



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
(UNIRIO)

THAINÁ MATOS PALHAES TOLEDO

**MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO GLIFOSATO E ÁCIDO
AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) EM ÁGUA ULTRAPURA**

RIO DE JANEIRO

2019

THAINÁ MATOS PALHAES TOLEDO

**MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO GLIFOSATO E ÁCIDO
AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) EM ÁGUA ULTRAPURA**

Monografia de conclusão de curso apresentada ao Curso de Toxicologia do centro de ciências Biológicas e da saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial à conclusão do curso.

Orientadora Acadêmica: Prof(a).Dr(a). Márcia Sarpa de Campos Mello
Orientadora Científica: Prof(a). Dr(a). Bárbara Rodrigues Geraldino

RIO DE JANEIRO

2019

T649 Toledo, Thainá Matos Palhaes
Método para determinação do glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em água ultrapura / Thainá Matos Palhaes Toledo. -- Rio de Janeiro, 2019.
63 f.

Orientadora: Marcia Sarpa de Campos Mello.
Coorientadora: Barbara Rodrigues Geraldino.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Graduação em Biomedicina, 2019.

1. Glifosato. 2. AMPA. 3. Metodologia. 4. HPLC. 5. Toxicologia. I. Mello, Marcia Sarpa de Campos, orient. II. Geraldino, Barbara Rodrigues, coorient. III. Título.

THAINÁ MATOS PALHAES TOLEDO

**MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO GLIFOSATO E ÁCIDO
AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) EM ÁGUA ULTRAPURA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação,
apresentado ao Instituto Biomédico da
Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro, como requisito parcial para a obtenção
do grau de Bacharel em Biomedicina. Área de
concentração: Toxicologia

Aprovado em: 01/07/2019

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Márcia Sarpa de Campos Mello (Orientadora acadêmica)
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Profa. Dra. Bárbara Rodrigues Geraldino (Orientadora científica)
Instituto Nacional do Câncer - INCA

Prof. Dr. Rafael Braga Gonçalves
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Profa. Dra. Kátia Soares da Poça
Instituto Nacional do Câncer – INCA

À minha avó Teresa Maria Palhaes Toledo (*in memoriam*), cujo maior desejo era poder ver-me formada e cuja memória me fortaleceu durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida e pelos pais maravilhosos que foram postos em meu caminho.

Agradeço à minha mãe por todo amor, incentivo, compreensão e bronca. Agradeço por ser a grande responsável por construir a pessoa que sou hoje, por me amar incondicionalmente, por me guiar quando eu estava perdida e por nunca desistir de mim mesmo quando eu já havia desistido.

Agradeço ao meu pai por todo amor e incentivo que me foram dados, pois mesmo com todas as atribulações da vida nunca deixou de torcer por mim e estar ao meu lado. Agradeço por me mostrar que estar ao lado de quem amamos é o mais importante da caminhada.

Agradeço ao meu noivo pelo amor, paciência, compreensão, parceria e carinho que me foram dados em todos esses quase cinco anos de caminhada juntos, principalmente nos momentos de tempestade, onde foi você o meu ponto de calma.

Agradeço ao meu avô por sempre me incentivar e aturar os meus momentos loucos de estudo, trancada dentro do seu quarto e falando sozinha.

Agradeço às minhas orientadoras maravilhosas pela confiança, dedicação, incentivo e afeto. Sei que o caminho da pesquisa apresenta muitos obstáculos, mas vocês me guiaram com tanta leveza, gentileza e carinho que tornaram ele muito mais fácil.

Agradeço ao professor Rafael por toda ajuda com os ajustes do HPLC e pela paciência toda vez que pedíamos sua ajuda com as manutenções.

Por fim, mas não menos importante, agradeço às minhas companheiras e companheiro de laboratório, Julia, Juliana Gomes, Juliana Amazonas, Paula, Rafaella, Layla, Kátia, Yngrid e Erick pelo auxílio, apoio e bate-papos que tornaram esse processo muito mais divertido.

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém pensou sobre aquilo que todo mundo vê."
(Arthur Schopenhauer)

TOLEDO, Thainá Matos Palhaes. **Método para determinação do glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em água ultrapura.** 2019. 63 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em biomedicina) – Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

RESUMO

O glifosato é um herbicida não seletivo, sistêmico, pós-emergente que está no topo da lista de ingredientes ativos mais comercializados no Brasil e no mundo. Seu uso na agricultura aumentou drasticamente desde o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas para serem resistentes ao glifosato. Ainda hoje pouco se conhece sobre a toxicidade deste ingrediente ativo para espécies não alvo. Porém, sabe-se que os agrotóxicos utilizados na agricultura, em geral, podem causar efeitos tóxicos sobre os organismos vivos. Efeitos resultantes da exposição a esses agentes químicos podem ser caracterizados por infertilidade, abortos, malformações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, imunotoxicidade, genotoxicidade e câncer. Em 2015, a IARC promoveu a reclassificação de cinco ingredientes ativos, incluindo o glifosato, reclassificando-o como provável agente carcinogênico (grupo 2A). Tendo em vista a ampla utilização do glifosato como herbicida agrícola nas lavouras do Brasil, a recente classificação do glifosato no grupo 2A da IARC e ainda a escassez de estudos científicos nacionais e internacionais publicados, talvez devido à dificuldade metodológica em analisar o glifosato em diferentes matrizes, é de extrema relevância a implementação e validação de metodologias para a detecção do glifosato e do seu principal metabólito, o AMPA, em diferentes matrizes como água e matrizes biológicas. Desta forma, o presente estudo apresenta como objetivo implementar método analítico quantitativo para a determinação de resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico em água e urina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplado à detector de fluorescência. Foram avaliados quatro métodos analíticos para a análise de glifosato e AMPA em água e urina por HPLC-FL. Foram construídas curvas de calibração para o glifosato e para o AMPA em água ultrapura utilizando o método de Bot et al (2002) onde os resultados obtidos mostram linearidade (0,9998 para o glifosato e 0,9990 para o AMPA), reprodutibilidade, seletividade, precisão e exatidão. Já para a matriz urina não houve resultados positivos em relação às análises do glifosato e do AMPA em nenhum dos métodos avaliados. Desta forma, se pode afirmar que o método foi implementado com sucesso para matriz água, porém não foi implementado para a matriz urina, sendo necessários novos estudos.

Palavras-chave: Glifosato. AMPA. Metodologia. HPLC. Toxicologia.

TOLEDO, Thainá Matos Palhaes. **Method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in ultrapure water.** 2019. 63 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em biomedicina) – Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

ABSTRACT

Glyphosate is a non-selective, systemic, post-emergent herbicide that is at the top of the list of active ingredients most marketed in Brazil and worldwide. Its use in agriculture has increased dramatically since the development of genetically modified plants to be resistant to glyphosate. Even today little is known about the toxicity of this ingredient to non-target species. However, it is known that pesticides used in agriculture, in general, can cause toxic effects on living organisms. Effects resulting from exposure to these chemical agents may be characterized by infertility, miscarriages, malformations, neurotoxicity, hormonal dysregulation, immunotoxicity, genotoxicity, and cancer. In 2015, IARC promoted the reclassification of five active ingredients, including glyphosate, reclassifying it as a probable carcinogenic agent (group 2A). Considering the widespread use of glyphosate as an agricultural herbicide in Brazilian crops, the recent classification of glyphosate in group 2A of the IARC, and the scarcity of published national and international scientific studies, perhaps due to the methodological difficulty in analyzing glyphosate in different matrices, the implementation and validation of methodologies for the detection of glyphosate and its main metabolite, AMPA, in different matrices such as water and biological matrices is extremely relevant. Thus, the present study aims to implement a quantitative analytical method for the determination of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and urine by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to the fluorescence detector. Four analytical methods were evaluated for the analysis of glyphosate and AMPA in water and urine by HPLC-FL. Calibration curves were constructed for glyphosate and AMPA in ultrapure water using the method of Bot et al (2002) where the results obtained show linearity (0.9998 for glyphosate and 0.9990 for AMPA), reproducibility, selectivity, precision and accuracy. For the urine matrix, there were no positive results in relation to the glyphosate and AMPA analyzes in any of the evaluated methods. In this way, it can be affirmed that the method was successfully implemented for water matrix, but was not implemented for the urine matrix, and new studies were necessary.

Keywords: Glyphosate. AMPA. Methodology. HPLC. Toxicology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação toxicológica (DL50) dos agrotóxicos.....	14
Figura 2 - Produção agrícola brasileira de 2002 a 2011, em milhões de hectares.	15
Figura 3 - Consumo de agrotóxicos no mundo de 1990 a 2016.....	16
Figura 4 - Estrutura química do glifosato.	17
Figura 5 - Derivatização do Glifosato e do AMPA utilizando Fmoc-Cl.	24
Figura 6 - Cromatógrafo utilizado nas análises.....	32
Figura 7 - Cromatograma do Branco para o glifosato em água ultrapura (A) e da solução de glifosato 500 µg/L em água ultrapura para o método 1.	38
Figura 8 - Cromatograma do branco para o AMPA em água ultrapura (A) e da solução de AMPA 600 µg/L em água ultrapura (B) para o método 1.	39
Figura 9 - Cromatograma da solução de glifosato 500 µg/L em água ultrapura (A) e da solução de glifosato 250 µg/L em água ultrapura (B) para o método 1.	40
Figura 10 - Cromatograma da solução de AMPA 600 µg/L em água ultrapura (A) e da solução de AMPA 300 µg/L em água ultrapura (B) para o método 1.....	40
Figura 11 - Curva de calibração do Glifosato em água ultrapura.	41
Figura 12 - Curva de calibração AMPA em água ultrapura.....	42
Figura 13 - Cromatograma do branco para o glifosato em urina (A) e da solução de glifosato 600 µg/L em urina (B) para o método 1.....	44
Figura 14 - Cromatograma do branco para o glifosato em urina (A) e da solução de glifosato 600 µg/L em urina (B) para o método 2.....	45
Figura 15 - Cromatograma da solução de glifosato 600 µg/L em urina (A) e da solução de glifosato 300 µg/L em urina (B) para o método 2.....	46
Figura 16 - Cromatograma do branco para o glifosato em urina (A) e da solução de glifosato 600 µg/L em urina (B) para o método 3.....	47
Figura 17 - Cartucho N+ eluído com Acetonitrila (esquerda) e cartucho N+ eluído com ácido acético 10% (direita)	48
Figura 18 - Cromatograma do branco em urina (A) e da solução de glifosato 600 µg/L em urina (B) usando cartucho HBL oásis para o método 4.....	49
Figura 19 - Cromatograma do branco em urina (A) e da solução de glifosato 600 µg/L em urina (B) usando cartucho C18 para o método 4.....	50
Figura 20 - Cromatograma do branco em urina (A) da solução de glifosato 600 µg/L em urina (B) usando cartucho NH2 para o método 4.....	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resumo das condições cromatográficas das metodologias testadas	34
Quadro 2 - Valores de precisão e exatidão para as concentrações de 18,25 µg/L, 75 µg/L e 600 µg/L	43
Quadro 3 - Valores de precisão e exatidão para as concentrações de 156,25 µg/L, 625 µg/L e 5000 µg/L	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Áreas das triplicatas das concentrações de glifosato.....	41
Tabela 2 - Áreas das triplicatas das concentrações de AMPA.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. O GLIFOSATO E SEU CONSUMO NO BRASIL E NO MUNDO.....	16
1.2. EFEITOS DO GLIFOSATO NO MEIO AMBIENTE.....	18
1.3. EFEITOS DO GLIFOSATO EM MAMÍFEROS	20
1.4. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DO GLIFOSATO.....	23
1.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	25
1.5.1. Seletividade.....	25
1.5.2. Linearidade	26
1.5.3. Seletividade.....	26
1.5.4. Linearidade	26
1.5.5. Precisão	27
1.5.6. Exatidão	27
1.2.5.7. Limite de detecção e limite de quantificação.....	27
1.6. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO	28
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. OBJETIVO GERAL.....	30
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. PADRÕES	31
3.2. REAGENTES E MATERIAIS.....	31
3.3. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	32
3.4. AMOSTRAGEM.....	32
3.5. SELEÇÃO DOS MÉTODOS.....	33
3.6. MÉTODOS.....	33
3.6.1. MÉTODO 1 – BOT <i>et al.</i> , 2002.....	33
3.6.2. MÉTODO 2 –ANADÓN <i>et al.</i> , 2009 combinada com BOT <i>et al.</i> , 2002.....	34
3.6.3. MÉTODO 3 - PEITER, 2017	34
3.6.4. MÉTODO 4 - MELO, K.G. – UNICAMP, 2018.....	35
3.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO/ QUANTIFICAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA ULTRAPURA	36
3.7.1. Seletividade e Linearidade	36
3.7.2. Precisão e Exatidão	37
3.7.3. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ):.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. MÉTODO 1: ANÁLISES EM ÁGUA ULTRAPURA	38

