tabela 8: Rectas de calibração associadas aos ensaios de recuperação, respectivos valores do factor e da %de recuperação e valor da média de recuperação e respectivo desvio padrão

	Recta Calibração	Factor recuperação	% Recuperação	Média ± Desvio Padrão
Ensaio I	EXP06	0,6	60	80 ± 14 %
Ensaio II	EXP07	0,9	90	
Ensaio III		0,8	80	
Ensaio IV	EXP08	0,9	90	

De acordo com a Comunidade Europeia [68], são aceitáveis percentagens de recuperação entre 70 e 110 %. Pode-se consultar no Apêndice C os valores das áreas e as rectas de calibração utilizadas nos quatro ensaios.

Apresentam-se, na Figura 39, Figura 41, Figura 42 e Figura 43, os cromatogramas obtidos por GC-MS em modo SIM correspondentes aos padrões e, na Figura 40, à amostra recuperada associada ao Ensaio 2 (a recta de calibração corresponde à EXP07 do glifosato, ver capítulo 3.1 pág. 66). Serve a sequência seguinte para ilustrar um ensaio de recuperação. A coluna analítica e o programa de temperatura utilizados para a obtenção dos cromatogramas obtidos por GC-MS em modo SIM e referidos anteriormente são as descritas no capítulo 2.2 Instrumentação alínea b) pág. 54. Os dados relativos às áreas e respectivo branco apresentam-se no Apêndice A.

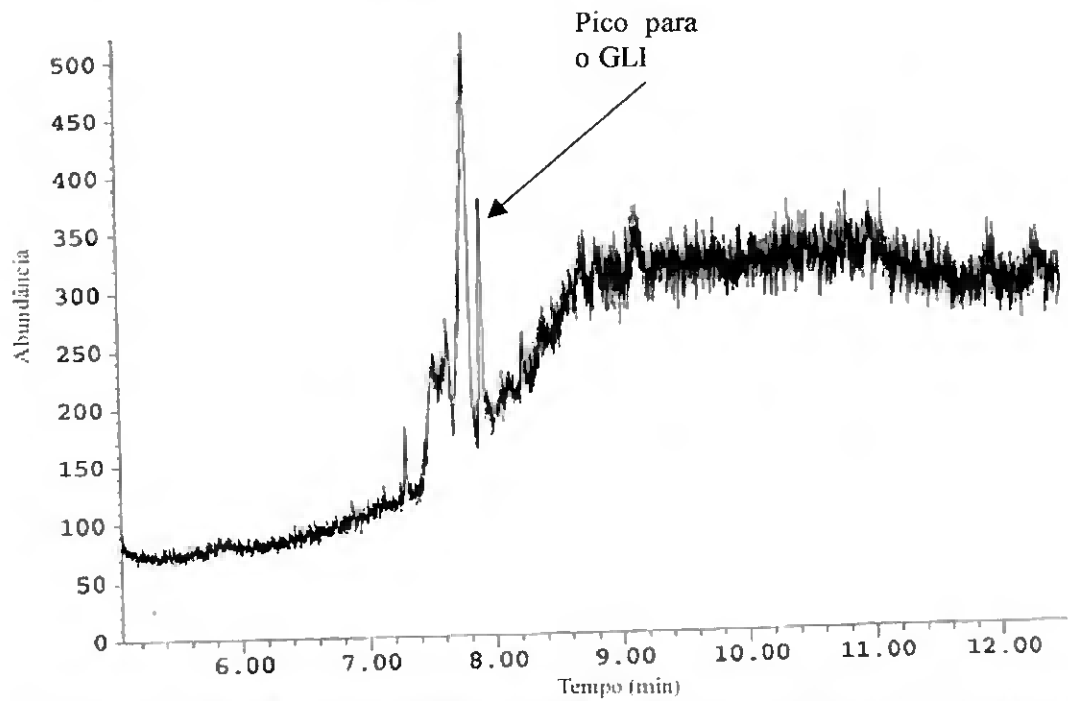


Figura 39 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 0,44 µg/L correspondente ao Ensaio 2 com tempo de retenção de 7,914 min.

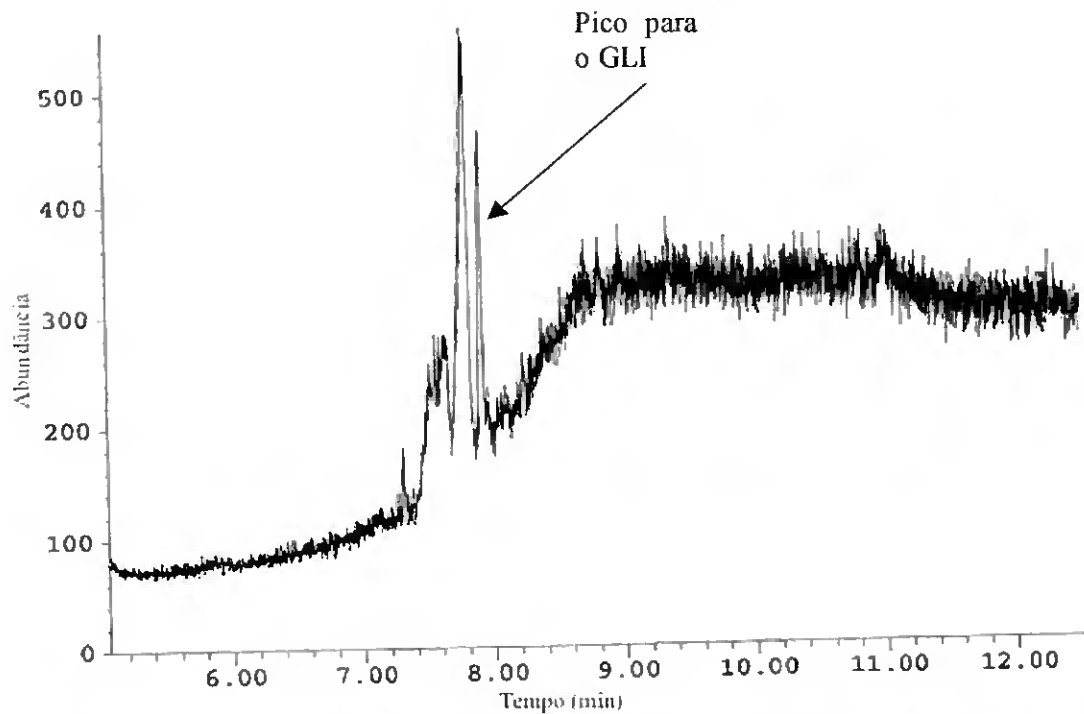


Figura 40 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para a amostra de concentração conhecida, 0,89 µg/L, correspondente ao Ensaio 2 com tempo de retenção de 7,903 min.

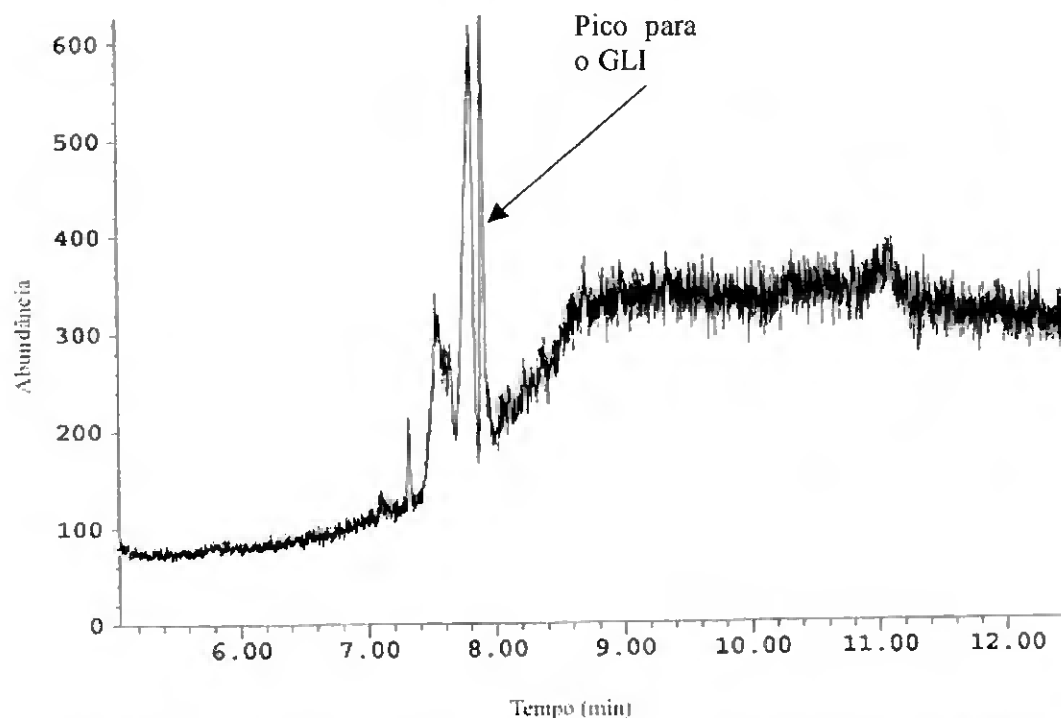


Figura 41 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 1,11 µg/L correspondente ao Ensaio 2 com tempo de retenção de 7,905 min.

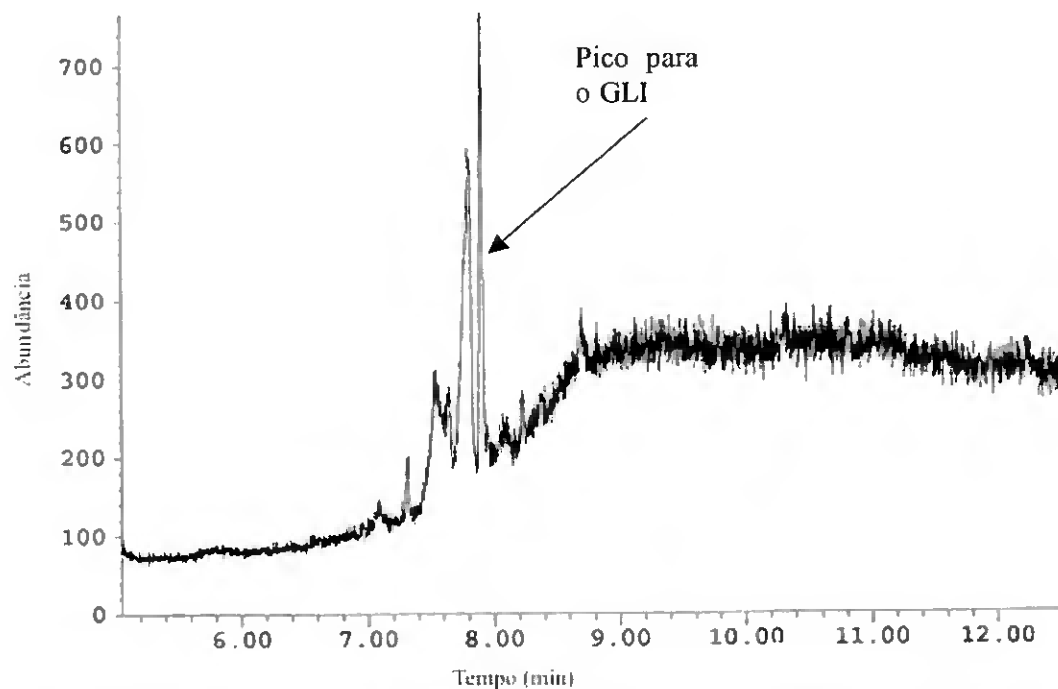


Figura 42 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 1,55 µg/L correspondente ao Ensaio 2 com tempo de retenção de 7,903 min.

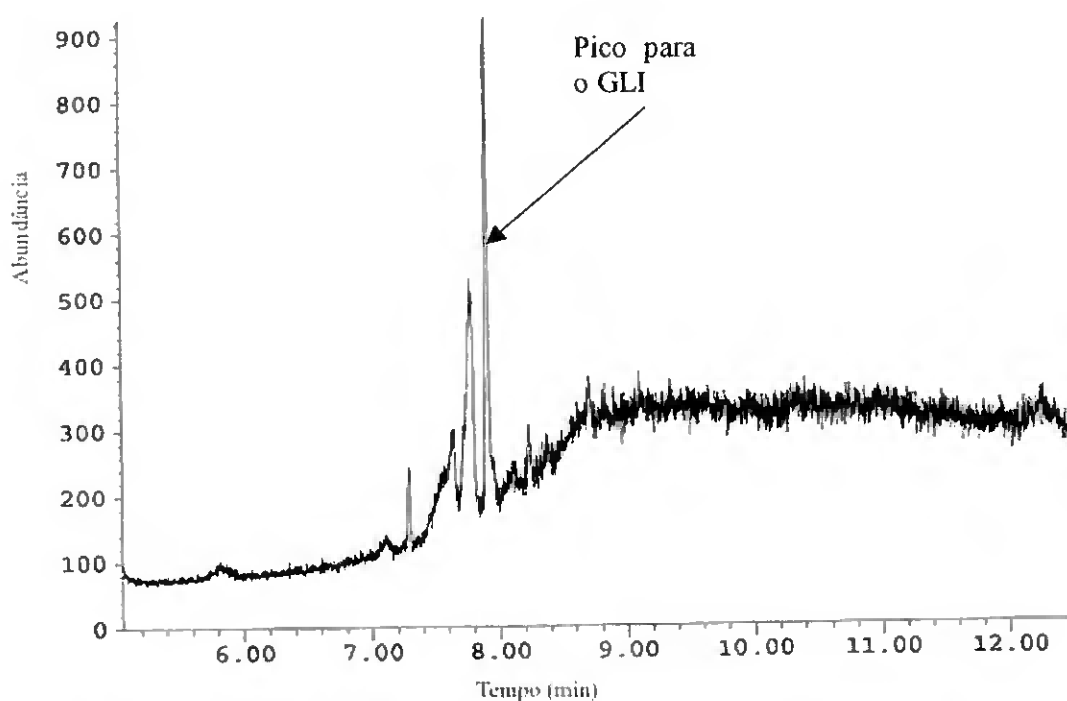


Figura 43 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o padrão de concentração 2,22 µg/L correspondente ao Ensaio 2 com tempo de retenção de 7,912 min.

Nota: O tempo de retenção para o GLI varia, nos diversos cromatogramas obtidos por GC-MS no modo SIM, porque não foi utilizada sempre a mesma coluna analítica.

3.3. Incertezas e limites de detecção e quantificação

As incertezas associadas aos resultados obtidos, dependem de incertezas quantificáveis (por exemplo incertezas da balança e da pipeta utilizadas) e de incertezas não quantificáveis (por exemplo adsorção aos recipientes de vidro e o efectivo rendimento da derivatização) associadas aos procedimentos adoptados. Tais incertezas influenciam os limites de detecção e de quantificação do método.

Apresentam-se, nos subcapítulos seguintes, as expressões e valores assumidos pelas incertezas, e os limites de detecção e de quantificação associados.

3.3.1. Cálculo das Incertezas

Para o cálculo da incerteza associada à concentração de uma amostra, começa-se por definir as fontes de incertezas intervenientes. No presente capítulo as fontes de incerteza consideradas são as seguintes [69].

- Incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na recta de calibração;
- Incerteza associada à diluição da amostra;
- Incerteza associada à preparação dos padrões de trabalho;
- Incerteza associada à recuperação do método de ensaio.

