

# MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO E AMPA DE SOLO E SEDIMENTO

*R. B. Abakerli, E. F. Fay*

*Embrapa Meio Ambiente- Caixa Postal 69- Jaguariúna, SP, Brasil, CEP 13820-000*

*e-mail: [abakerli@cnpma.embrapa.br](mailto:abakerli@cnpma.embrapa.br)*

## RESUMO

O glifosato liga-se com partículas de solo e essa ligação depende do teor de ferro, caulinita, pH e matéria orgânica. Devido ao caráter complexo dessas interações do glifosato com os componentes do solo, os métodos de extração de glifosato e seu metabólito, ácido aminometilfosfônico, (AMPA) têm mostrado dependência com o tipo de solo.

Existe dificuldade na extração de glifosato e AMPA de solos e de sedimentos, sendo os resultados de recuperação extremamente variáveis e muitas vezes ineficientes.

O procedimento descrito a seguir determina glifosato e AMPA por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em solo areno-argiloso e sedimento. Os dois compostos, glifosato e AMPA, podem ser isolados das matrizes com solução de hidróxido de amônio e dihidrogeniofosfato de potássio. Os extratos podem ser limpos em resina de troca catiônica. Após concentração a vácuo dos extratos obtidos, as amostras são analisadas por cromatografia de troca catiônica num cromatógrafo líquido equipado com um sistema de reação pós-coluna com OPA (o-ftalaldialdeído)/MERC (mercaptoetanol) e detector de fluorescência.

Foram estabelecidas as recuperações, os limites de detecção, a linearidade de resposta para a faixa de concentração de interesse, como também foram estimados limites práticos para determinação de resíduos de glifosato e AMPA nas matrizes testadas. O resultado indicou que o método preenche esse objetivo.

O método para solo e sedimento foi verificado para o intervalo de concentração de 0,05 – 1mg kg<sup>-1</sup> e 0,05 - 0,1mg kg<sup>-1</sup> respectivamente para as recuperações analíticas. Nas condições do sistema descrito acima, tanto o glifosato quanto o AMPA podem ser detectados em concentrações de 0,0075µg ml<sup>-1</sup>. A resposta do equipamento tem se mostrado linear na faixa de 0,0075-10,0µg ml<sup>-1</sup> com um coeficiente de correlação de 0,9999. A sensibilidade do método para 20g de solo e de sedimento é de 0,05mg kg<sup>-1</sup>. As recuperações médias de glifosato e AMPA no solo foram de 75 e 82% e para sedimento de 75% e 77% respectivamente.

## INTRODUÇÃO

Na agricultura brasileira, em 2000, destacaram-se os herbicidas com 52% do valor das vendas totais do conjunto de pesticidas usados no país, conforme os dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) (Ferreira et al., 2002). No Brasil, o uso de herbicidas tem se expandido muito nos últimos 35 anos e não mostra sinais de diminuição. O volume dos negócios com herbicidas passou de

U\$ 400 mil em 1964 para U\$ 1,37 bilhões em 1998 (Durigan, 1990; SINDAG, 1999). Apenas quatro culturas (soja, cana-de-açúcar, milho, arroz) concentram mais de 80% dos negócios com estes compostos (Oliveira Júnior, 2001). A perspectiva de crescimento das áreas de milho, soja e cana-de-açúcar, além da contínua substituição do sistema convencional de cultivo pelo sistema de plantio direto fortalecem esta tendência de crescimento. Em função disto, há um crescente interesse na metodologia analítica para análise de resíduos de glifosato e seu metabólito AMPA, em solo e sedimento, como resultado do aumento do uso desse herbicida no país. O glifosato é um herbicida não seletivo e de pós-emergência muito utilizado na agricultura para o controle de ervas daninhas anuais e perenes. A literatura é ampla em relação à química do glifosato, modo de ação e seus efeitos no metabolismo da planta, enquanto relativamente pouco é conhecido do seu comportamento em solo (Piccolo et al. 1996). No solo, tem baixa atividade devido à degradação microbiana e por sua grande capacidade de adsorção aos constituintes do mesmo (Sprankle et al., 1975). O glifosato compete, através do radical fosfônico, com fosfato inorgânico pelos sítios ativos de sorção dos solos e sedimentos (Hance, 1976; Carlisle & Trevors, 1988). Sítios possíveis de adsorção podem ser as argilas minerais (Bowmer et al., 1986), a matéria orgânica (Roy et al., 1989), os hidróxidos amorfos de ferro e alumínio (Piccolo et al., 1994), e óxidos férricos (Day et al., 1997). Alguns autores reportam que a matéria orgânica tem pouco efeito ou mesmo diminui a adsorção do glifosato (Torstensson (1985); Gerritse et al., (1996). Morillo et al., 1997) observaram que a adsorção do glifosato pelos solos, argilas minerais e óxidos geralmente diminui com o aumento do pH, contrariamente ao reportado por Carlisle & Trevors, (1988).