4.2. MÉTODO 1: ANÁLISES EM URINA	44
4.3. MÉTODO 2: ANÁLISES EM URINA	45
4.4. MÉTODO 3: ANÁLISES EM URINA	47
4.5. MÉTODO 4: ANÁLISES EM URINA	48
4.5.1. Análises em cartucho HLB	49
4.5.2. Análises em cartucho C18.....	50
4.5.3. Análises em cartucho N+	51
5. DISCUSSÃO.....	52
5.1. <i>MÉTODO 1: ANÁLISES EM ÁGUA ULTRAPURA</i>	52
5.2. <i>MÉTODO 1: ANÁLISES EM URINA</i>	53
5.3. <i>MÉTODO 2: ANÁLISES EM URINA</i>	53
5.4. <i>MÉTODO 3: ANÁLISES EM URINA</i>	54
5.5. <i>MÉTODO 4: ANÁLISES EM URINA</i>	55
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS	58

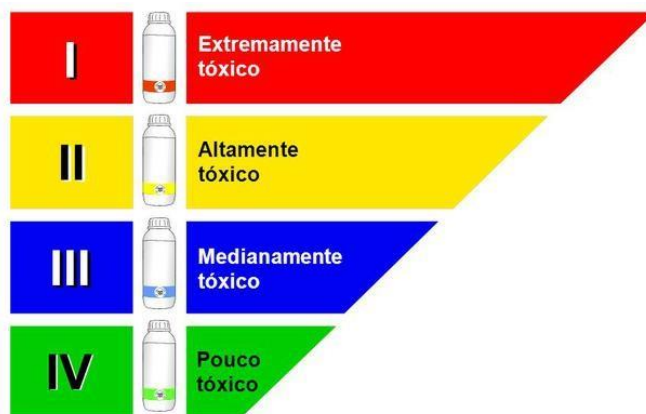
1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos constituem um grupo grande e heterogêneo de produtos químicos que são usados para controlar e repelir pragas em diferentes campos (MOSTAFALOU & ABDOLLAHI, 2016). Os princípios ativos que compõem os produtos comercializados podem ser orgânicos ou inorgânicos, sendo que, os orgânicos podem ser adicionalmente subdivididos em dois grupos: natural ou sintético (KIM; KABIR; JAHAN, 2017).

Os agrotóxicos podem ser classificados por vários critérios, como classes químicas, grupos funcionais, modo de ação e toxicidade (GARCIA *et al.*, 2012). Além disso, tais substâncias são às vezes classificadas pelo tipo de praga alvo para o qual são aplicados, como é caso dos fungicidas, herbicidas e inseticidas (KIM; KABIR; JAHAN, 2017).

Ademais, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os agrotóxicos são classificados quanto à sua toxicidade aguda baseados no valor da Dose Letal para 50% dos organismos (DL_{50}) em um ensaio de toxicidade (fase pré-clínica). Quanto menor a DL_{50} , maior será a toxicidade do composto. Assim, eles podem ser classificados em extremamente tóxico, altamente tóxico, moderadamente tóxico, ligeiramente tóxico, respectivamente (WHO, 2009) (Figura 1).

Figura 1 - Classificação toxicológica (DL_{50}) dos agrotóxicos.



Fonte: Adaptado de DIANA (2019)

Devido ao crescimento exponencial da população humana, que gera a necessidade de aumento da produção alimentícia, os agrotóxicos tornaram-se um componente importante dos sistemas agrícolas mundiais durante o último século, permitindo um notável aumento no rendimento das culturas e na produção de alimentos (ALEXANDRATOS & BRUINSMA, 2012; CARVALHO, 2017). Porém, é importante

ressaltar, que os valores sugerem que o aumento no uso de agrotóxicos se deve principalmente a *commodities* agrícolas geneticamente modificadas. Isto porque os dados indicam que, no período de 2002 a 2011, período onde se teve um aumento de 288% no consumo de agrotóxicos pela agricultura brasileira, alguns alimentos adotados no cotidiano de boa parte dos brasileiros, como arroz, feijão e mandioca, continuaram com a mesma área plantada, enquanto soja, milho e algodão tiveram aumentos de área plantada (Tabela 1). Além disso, de um total de 852,8 milhões de litros de agrotóxicos pulverizados nas lavouras em 2011, a soja utilizou 40% do volume total entre herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas e outros. Em seguida está o milho com 15%, a cana de açúcar e o algodão com 10% e as demais culturas consumiram os outros 25%. Dessa forma, mostra-se o crescente consumo de agrotóxicos e fertilizantes químicos pela agricultura brasileira, proporcional ao aumento das monoculturas, cada vez mais dependentes dos insumos químicos (ABRASCO, 2015).

Figura 2 - Produção agrícola brasileira de 2002 a 2011, em milhões de hectares.

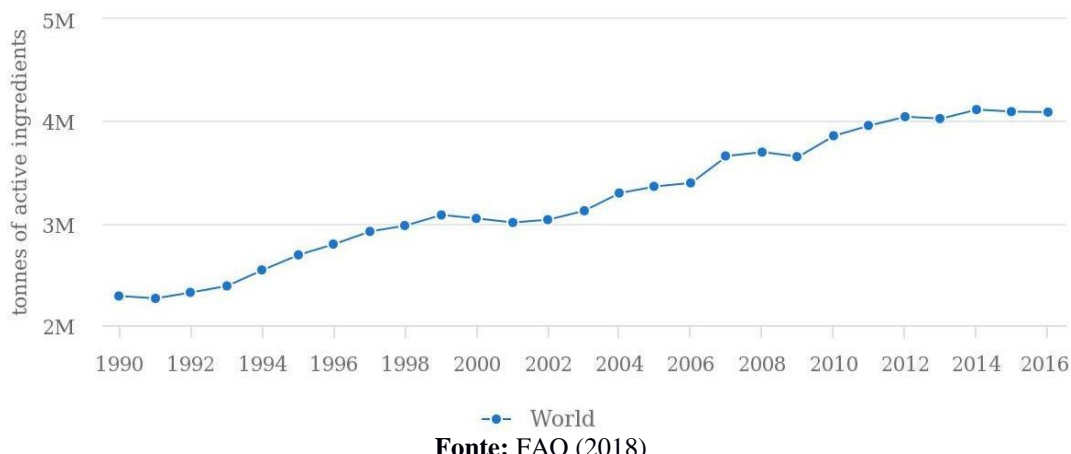
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Algodão	0,8	0,7	1,2	1,3	0,9	1,1	1,1	1,2	1,4	1,7
Arroz	3,2	3,2	3,8	4,0	3,0	2,9	2,9	2,8	2,9	2,8
Borracha	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
Café	2,4	2,4	2,4	2,3	2,3	2,3	2,3	2,2	2,1	2,2
Cana	5,2	5,4	5,6	5,8	6,4	7,1	8,2	9,5	10,0	11,0
Feijão	4,3	4,4	4,3	4,0	4,2	4,0	4,0	4,0	4,3	3,7
Mandioca	1,7	1,6	1,8	1,9	2,0	1,9	2,0	2,1	1,8	1,8
Milho	12,3	13,3	12,9	12,2	13	14	14,7	15,5	13,6	13,6
Soja	16,4	18,5	21,6	23,4	22,1	20,6	21,1	21,6	22,2	22,7
Sorgo	0,5	0,8	0,9	0,8	0,7	0,7	0,8	1,1	0,8	0,7
Trigo	2,2	2,6	2,8	2,4	1,8	1,9	2,4	2,6	2,4	2,2
Citrus	0,9	1	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Outros	4,5	4,5	4,7	5,1	5,1	4,9	4,8	4,8	6,4	7,8
Total	54,5	58,5	63,0	64,3	62,6	62,3	65,3	68,4	69,0	71,2

Fonte: ABRASCO (2015)

Segundo a FAO (2018), o uso de agrotóxicos no mundo cresceu de 2,2 milhões de toneladas em 1990 para mais de 4 milhões de toneladas em 2016 (Figura 2). Além disso, em 2014, do consumo mundial de agrotóxico, 47,5% era a participação de herbicidas, 29,5% era a participação de inseticidas, 17,5% era de fungicidas e as demais

categorias 5,5% (CENGIZ; BASANCELEBI; KITIS, 2017).

Figura 3 - Consumo de agrotóxicos no mundo de 1990 a 2016.