A concentração desconhecida de glifosato (C_{amostra}), existente na amostra inicial a analisar, será obtida pelo produto, da concentração obtida através da recta de calibração (C_{obtida}), por um factor de diluição, F_{dil} , e dividindo tudo pelo factor de recuperação (Rec):

$$C_{\text{amostra}} = \frac{C_{\text{obtida}} \cdot F_{\text{dil}}}{\text{Rec}} \quad (3.3.1-1)$$

Assim, tendo em conta a teoria descrita no subcapítulo 1.5 pág. 36 a incerteza padrão combinada (expressa em termos de incerteza padrão relativa) associada à concentração da amostra [$u(C_{\text{amostra}})$] virá expressa pela fórmula:

$$u_{\text{rel}}(C_{\text{amostra}}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(C_{\text{obtida}}) + u_{\text{rel}}^2(F_{\text{dil}}) + u_{\text{rel}}^2(\text{Rec})} \quad (3.3.1-2)$$

onde $u_{\text{rel}}(x)$ representa a incerteza relativa das várias fontes de incertezas identificadas.

3.3.1.1. Cálculo da incerteza da concentração obtida da recta de calibração

A incerteza da concentração obtida da recta de calibração $u(C_{\text{obtida}})$ é uma combinação das incertezas associadas à preparação dos padrões de trabalho, $u^2(\text{padrão})$, da transformação do sinal cromatográfico em concentrações, $u^2(\text{cal})$, e da repetibilidade das medições. A incerteza associada à repetibilidade não será apresentada neste trabalho uma vez que não se dispõe de dados para tal. Esta combinação é calculada através da expressão:

$$u(C_{\text{obtida}}) = \sqrt{u^2(\text{padrão}) + u^2(\text{cal})} \quad (3.3.1-3)$$

3.3.1.1.1. Cálculo $u(\text{padrão})$

Para se perceber melhor as fontes de incerteza associada à preparação dos padrões de trabalho apresenta-se em seguida uma descrição da sua preparação e as respectivas fórmulas.

Seja a concentração C de glifosato ou de ácido aminometilfosfónico, dada por:

$$C = \frac{m_S \cdot P_S \cdot \rho_A}{m_A} \quad (3.3.1-4)$$

onde m_S é a massa do glifosato ou do ácido aminometilfosfónico, P_S o grau de pureza, ρ_A a densidade da água e m_A a massa de água (despreza-se a massa do GLI ou do AAMF relativamente à massa de água).

Adicionando água a 5 g (m_{5g}) da solução anterior até o total perfazer 50 g (m_{50g}), tem-se que esta nova concentração (C_1) vem dada por:

$$C_1 = \frac{C \cdot m_{5g}}{m_{50g}} \quad (3.3.1-5)$$

Foram efectuadas mais três diluições em série até C_4 e as expressões para as respectivas concentrações vêm dadas por:

$$C_2 = \frac{C_1 \cdot m_{5g}}{m_{50g}} \quad (3.3.1-6)$$

$$C_3 = \frac{C_2 \cdot m_{5g}}{m_{50g}} \quad (3.3.1-7)$$

$$C_4 = \frac{C_3 \cdot m_{5g}}{m_{50g}} \quad (3.3.1-8)$$

sendo C_2 a concentração obtida com a segunda diluição, C_3 a concentração da terceira diluição e C_4 a concentração da quarta diluição.

Medindo separadamente 20 μL , 50 μL , 70 μL e 100 μL , da última solução, mediante uma pipeta com erro máximo admissível de [70]:

$$\text{até } 200 \mu\text{L} \rightarrow \delta V = \pm 3 \mu\text{L}$$

$$\text{até } 500 \mu\text{L} \rightarrow \delta V = \pm 4 \mu\text{L}$$

$$\text{até } 1000 \mu\text{L} \rightarrow \delta V = \pm 8 \mu\text{L}$$

e adicionando a solução AMAC em quantidade suficiente para perfazer 1 mL, mediante a mesma pipeta, tem-se que as novas concentrações vêm dadas por:

$$C_{20\mu\text{L}} = \frac{C_4 \cdot V_{20\mu\text{L}}}{(V_{980\mu\text{L}} + V_{20\mu\text{L}})} \quad (3.3.1-9)$$

$$C_{50\mu\text{L}} = \frac{C_4 \cdot V_{50\mu\text{L}}}{(V_{950\mu\text{L}} + V_{50\mu\text{L}})} \quad (3.3.1-10)$$

$$C_{70\mu\text{L}} = \frac{C_4 \cdot V_{70\mu\text{L}}}{(V_{930\mu\text{L}} + V_{70\mu\text{L}})} \quad (3.3.1-11)$$

$$C_{100\mu\text{L}} = \frac{C_4 \cdot V_{100\mu\text{L}}}{(V_{900\mu\text{L}} + V_{100\mu\text{L}})} \quad (3.3.1-12)$$

onde $C_{20\mu\text{L}}$, $C_{50\mu\text{L}}$, $C_{70\mu\text{L}}$ e $C_{100\mu\text{L}}$, são as concentrações da solução padrão diário quando se retira, ao padrão de concentração igual a $0,1\ \mu\text{g}/\text{mL}$, o volume de $20\ \mu\text{L}$, $50\ \mu\text{L}$, $70\ \mu\text{L}$ e $100\ \mu\text{L}$ respectivamente, perfazendo o volume de $1\ \text{mL}$.

Levando a derivatizar $50\ \mu\text{L}$ de cada uma das concentrações anteriores, com o auxílio da mesma pipeta, tem-se que a massa que se leva a derivatizar é dada por:

$$m_x = \frac{C_x \cdot V_{50\mu\text{L}}}{1000} \quad (3.3.1-13)$$

onde x corresponde a $20\ \mu\text{L}$, $50\ \mu\text{L}$, $70\ \mu\text{L}$ ou $100\ \mu\text{L}$.

Considerando que na derivatização a estequiometria é de 1:1, o rendimento de 100 % e que se dissolve a massa anterior num volume de $225\ \mu\text{L}$, temos que a concentração injectada, $C_{\text{injectada}}$, para cada padrão será a representada pela expressão (3.3.1-14).

$$C_{\text{injectada}} = \frac{m_x}{V_{225\mu\text{L}}} \quad (3.3.1-14)$$

Na Tabela 9 apresentam-se os valores das quatro concentrações dos padrões utilizados para o traçado da recta de calibração:

Tabela 9 – Valores das quatro concentrações dos padrões utilizados no traçado da recta de calibração.

$C_{\text{injectada}}$	$0,44\ \mu\text{g}/\text{L}$
$C_{\text{injectada}}$	$1,11\ \mu\text{g}/\text{L}$
$C_{\text{injectada}}$	$1,56\ \mu\text{g}/\text{L}$
$C_{\text{injectada}}$	$2,22\ \mu\text{g}/\text{L}$

A incerteza relativa associada à preparação dos padrões de trabalho será:

$$u_{\text{rel}}(\text{padrão}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(m_S) + u_{\text{rel}}^2(P_S) + u_{\text{rel}}^2(\rho_A) + u_{\text{rel}}^2(m_A) + u_{\text{rel}}^2(m_{5g}^4) + u_{\text{rel}}^2(m_{50g}^4) + u_{\text{rel}}^2(\bar{V}_x) + u_{\text{rel}}^2(\bar{V}_y) + u_{\text{rel}}^2(V_{50\mu\text{L}}) + u_{\text{rel}}^2(V_{225\mu\text{L}})} \quad (3.3.1-15)$$

Onde \bar{V}_x vem dado pela expressão:

$$\bar{V}_x = \frac{V_{20\mu\text{L}} + V_{50\mu\text{L}} + V_{70\mu\text{L}} + V_{100\mu\text{L}}}{4} \quad (3.3.1-16)$$

e \bar{V}_y pela expressão:

$$\bar{V}_y = \frac{V_{980\mu\text{L}} + V_{950\mu\text{L}} + V_{930\mu\text{L}} + V_{900\mu\text{L}}}{4} \quad (3.3.1-17)$$

Para o cálculo dos volumes \bar{V}_x e \bar{V}_y efectuou-se uma simplificação que correspondeu à utilização da média dos quatro volumes [68]. Sem perder de vista o facto do erro dos volumes não ser aditivo, recorreu-se esta simplificação uma vez que para medições até 200 μL o erro máximo admissível é igual ($\delta V = \pm 3$) [70] e para medições entre 500 μL até 1000 μL o erro máximo admissível é igual ($\delta V = \pm 8$) [70].

Na Tabela 10 apresentam-se os valores das fontes de incerteza, respectiva incerteza padrão, e a incerteza relativa para o GLI e para o AAMF:

Tabela 10 – Valores da fontes de incerteza, respectiva incerteza padrão e incerteza relativa para o GLI e para o AAMF

Descrição	Valor z	Incerteza padrão u(z)	Incerteza padrão relativa $\frac{u(z)}{z}$	Observação
m _s	0,05 g	0,00003 g *	0,0006	*valor obtido $\frac{e.m.a}{\sqrt{3}}$
P _s (GLI)	0,999	0,0006*	0,0006	* valores obtidos a partir de $\frac{1-P_s}{\sqrt{3}}$
P _s (AAMF)	0,990	0,006*	0,006	
ρ _A	1 g/mL	0	0	Desprezou-se variação temperatura
m _A (GLI)	48,0 g	0,00003 g *	0,000001	*valor obtido $\frac{e.m.a}{\sqrt{3}}$
m _A (AAMF)	49,5 g	0,00003 g *	0,000001	
m _{5g}	5 g	0,00003 g *	0,000006	*valor obtido $\frac{e.m.a}{\sqrt{3}}$
m _{50g}	50 g	0,00003 g *	0,000001	*valor obtido $\frac{e.m.a}{\sqrt{3}}$
\overline{V}_x	60 μL	1,73 μL *	0,03	*valor obtido $\frac{e.m.a}{\sqrt{3}}$
\overline{V}_y	940 μL	4,62 μL *	0,005	*valor obtido $\frac{e.m.a}{\sqrt{3}}$
V _{50μL}	50 μL	1,73 μL *	0,03	*valor obtido $\frac{e.m.a}{\sqrt{3}}$
V _{225μL}	225 μL	2,31 μL *	0,01	*valor obtido $\frac{e.m.a}{\sqrt{3}}$
padrão (GLI) padrão (AAMF)	1.33 μg/L*	0,062 μg/L	0,046 **	* média dos valores das concentrações dos padrões ** valor obtido da expressão (1.1.1-15)

e.m.a. – erro máximo admissível.

3.3.1.1.2. Cálculo u(cal)

A incerteza devida à transformação do sinal cromatográfico em concentrações é estimada por aplicação da expressão (1.5-18).

Como no presente trabalho se traçaram várias rectas de calibração, calcula-se a incerteza para a melhor recta (EXP7; $r^2=0,992$) e para a pior recta (EXP6; $r^2=0,90$) de calibração obtida.

Na Tabela 11 apresentam-se os valores das variáveis, para a EXP7, necessárias para o cálculo da incerteza do valor interpolado de um concentração x_0 desconhecida.

Tabela 11 – Valores de concentração dos padrões, x_i , da respectiva área, y_i , respectivos valores médios, declive, m , e ordenada na origem, b , da recta de calibração, desvio padrão residual, $S_{y/x}$, e desvio padrão estimado, S_{x_0} , para uma concentração (EXP7)

EXP7			
		b	-388
x_i	y_i	m	5379
0,44 $\mu\text{g/L}$	1852	\bar{x}	1,06
1,11 $\mu\text{g/L}$	5278	\bar{y}	4416
1,55 $\mu\text{g/L}$	7502	$S_{y/x}$	1424
2,22 $\mu\text{g/L}$	12043	S_{x_0}	0,13 $\mu\text{g/L}$

Na Tabela 12 apresentam-se os valores das variáveis, para a EXP6, necessárias para o cálculo da incerteza do valor interpolado de um concentração x_0 desconhecida.

Tabela 12 – Valores de concentração dos padrões, x_i , da respectiva área, y_i , respectivos valores médios, declive, m , e ordenada na origem, b , da recta de calibração, desvio padrão residual, $S_{y/x}$, e desvio padrão estimado, S_{x0} , para uma concentração (EXP6)

EXP6			
x_i	y_i	b	895
		m	3309
0,44 µg/L	3310	\bar{x}	1,06
1,11 µg/L	4172	\bar{y}	22080
1,55 µg/L	7100	$S_{y/x}$	624
2,22 µg/L	7498	S_{x0}	0,47 µg/L

Uma vez calculada a incerteza associada à preparação das rectas de calibração, $u(\text{padrão})$ e a incerteza associada à transformação do sinal cromatográfico em concentração podemos calcular a incerteza da concentração obtida da recta de calibração. Substituindo as variáveis da expressão (1.1.1-3) pelos respectivos valores obtemos a respectiva incerteza, que se apresenta na Tabela 13. Os valores das incertezas são calculadas para a melhor recta (EXP7) e para a pior recta (EXP6).

Tabela 13 – Valores da incerteza e da incerteza relativa para a concentração obtida da recta de calibração para a EXP7 e EXP6

EXP7	$u(C_{\text{obtida}}) = \sqrt{(0,06)^2 + (0,13)^2} = 0,14 \text{ µg/L}$	$u_{\text{rel}}(C_{\text{obtida}}) = 0,16$
EXP6	$u(C_{\text{obtida}}) = \sqrt{(0,06)^2 + (0,47)^2} = 0,47 \text{ µg/L}$	$u_{\text{rel}}(C_{\text{obtida}}) = 0,53$

Para o cálculo da incerteza relativa associada à concentração obtida da recta de calibração empregou-se a expressão:

$$u_{\text{rel}}(C_{\text{obtida}}) = \frac{u(C_{\text{obtida}})}{C_{\text{obtida}}} \quad (3.3.1-18)$$

e o valor de C_{obtida} considerado para os cálculos foi de 0,89 µg/L [68].

3.3.1.2. Cálculo da incerteza associada ao factor de diluição

O factor de diluição pode ser calculado pela expressão seguinte:

$$F_{\text{dil}} = \frac{V_{1,25\text{mL}} \cdot V_{225\mu\text{L}}}{V_{50\text{mL}} \cdot V_{50\mu\text{L}}} \quad (3.3.1-19)$$

onde $V_{1,25\text{mL}}$ corresponde ao volume de 1,25 mL, $V_{225\mu\text{L}}$, ao volume de 225 µL, $V_{50\text{mL}}$ ao volume de 50 mL e o $V_{50\mu\text{L}}$ ao volume de 50 µL. Desta forma e aplicando as regras definidas no capítulo 1.5 pág. 36 a incerteza associada ao factor de diluição vem expressa por:

$$u_{\text{rel}}(F_{\text{dil}}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(V_{1,25\text{mL}}) + u_{\text{rel}}^2(V_{225\mu\text{L}}) + u_{\text{rel}}^2(V_{50\text{mL}}) + u_{\text{rel}}^2(V_{50\mu\text{L}})} \quad (3.3.1-20)$$

Na Tabela 14 apresentam-se os valores dos volumes bem como as respectivas incertezas padrão calculadas através da expressão $\frac{\text{e.m.a}}{\sqrt{3}}$ (ver no capítulo 1.5 pág. 38). O erro máximo admissível para as pipetas de vidro classe A vem descrito na própria pipeta ($V_{1,25\text{mL}}$ e $V_{50\text{mL}}$) para as micropipeta da Gilson o erro máximo admissível é o descrito no site da marca [70] e já apresentados no capítulo 3.3.1.1.1 pág. 105.