Devido ao caráter das interações do glifosato com os diversos componentes do solo, os métodos de extração relatados para análise de seus resíduos têm-se mostrado complexos e fortemente dependentes do tipo de solo. Este trabalho teve o objetivo de determinar uma metodologia de extração de glifosato e AMPA em solo e sedimento que proporcione uma maior recuperação do herbicida aplicado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Equipamentos e condições cromatográficas**

As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido marca Shimadzu com amostrador automático, SIL-10 A; bomba para HPLC, LC-10AD; forno para coluna cromatográfica, CTO-10A; bombas para reação pós-coluna, Eldex; forno para reação pós-coluna; detector de fluorescência, RF-535; processador Class- LC 10. Coluna para HPLC: Aminex A-9, forma potássica, 300 x 4,6 mm d.i. e 150 x 4,6 mm d.i., Bio Rad Laboratories. Ao sistema estava acoplada uma válvula de 6 vias desviadora de fluxo, Valco. Tubos de aço em espirais para reação (solução oxidante 3.0m de comp. X 0.02" d.i. x 1/16" d.e.; solução de OPA/MERC, 3.0m comp. x 0.02" d.i. x 1/16" d.e.).

Temperatura das colunas: 50°C; temperatura da espiral de reação com oxidante: 38°C; fluxo da fase móvel: 0,5mL min<sup>-1</sup>; fluxo da solução oxidante: 0,2mL min<sup>-1</sup>; fluxo da solução de OPA: 0,4mL min<sup>-1</sup>; volume injetado: 100µL; detector: comprimento de onda de excitação: 350nm; comprimento de onda de emissão: 440nm.

## 2. Reagentes

Padrões analíticos de glifosato e AMPA, pureza 99,9%, cedidos pela Monsanto do Brasil. Resina de troca catiônica AG50-W, 100-200 mesh forma hidrogênio, ácido clorídrico concentrado, hidróxido de amônio 25%, hidróxido de sódio; ácido bórico, cloreto de sódio, 1,2- dicarboxaldeído ftálico foram grau analítico; dihidrogênio fosfato de potássio 99,99%, metanol, grau HPLC; 2-mercaptoetanol, grau reagente; hipoclorito de cálcio 65% de cloro disponível; água deionizada; soluções de ácido clorídrico 0,01M e 6M.

Soluções padrão de glifosato e AMPA, para cromatografia e para as fortificações, foram preparadas em água deionizada a partir de diluições de uma solução estoque de  $1000\mu\text{g mL}^{-1}$ . Foram pesadas diretamente em frascos de boca larga, de 20mL, 0,0100g de glifosato e 0,0100g de AMPA e adicionados 10mL de água deionizada com ajuda de uma pipeta volumétrica.

Fase móvel para HPLC: 0,005M de dihidrogênio fosfato de potássio, 4,0% de metanol em água deionizada, pH 2,1, ajustado com ácido fosfórico concentrado.

Solução oxidante de hipoclorito de cálcio: Foram pesados 1,36g de dihidrogênio fosfato de potássio, 11,6g de cloreto de sódio e 0,4g de hidróxido de sódio e dissolvidos em 500mL de água deionizada. A essa solução foram adicionadas 20,0mg de hipoclorito de cálcio dissolvido em 50mL de água deionizada. O volume foi acertado para 1,0L com água deionizada e a solução filtrada por membrana de nylon de 0,45 $\mu\text{m}$ .

Solução de OPA/MERC: Foi preparado 1L de uma solução de ácido bórico 0,4M e o pH ajustado para  $10,40 \pm 0,02$  usando solução de hidróxido de potássio 45%. A solução foi filtrada em membrana de 0,45 $\mu\text{m}$  e cerca de 700mL dessa solução foram transferidos para um frasco volumétrico de 1L, a esta foi adicionada uma solução de 800,0mg de 1,2-dicarboxaldeído ftálico dissolvido em 10mL de metanol e 2mL de 2-mercaptoetanol, o volume do balão foi completado com ácido bórico 0,4M.