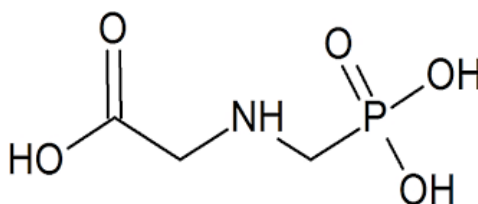


Esse expressivo aumento na quantidade de agrotóxicos utilizada tem gerado preocupações em relação às consequências que estão sendo sofridas não só pelo meio ambiente como também pela própria população. Existem evidências tanto epidemiológicas quanto experimentais sobre a ligação entre a exposição a pesticidas e a incidência de vários distúrbios de saúde em seres humanos, sendo eles: diversos tipos de câncer e alterações neurodegenerativas, reprodutivas, de desenvolvimento, respiratórias e metabólicas (MOSTAFALOU *et al.*, 2012). Além disso, a disseminação de agrotóxicos pelo meio ambiente também tem sido responsável por alterações da biota não humana (OMS, 2017).

1.1. O GLIFOSATO E SEU CONSUMO NO BRASIL E NO MUNDO

O herbicida glifosato [N-(fosfonometil) glicina] tem fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (Fig. 3) e massa molar de 169,1 g/mol. Em condições ambientais, tanto o glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos, muito solúveis em água (12 g/L a 25°C, para glifosato) e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol, entre outros. O glifosato funde a 200 °C, possui densidade aparente de 0,5 g/cm³ e se apresenta bastante estável em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60 °C (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002).

Figura 4 - Estrutura química do glifosato.



Fonte: Adaptado de FARIA (2015)

Mais conhecido por seu nome popular de Roundup®, o glifosato é um herbicida não seletivo com uma atividade de amplo espectro que foi introduzido para o controle de ervas daninhas em campos de produção agrícola em 1974 (BENBROOK, 2016). Esse produto atua interferindo na síntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, através da inibição da enzima 5 enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), impedindo, dessa forma, o crescimento de plantas, como ervas daninhas (BAI; OGBOURNE, 2016). O glifosato é aplicado em uma variedade de formas, incluindo um ácido e os sais de isopropilamina, de amônio, de diamônio, de dimetilamônio e de potássio podendo ser sólidos ou um líquido na cor âmbar (DILL *et al.*, 2010; NPIC, 2015)

Durante as primeiras duas décadas de uso do glifosato, o consumo do mesmo era bem limitado, pois só podia ser pulverizado onde os administradores de terras pretendiam matar toda a vegetação, devido ao dano fornecido para o cultivo, visto que, este herbicida causava danos não apenas a erva daninha como também a cultura em si (BENBROOK, 2016). Com o advento de culturas geneticamente modificadas para resistir ao glifosato como a soja (*Glycinemax*) e canola (*Brassicanapus*) em 1996, algodão (*Gossypiumhirsutum*) em 1997 e milho (*Zeamays*) em 1998 (MYERS *et al.*, 2016), a área total tratada com o glifosato aumentou rapidamente junto com taxas anuais de aplicação de glifosato por hectare.

O glifosato é usado extensivamente em culturas geneticamente modificadas tolerantes a herbicidas. Sítios agrícolas com o maior uso deste herbicida incluem soja, milho, algodão, pastagem e feno. Além disso, segundo Richmond (2018), culturas comerciais importantes também incluem canola, cana-de-açúcar e beterraba sacarina.

Em áreas não agrícolas, o glifosato é amplamente aplicado na silvicultura, controle de plantas daninhas industriais, gramado, jardim e ambientes aquáticos (CENGIZ; BASANCELEBI; KITIS, 2017). A tecnologia de sementes transgênicas permite a pulverização das culturas de transgênicos com o herbicida, que tem como alvo a erva

daninha, principalmente, mas não prejudica a cultura em si, já que as mesmas são resistentes ao herbicida.

Cultivos transgênicos têm crescido amplamente, em 2015, o cultivo global atingiu 147,9 milhões de hectares, um aumento de 200 vezes em relação a 1996 (BROOKES; TAHERIPOUR; TYNER, 2017). O uso agrícola global de glifosato aumentou após a adoção de culturas transgênicas em 1996. Visto que, o volume total aplicado pelos agricultores aumentou 14,6 vezes, de 51 milhões de quilos em 1995 para 747 milhões de quilos em 2014 (BENBROOK, 2016).

Os EUA, a Argentina e o Brasil são os maiores usuários de sementes resistentes ao glifosato (BENBROOK, 2016). Na última década, 6,1 bilhões de quilos de glifosato foram aplicados. Esse valor representa cerca de 70% do uso total mundial de glifosato de 1974 a 2014 (BENBROOK, 2016).

De acordo com os dados obtidos da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), em termos de quantidade de consumo de glifosato nos EUA, em 1993, o glifosato ficou em 11º lugar entre outros pesticidas. Em 1999 já ocupava o 2º lugar e a partir de 2001, o glifosato assumiu o primeiro lugar como ingrediente ativo comumente usado no setor agrícola dos EUA (EPA, 2017). Segundo o IBGE (2015), esse ingrediente ativo é o mais comercializado e usado na agricultura no Brasil, correspondendo a 40% do total de agrotóxicos empregados e a um volume de mais de 190.000 toneladas (ABRASCO, 2015).

1.2. EFEITOS DO GLIFOSATO NO MEIO AMBIENTE

Herbicidas contendo glifosato podem contaminar solos dentro e ao redor de áreas tratadas. O glifosato é altamente resistente à degradação devido à ligação C-P inerte em sua estrutura (CHEKAN; COGA; NAIR, 2016). No entanto, pode ser decomposto em material vegetal morto e solo por vários microrganismos gerando frequentemente como primeiro produto de decomposição o ácido aminometilfosfônico (AMPA), principal metabólito do glifosato (SINGH & SINGH, 2016; MAMY, BARRIUSO, GABRIELLE, 2016).

Porém, devido à capacidade de se adsorver a argila e matéria orgânica, este agrotóxico tem sua degradação pelos microrganismos do solo retardada, levando à acumulação no solo ao longo do tempo (CASSIGNEUL *et al.*, 2016; OKADA; COSTA; BEDMAR, 2016). Como resultado, o glifosato e seu produto de degradação AMPA podem persistir por mais de um ano em solos com alto teor de argila, mas podem rapidamente desaparecer dos solos arenosos (OKADA; COSTA; BEDMAR, 2016; SIDOLI; BARAN;

ANGULO-JARAMILLO, 2016). No entanto, parte do glifosato e seu metabolito AMPA acabam na fase dissolvida em águas subterrâneas após chuvas fortes (MAQUEDA *et al.*, 2017; OSTEN; DZUL-CAAMAL, 2017; VAN BRUGGEN *et al.*, 2018). A chuva e a erosão também transportar partículas do solo com o glifosato e o AMPA para as águas superficiais, onde podem permanecer na fase podem particulada ou serem dissolvidos (MAQUEDA *et al.*, 2017; OSTEN; DZUL- CAAMAL, 2017; WANG *et al.*, 2016b; VAN BRUGGEN *et al.*, 2018).

A detecção de resíduos de glifosato e AMPA em fontes de água tem recebido maior visibilidade. Em um levantamento geológico do “Departamento do Interior dos Estados Unidos”, 2135 amostras de águas subterrâneas e superficiais, 14 amostras de chuva e 193 amostras de solo foram investigadas de 2001 a 2006. De acordo com os resultados, o glifosato e o AMPA foram detectados em todas as amostras analisadas no estudo. As águas superficiais apresentaram concentrações maiores desses analitos do que águas subterrâneas, chegando à concentrações de 98 µg/L de glifosato e 89 µg/L de AMPA em amostra de água superficial no Kansas. Porém, a fonte avaliada com maior concentração de glifosato e AMPA foi o solo, chegando à concentrações de 476 µg/L de glifosato e 341 µg/L de AMPA em amostra de solo em Indiana (SCRIBNER *et al.*, 2007).

Um relatório realizado pelo “US Geological Survey”, que examinou amostras de água e solo de 38 estados coletadas de 2001 a 2010, constatou que o glifosato e o AMPA estão difundidos no ambiente, especialmente em sedimentos, solos, precipitação, valas, drenos, rios e córregos (BATTAGLIN *et al.* 2014). Em alguns casos, as concentrações relatadas são motivo de preocupação. Por exemplo, concentrações de glifosato acima de 400µg/L são potencialmente tóxicas para algumas espécies aquáticas. Tais efeitos tóxicos abrangem alterações morfológicas e alterações bioquímicas em peixes e aumento da mortalidade em anfíbios (ANNETTE *et al.*, 2014; ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014).

Os dados sobre os efeitos do glifosato nos organismos do solo são complexos e os resultados têm sido contraditórios (SOIL ASSOCIATION, 2016). Isso pode ser explicado pelas diferentes composições dos solos que não só determinam como glifosato e AMPA se fixam ao solo, mas como também determinam a composição da comunidade de microrganismos, o teor de água do solo e o padrão de uso de glifosato (RICHMOND, 2018).

Segundo estudo de García-Pérez e colaboradores (2014), em uma plantação de café submetida à aplicação repetida de glifosato por vinte e dois anos (de 1989 a 2010), a biomassa e densidade de minhoca do solo analisadas em fevereiro de 2011 foram significativamente menores do que aquelas plantações com aplicação anterior de glifosato

por quinze anos (de 1989 a 2003), porém sem aplicação deste herbicida nos últimos sete anos (de 2004 a 2010). No entanto, outros estudos não relatam nenhum efeito direto do glifosato sobre as minhocas (ZHOU *et al.* 2012; FUSILERO *et al.* 2013).

O glifosato é tóxico tanto para plantas monocotiledôneas quanto para plantas dicotiledôneas (VAN BRUGGEN *et al.*, 2018). Esse herbicida e seu produto de decomposição AMPA inibem as atividades das enzimas antioxidantes e induzem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam disfunção fisiológica e dano celular (GOMES *et al.*, 2016). Além disso, Glifosato e AMPA são capazes de diminuir a fotossíntese, mas através de mecanismos diferentes: o glifosato aumenta a degradação da clorofila, enquanto o AMPA perturba a sua biossíntese (GOMES *et al.*, 2016).

1.3. EFEITOS DO GLIFOSATO EM MAMÍFEROS

Relatos de efeitos tóxicos agudos resultantes de ingestão acidental ou intencional de glifosato podem ser encontrados na literatura. No entanto, as principais preocupações sobre os efeitos à saúde consideram desfechos adversos que podem surgir devido à presença cada vez maior do glifosato no ambiente em baixas concentrações (RICHMOND, 2018). Dessa forma, os estudos têm se concentrado em estudar os efeitos subcrônicos e crônicos da exposição ao glifosato.

O número de maneiras pelas quais os agentes contribuem para a carcinogênese pode ser agrupado em um número limitado de dez. Sabe-se que os carcinógenos humanos comumente apresentam uma ou mais das dez propriedades características. Tais características incluem: Ser eletrofílico ou poder se tornar metabolicamente ativado, ser genotóxico, alterar o reparo do DNA ou causar instabilidade genômica, induzir alterações epigenéticas, induzir estresse oxidativo, induzir inflamação crônica, ser imunossupressor, modular os efeitos mediados pelo receptor, causar imortalização e alterar a proliferação celular, a morte celular ou o suprimento de nutrientes (SMITH *et al.*, 2016). Baseado nessas características ficou concluído, pela monografia volume 112 da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), que existe forte evidência de duas características principais de carcinogenicidade para o glifosato (genotoxicidade e estresse oxidativo), fornecendo evidências para apoiar sua classificação como provável carcinogênico humano no Grupo 2^a (SMITH *et al.*, 2016).