Tabela 14 – Valores dos volumes, respectivos volumes e incertezas padrão, valor do factor de diluição e respectiva incerteza relativa

V(z)	e.m.a	$u_{\text{rel}}(V)$	F_{dil}	$u_{\text{rel}}(F_{\text{dil}})$
1,25 mL	± 0,01 mL	0,006 mL		
50 mL	± 0,06 mL	0,03 mL		
225 µL	± 4 µL	2,3 µL	0,11	0,03
50 µL	± 3 µL	1,7 µL		

3.3.1.3. Cálculo da incerteza associada ao factor de recuperação

A incerteza associada à recuperação depende do desvio padrão do factor de recuperação a dividir pela raiz quadrada do número de replicados. O factor de recuperação e o respectivo desvio padrão já foi calculado no capítulo 3.2 pág. 75.

$$u(\text{Rec}) = \frac{0,014}{\sqrt{4}} = 0,007 \quad (3.3.1-21)$$

Uma vez calculadas todas as variáveis da expressão (1.1.1-2) podemos calcular a incerteza relativa da concentração da amostra

$$u_{\text{rel}}(C_{\text{amostra}}) = \sqrt{\left(\frac{u(C_{\text{obtida}})}{C_{\text{obtida}}}\right)^2 + \left(\frac{u(F_{\text{dil}})}{F_{\text{dil}}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Rec})}{\text{Rec}}\right)^2} \quad (3.3.1-22)$$

substituindo as variáveis pelos respectivos valores vamos obter para a EXP7:

$$u_{\text{rel}}(C_{\text{amostra}}) = \sqrt{\left(\frac{0,14}{0,89}\right)^2 + (0,03)^2 + \left(\frac{0,007}{0,8}\right)^2} = 0,16 \quad (3.3.1-23)$$

e para EXP6:

$$u_{\text{rel}}(C_{\text{amostra}}) = \sqrt{\left(\frac{0,47}{0,89}\right)^2 + (0,03)^2 + \left(\frac{0,007}{0,8}\right)^2} = 0,53 \quad (3.3.1-24)$$

A incerteza relativa varia, assim, entre cerca de 16 % (EXP7) e 53 % (EXP6). Estes valores são elevados, quando comparados com os valores explicitados em estudos idênticos [68], mas poderão ser ligeiramente reduzidos utilizando, na preparação dos padrões, uma pipeta de menor capacidade volumétrica para a medição dos volumes até 100 µL. Na Tabela 15 apresentam-se os valores que se alteraram quando se considera a

utilização de uma pipeta P100 da Gilson [70] na medição dos volumes até 100 µL. Os cálculos representados referem-se apenas à EXP7.

Tabela 15 – Valores das incertezas que se alteram com a utilização de uma pipeta Gilson P100 na medição dos volumes até 100 µL.

	P1000	P100
$u(\text{padrão})$	0,06	0,02
$u(C_{\text{obtida}})$	0,16	0,13
$u_{\text{rel}}(F_{\text{dil}})$	0,03	0,01
$u_{\text{rel}}(C_{\text{amostra}})$	0,16	0,15

Por último falta apresentar o cálculo da incerteza padrão combinada.. A título meramente exemplificativo apresenta-se na Tabela 16 o valor da incerteza padrão combinada para a experiência 7 (a “melhor” recta) e para a experiência 6 (a “pior” recta), com um nível de confiança de 68%, utilizando para o efeito a média do valor de concentração obtida nos quatro ensaios de recuperação divididos pelo factor de recuperação médio (não foi determinada a incerteza relativa à repetibilidade do método aplicado à análise de amostras).

Tabela 16 – Valores para a concentração da amostra apresentados com a respectiva incerteza padrão combinada

Exp07	$C_{\text{amostra}}=0,10 \pm (0,10 \times 0,16) = 0,10 \pm 0,02 \text{ µg/L}$
Exp06	$C_{\text{amostra}}=0,10 \pm (0,10 \times 0,53) = 0,10 \pm 0,05 \text{ µg/L}$

Para aumentar o nível de confiança da incerteza calculada para 95 % dever-se-á calcular a incerteza expandida utilizando um número de replicados suficientemente elevado (>6) de forma a aumentar o número de graus de liberdade, permitindo consequentemente que k se

aproxime de 2 (para 95 % de nível de confiança), de acordo com a situação referida na pág. 41.

3.3.2. Limites de detecção e quantificação

Para o cálculo do limite de detecção e do limite de quantificação utiliza-se, tal como para o cálculo das incertezas, a melhor recta (EXP7) e a pior recta (EXP6) de calibração (os cálculos são efectuados apenas para o GLI).

A metodologia escolhida para determinação do limite de detecção foi a recomendada pela IUPAC e encontra-se descrita na referência [66]. Assim, para a definição do limite de detecção, LOD, temos que:

$$x_L = \bar{x}_A + k \cdot S_{y/x} \quad (3.3.2-1)$$

onde k é um factor numérico escolhido de acordo com o nível de confiança desejado, \bar{x}_A é o valor médio do branco e $S_{y/x}$ o desvio padrão do residual da recta de calibração [ver expressão (1.5-12)]. O limite de detecção, LOD, é uma função de x_L , obtendo-se a expressão:

$$\text{LOD} = \frac{(x_L - \bar{x}_A)}{m} \quad (3.3.2-2)$$

onde m é o declive. Substituindo a equação (3.3.2-1) na equação (3.3.2-2) obtemos a equação (3.3.2-3):

$$\text{LOD} = \frac{k \cdot S_{y/x}}{m} \quad (3.3.2-3)$$

O uso de $k=3$ permite um nível de confiança de 99,86 % (distribuição normal), quando a distribuição não é normal, e no presente trabalho o número de medições efectuadas não permite afirmar que a distribuição é normal então o nível de confiança será, para $k=3$, de 89 % [66]. Quando se considera $k=2$ o nível de confiança para uma distribuição normal é

de 97,7 % e para uma distribuição não normal o nível de confiança é de 75 % [66]. Na Tabela 17 apresentam-se os resultados para o limite de detecção com k=3 e k=2.

Considerando que o limite de quantificação, LOQ, é obtido fazendo k=10, conforme referido no artigo “*Limit of Detection*” [66] obtemos os resultados especificados na Tabela 17.

Tabela 17 – Valores dos limites de detecção e de quantificação para a EXP7 e para a EXP6

	Limite detecção		Limite quantificação	
	$\frac{S_{y/x}}{m} = 0,09$			
EXP7	k=3		k=10	
	LOD	0,27 µg/L		
	k=2		LOQ	0,90 µg/L
	LOD	0,18 µg/L		
	$\frac{S_{y/x}}{m} = 0,33$			
EXP6	k=3		k=10	
	LOD	0,99 µg/L		
	k=2		LOQ	3,3 µg/L
	LOD	0,66 µg/L		

Com os valores obtidos para o limite de detecção e para o limite de quantificação afigura-se que se consegue detectar o valor máximo permitido por lei (na amostra 0,1 µg/L o que corresponde a 0,89 µg/L de concentração injectada) em ambas as situações para k=2, enquanto que para k=3 apenas se detecta na situação em que o

coeficiente de correlação é mais próximo de 1 (EXP7). O limite de quantificação na EXP7 apresenta um valor muito próximo da concentração injectada (concentração máxima permitida por lei), pelo que, será legítimo considerar que resolvidos os problemas associados à linearidade das rectas de calibração poder-se-á quantificar o glifosato em amostras de água.

3.4. Concentrações desconhecidas

O método foi aplicado a duas amostras cuja concentração de glifosato e de ácido aminometilfosfónico era totalmente desconhecida. Escolheu-se uma ribeira no sítio da Cancela, um curso de água superficial que atravessa zonas agrícolas, tendo a recolha sido efectuada junto a uma plantação de citrinos, e um poço no sítio do Coiro da Burra perto de Estoi, uma água subterrânea que contacta com um curso de água de uma ribeira que passa nas imediações.

Na Tabela 18 apresentam-se os valores das áreas dos picos dos cromatogramas obtidos por GC-MS em modo SIM e o respectivo tempo de retenção. Os cromatogramas respectivos obtidos por GC-MS em modo SIM apresentam-se no Apêndice D. A coluna analítica e o programa de temperatura utilizados para a obtenção dos cromatogramas referidos são as descritas no capítulo 2.2 Instrumentação alínea c) pág. 55. O padrão de concentração 2,22 µg/L foi desprezado porque não apareceu nenhum pico relativo ao tempo de retenção do glifosato, na Figura 44 está representada a respectiva recta de calibração.

Tabela 18 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas obtidos por GC-MS em modo SIM, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco	1544	4,901
[GLI]=0,44 µg/L	4 301	4,950
[GLI]=1,11 µg/L	6 941	4,904
[GLI]=1,55 µg/L	7555	4,910
[GLI]=2,22 µg/L	-	-

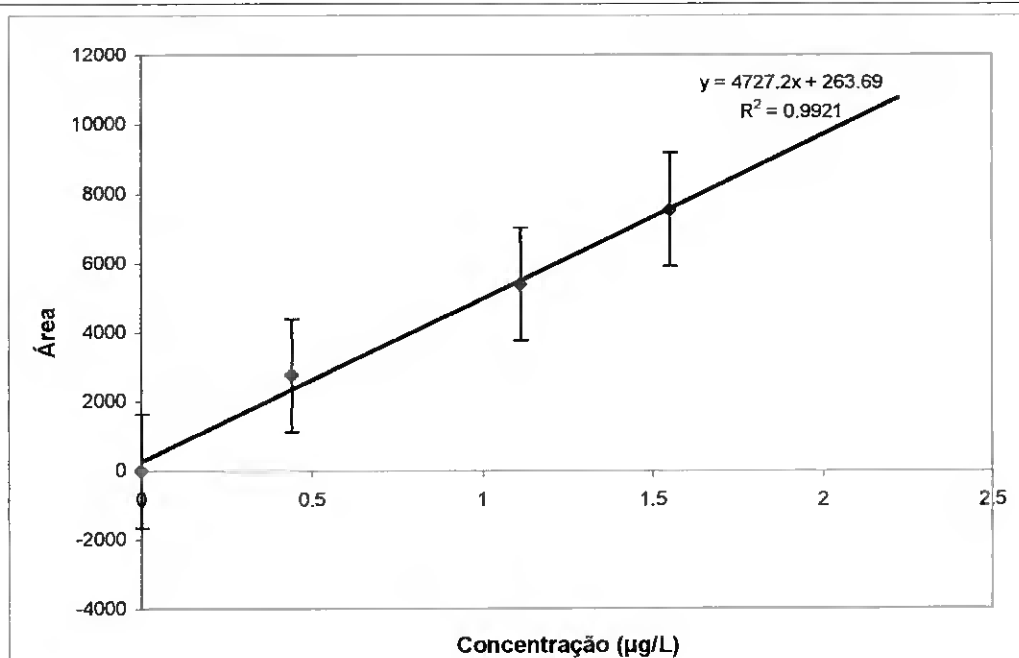


Figura 44 – Gráfico da recta de calibração para amostras de concentração desconhecida

O cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM da Figura 45 é o branco e os cromatogramas obtidos por GC-MS em modo SIM representados na Figura 46 e na Figura 47, foram obtidos por derivatização de amostras de água recolhidas num poço alimentado por uma ribeira no Sítio do Coiro da Burra (Estoi) e os representados na

Figura 48 e na Figura 49 foram obtidos por derivatização de amostras de água recolhidas numa ribeira no sítio da Cancela (Estoi). As amostras foram recolhidas no mesmo dia.

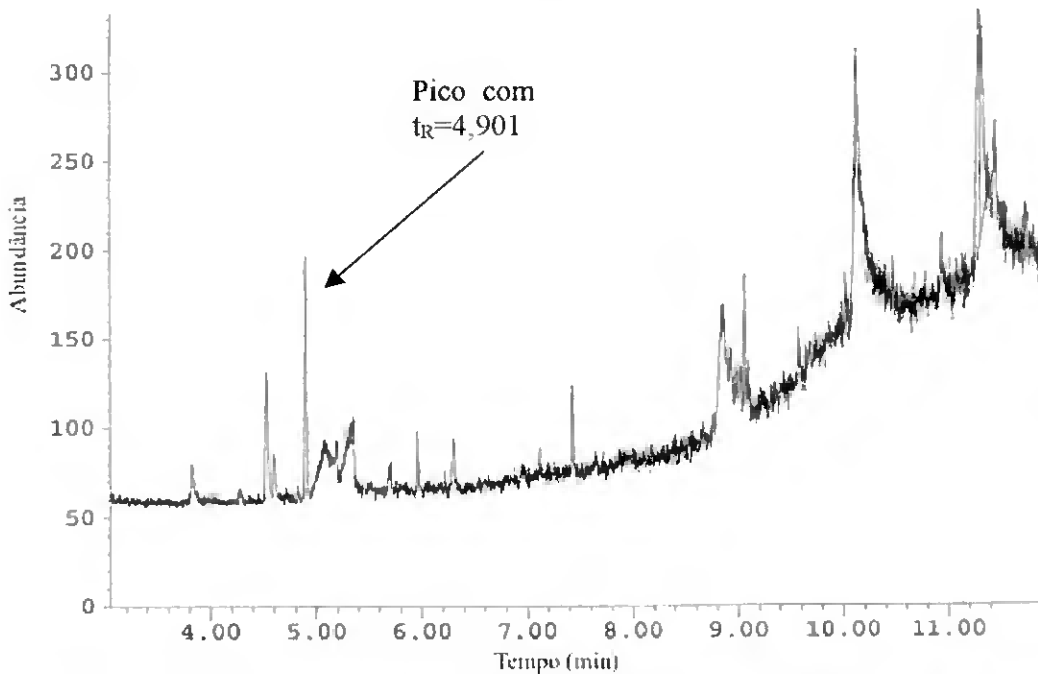


Figura 45 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para o branco com tempo de retenção de 4,901 min que é o tempo de retenção do GLI.

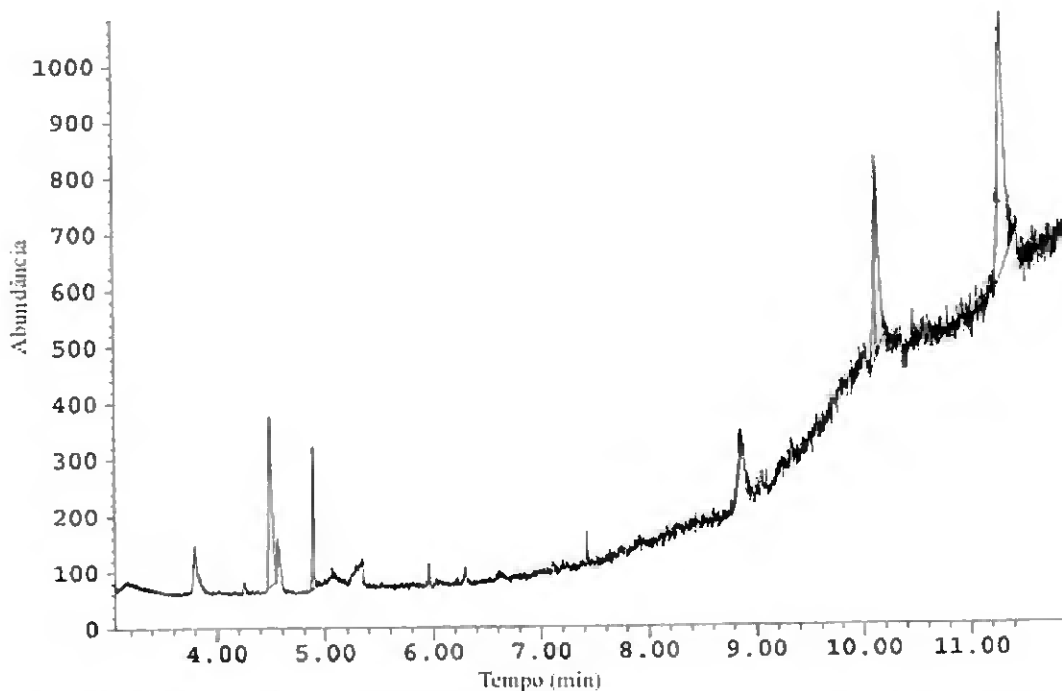


Figura 46 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para a amostra de água de concentração desconhecida proveniente do Poço (ensaio I).