## 3. Amostras

Amostras de solo coletadas na profundidade de 0 a 10cm e sedimento foram obtidas a campo e não foram expostas ao herbicida glifosato. Foram utilizadas como testemunhas e fortificadas para a verificação do método. O solo foi analisado quanto às características físico-químicas e textural apresentando pH  $(\text{CaCl}_2) = 5,2$ ; matéria orgânica  $34\text{mg dm}^{-3}$ ; argila  $380\text{g kg}^{-1}$ ; limo  $100\text{g kg}^{-1}$ ; areia fina  $130\text{g kg}^{-1}$ ; areia grossa  $390\text{g kg}^{-1}$ ; textural média. Também foram determinados os valores de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, hidrogênio + alumínio, soma de bases, capacidade de troca catiônica (CTC), saturação de bases (dados não apresentados). Este solo apresentou acidez e matéria orgânica com teores médios, segundo os padrões adotados pelo Laboratório de Fertilidade do Solo do Departamento de Solos e Adubos da FCAV/UNESP. Foram coletadas 10 sub-amostras de 500g, de solo e sedimento, uniformemente misturadas, formando amostras compostas. Uma alíquota de 5kg destas amostras compostas foi congelada e enviada ao laboratório de resíduos.

#### 4. Procedimento

A quantidade amostrada (5kg) foi colocada em bandejas de aço inox e seca em estufa com circulação de ar (40°C) por até 48h. Após a secagem foram peneiradas em malha de 2mm.

Foram pesados 20g de solo homogêneo, diretamente em tubos de centrifuga de 250mL, adicionados 80mL de uma solução extratora de 0,25M de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e 0,1M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Após agitação em *shaker* durante 90 min., foram centrifugados por 20min. a 3000rpm, sendo o sobrenadante foi decantado para um outro tubo de centrifuga. O pH foi ajustado para 2 com ácido clorídrico 6N, e os tubos centrifugados por 10min. a 2500rpm, decantado o sobrenadante diretamente para um balão de fundo redondo de 500ml. A extração foi repetida com o resíduo sólido. Os extratos combinados<sup>1</sup> foram reduzidos para 5ml sob vácuo e a temperatura de 60°C. O pH foi ajustado para 1,8-2,0 com hidróxido de amônio concentrado e o extrato reduzido foi centrifugado a 4000rpm por 10min. O sobrenadante foi completado para 10mL com HCl 0,01M e submetido a limpeza do extrato por cromatografia em resina AG 50-W.

50,0g de resina AG-50W foram adicionados de HCl 0,01M e transferidos para uma coluna de vidro (2cm de diâmetro e 30cm de comprimento), sem deixar secar. A coluna foi condicionada com 200ml de solução de HCl 0,01M a um fluxo de 2,5ml min<sup>-1</sup>. 5mL do extrato de solo foi então aplicado na coluna AG 50-W. A coluna foi lavada com 9 porções de 5mL de HCl 0,01M, desprezando o eluato. A amostra foi eluída com 5 porções de 55mL de HCl 0,01M e evaporada à secura em evaporador rotatório a vácuo com banho mantido a 60°C. O resíduo de glifosato e AMPA foi redissolvido em 5mL de em fase móvel, filtrado por filtro de 0,45um e analisado por cromatografia. Para sedimento procedimento idêntico foi realizado.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O problema na análise de glifosato e AMPA em solos e sedimento é a dificuldade na etapa de extração devido as fortes interações com as partículas do solo. Não é difícil encontrar em função da solução extratora utilizadas recuperações extremamente baixas e variáveis. Com a utilização da solução de KOH 0,5M e NaOH 1M as recuperações são muito variáveis e não passam de 40% para solos argilosos (Araújo et al., 2001). O solo utilizado neste trabalho foi classificado como de textura média, incluindo pontos na classe argilosa (38%), sendo característico da região onde foi coletado. Nossos resultados apresentaram baixa recuperação com estas soluções extratoras (dados não apresentados). Em função do solo utilizado a solução básica de extração foi acrescida de um sal de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), para competir com sítios de ligação de glifosato no solo, tornando possível a sua extração. Para a limpeza do extrato de solo e sedimento foram comparados dois procedimentos, limpeza em resina de troca catiônica e a limpeza em resina de complexação (Cowell et al., 1986). Ambos os procedimentos de limpeza fornecem recuperações equivalentes dos analitos. A escolha da resina de troca catiônica foi devido à obtenção de extratos mais limpos para a determinação cromatográfica.