Embora a toxicidade oral aguda do glifosato para os mamíferos seja baixa, com a DL₅₀ variando de 800 a 5000 mg kg⁻¹ de peso corporal para diferentes espécies de animais

(WHO, 2009), há um interesse crescente em potenciais efeitos crônicos do glifosato formulado e seus produtos de degradação à medida que se acumulam no ambiente (BAI *et al.*, 2016). Correlações foram encontradas entre o aumento do uso de glifosato e a variedade de doenças humanas, incluindo danos renais e doenças mentais como transtorno de ansiedade e hiperatividade (TDAH), autismo, Alzheimer e doença de Parkinson (FLUEGGE; FLUEGGE, 2016; FORTES *et al.*, 2016).

Por exemplo, ratos que foram expostos ao glifosato em taxas entre 5 e 490 mg kg⁻¹ a cada 48 h por 75 dias tiveram danos irreversíveis aos hepatócitos (BENEDETTI *et al.*, 2004). Alguns estudos mostram que mesmo uma exposição do glifosato em concentrações muito baixas é suficiente para alterar as funções celulares e causar citotoxicidade. Como é o caso de um estudo realizado por GASNIER e colaboradores (2009), onde glifosato e Roundup® 400 foram testados em linhagem celular MDA-MB453-kb2 em concentrações abaixo de 10 ppm, sendo observados como resultados a ruptura do sistema endócrino humano a 0,5 ppm, inibição da atividade transcricional dos receptores de estrogênio a 2 ppm e citotoxicidade a 10 ppm *in vitro*.

Em relação à toxicidade reprodutiva, os estudos são contraditórios. Alguns estudos sugerem que a exposição ao glifosato mesmo em níveis sem efeitos adversos observáveis (NOAEL) pode causar efeitos adversos na função reprodutiva da prole (ROMANO *et al.* 2012). Já em outro estudo, fêmeas de rato grávidas expostas ao Roundup® em doses entre 50 mg/kg (NOAEL recomendado por Lu (1995)) e 450 mg/kg por 21 dias não mostraram efeitos adversos, mas, curiosamente, os descendentes do sexo masculino tiveram danos em seus órgãos reprodutivos. A histologia dos testículos na puberdade mostrou a presença de distúrbios de crescimento e degeneração caracterizados por uma diminuição na espermatíde alongada e a presença de vacuolização para as doses de 150 e 450 mg/kg. Já a histologia do testículo na fase adulta mostrou a presença de intensa degeneração caracterizada pela ausência de luz tubular para todas as doses (DALLEGRAVE *et al.*, 2007).

Além disso, um estudo recente mostra que após 1 h de exposição de espermatozóides humanos a 0,36 mg/L de glifosato, observou-se diminuição significativa da motilidade progressiva espermática, embora uma avaliação de várias doses de glifosato seja necessária para desenvolver outras conclusões (ANIFANDIS *et al.*, 2018). Dessa forma, pesquisas adicionais são necessárias para melhorar a compreensão dos efeitos do glifosato na reprodução de mamíferos.

Quanto à genotoxicidade, estudos que usaram doses de glifosato e Roundup® entre 5

ppm e 20 ppm observaram danos no DNA de células humanas tanto no em ensaio cometa como no teste do micronúcleo (GASNIER *et al.* 2009; KOLLER *et al.* 2012). Em outro estudo de Kwiatkowska e colaboradores (2017), a exposição das células do sangue periférico ao glifosato em ensaio cometa resultou em danos no DNA de leucócitos em concentrações moderadas a altas (85 a 1690 mg/L) e diminuição da metilação do DNA em 42 mg/L de glifosato *in vitro*. Já em relação à citotoxicidade, sob condições experimentais com culturas celulares, o glifosato e o AMPA aumentaram as espécies reativas de oxigênio em culturas de eritrócitos humanos em concentrações moderadamente altas (42 mg/L) por 24 h (KWIATKOWSKA; HURAS; BUKOWSKA, 2014). Tanto o glifosato quanto o AMPA diminuíram a atividade da acetilcolinesterase nas culturas de eritrócitos (KWIATKOWSKA; NOWACKA-KRUKOWSKA; BUKOWSKA, 2014).

Com relação ao potencial carcinogênico do glifosato, a possibilidade de que a exposição em longo prazo a esse herbicida, isoladamente ou em formulações, possa levar ao desenvolvimento de câncer, tem sido investigada há algum tempo. (RICHMOND, 2018). Porém, os resultados de vários desses estudos apresentam-se discordantes. Em um estudo de Greim e colaboradores (2015) ficou concluído que não houve relação estatisticamente significativa entre a carcinogenicidade e a exposição de ratos ao glifosato através de água contaminada em concentrações dentro do NOAEL por dois anos. No entanto, esses autores reconheceram que mais pesquisas são necessárias antes que o potencial carcinogênico do glifosato possa ser completamente excluído.

Em contrapartida, um estudo de coorte prospectivo realizado por Andreotti e colaboradores (2017) no período de 1993 a 2013 acompanhou pessoas que buscavam licença para aplicar pesticidas de uso restrito na Carolina do Norte e em Iwoa entre 1993 e 1997. Foi avaliada a relação entre o uso do glifosato por aplicadores com a incidência de câncer por meio da vinculação aos registros de câncer no Instituto Nacional do Câncer até 2012 na Carolina do Norte e até 2013 em Iowa. O tempo de uso e a intensidade ponderada de uso de glifosato foram baseados em informações autorreferidas pelo questionário de matrícula (1993-1997) e questionários de acompanhamento (1999-2005), sendo os aplicadores classificados de acordo com esses parâmetros em quatro grupos (Q1, Q2, Q3 e Q4), onde o grupo de menor exposição foi classificado como Q1 e o de maior exposição Q4. Nesta avaliação, não foram observadas associações entre o uso de glifosato e o risco geral de câncer ou com cânceres linfo-hematopoiéticos totais, incluindo linfoma não-Hodgkin e mieloma múltiplo. No entanto, houve alguma evidência de um aumento do risco de leucemia mielóide aguda para aplicadores, particularmente na categoria mais alta de exposição ao

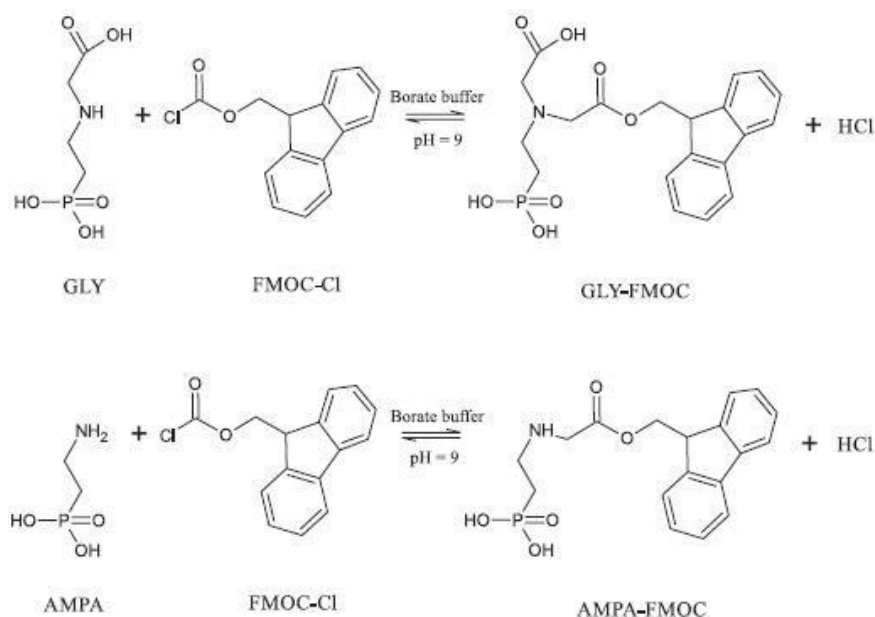
glifosato (Q4) em comparação com indivíduos que nunca fizeram uso de glifosato. Porém, outros estudos apresentam-se necessários, visto que, os resultados não foram estatisticamente significativos.

Durante a reavaliação toxicológica do glifosato em 2015, foram considerados pelo Grupo de Trabalho da IARC os seguintes parâmetros: As descobertas anteriores da EPA dos EUA, as publicações científicas mais recentes e os relatórios do governo disponíveis publicamente (BROOKES; TAHERIPOUR; TYNER, 2017). Após a reavaliação do glifosato realizada pela IARC/OMS e a sua classificação como provável carcinógeno para seres humanos (grupo 2A) além da crescente preocupação com outros possíveis efeitos adversos do glifosato sobre a saúde humana, alguns países da Europa (ex: França, Suíça, Alemanha) e o estado da Califórnia (EUA) resolveram banir o uso do glifosato das suas lavouras e de seus territórios baseado no potencial risco para a saúde humana e o meio ambiente (EPA, 2016). No Brasil, entretanto, a ANVISA finalizou, em março de 2019, a reavaliação do glifosato, que se iniciou em 2008, alegando que o mesmo não apresenta características mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas, não é desregulador endócrino e não é tóxico para a reprodução, representando uma contradição em relação ao cenário internacional (ANVISA, 2017).

1.4. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DO GLIFOSATO

Existe grande dificuldade metodológica em analisar o glifosato em diferentes matrizes, principalmente devido às suas propriedades físico-químicas como alta polaridade, baixo peso molecular e ausência de grupos cromóforos. Por isso, existe dificuldade em separá-lo e aplicar parâmetros cromatográficos adequados, a partir de técnicas como a cromatografia gasosa, cromatografia líquida e equipamentos com detecção por UV-visível (CATRINCK *et al.*, 2014). Assim, a derivatização com Cloroformiato de 9-fluorenilmetila (Figura 4) é uma técnica recomendada para alcançar sensibilidade e seletividade, já que, a derivatização é uma reação química utilizada para alterar a propriedade de uma substância, objetivando uma melhor separação cromatográfica dos analitos e permitindo sua detecção por fluorescência (SCHUMMER *et al.*, 2009).

Figura 5 - Derivatização do Glifosato e do AMPA utilizando Fmoc-Cl.