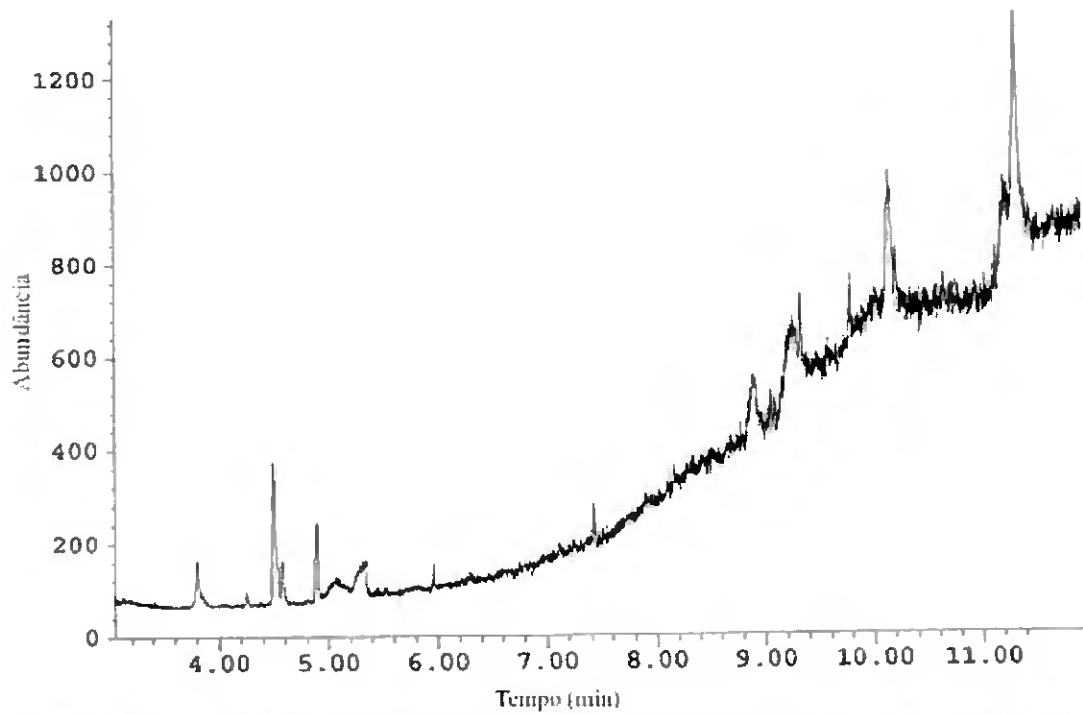


Figura 47 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para a amostra de água de concentração desconhecida proveniente do Poço (ensaio II).

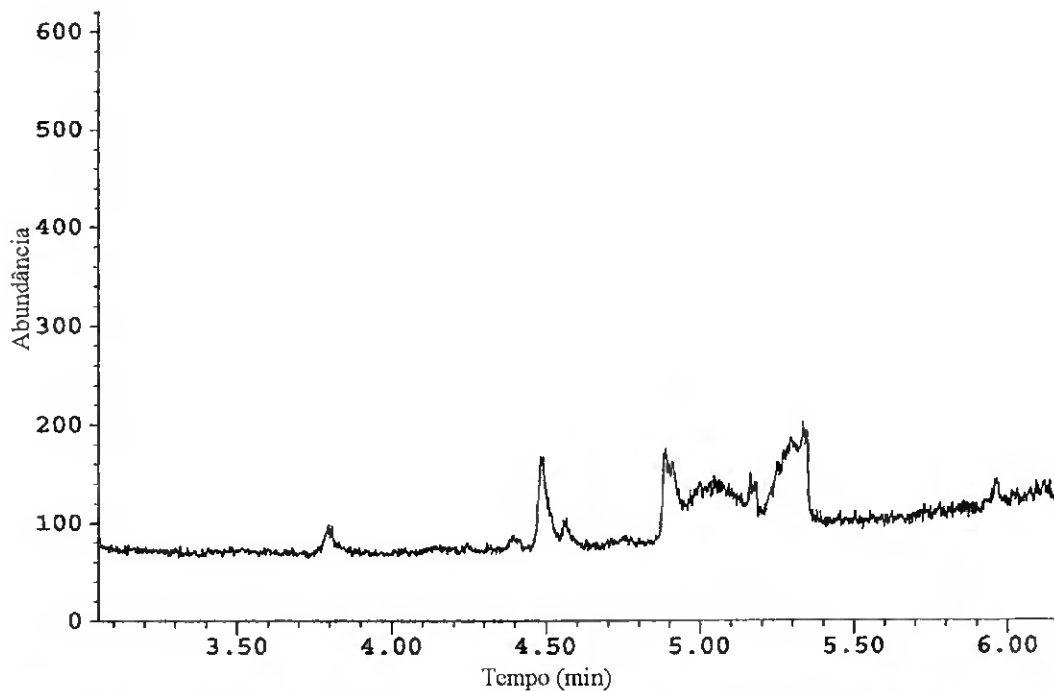


Figura 48 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para a amostra de água de concentração desconhecida proveniente da Ribeira (ensaio I).

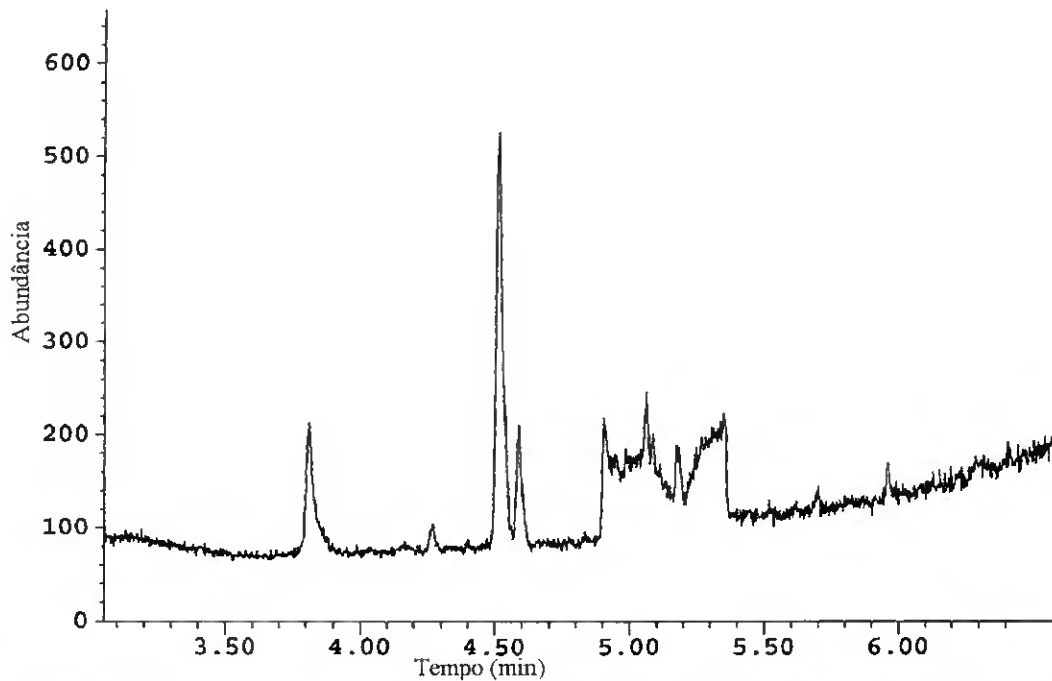


Figura 49 – Cromatograma obtido por GC-MS em modo SIM para a amostra de água de concentração desconhecida proveniente da Ribeira (ensaio II).

Pela observação dos cromatogramas obtidos por GC-MS em modo SIM, verifica-se que o pico obtido no tempo de retenção do glifosato (aproximadamente 4,9 minutos), é desprezável relativamente ao pico obtido para o branco, logo não se pode concluir que as amostras recolhidas estejam contaminadas com glifosato.

De notar que dada a escassez de amostras recolhidas, este resultado nulo deve ser entendido como indicativo mas não como representativo.

4. Conclusões

O objectivo inicial seria utilizar um método descrito na literatura para determinação e quantificação do glifosato e aplicá-lo/adaptá-lo para verificar da contaminação, ou não, de sistemas de águas naturais que vão desaguar na Ria Formosa, através da recolha de amostras de água em alguns pontos na região do sotavento Algarvio. Esses pontos de recolha seriam estratégicos uma vez que os cursos de água escolhidos passariam por zonas agrícolas. Os resultados obtidos não foram os esperados inicialmente, pois a aplicação/adaptação do método descrito na literatura revelou-se muito difícil, dada a baixa repetibilidade no traçar das rectas de calibração. Grande parte do tempo foi utilizado na tentativa de resolução dos problemas relacionados com a repetibilidade.

Mesmo assim tentou-se seguir uma metodologia que consistiu no traçar de uma recta de calibração para cada dia em que se fazia uma derivatização de uma amostra. Um dos procedimentos da metodologia apresentada, consistia na derivatização do glifosato e do ácido aminometilfosfónico. Pensa-se que a maior limitação da metodologia corresponde a esse procedimento. Uma vez que derivatizações feitas simultaneamente e para a mesma concentração apresentavam sinais no cromatograma muito dispares, julga-se que o rendimento da derivatização não é constante. Não foi possível, contudo, identificar uma relação causa efeito.

Face à inviabilidade aparente de determinação de uma relação causa efeito para a aleatoriedade no traçado das rectas de calibração, decidiu-se efectuar uma análise ao método através do cálculo da incerteza associada à concentração, cálculo este que, na forma e extensão apresentadas, não fazia parte do objectivo inicial da presente

dissertação. Obteve-se uma incerteza relativa para a concentração que varia entre 16 % e 53 %. Para a incerteza padrão combinada obtiveram-se os valores de $0,10 \pm 0,02$ $\mu\text{g/L}$ e de $0,10 \pm 0,05$ $\mu\text{g/L}$ para um nível de confiança de 68 %. Os valores das incertezas são elevados, mas ter-se-ia conseguido uma diminuição dos mesmos se as rectas de calibração obtidas apresentassem um coeficiente de correlação mais próximo de 1. A percentagem de recuperação foi 80 ± 14 %. Os limites de detecção e quantificação também foram calculados e os valores obtidos variaram para o caso do limite de detecção entre 0,27 e 0,99 $\mu\text{g/L}$ ($k=3$) e para o limite de quantificação entre 0,90 e 3,30 $\mu\text{g/L}$ ($k=10$).

Para as amostras de água recolhidas na ribeira e na nora, foram nulos os valores obtidos para a concentração de GLI, ou seja, dentro dos limites de validade do método, pode concluir-se que as amostras analisadas não estão contaminadas com GLI. Alerta-se para o facto de não poder generalizar-se que as águas analisadas não estão contaminadas uma vez que o número de análises foi apenas igual a dois. Os dados das amostras são, assim, apenas indicativos e não conclusivos.

4.1.1. Sugestões de trabalho futuro

Apresenta-se, em seguida, hipóteses que não foram testadas e que poderão permitir melhores resultados:

- Talvez o rendimento da derivatização dependa da concentração do analito a derivatizar. Se assim for, é conveniente efectuar a derivatização com uma maior concentração e efectuar as diluições depois.
- Talvez a temperatura da placa de alumínio, utilizada na derivatização, não seja uniforme e o rendimento seja diferente para cada posição/concentração. Se assim

for, é conveniente efectuar a derivatização para uma única concentração (a mais elevada) e fazer diluições distributivas depois, por forma a obter as 4 concentrações desejadas.

- Talvez o fluxo de azoto durante a evaporação tivesse importância, assim sendo deve-se tentar arranjar um dispositivo onde o fluxo de azoto seja constante durante toda a evaporação e também constante em dias diferentes.

Como já foi referido na introdução deste trabalho, a problemática dos pesticidas e, mais em concreto, a problemática dos herbicidas, são de extrema importância, pois são questões que envolvem a saúde pública.

Se em condições normais de utilização dos pesticidas já seria de elevada importância da determinação científica da efectiva contaminação das águas e dos produtos que chegam ao consumidor, mais relevante e necessária se torna essa determinação quando é sabido que alguns agricultores para conseguirem sobreviver, não respeitam os tempos e as doses estabelecidas pela lei.

Os resultados obtidos no presente trabalho não permitem concluir se os sistemas de águas naturais analisados estão ou não contaminados por GLI, mas entreabrem um caminho de investigação que pode e deve ser continuado, em prol de um esclarecimento fundamentado da opinião pública, por forma a poder-se colmatar o facto de em Portugal ainda se saber muito pouco sobre o estado dos sistemas de águas naturais relativamente a contaminações com pesticidas.

5. Bibliografia

- [1] – Amarante Jr., Ozelito; Santos, Teresa e Ribeiro, Natilene; “*Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: Breve Revisão*”, Química Nova, Vol. 25, N.º 3, 420-428, 2002.
- [2] – Borjesson, Elisabet e Torstensson, Lennart; “*New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil*” – Journal of Chromatography A, 886, 207-216, 2000.
- [3] – Kudzin, Zbigniew H.; Gralak, Dorota K.; Drabowicz, Józef e Luczak, Jerzy; “*Novel approach for the simultaneous analysis of glyphosate and its metabolites*” – Journal of Chromatography A, 947, 129-141, 2002.
- [4] – Patsias, J.; Papadopoulou, A. e Mourkidou, E. Papadopoulou; “*Automate trace level determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization*” – Journal of Chromatography A, 932, 83-90, 2001.
- [5] – Dzygiel, Pawel e Wieczorek, Piotr; “*Extraction of glyphosate by a supported liquid membrane technique*” – Journal of Chromatography A, 889, 93-98, 2000.
- [6] – Mogadati, Paul S.; Louis, Judith B. e Rosen, Joseph D.; “*Determination of glyphosate and its metabolite, (aminomethyl)phosphonic acid, in river water*” – Journal of AOAC International, Vol. 79, n.º 1, 157-162, 1996.
- [7] – Amarante Jr., Ozelito; Santos, Teresa e Ribeiro, Natilene; “*Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação*”; Química Nova, Vol. 25, N.º 4, 589-593, 2002.
- [8] – <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1948/press.html>, acedida em Dezembro de 2003.
- [9] – <http://paginas.fe.up.pt/~jotace/saudepublica/principiosprecaucao.htm>, acedida em Novembro de 2003.
- [10] – <http://iibce.edu.uy/posdata/drit.htm>, acedida em Dezembro de 2003.
- [11] – http://europa.eu.int/eur-lex/pri/pt/oj/dat/1998/l_330/l_33019981205pt00320054.pdf acedida em Dezembro de 2004.
- [12] – Dores, Eliana e Freire, Ermelinda; “*Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise Preliminar*”, Química Nova, Vol. 24, N.º 1, 27-36, 2001.