---

<sup>1</sup> Se a quantidade de cátions extraídos não saturarem a resina de purificação. Caso contrário trate os extratos em separado.

O limite de detecção estimado, nas condições do sistema analítico, para o glifosato e AMPA é de  $0,0075\mu\text{g mL}^{-1}$  (Abakerli & Fay, 2003). Assim, em amostras de solo e sedimento, foram estabelecidas as recuperações de glifosato e AMPA para o intervalo de concentração no solo e sedimento de  $0,01$  até  $1,0\text{ mg kg}^{-1}$  (Tabela 1).

**Tabela 1.** Recuperação de glifosato e AMPA em solo e sedimento.

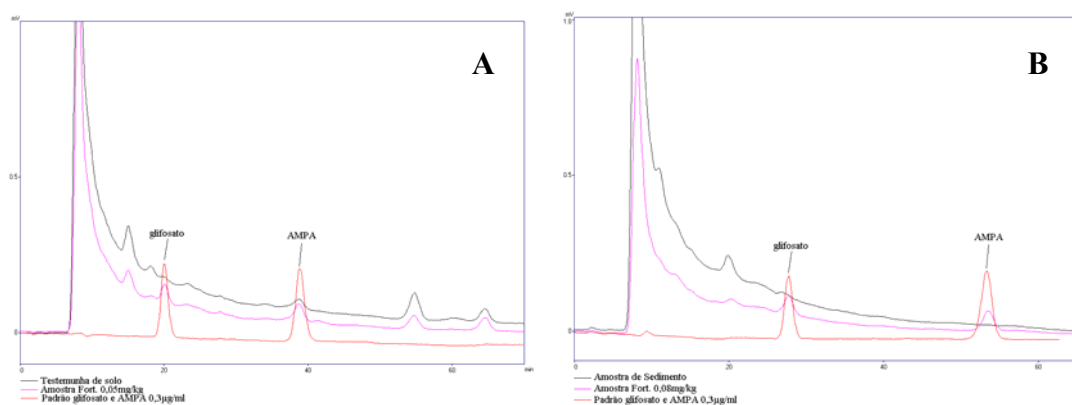
Nível de Fortificação em: ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	glifosato (%)	AMPA (%)
Testemunha de solo	ND	$0,018\text{mg kg}^{-1}$
0,010	150	250
0,050	$65 \pm 6,4$	$68 \pm 5,2$
0,100	$83 \pm 10,6$	$104 \pm 2,1$
1,0	$80 \pm 6,3$	$84 \pm 5,0$
<b>Sedimento</b>		
Testemunha de sedimento	ND	ND
0,050	64	80
0,080	63	100
0,10	$87 \pm 9,2$	$87 \pm 4,2$

As recuperações foram feitas em replicatas nos níveis de fortificação com exceção da amostra de sedimento ( $0,050$  e  $0,080\text{ mg kg}^{-1}$ ).

ND: não detectado.

As amostras de testemunha de solo mostraram um nível basal na região do AMPA da ordem de  $0,02\text{ mg kg}^{-1}$ , não sendo detectado nenhum nível basal significativo na região do glifosato. A amostra testemunha de sedimento não apresentou resposta nas regiões dos analitos. O limite de determinação de  $0,05\text{mg kg}^{-1}$  para glifosato e AMPA pode ser utilizado na análise de solo e sedimento para  $20\text{g}$  de amostra.

A Figura 1 ilustra os cromatogramas de testemunha de solo e sedimento e fortificadas no nível de  $0,05\text{mg kg}^{-1}$  e  $0,08\text{mg kg}^{-1}$ .



**Figura 1.** Cromatogramas de amostra de testemunha de solo (A) e sedimento (B) e respectivas fortificações.

Em virtude da provável degradação microbiológica foi verificada a estabilidade dos analitos em solo, fortificado com  $1,0\text{mg kg}^{-1}$  até 35 dias, mantido a temperatura ambiente, não tendo sido observada degradação do glifosato e AMPA (Tabela 2).