Fonte: Adaptado de CATRINCK (2014)

Além disso, existe grande dificuldade em analisar o glifosato em matrizes biológicas, visto que, antes das análises cromatográficas é necessária a aplicação de uma etapa preliminar com objetivo de remover do meio (sangue e urina) diversos compostos que são incompatíveis com o sistema analítico, como proteínas e carboidratos. Desta forma, técnicas de extração devem ser aplicadas no preparo da amostra, o qual pode incluir também etapas de *clean-up*, concentração do analito e derivatização. As técnicas de extração mais comumente utilizadas são extração líquido-líquido e a extração em fase sólida (SPE) que apresenta a vantagem de promover a concentração do analito e eliminação de interferentes ao mesmo tempo (EINIG; DEHNEN, 1995). A execução da técnica de SPE consiste em quatro etapas, sendo elas (i) o condicionamento do cartucho, (ii) a permeação da amostra, (iii) a limpeza do cartucho para eliminar os interferentes menos retidos que os analitos e (iv) a eluição dos compostos de interesse (CALDAS *et al.*, 2011)

Por estas limitações metodológicas, a avaliação desse herbicida em alimentos ainda não seja contemplada pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que visa analisar a presença de agrotóxicos nos alimentos consumidos no Brasil a fim de promover a sua qualidade e a segurança alimentar (ANVISA, 2014). Nesse contexto, portanto, verifica-se grande inconsistência entre a implementação de técnicas analíticas e a realidade brasileira, já

que o principal agrotóxico utilizado no país, o glifosato, não está presente nas análises do PARA.

1.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Para que exista confiabilidade nas análises realizadas por um método é necessário que o mesmo seja normalizado e cumpra requisitos que garantam resultados confiáveis (PASCHOAL *et al.*, 2008). Normas nacionais e internacionais de sistemas de gestão da qualidade evidenciam a importância da validação de métodos analíticos para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido, visto que, dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões equivocadas (BARROS, 2002). Dessa forma, com o objetivo de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos através de um método analítico são elaborados procedimentos de validação por meio de comparação, rastreabilidade e confiabilidade (PASCHOAL *et al.*, 2008).

No Brasil, a agência credenciadora é a ANVISA e a instituição que credita a competência dos laboratórios de ensaios é o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, que são a Resolução nº 899 de 29/05/2003 e o DOQ-CGCRE-008 de 04/07/2011 (INMETRO, 2011).

Os parâmetros analíticos de validação mais utilizados para avaliar métodos analíticos são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Mesmo que um método analítico já tenha sido objeto de um processo de validação, o analista deve validá-lo em seu laboratório através da análise destes critérios de desempenho analítico (RIBANI *et al.*, 2004).

1.5.1. Seletividade

A seletividade define a capacidade do método em detectar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz que possam interferir na sua determinação, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004). A seletividade pode ser avaliada comparando a matriz isenta da substância de interesse (denominada de branco) e a matriz adicionada com um padrão desta substância, onde, neste caso, nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção do analito de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

1.5.2. Linearidade

A linearidade de um método analítico refere-se à sua capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em estudo, enquadrados em faixa analítica especificada (BRITO *et al.*, 2003). A relação matemática entre o sinal e a concentração do analito de interesse é determinada a partir do conjunto de medições experimentais (RIBANI *et al.*, 2004). Essa relação pode ser expressa por uma equação de reta obtida a partir de uma curva analítica, utilizando o método matemático de regressão linear, representado pela equação $y = a + bx$. A correlação entre os valores numéricos de x e de y é frequentemente representada pelo coeficiente de determinação (R^2).

1.5.3. Seletividade

A seletividade define a capacidade do método em detectar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz que possam interferir na sua determinação, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004). A seletividade pode ser avaliada comparando a matriz isenta da substância de interesse (denominada de branco) e a matriz adicionada com um padrão desta substância, onde, neste caso, nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção do analito de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

1.5.4. Linearidade

A linearidade de um método analítico refere-se à sua capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em estudo, enquadrados em faixa analítica especificada (BRITO *et al.*, 2003). A relação matemática entre o sinal e a concentração do analito de interesse é determinada a partir do conjunto de medições experimentais (RIBANI *et al.*, 2004). Essa relação pode ser expressa por uma equação de reta obtida a partir de uma curva analítica, utilizando o método matemático de regressão linear, representado pela equação $y = a + bx$. A correlação entre os valores numéricos de x e de y é frequentemente representada pelo coeficiente de determinação (R^2).

1.5.5. Precisão

A precisão de medição representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (INMETRO, 2011). Ou seja, representa parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra. Este parâmetro é definido por meio da repetitividade e reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação determinados pela Equação 1. (INMETRO, 2011).

$$cv(\%) = \frac{S}{M} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

S = Estimativa do desvio-padrão absoluto;

M = Média aritmética do número de medições das determinações.

1.5.6. Exatidão

A exatidão expressa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro (INMETRO, 2011). Os procedimentos mais utilizados para validar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI *et al.*, 2004). A exatidão é expressa pelo erro padrão relativo (EPR) demonstrado na equação 2.

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Concentração nominal})}{\text{Concentração nominal}} \times 100 \quad (2)$$

1.2.5.7. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito em estudo que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas (BRITO *et al.*, 2003). O LD pode ser obtido a partir de parâmetros da curva analítica que é expressa pela Equação 3.

$$LD = \frac{PDax 3,3}{IC} \quad (3)$$

Onde:

PDa = Desvio padrão do coeficiente linear da equação;

IC = Coeficiente angular da curva analítica.

O Limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser quantificada, com precisão e exatidão aceitáveis, utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2011). Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando uma razão S/N de 10:1 (RIBANI *et al.*, 2004) como demonstrado na Equação 4.

$$LQ = \frac{PDax 10}{IC} \quad (4)$$

Onde:

PDa = Desvio padrão do coeficiente linear da equação;

IC = Coeficiente angular da curva analítica.

1.6. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e está entre os três maiores produtores. O principal agrotóxico consumido no Brasil é o glifosato, sendo este também o agrotóxico mais consumido no mundo. Mais conhecido como Roundup®, o glifosato é um herbicida não seletivo utilizado como ingrediente ativo de agrotóxicos para o controle principal de erva daninha em culturas transgênicas de soja e milho.

Ainda hoje pouco se conhece sobre a toxicidade deste ingrediente para espécies não alvo. Porém, sabe-se que os agrotóxicos utilizados na agricultura, em geral, podem causar efeitos tóxicos sobre os organismos vivos. Tais efeitos resultantes da exposição a esses agentes químicos podem ser caracterizados por infertilidade, abortos, malformações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, imunotoxicidade, genotoxicidade e câncer. A população em geral é exposta principalmente através da dieta.

Em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) reavaliou a classificação do glifosato quanto à carcinogenicidade, classificando-o como provável agente carcinogênico para seres humanos (grupo 2A). Essa reclassificação impulsionou o desenvolvimento de novas pesquisas acerca de seus efeitos tóxicos e de metodologias que possibilitem a identificação e quantificação do glifosato e seu metabólito AMPA em diferentes matrizes. Ainda que, exista grande dificuldade metodológica em analisar o glifosato, principalmente em matrizes biológicas, devido às propriedades físico-químicas do mesmo.

Neste contexto, pode-se dizer que o desenvolvimento do presente estudo é importante em termos de fornecimento de dados que permitam a implementação das análises do glifosato no Brasil, com a definição de uma legislação, que imponha restrições ou estabeleça níveis permissíveis desse composto, sobretudo em países como o Brasil, em que esses compostos são livremente comercializados, sem que, no entanto, haja dados disponíveis sobre contaminação humana, principalmente dos trabalhadores rurais, ou ambiental.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Implementar método analítico para a determinação do glifosato e ácido aminometilfosfônico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplado à detector de fluorescência.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a seletividade dos métodos em detectar glifosato e AMPA por HPLC com detector de fluorescência em água ultrapura;
- Analisar os parâmetros de validação analítica - precisão, exatidão, seletividade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação da metodologia para água ultrapura;
- Selecionar metodologias e avaliar o desempenho das mesmas para detectar glifosato e AMPA por HPLC com detector de fluorescência em amostras de urina „fortificadas“ com o padrão de glifosato e AMPA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PADRÕES

Foram utilizadas soluções aquosas dos padrões de glifosato Sigma® e ácido aminometilfosfônico Sigma® na concentração de 10 mg/L.

3.2. REAGENTES E MATERIAIS

- Glifosato, Sigma Aldrich, lote BCBT6735
- Ácido Aminometilfosfônico, Sigma Aldrich, lote BCBW6516
- Cloroformiato de 9-fluorenilmetila 99,0%, Sigma Aldrich, lote BCBR8922V
- Tetraborato de sódio decahidratado, Auro's Química, lote AQ18A177
- Fosfato de sódio Dibásico Heptahidratado P.A., Sigma Aldrich, lote DCBD4160V
- Fosfato de Potássio Monobásico P.A.
- Metanol grau HPLC, LiChrosolv® Merck, lote I844107631
- Acetonitrila grau HPLC, J.T.Baker® Avantor, lote X51C53
- Água ultrapura, Invitrogen™
- Ácido acético Grau HPLC, ProQuimios®, lote 80189
- Éter etílico P.A; LS Chemicals, lote: EZ0071
- Tubo de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 15 mL
- Tubo de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 mL
- Espátulas metálicas
- Proveta de 50 mL, 100 mL e 500 mL
- Microtubo eppendorf graduado 2 ml
- Tubo de ensaio
- Micropipeta Monocanal Volume 0,5 a 5 mL LABMATE PRO
- Micropipeta Monocanal Volume 100 a 1000 uL LABMATE PRO
- Cartuchos SPE Waters OASIS, HLB Catridge 1g, 60 µm Particle Size, lote 07A30056A
- Cartuchos SPE Applied Separations Octadecyl C18/ 18%, 500mg/3mL, lote 31306
- Cartuchos SPE Applied Separations Quaternary Amino N+, 500mg/3mL, lote 3092

3.3.EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Cromatógrafo modelo SPD-20AV Shimadzu® acoplado à detector de fluorescência RF-20A XS, como observado na FIGURA 6.
- Coluna cromatográfica Luna 5 um NH2 100A (250x4,6 mm) Allcrom
- Coluna cromatográfica ODS C18 (150 mm x 4,6 mm) REGIS®.
- Manifold à vácuo SPE para 24 colunas Chromabond®
- Balança analítica com precisão de 0,1 mg, Shimadzu, Modelo AUY 220
- Filtros em membrana 0,22 um Millipore™ Merck
- Sistema de Filtração, RONI ALZI
- Bomba de Vácuo 7CFM, SURYHA
- Agitador de tubos tipo Vortex, GEHAKA, modelo AV-2 82328
- Centrífuga, CELM, modelo LS 4 Plus
- Lavadora ultrasônica, Ultronique, modelo Q3.0/40

Figura 6 - Cromatógrafo utilizado nas análises.