- [13] – Buffin, David e Jewell, Topsy; “*Health and environmental impacts of glyphosate: The implications of increased use of glyphosate in association with genetically modified crops*” – Pesticide Action Network UK, 2001.
- [14] – <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>, acedida em Janeiro de 2004.
- [15] – Dousset, S.; Chauvin, C.; Durllet, P. e Thévenot, M.; “*Transfer of hexazinone and glyphosate through undisturbed soil columns in soils under Christmas tree cultivation*” – *Chemosphere*, 57, 265-272, 2004.
- [16] – World Health Organization; “*Guidelines for drinking water quality – Health criteria and other supporting information*”; 2ª edição, Geneva, 1998.
- [17] – http://www.dgpc.min-agricultura.pt/fitofarmaceuticos/lista/Subst_activas/Herbicidas/glifosato.htm, acedida em Outubro de 2005.
- [18] – <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emprm/pubs/fatememo/glyphos.pdf>, acedida em Janeiro de 2004.
- [19] – Rocha, Fátima; Calha, Isabel e Graça, Gaetano; “*Boa Prática Fitossanitária no Combate a Infestantes de Culturas Hortícolas Herbáceas*”; Ministério de Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Direcção Geral de Protecção das Culturas, Oeiras, 1998.
- [20] – Cowell, J. E.; Kunstman, James, L.; Nord, Paul J.; Steinmetz, Jerry R. e Wilson, Gloria R.; “*Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite – an interlaboratory study*” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 955-960, 1986.
- [21] – Wigfield, Yuk Y. e Lanouette, Monique; “*Simplified liquid chromatographic determination of glyphosate and metabolite residues in environmental water using post-column fluorogenic labelling*” – *Analytical Chimia Acta*, 233, 311-314, 1990
- [22] – Abdullah, M. P.; Daud, J.; Hong, K. S. e Yew, C. H.; “*Improved method for the determination of glyphosate in water*” – *Journal of Chromatography A*, 697, 363-, 1995.
- [23] – Friestad, Håkon, O. e Brønstad, Jan O.; “*Improved method for determination of glyphosate herbicide in crops, soli, and water*” – *Journal of Association of the Official Analytical Chemists*, 68, 1, 76-79, 1985.
- [24] – Vreeken, R. J.; Speksnijder, P.; Pastrorova, I. Bobeldijk e 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 ionisation mass spectrometry*” – *Journal of Chromatography A*, 794, 187-199, 1998.

- [25] – Stalikas, Constantine D. e Konidari, Constantina N.; “*Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group – containing pesticides*” – Journal of Chromatography A, 907, 1-19, 2001.
- [26] – Ridlen, Jennifer S.; Klopff, Gary J. e Nieman, Timothy A.; “*Determination of glyphosate and related compounds using HPLC with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium (II) electrogenerated chemiluminescence detection*” – Analytica Chimica Acta, 341, 195-204, 1997.
- [27] – Sancho, J. V.; Hernández, F.; López, F. J.; Hogendoorn, E. A.; Dijman, E. e Zoonen, P. van; “*Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography*” – Journal of Chromatography A, 737, 75-83, 1996.
- [28] – Mallat, E. e Barceló, 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*” – Journal of Chromatography A, 823, 129-136, 1998
- [29] – Powell, H. A.; Kerby, N. W. e Rowell, P.; “*High-performance liquid-chromatographic determination of the herbicide glyphosate and its metabolite (aminomethyl)phosphonic acid and their extraction from cyanobacteria*” – Journal of Chromatography, 502, 201-201, 1990.
- [30] – Bauer, Karl-Heinz; Knepper, Thomas P.; Maes, Anke; Schatz, Viktor e Voihsel, Martin; “*Analysis of polar organic micropollutants in water with ion chromatography-electrospray mass spectrometry*” – Journal of Chromatography A, 837, 117-128, 1999.
- [31] – Miles, Carl J.; Wallace, Louis R. e Moye, H. Anson; “*Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl)phosphonic acid in natural waters by liquid chromatography using pre-column fluorogenic labelling with 9-fluorenylmethyl chloroformate*” – Journal of Association of the Official Analytical Chemists, 69, 3, 458-461, 1986.
- [32] – Burns, Arnold J.; “*Liquid chromatography of glyphosate technical and its formulation: collaborative study*” – Journal of Association of the Official Analytical Chemists, 66, 5, 1214-1219, 1983.
- [33] – Lundgren, Lennart N.; “*A new method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid residues in soils*” – Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34, 535-538, 1986.
- [34] – Thompson, Dean G.; Cowell, John E.; Daniels, Robert J.; Staznik, Bozena e MacDonald, Linda M.; “*Liquid chromatography method for quantitation of glyphosate and metabolite residues in organic and mineral soils, stream sediments, and hardwood foliage*” – Journal of Association of the Official Analytical Chemists, 72, 2, 355-360, 1989.

- [35] – Miles, Carl J. e Moye, H. Anson; “*Extraction of glyphosate herbicide fro soil and clay minerals and determination of residues in soils*” – Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36, 486-491, 1988.
- [36] – Lovdahl, Michael J. e Pietrzyk, Donald J.; “*Liquid chromatography and postcolumn indirect detection of glyphosate*” – Journal of Chromatography, 602, 197-204, 1992.
- [37] – Seiber, James N.; McChesney, Michael M.; Kon, Robert e Leavitt, Richard A.; “*Analysis of glyphosate residues in kiwi fruit and asparagus using high-performance liquid chromatography of derivatized glyphosate as a cleanup step*” – Journal of Agricultural and Food Chemistry, 32, 678-681, 1984.
- [38] – Moye, H. Anson e Deyrup, Cynthia L.; “*A simple single-step derivatization method for the gas-chromatographic analysis of the hebcide glyphosate and its metabolite*” – Journal of Agricultural and Food Chemistry, 32, 192-195, 1984.
- [39] – Tsunoda, N.; “*Simultaneous determination of the herbicides glyphosate, glufosinate and bialaphos and their metabolites by capillary gás chromatography-ion-trap mass spectrometry*” – Journal of Chromatography, 637, 167-173, 1993.
- [40] – Alferness, Philip L. e Iwata Yutaka; “*Determination of glyphosate and (Aminomethyl)phosphonic acid in soil, plant and animal matrices, and water by capillary gás chromatography with mass selective detection*” – Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 2751-2759, 1994.
- [41] – Kataoka, Hiroyuki; Ryu, Sunhi; Sakiyama, Norihisa e Makita, Masami; “*Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection*” – Journal of Chromatography A, 726, 253-258, 1996.
- [42] – Stalikas, Constantine D. e Philidis, George A.; “*Development of a method for the simultaneous determination of phosphoric and amino acid group containing pesticides by gas chromatography with mass-selective detection – optimisation of the derivatization procedure using an experimental design approach*” – Journal of Chromatography A, 872, 215-225, 2000
- [43] – Alferness, Philip L. e Wiebe, Lawrence A.; “*Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in crops by capillary gas chromatography with mass-selective detection: collaborative study*” – Journal of AOAC International, 84, 3, 823-846, 2001.
- [44] – Roy, Dibyendu N. e Konar, Samir K.; “*Development of an analytical method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid residuos in soils by nitrogen-selective gas-chromatography*” – Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37, 441-443, 1989.
- [45] – Eberbach, P.hilip. L. e Douglas, L.yle. A.; “*Method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil using electron-capture gas-chromatography*” – Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 1776-1780, 1991.

- [46] – Konar, Samir K. e Roy, Dibyendu N.; “*Method for the determination of residues of the herbicide glyphosate and its principal metabolite, (aminomethyl)phosphonic acid, in plant materials by nitrogen-selective gas chromatography*” – *Analytical Chimia Acta*, 229, 277-280, 1990.
- [47] – Guinivan, Richard. A.; Thompson, Neal P. e Wheeler, Willis B.; “*Verification of structures of chloroethyl N-heptafluorobutryl derivatives of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid by chemical ionisation and electron-impact mass-spectrometry*” – *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 977-982, 1982.
- [48] – Willard, Hobart H.; Merritt Jr., Lynne L.; Dean, John A. e Settle Jr., Frank A.; “*Instrumental methods of analysis*” – Wadsworth, Inc, 7ª Edição, Califórnia, 1988.
- [49] – <http://www.umd.umich.edu/casl/natsci/slc/slconline/GC/> acessada em Janeiro de 2004.
- [50] – <http://fate.clu-in.org/gc.asp?techtipeid=44> acessada em Dezembro de 2003.
- [51] – <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/gc/gc.htm> acessada em Janeiro de 2004.
- [52] – http://www.anc.univie.ac.at/scripts/Gas_Chromatography_in_Capillaries.pdf acessada em Dezembro de 2004.
- [53] – Hoffmann, Edmond e Stroobant, Vicent; “*Mass spectrometry – Principles and Applications*” – John Wiley & Sons, Lda, 2ª Edição, Chichester, 2001.
- [54] – Santos, F. J. e Galceran, M. T.; “*Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis*” – *Journal of Chromatography A*, 1000, 125-151, 2003.
- [55] – Pombeiro, Armando J.; “*Técnicas e operações unitárias em química laboratorial*” – Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983.
- [56] – EURACHEM / CITAC Guide – EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2000.
- [57] – Camões, Maria F. “*Quantificação da Incerteza nas Medições Analíticas*” – Versão em Português do Guia EURACHEM/CITAC; Tradução e adaptação da 2ª edição, 2000.
- [58] – Guia RELACRE13 – “*Validação de métodos internos de ensaio em análise química*”, 2000.
- [59] – Taylor, John R.; “*An Introduction to Error Analysis*” – University Science Book; Califórnia, 1982.
- [60] – Prichard, Elizabeth – “*Quality in the Analytical Chemistry Laboratory*”, John Wiley & Sons, 1999.

[61] – <http://nvl.nist.gov/pub/nistpubs/sp958-lide/164-166.pdf> acedida em Dezembro de 2004.

[62] – http://media.wiley.com/product_data/excerpt/42/04714919/0471491942-4.pdf acedida em Dezembro de 2004.

[63] – <http://www.iupac.org/publications/pac/1995/pdf/6710x1699.pdf> acedida em Dezembro de 2004.

[64] – http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/1999/l_128/l_12819990521en00250055.pdf acedida em Dezembro de 2004.

[65] – http://europa.eu.int/comm/food/fs/ifsi/eupositions/ccmas/ccmas_cl2004-37_en.pdf acedida em Dezembro de 2004.

[66] – Winefordner, James D. e Long, Gary L. – “*Limit of Detection – A closer look at the IUPAC definition*”; Analytical Chemistry, 55, 7, 712A-724A, 1983.

[67] – Deyrup, Cynthia L.; Chang, Shou-Mei; Weintraub, Randy A. e Moye, H. Anson; “*Simultaneous esterification and acylation of pesticides for analysis by gas-chromatography derivatization of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid with fluorinated alcohols-perfluorinated anhydrides*” – Journal of Agricultural and Food Chemistry, 33, 944-947, 1985.

[68] – Rodríguez, L. Cuadros; Torres, M. E. Hernández; López, E. Almansa; González, F. J. Egea; Liébanas, F. J. Arrebola; Vidal, J. L. Martínez; “*Assessment of uncertainty in pesticide multiresidue analytical methods: main sources and estimation*” – Analytica Chimica Acta, 454, 297-314, 2002.

[69] – Guia EURACHEM/RELACRE1 – “*Exemplos de Cálculos de Incertezas*”, 2002.

[70] – <http://www.gilson.com/Products/prodInfo.asp?pid=67&tID=1>, acedida em Agosto de 2004.

Apêndices

Apêndice A

Nas tabelas que se seguem (Tabela 19, Tabela 20, Tabela 21, Tabela 22, Tabela 23, Tabela 24, Tabela 25 e Tabela 26) apresentam-se os valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para os padrões de ácido aminometilfosfónico e respectivas concentrações (valores de concentração injectados). Para as EXP01 a EXP05 não se apresentam valores para o branco uma vez que não apareceu nenhum pico com tempo de retenção relativo ao AAMF. A coluna analítica e programa de temperatura utilizados nas EXP01 à EXP05 são as especificadas no capítulo 2.2 Instrumentação alínea a) pág. 54 e nas EXP06 à EXP08 são as descritas no capítulo já referido alínea b) pág. 54.

Tabela 19 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP01.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco	-	-
[AAMF]=0,44 µg/L	89 180	5,720
[AAMF]=1,11 µg/L	105 807	5,711
[AAMF]=1,55 µg/L	191 710	5,698
[AAMF]=2,22 µg/L	125 861	5,688

Tabela 20 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP02.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco	-	-
[AAMF]=0,44 µg/L	86121	5,706
[AAMF]=1,11 µg/L	123 404	5,697
[AAMF]=1,55 µg/L	106 376	5,707
[AAMF]=2,22 µg/L	243 371	5,701

Tabela 21 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP03.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco	-	-
[AAMF]=0,44 µg/L	88 446	5,701
[AAMF]=1,11 µg/L	89 903	5,705
[AAMF]=1,55 µg/L	112 294	5,706
[AAMF]=2,22 µg/L	242 615	5,715

Tabela 22 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP04.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco	-	-
[AAMF]=0,44 µg/L	90 678	5,706
[AAMF]=1,11 µg/L	193 805	5,708
[AAMF]=1,55 µg/L	116 669	5,685
[AAMF]=2,22 µg/L	288 769	5,692

Tabela 23 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP05.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco	-	-
[AAMF]=0,44 µg/L	0	-
[AAMF]=1,11 µg/L	109 457	5,686
[AAMF]=1,55 µg/L	127 255	5,695
[AAMF]=2,22 µg/L	213 947	5,682

Tabela 24 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP06.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco	173 452	12,879
[AAMF]=0,44 µg/L	24 604	12,531
[AAMF]=1,11 µg/L	269 512	12,887
[AAMF]=1,55 µg/L	96 569	12,889
[AAMF]=2,22 µg/L	121 406	12,894

Tabela 25 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido aminometilfosfónico-EXP07.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco	52 484	12,883
[AAMF]=0,44 µg/L	53 673	12,884
[AAMF]=1,11 µg/L	60 885	12,902
[AAMF]=1,55 µg/L	64 283	12,805
[AAMF]=2,22 µg/L	164 256	12,904

Tabela 26 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de ácido amino metil fosfónico-EXP08.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco	215 014	12,858
[AAMF]=0,44 µg/L	193 061	12,855
[AAMF]=1,11 µg/L	81 562	12,786
[AAMF]=1,55 µg/L	152 714	12,854
[AAMF]=2,22 µg/L	108 273	12,850

Nas tabelas que se seguem (Tabela 27, Tabela 28, Tabela 29, Tabela 30, Tabela 31, Tabela 32, Tabela 33 e Tabela 34) apresentam-se os valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para os padrões de glifosato e respectivas concentrações (valores de concentração injectados). Para as EXP01 a EXP06 não se apresentam valores para o branco uma vez que não apareceu nenhum pico com tempo de retenção relativo ao GLI. A coluna analítica e programa de temperatura utilizados nas EXP01 à EXP05 são as especificadas no capítulo 2.2 Instrumentação alínea a) pág. 54, nas EXP06 à EXP07 são as descritas no mesmo capítulo alínea b) pág. 54 e na EXP08 são as descritas no capítulo já referido alínea c) pág. 55.