**Tabela 2.** Estabilidade de glifosato e AMPA na concentração de  $1,0\text{mg kg}^{-1}$  em solo.

Tempo (dias)	Recuperação de glifosato (%)	Recuperação de AMPA (%)
1	78	90
7	72	83
21	86	78
35	83	84

A utilização de fosfato na solução de extração mostrou ser eficiente para o tipo de solo analisado e até 35 dias não houve degradação dos analitos no solo testado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABAKERLI, R.B.; FAY, E.F. Validação de Método para Análise de Glifosato e AMPA por HPLC e Detecção por Fluorescência, em Culturas. Segundo Congresso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. 2003.
2. ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABAKERLI, R.B.; SILVESTRE, L.S. Avaliação de métodos de extração de glifosato do solo. In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu, PR, Brasil. 2001.
3. BOWMER, K. H.; BOULTON, P. M. D.; SHORT, D. L.; HIGGINS, M. L. Glyphosate-sediment interactions and phytotoxicity in turbid water. *Pesticide Science*, v. 17, p. 79-88. 1986.
4. CARLISLE, S. M.; TREVORS, J. T. Glyphosate in the environment. *Water, Air, Soil Pollution*, v. 39, p. 409-420. 1988.
5. COWELL, J. E.; KUNSTMAN, J. L.; NORD, P. J.; STEINMETZ, J. R.; WILSON, G. R. Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite: An interlaboratory study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 34, p. 955-960, 1986.
6. DAY G. M.; HART, B. T.; McKELVIE, I. D.; BECKETT, R. Influence of natural organic matter on the sorption of biocides onto goethite. II Glyphosate. *Environmental Technology*, v. 18, p. 781-794. 1997.
7. DURIGAN, J.C. Controle químico de plantas daninhas. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 1990, 9p.
8. FERREIRA, C.R.R.P.T.; SILVA, J.R.; ASSUMPÇÃO, R. Distribuição territorial das vendas de herbicidas no Brasil, 1991-2000. *Informações Econômicas*, v. 32, n. 6, 2002.
9. GERRITSE, R. G.; BELTRÁN, J.; HERNÁNDEZ, F. Adsorption of atrazine, simazine, and glyphosate in soils of the Gngangara Mound, Western Australia. *Australian Journal of Soil Research*, v. 34, p. 599-607. 1996.
10. HANCE, J. R. Adsorption of glyphosate by soils. *Pesticide Science*, v. 7, p. 363-366. 1976.

11. MORILLO, E.; UNDABEYTIA, T.; MAQUEDA, C. Adsorption of glyphosate on the clay mineral montmorillonite: effect of Cu (II) in solution and adsorbed on the mineral. *Environmental Science Technology*, v. 31, p. 3588-3592. 1997.
12. OLIVEIRA JUNIOR, R. S. Introdução ao controle químico. In.: OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIM, J. ed. Plantas daninhas e seu manejo. Guaíba: Agropecuária, 2001, p. 187-204.
13. PICCOLO, A.; CELANO, G.; ARIENZO, M.; MIRABELLA, A. Adsorption and desorption of glyphosate in some european soils. *Journal of Environmental Science and Health B*, v. 29, p. 1105-1115. 1994,
14. PICCOLO, A.; CELANO, G.; CONTE, P. Adsorption of Glyphosate by Humic Substances. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.44, p. 2442-2446, 1996.
15. ROY, D. N.; KONAR, S. K.; BANERJEE, S.; CHARLES, D. A.; THOMPSON, D. G.; PRASAD, R. Persistence, movement and degradation of glyphosate in selected canadian boreal forest soils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 37, p. 437-440, 1989.
16. SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS-SINDAG. Vendas mensais de defensivos agrícolas, 1997/1998. São Paulo, 1999.
17. SPRANKLE, P.; MEGGIT, W. F.; PENNER, D. Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Science*, v. 23, p. 229-234. 1975.
18. TORSTENSSON, L. Behaviour of glyphosate in soils and its degradation. IN: GROSSBARD; ATKINSON (ED.). *The herbicide glyphosate* London: Butterworths, 1985.
19. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- FACULDADE de CIÊNCIAS AGRÁRIAS e VETERINÁRIAS. Laboratório de Fertilidade do Solo do Departamento de Solos e Adubos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal/ São Paulo. 2000.