Fonte: Autor

3.4. AMOSTRAGEM

As amostras destinadas à avaliação dos métodos analíticos foram preparadas a partir de água ultrapura e pool de urina de indivíduos não expostos a agrotóxicos. Alíquotas das amostras de água ultrapura e urina coletadas, homogeneizadas e filtradas foram fortificadas/enriquecidas com a solução padrão de glifosato e AMPA, em quantidade suficiente para atingir diferentes concentrações. Alíquotas de água ultrapura e do pool de urina não adicionado de padrão foram utilizadas como “branco”, objetivando realizar a comparação entre o cromatograma da amostra sem padrão e da amostra com padrão a fim de identificar

os picos correspondentes ao glifosato e AMPA.

3.5. SELEÇÃO DOS MÉTODOS

A seleção dos métodos foi realizada através de pesquisa na base de dados Pubmed e LILACS utilizando os termos “HPLC” AND “Fluorescence” AND “glyphosate” e “HPLC” AND “Fluorescence” AND “glyphosate” AND “urine”. Além dos artigos, foram incluídas as dissertações e teses encontradas, onde foram utilizados os mesmos descritores. O critério de seleção das metodologias a serem estudadas foi utilizar colunas cromatográficas, derivatizante (FMOCCI), cartuchos de EFS que dispunham no laboratório e métodos que utilizavam HPLC com detector UV ou fluorescência.

3.6. MÉTODOS

O Quadro 1 apresenta um resumo das condições cromatográficas utilizadas no estudo, onde são mostrados os seguintes parâmetros: volume de injeção, coluna cromatográfica, temperatura da coluna, fase móvel, fluxo, sistema de eluição, comprimento de onda, esquema de derivatização nas duas matrizes: água ultrapura e urina.

3.6.1. MÉTODO 1 – BOT *et al.*, 2002

A coluna cromatográfica utilizada foi a Luna 5 µm NH₂ 100A (250 x 4,6 mm) Allcrom®. A fase móvel foi composta por uma mistura de Tampão KH₂PO₄ (0,1M) pH 5,8 e acetonitrila na proporção de 55:45, em fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do termostato da coluna foi mantida a 35 °C e a detecção foi realizada por fluorescência em λ_{em}: 260 nm / λ_{ex}: 310 nm. O tempo de corrida foi de 15 min.

Para a análise no HPLC, foi realizada a derivatização de 3 mL de pool de urina previamente filtrado e água ultrapura com adição de padrão e sem adição de padrão (branco). Adicionou-se a essa urina 500 µL de solução tampão tetraborato de sódio decahidratado (0,05M) pH 9 e 500 µL de derivatizante FMOCCI (1g/L). A derivatização ocorreu sob agitação periódica no vórtex por cerca de 1h. Após o processo de derivatização o excesso de derivatizante foi removido adicionando-se 2 mL de éter dietílico. A mistura foi submetida à agitação no vórtex por cerca de 1 min e posteriormente deixada em repouso para que ocorresse a separação das fases. Apenas a fase aquosa foi injetada no HPLC e o volume injetado foi de 20 µL. Este método foi originalmente desenvolvido para análise de glifosato e AMPA em água ultrapura, porém, neste estudo, tal método foi avaliado para a análise destes mesmos

analitos tanto para água ultrapura como para urina, onde as condições cromatográficas e técnica de derivatização do método foram as mesmas.

3.6.2. MÉTODO 2 –ANADÓN *et al.*, 2009 combinada com BOT *et al.*, 2002

A coluna cromatográfica utilizada foi a Luna 5 μm NH_2 100A (250 x 4,6 mm) Allcrom®. A fase móvel foi composta por uma mistura de Tampão KH_2PO_4 (0,1M) pH 5,8 e acetonitrila na proporção de 55:45, em fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do termostato da coluna foi mantida a 35 °C e a detecção foi realizada por fluorescência em λ_{em} : 260 nm / λ_{ex} : 310 nm. O tempo de corrida foi de 17 min.

No preparo da amostra, 3 mL do pool de urina previamente filtrado com adição de padrão e sem adição de padrão (branco) foi adicionado a 3 mL de acetonitrila e levado à centrífuga por 30 min a 3000 rpm. Após a centrifugação, foi retirado 3 mL do sobrenadante para realizar a derivatização.

Para o procedimento de derivatização, adicionou-se a esse sobrenadante 500 μL de solução tampão tetraborato de sódio decahidratado (0,05M) pH 9 e 500 μL de derivatizante FMOCCl (1g/L). A derivatização ocorreu sob agitação periódica no vórtex por cerca de 1h. Após o processo de derivatização o excesso de FMOCCl foi removido adicionando-se 2 mL de éter dietílico. A mistura foi submetida a agitação no vórtex por cerca de 1 min e posteriormente deixada em repouso para que ocorresse a separação das fases. Apenas a fase aquosa foi injetada no HPLC (20 μL). Este método de limpeza da matriz foi originalmente desenvolvido para análise de glifosato e AMPA em sangue, porém, neste estudo, tal método foi avaliado para a análise destes mesmos analitos em urina.

3.6.3. MÉTODO 3 - PEITER, 2017

A coluna cromatográfica utilizada foi a ODS C18 (150 x 4,6 mm) REGIS®. A fase móvel foi composta por uma mistura de Tampão KH_2PO_4 (0,05M) pH 5,44 e acetonitrila na proporção de 70:30, em fluxo de 0,8mL/min. A temperatura do termostato da coluna foi mantida a 30°C e a detecção foi realizada por fluorescência em λ_{em} : 270nm / λ_{ex} : 315nm. O tempo de corrida foi de 10 min.

O pool de urina previamente filtrado com adição de padrão (concentrações de 600 e 300 $\mu\text{g/L}$) e sem adição de padrão (branco) passou por um processo de extração de fase sólida realizado com cartucho Oasis HLB em um equipamento manifold à vácuo. O cartucho

foi previamente condicionado com 3 mL de metanol e 3 mL de água ultrapura. Após o condicionamento do cartucho, 5 mL de urina foram passados pelo mesmo. Posteriormente, o cartucho foi lavado com 3 mL de água ultrapura e a amostra foi eluída com 5 mL de HCL 0,5 mol/L.

Para o procedimento de derivatização, adicionou-se a 1 mL da amostra eluída, 0,25 mL de Tampão tetraborato de sódio decahidratado 5% e 1 mL de FMOCCl (0,02 mol/L). A derivatização ocorreu por cerca de 20 min e o volume injetado foi de 20 µL. Este método foi originalmente desenvolvido para análise de glifosato e AMPA em água, porém, neste estudo, tal método foi avaliado para estes mesmos analitos em urina.

3.6.4. MÉTODO 4 - MELO, K.G. – UNICAMP, 2018

A coluna cromatográfica utilizada foi a ODS C18 (150 x 4,6 mm) REGIS®. A fase móvel foi composta por uma mistura de Tampão Fosfato pH 5,5 e acetonitrila na proporção de 75:25. A composição do tampão fosfato foi: KH_2PO_4 (13,6g/L) com Na_2HPO_4 (35,8 g/L) na proporção 482 mL de KH_2PO_4 para 18mL de Na_2HPO_4 . O fluxo foi de 1,0 mL/min, a temperatura do termostato da coluna foi mantida a 24°C e a detecção foi realizada por fluorescência em λ_{ex} : 263nm / λ_{em} : 317nm. O tempo de corrida foi de 10 min.

Foi aliquotado 4 ml do pool de urina previamente filtrado com adição de padrão e sem adição de padrão (branco). A essa alíquota foi adicionado 1 mL de metanol e essa mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min.

Após a centrifugação a amostra passou por um processo de extração em fase sólida utilizando os cartuchos HLB (utilizado no método original) C18 e N+. Em seguida, 2 mL da amostra foram passados pelos cartuchos após prévio condicionamento dos mesmos com 2 mL de metanol acidificado com ácido acético 10% (50 mL de metanol + 1 mL de ácido acético 10%).

A eluição da amostra foi realizada com diferentes soluções eluentes. Inicialmente, 3 mL das soluções eluentes foram passados pelo cartucho para cada 1 mL de urina. As soluções eluentes testadas foram acetonitrila e ácido acético 10%. Após a eluição, 2 mL da amostra foram derivatizados com 1 mL de tetraborato de sódio pH 9,0 (0,05 mol/L) e 1 mL de FMOCCl (1g/L). A derivatização ocorreu por 15 minutos no ultrassom. O volume injetado foi de 20 µL. Este método foi avaliado apenas para a matriz urina.

Quadro 1 - Resumo das condições cromatográficas das metodologias testadas

	Volume de injeção	Coluna cromatográfica	Temperatura da coluna	Fase móvel	Fluxo da fase móvel	Sistema de eluição	Comprimento de onda	Derivatização	Matriz Testada
Método 1	20 uL	Luna 5 µm NH ₂ 100 Å (250x4,6 mm)	35 °C	Tampão KH ₂ PO ₄ (0,1M) pH 5,8– Acetonitrila (55:45)	1,0 mL/min	Isocrático	λ _{em} : 260nm / λ _{ex} : 310nm	500 µL de tampão tetraborato de sódio (0,05M) pH 9 e 500 µL de derivatizante FMOCCI (1g/L) Tempo: 1h	Água e urina
Método 2	20 uL	Luna 5 µm NH ₂ 100 Å (250x4,6 mm)	35 °C	Tampão KH ₂ PO ₄ (0,1M) pH 5,8– Acetonitrila (55:45)	1,0 mL/min	Isocrático	λ _{em} : 260nm / λ _{ex} : 310nm	100 µL de tampão tetraborato de sódio (0,05M) pH 9 e 100 µL de FMOCCI (1g/L) Tempo: 1h	Urina

Método 3	20 uL	ODS C18 (150x4,6 mm)	35 °C	Tampão KH ₂ PO ₄ (0,05M) pH 5,44– Acetonitrila (70:30)	0,8 mL/min	Isocrático	λem: 270nm / λex: 315nm	0,25 mL de tampão tetraborato de sódio 5% e 1 mL de FMOCCI (0,02 mol/L). Tempo: 20 min	Urina
Método 4	20 uL	ODS C18 (150x4,6mm) e Luna 5 μm NH ₂ 100 Å (250x4,6 mm)	24 °C	Tampão Fosfato (Na ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄) pH 5,5 – Acetonitrila (75:25)	1,0 mL/min	Isocrático	λem: 263nm / λex: 317nm	1 mL de tampão tetraborato de sódio ph 9,0 (0,05 mol/L) e 1 mL de FMOCCI (1 g/L) Tempo: 15 min	Urina

Fonte: Autor

3.7.VALIDAÇÃO DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO/ QUANTIFICAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA ULTRAPURA

A validação de todas as metodologias analíticas seguiu os critérios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária determinados pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017).

3.7.1. Seletividade e Linearidade

A seletividade foi determinada comparando os cromatogramas de uma amostra de branco composta por água ultrapura isenta de contaminação por glifosato e outra amostra acrescida de glifosato na concentração de 500 µg/L. Já para o AMPA essa concentração foi de 600 µg/L.