Tabela 27 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP01.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco		
[GLI]=0,44 µg/L	812	6,455
[GLI]=1,11 µg/L	2 027	6,455
[GLI]=1,55 µg/L	2 493	6,456
[GLI]=2,22 µg/L	5 891	6,457

Tabela 28 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP02.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco		
[GLI]=0,44 µg/L	1 159	6,459
[GLI]=1,11 µg/L	2 196	6,458
[GLI]=1,55 µg/L	3 462	6,455
[GLI]=2,22 µg/L	5 165	6,454

Tabela 29 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP03.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco		
[GLI]=0,44 µg/L	1 780	6,454
[GLI]=1,11 µg/L	2 745	6,456
[GLI]=1,55 µg/L	3 296	6,455
[GLI]=2,22 µg/L	5 695	6,454

Tabela 30 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP04.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco		
[GLI]=0,44 µg/L	2 564	6,441
[GLI]=1,11 µg/L	4 112	6,441
[GLI]=1,55 µg/L	4 631	6,438
[GLI]=2,22 µg/L	9 616	6,439

Tabela 31 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP05.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco		
[GLI]=0,44 µg/L	2 882	6,437
[GLI]=1,11 µg/L	5 393	6,433
[GLI]=1,55 µg/L	6 523	6,432
[GLI]=2,22 µg/L	10 152	6,430

Tabela 32 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP06.

	Área	Tempo retenção (min)
Branco	-	-
[GLI]=0,44 µg/L	3 310	7,945
[GLI]=1,11 µg/L	4 172	7,943
[GLI]=1,55 µg/L	7 100	7,939
[GLI]=2,22 µg/L	7 498	7,947

Tabela 33 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP07.

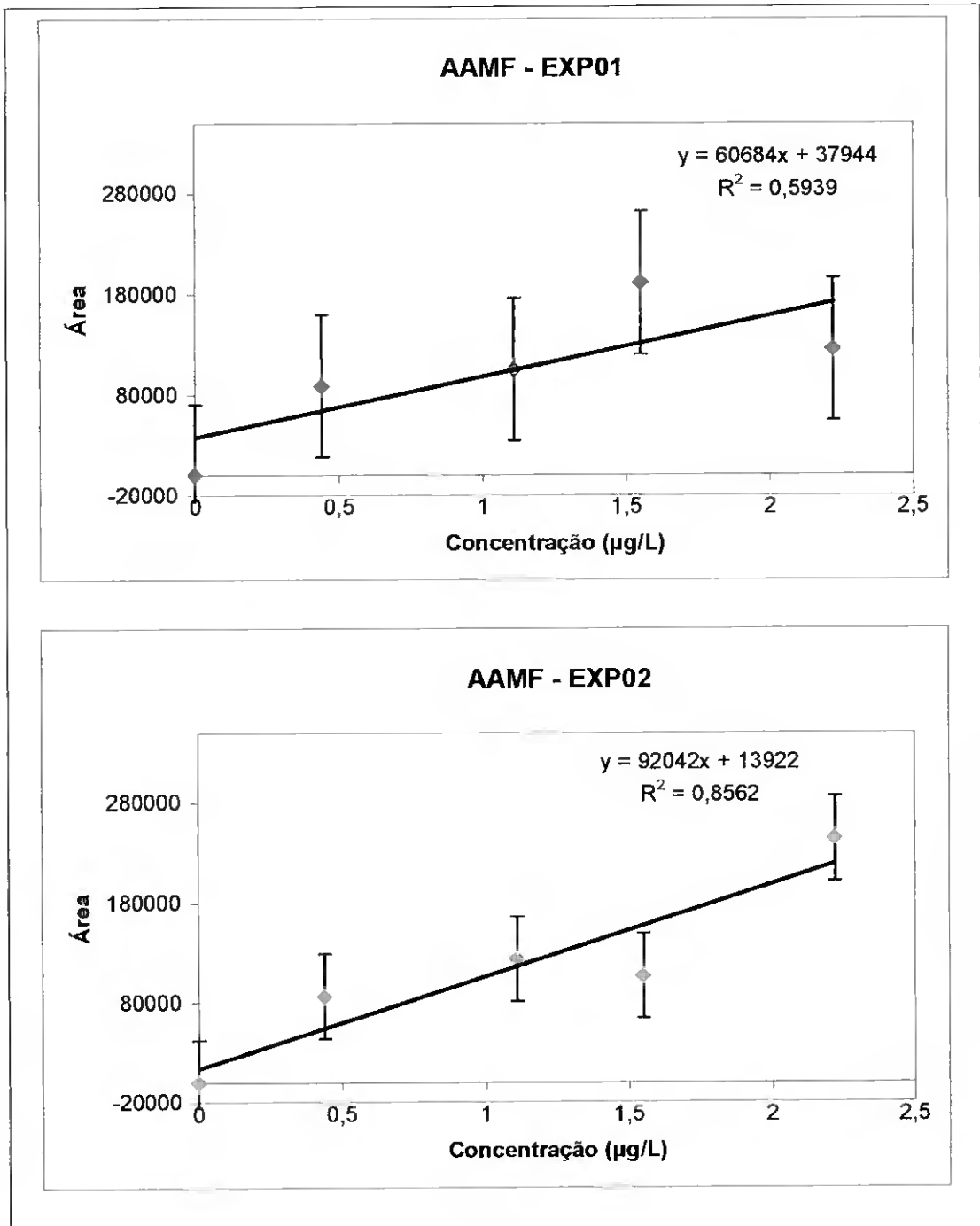
	Área	Tempo retenção (min)
Branco	1 801	7,898
[GLI]=0,44 µg/L	3 653	7,914
[GLI]=1,11 µg/L	7 059	7,905
[GLI]=1,55 µg/L	9 303	7,903
[GLI]=2,22 µg/L	13 844	7,912

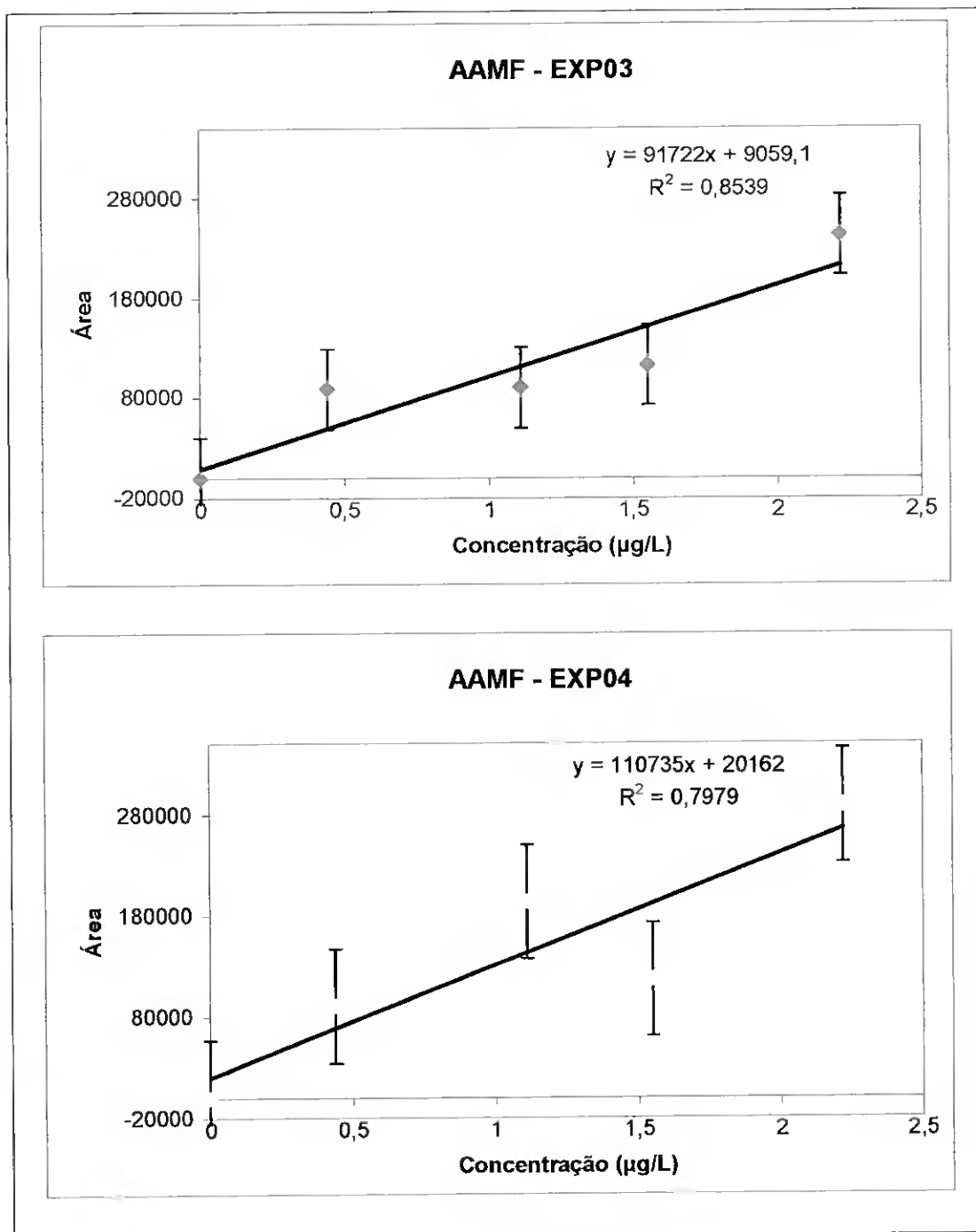
Tabela 34 – Valores das áreas dos picos dos cromatogramas, respectivo tempo de retenção para o branco e para os padrões de glifosato – EXP08.

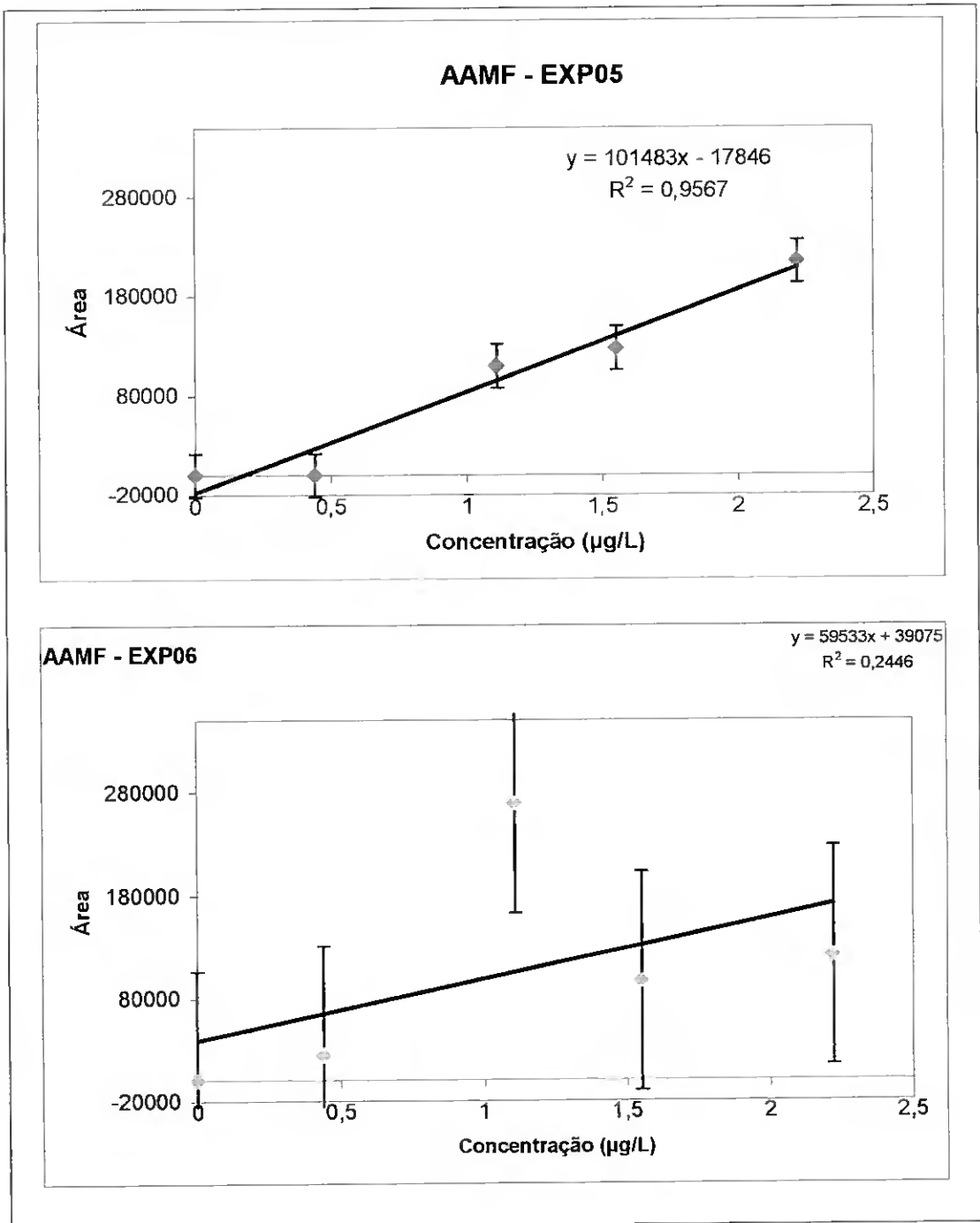
	Área	Tempo retenção (min)
Branco	710	5,004
[GLI]=0,44 µg/L	3 174	5,030
[GLI]=1,11 µg/L	7 478	4,932
[GLI]=1,55 µg/L	11 483	5,017
[GLI]=2,22 µg/L	13 426	5,023

Apêndice B

No presente apêndice representa-se na Figura 50 e na Figura 51 os gráficos das rectas de calibração obtidas para cada uma das 8 experiências com o AAMF e com o GLI.