Para a avaliação da linearidade e confecção das curvas de calibração, as amostras foram submetidas à análises em triplicata nas concentrações de 18,75 µg/L; 37,5 µg/L; 75 µg/L; 150 µg/L; 300 µg/L e 600 µg/L para o glifosato e 156,25 µg/L; 312,5 µg/L; 625 µg/L; 1250 µg/L; 2500 µg/L; 5000 µg/L para o AMPA. As etapas do método utilizado estão descritas a seguir:

1. Inicialmente foi preparada uma solução mãe de 10 mg/L pensando-se 0,1 mg ± 0,5 mg de glifosato em um tubo de centrífuga de 15mL. Para o AMPA a preparação da solução mãe foi a mesma;
2. Posteriormente, para o glifosato, foram pipetados 360 uL da solução mãe e avolumados para 6 mL com água ultrapura em um tubo de centrífuga para preparar a solução de 600 µg/L; Já para o AMPA, foram pipetados 3mL da solução mãe e avolumados para 6 mL com água ultrapura em um tubo de centrífuga para preparar a solução de 5000 µg/L;
3. As demais soluções, tanto para o glifosato como para o AMPA, foram preparadas através de diluições seriadas das soluções de 600 µg/L e 5000 µg/L respectivamente.
4. Derivatizou-se 3 mL das soluções preparadas com 500 uL de Fmoc-Cl 1g/L e 500 uL de tampão borato pH 9,0 0,05 mol/L;

3.7.2. Precisão e Exatidão

Os cálculos de precisão e exatidão foram realizados para três concentrações (baixa, média e alta) de glifosato e AMPA em triplicada. Para o glifosato as concentrações utilizadas foram: 18,25 µg/L, 75 µg/L e 600 µg/L. Já para o AMPA, as concentrações utilizadas foram: 156,25 µg/L, 625 µg/L e 5000 µg/L. Os valores de precisão foram obtidos através da Equação 1, descrita anteriormente, já os valores de exatidão foram obtidos através da Equação 2, apresentada anteriormente.

3.7.3. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ):

O limite de detecção tanto do glifosato como do AMPA foi obtido através da Equação 3 e o limite de quantificação para esses mesmos analitos foi obtido por meio da Equação 4, já apresentadas anteriormente.

4. RESULTADOS

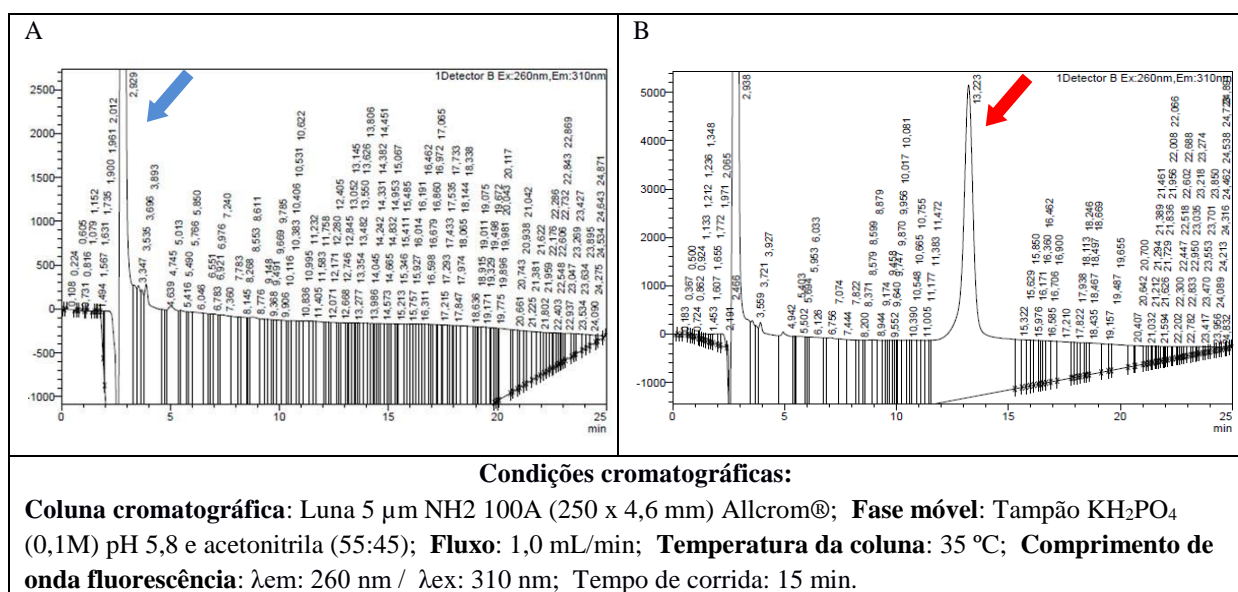
A seguir serão apresentados os resultados obtidos, tanto para água ultrapura, quanto para urina. Os resultados serão apresentados a partir dos métodos estudados para cada matriz.

4.1. MÉTODO 1: ANÁLISES EM ÁGUA ULTRAPURA

Inicialmente foram testados glifosato e AMPA na concentração de 500 µg/L e 600 µg/L, respectivamente, e o Branco, composto por água ultrapura isenta de glifosato e AMPA, adicionada de derivatizante FMOC-Cl e tampão tetraborato de sódio. Esta análise primária ocorreu para que fosse possível avaliar a capacidade do método em detectar os analitos de interesse sem interferência (seletividade). Glifosato e AMPA foram avaliados separadamente a fim de minimizar interferência entre os mesmos.

Na Figura 7A observou-se a presença de um único pico no início do cromatograma (2,9 min) que representa o excesso de derivatizante (seta azul). Já na Figura 7B, observou-se a presença de um pico inicial representando o excesso de derivatizante (2,9 min) e um segundo pico em 13,2 min que representa teoricamente o pico do glifosato (seta vermelha).

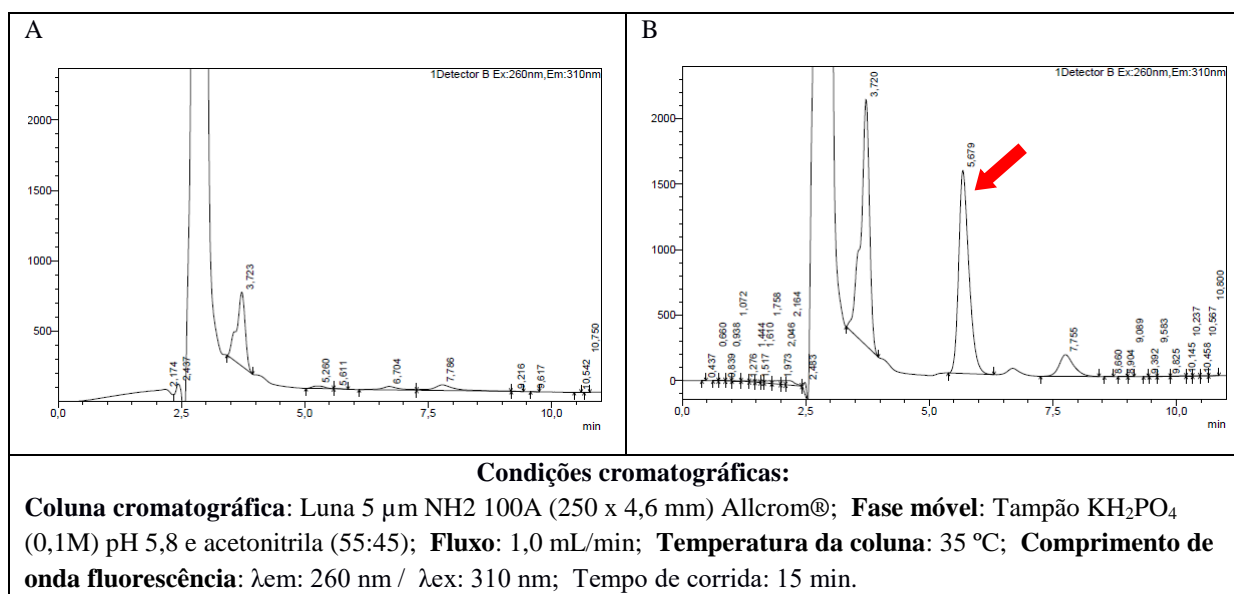
Figura 7 - Cromatograma do Branco para o glifosato em água ultrapura (A) e da solução de glifosato 500 µg/L em água ultrapura para o método 1.



Fonte: Autor

Na Figura 8A observou-se a presença de três picos no cromatograma (2,4 min; 3,7 min e 7,7 min) que representam os produtos da reação de derivatização. Já na Figura 8B, observou-se a presença dos três picos representando os produtos da reação de derivatização (2,4 min; 3,7 min e 7,7 min) e um quarto pico em 5,6 min que correspondente ao pico do AMPA (seta vermelha).

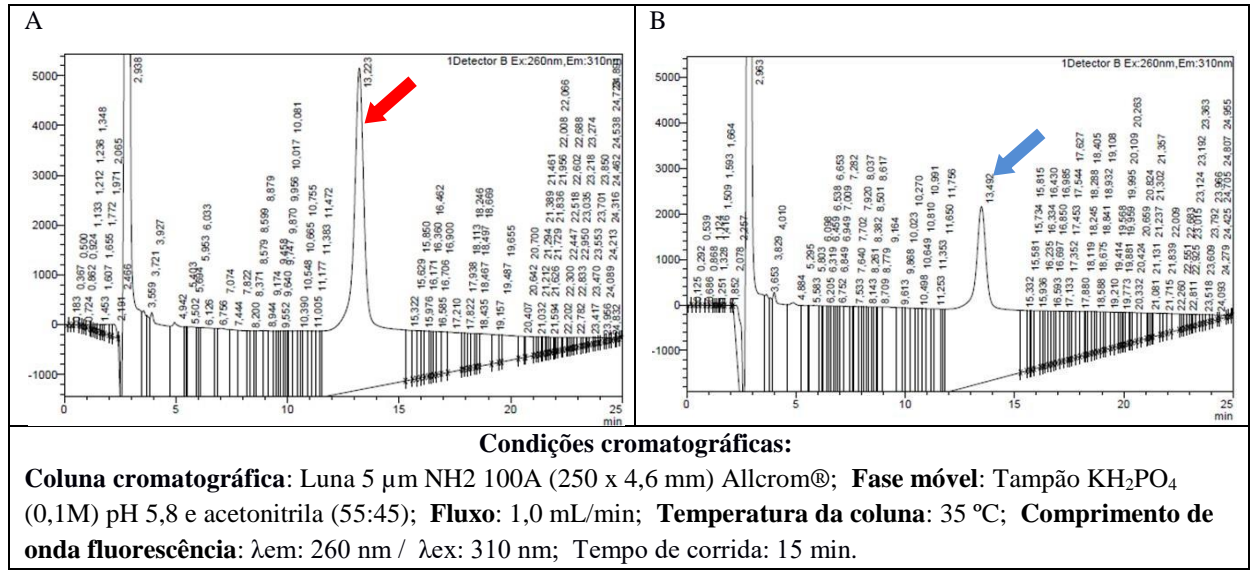
Figura 8 - Cromatograma do branco para o AMPA em água ultrapura (A) e da solução de AMPA 600 µg/L em água ultrapura (B) para o método 1.