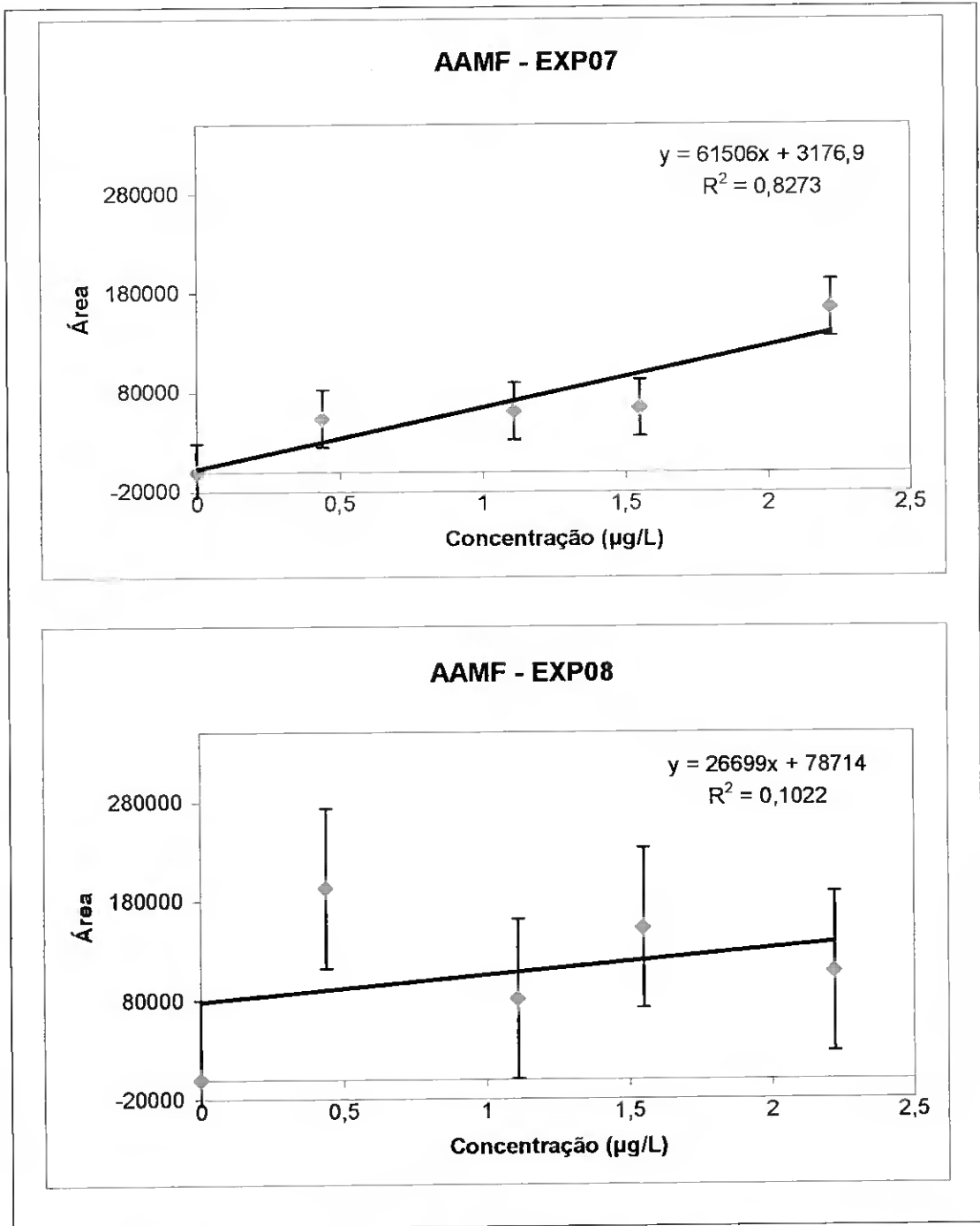
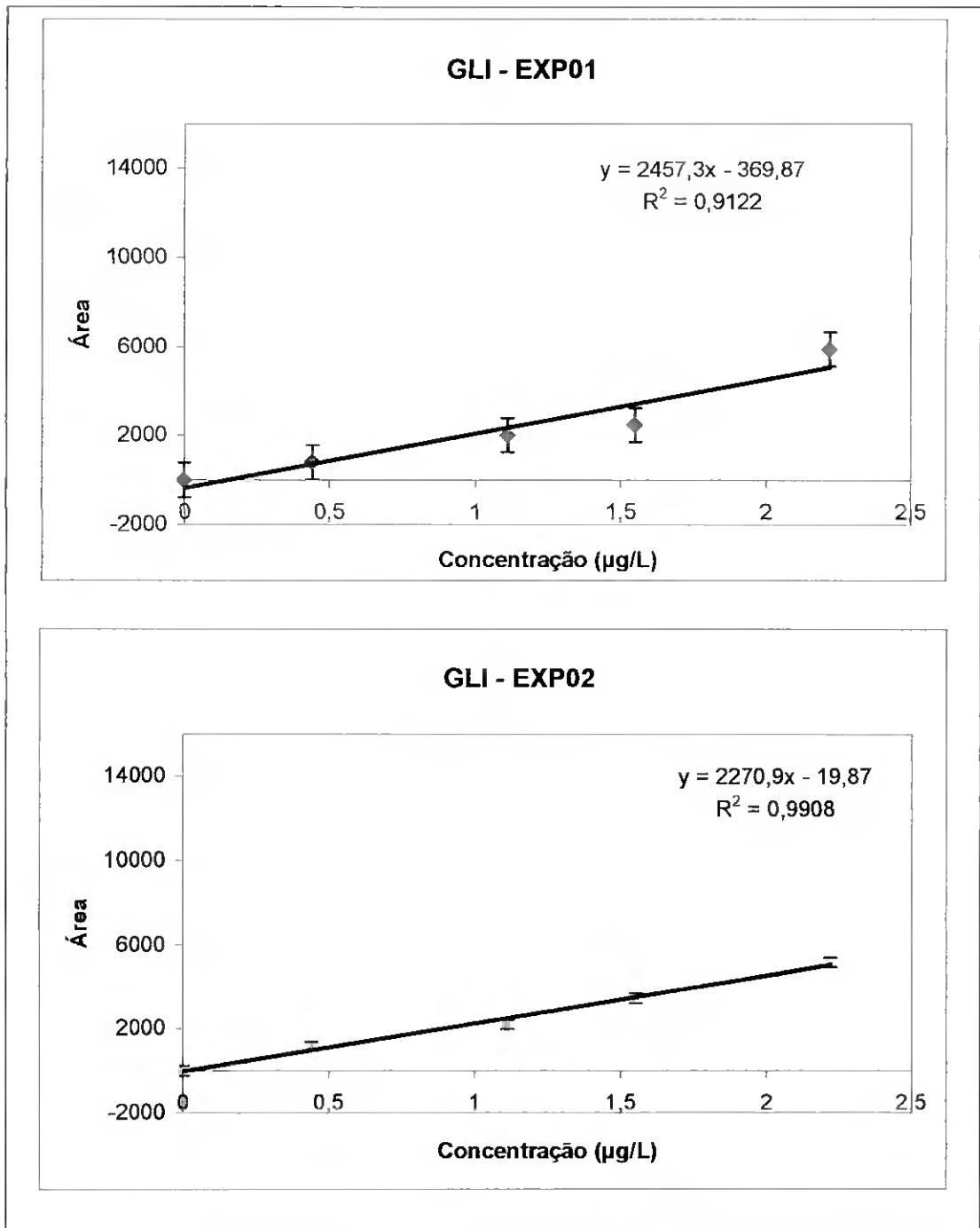
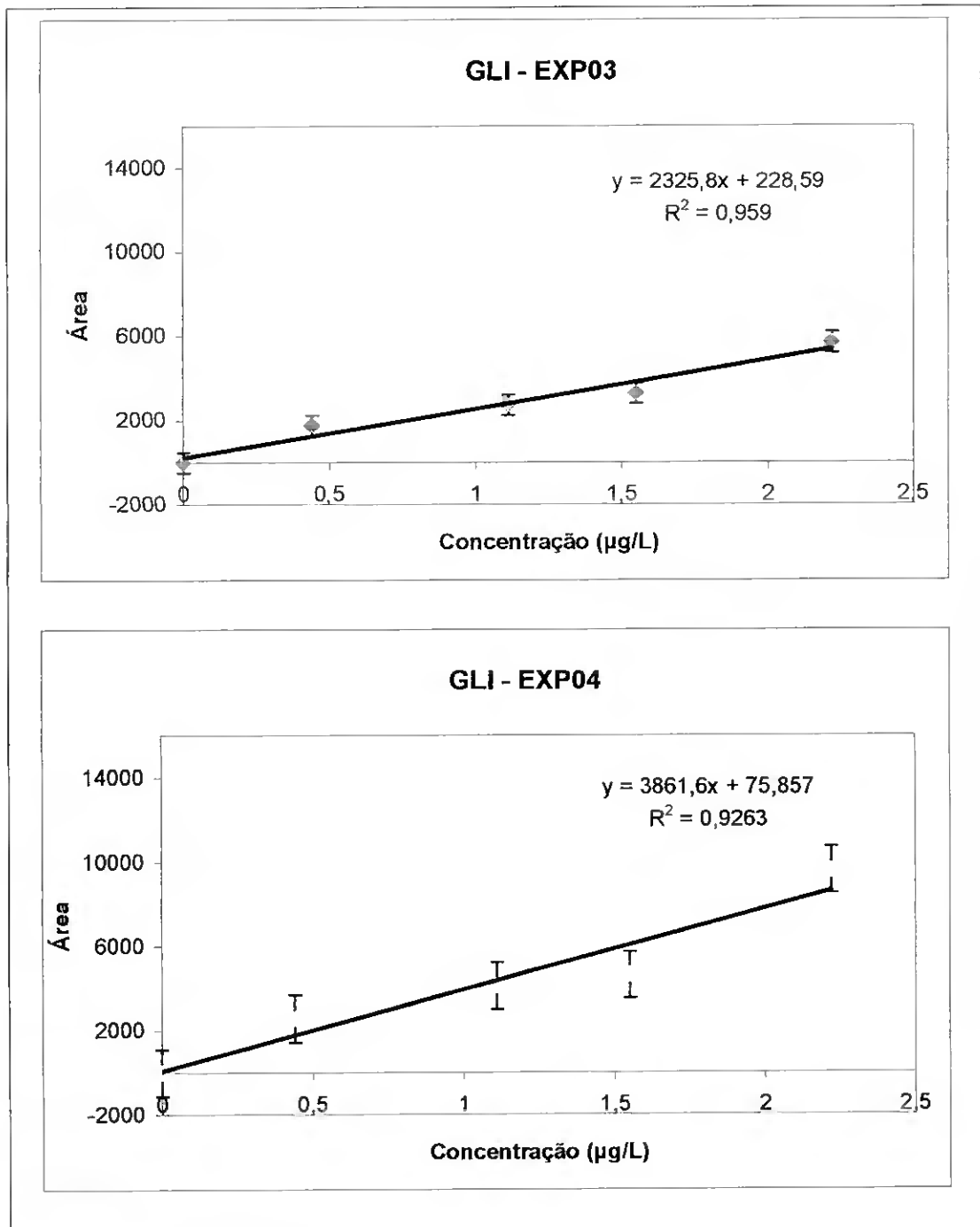
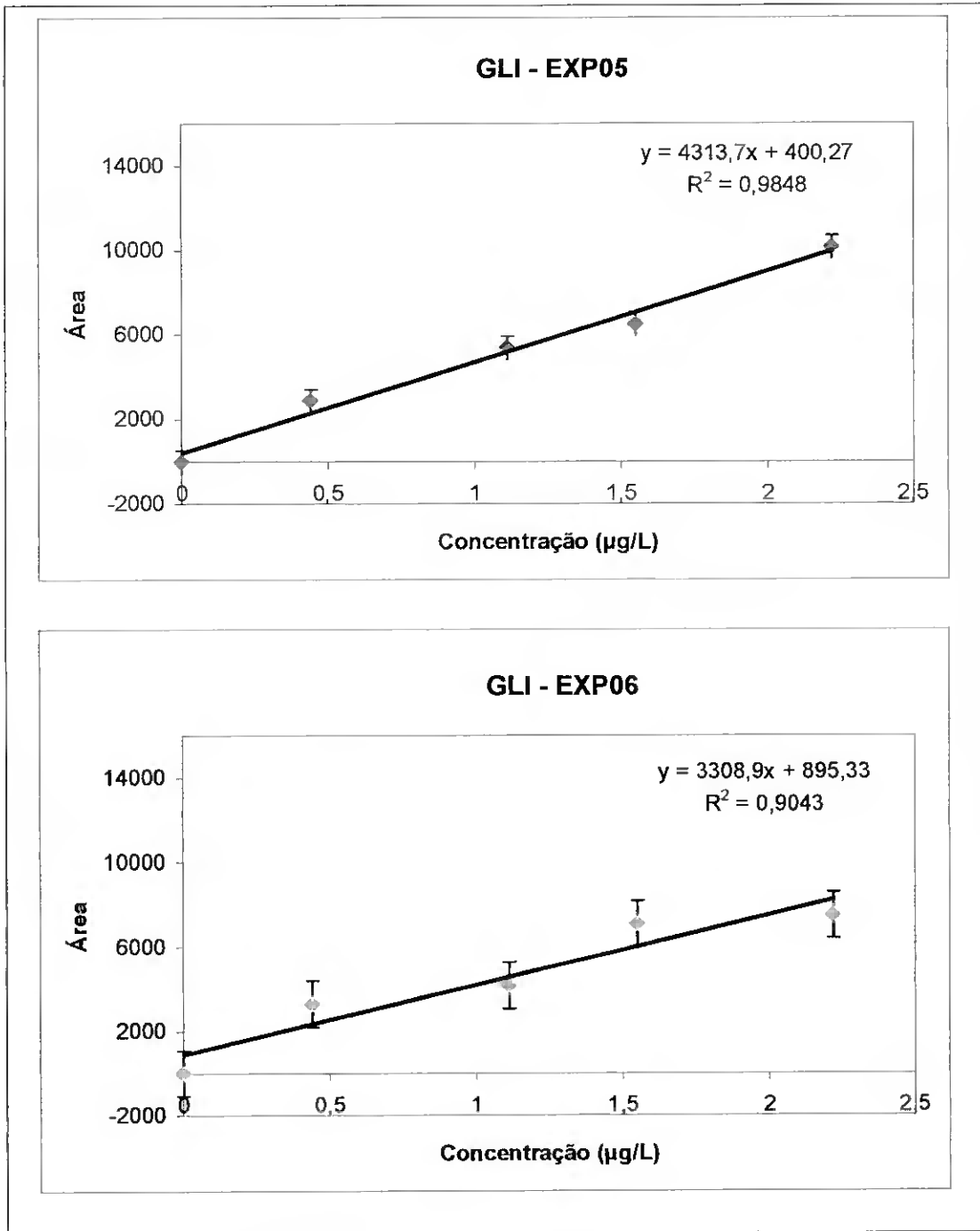


Figura 50 – Gráficos das rectas de calibração obtidas para cada uma das 8 experiências com o AAMF







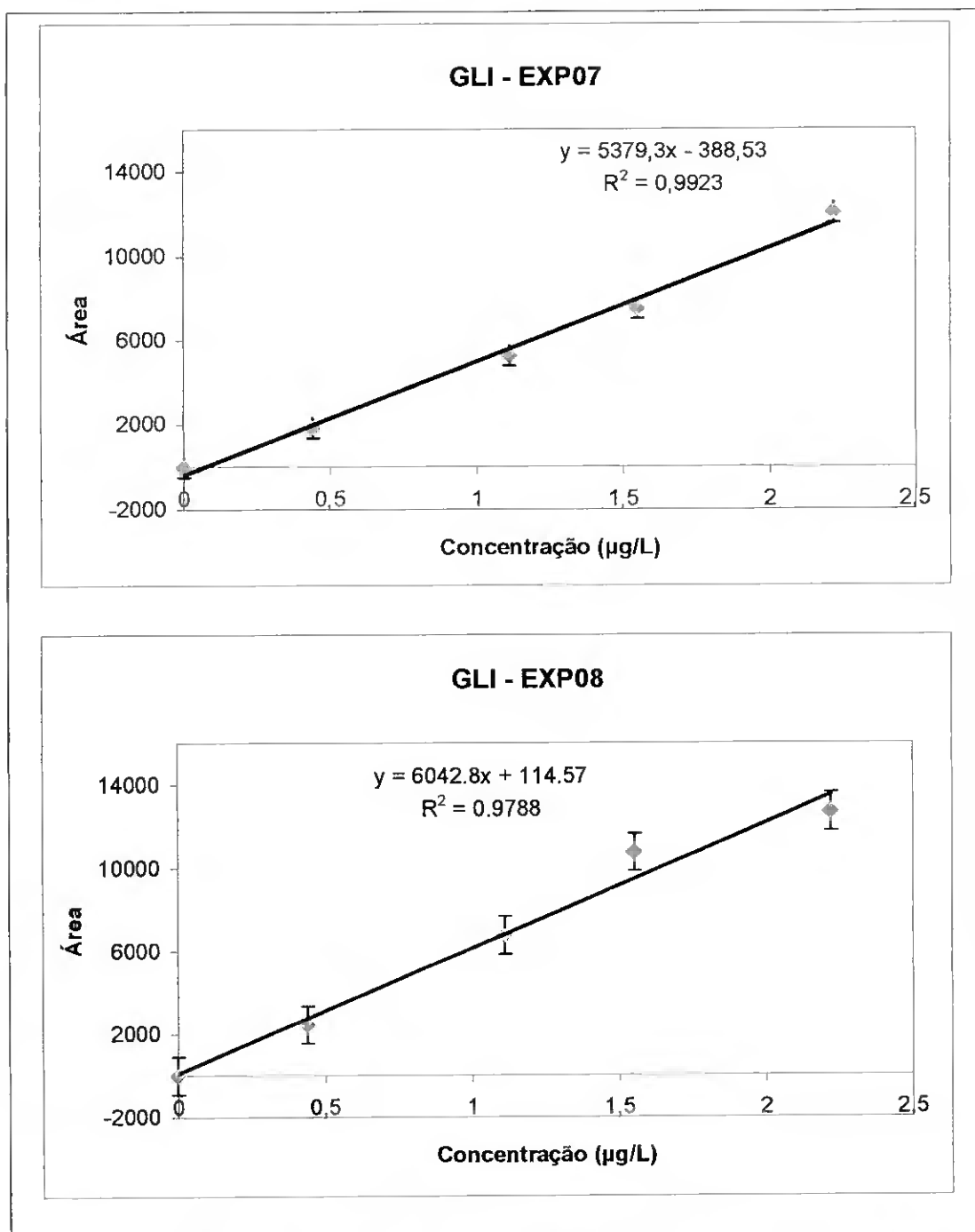


Figura 51 – Gráficos das rectas de calibração obtidas para cada uma das 8 experiências com o GLI

Apêndice C

Serve o presente apêndice para apresentar os valores relativos aos ensaios de recuperação, valores esses apresentados na Tabela 35.

Tabela 35 – Valores relativos aos ensaios de recuperação.

Ensaio	Experiência	Recta Calibração	Área	C _{obtida}	C _{amostra}
I	EXP6	$y = 3309 \cdot x + 895$	2529	0,5 µg/L	0,06 µg/L
II	EXP7	$y = 5379 \cdot x - 388$	3626	0,7 µg/L	0,08 µg/L
III	EXP7	$y = 5379 \cdot x - 388$	3929	0,8 µg/L	0,09 µg/L
IV	EXP8	$y = 6043 \cdot x + 115$	5065	0,8 µg/L	0,09 µg/L

Apêndice D

Apresenta-se na Figura 52 o cromatograma relativo a uma injeção de solvente para ilustrar o comportamento da coluna na presença de solvente.

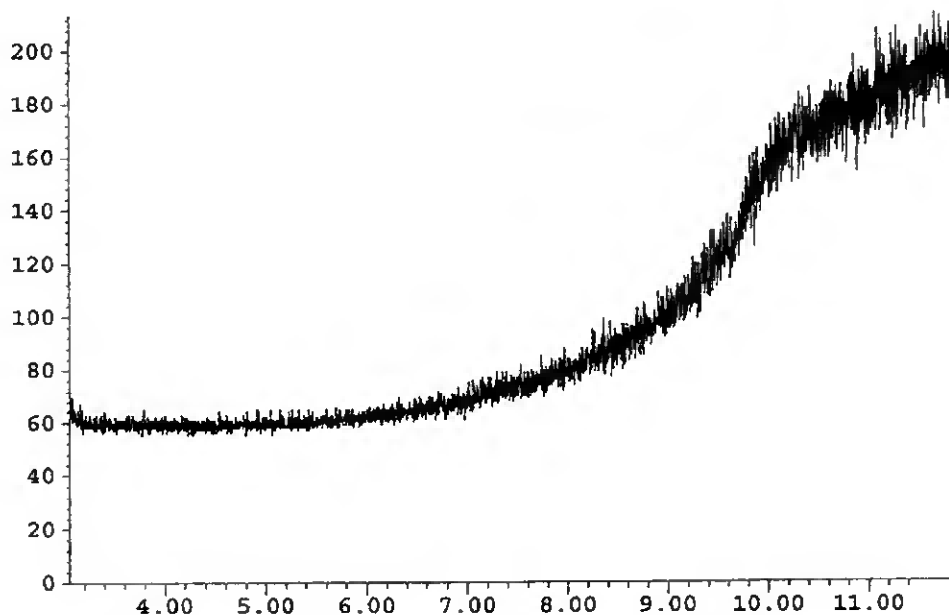


Figura 52 – Cromatograma relativo a uma injeção de solvente (acetato de etilo).

Na Figura 53 representa-se o cromatograma do branco efectuado quando se determinou a concentração das amostra de água da ribeira e do poço. Nas Figura 54, Figura 55 e Figura 56, apresentam-se os cromatogramas referentes aos padrões para a determinação da concentração das amostras de água da ribeira e do poço.

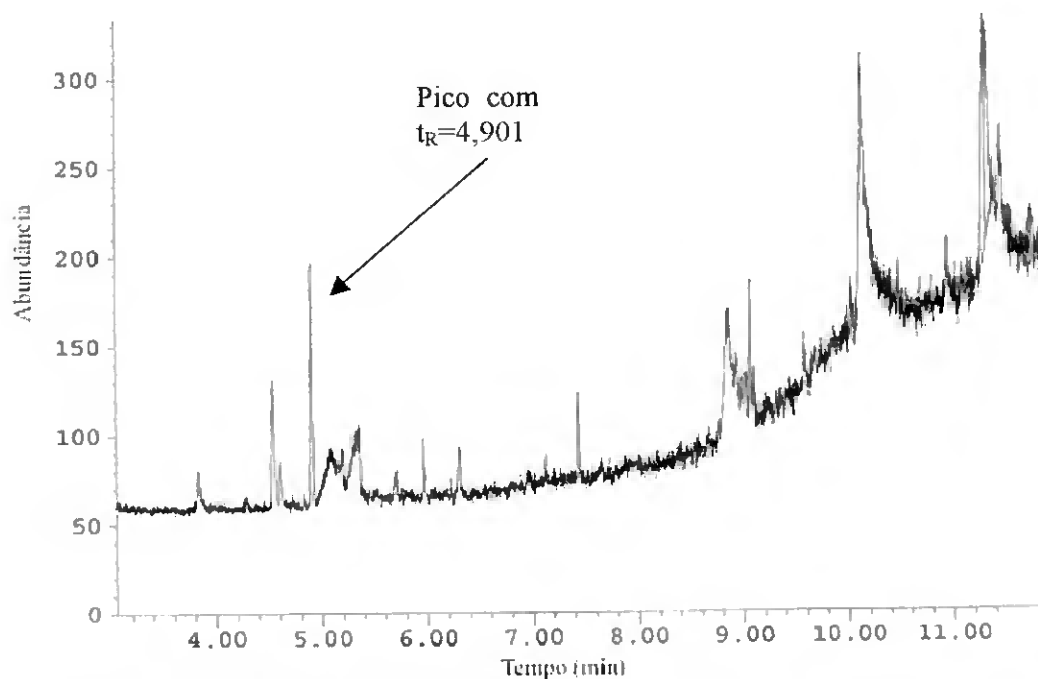


Figura 53 – Cromatograma para o branco tempo de retenção de 4,901 min que é o tempo de retenção do glifosato.

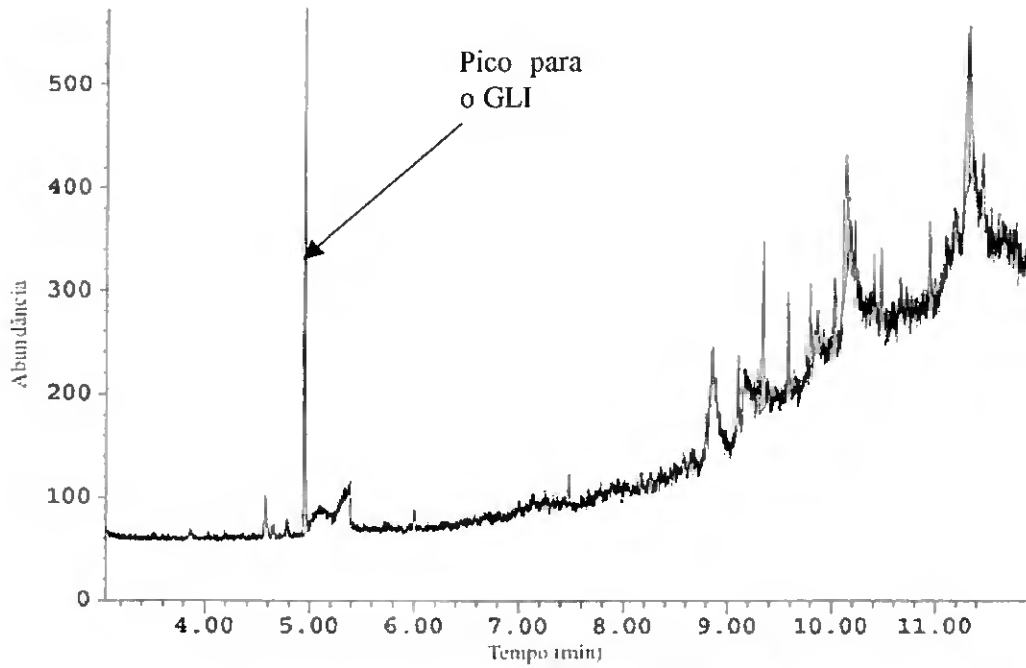


Figura 54 – Cromatograma para a concentração do padrão de 0,44 µg/L com tempo de retenção de 4,950 min.

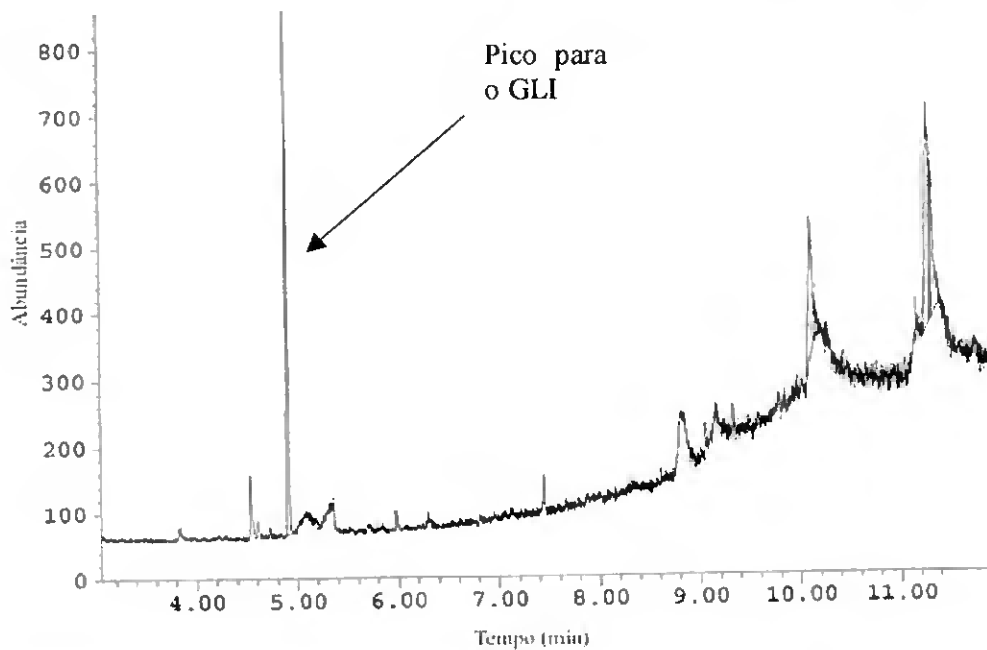


Figura 55 – Cromatograma para a concentração do padrão de 1,11 µg/L com tempo de retenção de 4,904 min.

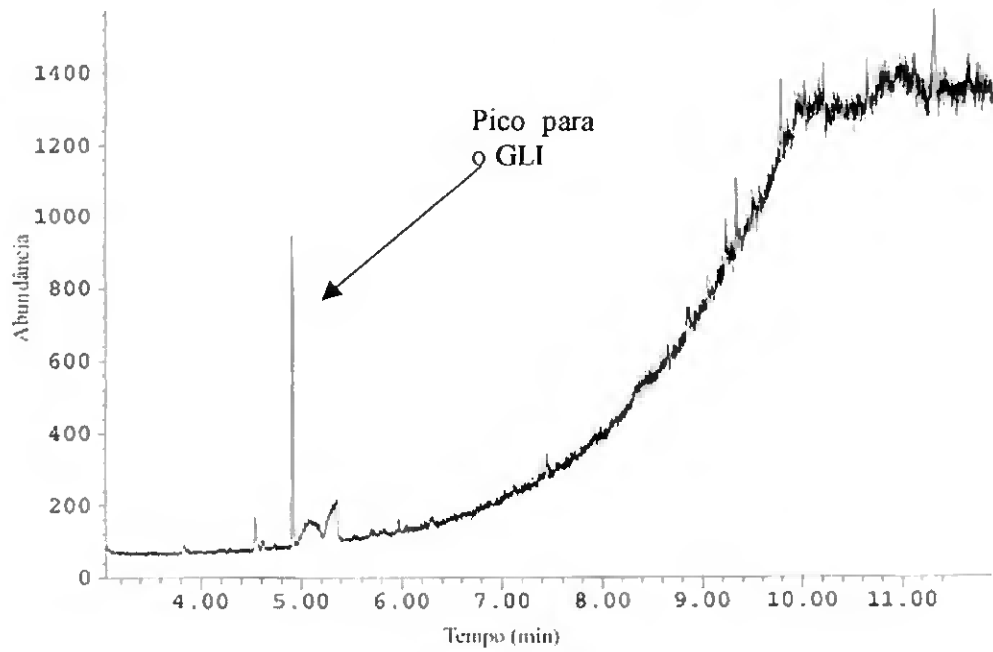


Figura 56 – Cromatograma para a concentração do padrão de 1,55 µg/L com tempo de retenção de 4,975 min.

Glossário

A – Água;

AC – Ácido clorídrico;

AMAC – Solução contendo 160 mL de água, 40 mL de metanol e 2,7 mL de ácido clorídrico;

AAMF – Ácido aminometilfosfônico

C-1 – Coluna 1; C-2 – Coluna 2

CI – Ionização química;

DCE – Detector de captura de electrões;

DDT – Dicloro-Difenil-Triclorometilmetano

DFC – Detector fotométrico de chama;

DNP – Detector azoto/fosfóro;

ECL – Quimiluminescência em inglês *Electrogenerated chemiluminescence*;

EFS – Extração em fase sólida

EI – Ionização por impacto de electrões.

EPA – Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos

FL – Fluorescência;

FM – Fase móvel;

GC – Cromatografia de fase Gasosa

GLI – Glifosato

GS-MS – Cromatografia de fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

HBF – 2,2,3,3,4,4,4-heptafluor-1-butanol;

HFBA – Heptafluorobutírico anidro

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

I. D. – Diâmetro interno;

LOD – Limite de detecção;

LOQ – Limite de quantificação;

M – Metanol;

MS – Espectrometria de massa;

MSD – Detector de espectrometria de massa;

OMS – Organização Mundial de Saúde

PFTBA – Perfluortributilamina.

PP – Polipropileno;

PTFE – Politetrafluoroetileno;

RMN³¹P – Ressonância magnética nuclear de fósforo 31

SIM – Selected-ion monitoring;

SRM – Selected-reaction monitoring;

T_c – Temperatura coluna;

TFAA – Ácido trifluoracético anidro;

TFE – Trifluoretanol;

UV – Ultra-Violeta;

VIS – Visível.