Posteriormente, foi avaliada a capacidade do método de gerar resultados de área diretamente proporcionais à concentração dos analitos, possibilitando assim, a confirmação dos picos encontrados para o glifosato e o AMPA. Para isso, foram analisadas soluções de glifosato de 500 µg/L e 250 µg/L, enquanto para o AMPA foram analisadas soluções de 600 µg/L e 300 µg/L.

Na Figura 9A observou-se o pico do glifosato em 13,2 min (seta vermelha), cuja área encontrada foi 426585386 mV. Já na Figura 9B, observou-se o pico do glifosato em 13,4 min (seta azul) cuja área encontrada foi 204079038 mV. Dessa forma, percebe-se que a área correspondente ao pico de 500 µg/L de glifosato foi 2,09 vezes maior que a área correspondente ao pico de 250 µg/L de glifosato, demonstrando a proporcionalidade dos resultados de área em relação à concentração do glifosato e confirmando o pico encontrado para este analito.

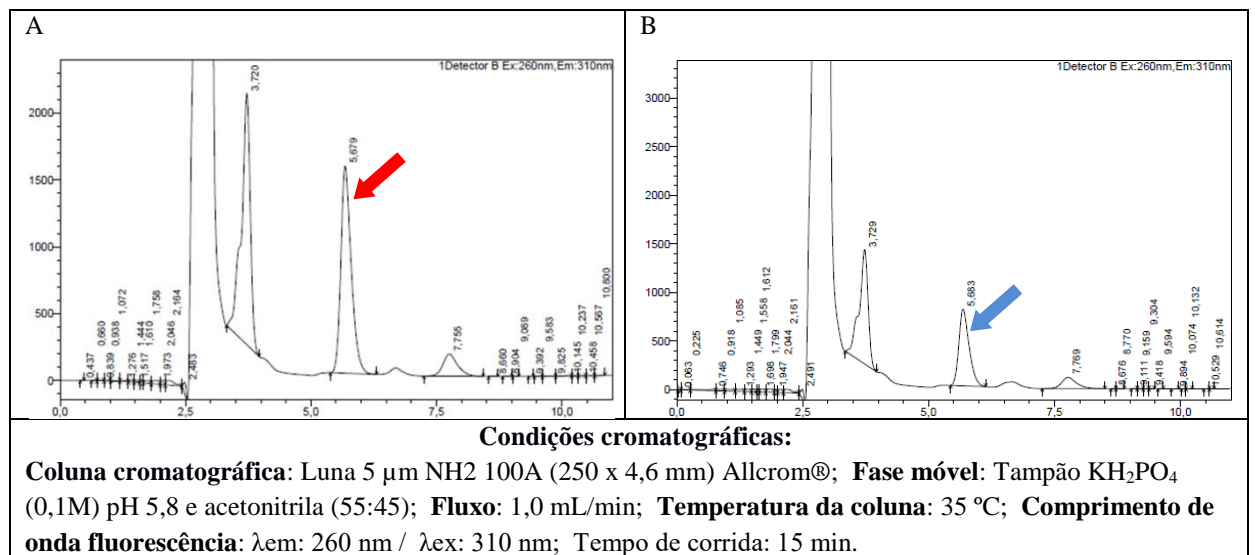
Figura 9 - Cromatograma da solução de glifosato 500 µg/L em água ultrapura (A) e da solução de glifosato 250 µg/L em água ultrapura (B) para o método 1.



Fonte: Autor

Na Figura 10A observou-se o pico do AMPA em 5,6 min (seta vermelha), cuja área encontrada foi 22280079 mV. Já na Figura 10B, observou-se o pico do AMPA em 5,6 min (seta azul) cuja área encontrada foi 11095927 mV. Dessa forma, percebe-se que a área correspondente ao pico de 600 µg/L de AMPA foi 2,01 vezes maior que a área correspondente ao pico de 300 µg/L de AMPA, demonstrando a proporcionalidade dos resultados de área em relação à concentração do AMPA e confirmando o pico encontrado para este analito.

Figura 10 - Cromatograma da solução de AMPA 600 µg/L em água ultrapura (A) e da solução de AMPA 300 µg/L em água ultrapura (B) para o método 1.



Fonte: Autor

Por fim, foram construídas curvas de calibração para o glifosato e AMPA, compostas por 6 pontos em triplicata (Tabela 1 e Tabela 2) segundo os critérios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária determinados pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017, para avaliar a linearidade do método. Para o glifosato os pontos utilizados foram: 18,75 µg/L; 37,5 µg/L; 75 µg/L; 150 µg/L; 300 µg/L e 600 µg/L. Já para o AMPA os pontos utilizados foram: 156,25 µg/L; 312,5 µg/L; 625 µg/L; 1250 µg/L; 2500 µg/L; 5000 µg/L.

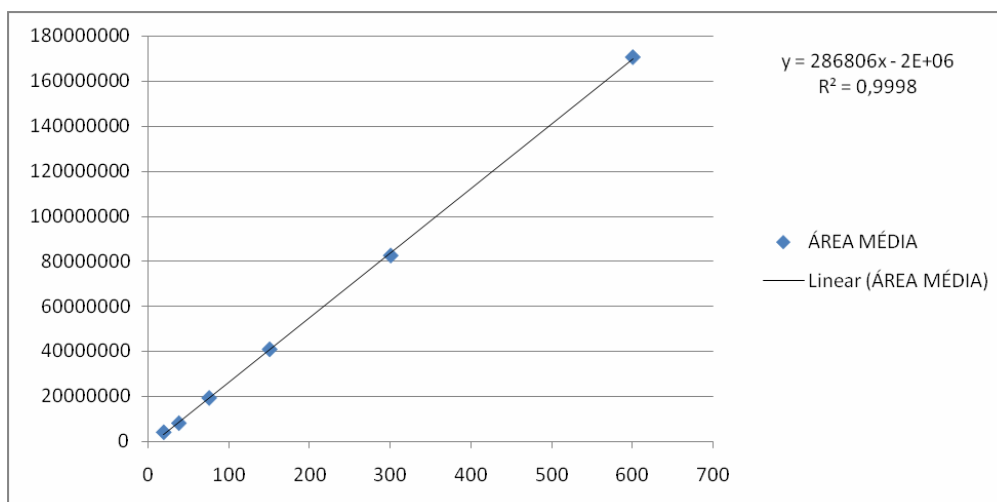
Tabela 1 - Áreas das triplicatas das concentrações de glifosato em água ultrapura.

Concentração (µg/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área Média
18,75	3592186	4724491	4023371	4113349
37,5	7835849	8421513	8220521	8159294
75	18524896	20738440	18713622	19325653
150	40173671	42221589	40311437	40902232
300	80183494	85697498	81636417	82505803
600	184527735	161690189	165270726	170496217

Fonte: Autor

A curva de calibração do glifosato (Figura 11) foi realizada a partir da média das áreas encontradas nas concentrações em triplicata. A equação da reta encontrada foi $y = 286806x - 2E+06$ e seu coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9998.

Figura 11 - Curva de calibração do Glifosato em água ultrapura.



Fonte: Autor

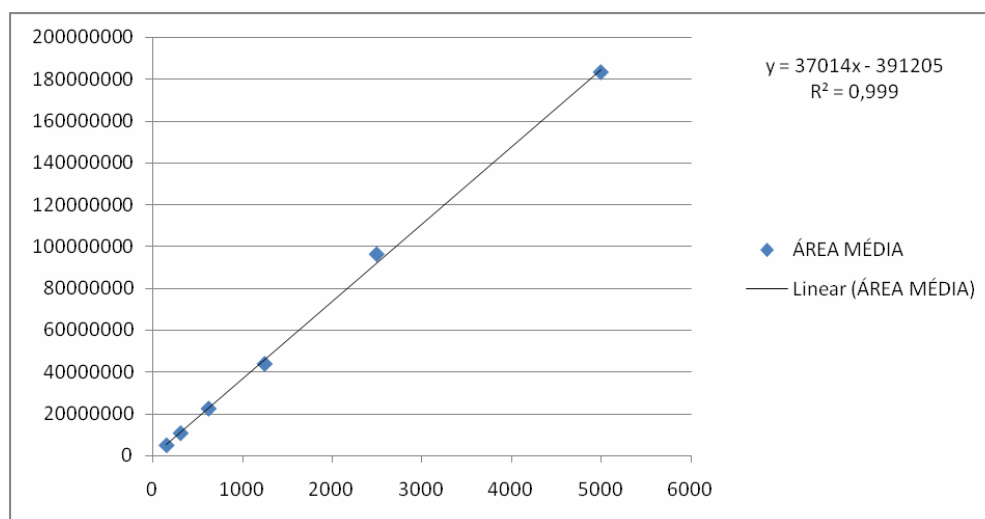
Tabela 2 - Áreas das triplicatas das concentrações de AMPA em água ultrapura.

Concentração (µg/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área Média
156,25	5388622	4958228	5028954	5125268
312,5	11191468	10645835	10867582	10901628
625	23167326	20973412	23692578	22611105
1250	46261517	42662874	42936173	43953521
2500	97020194	93571491	98276347	96289344
5000	180036834	185764474	183585465	183128924

Fonte: Autor

A curva de calibração do AMPA (Figura 12) foi realizada com a média das áreas encontradas nas concentrações em triplicata. A equação da reta encontrada foi e seu coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,999.

Figura 12 - Curva de calibração AMPA em água ultrapura.



Fonte: Autor

Além das análises de seletividade e linearidade, para que o método fosse validado segundo a RDC N° 166, foram realizados cálculos para determinar os parâmetros de precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

- Precisão e exatidão para o glifosato

Os valores de precisão ou „desvio padrão relativo“ encontrados para o glifosato foram (Quadro 2): 13,89 % para a concentração de 18,25 µg/L, 6,35% para a concentração de 75 µg/L e 7,2% para a concentração de 600 µg/L. Já os valores de exatidão encontrados para esse mesmo analito foram (Quadro 2): 76,49 % para a concentração de 18,25 µg/L, 89,84% para a concentração de 75 µg/L e 99,08% para a concentração de 600 µg/L.

Quadro 2 - Valores de precisão e exatidão para as concentrações de 18,25 µg/L, 75 µg/L e 600 µg/L

Concentração (µg/L)	PRECISÃO (DPR%)	EXATIDÃO (%)
18,75	13,89	76,49
75	6,35	89,84
600	7,2	99,08

Fonte: Autor

- Precisão e exatidão para o AMPA

Os valores de precisão ou ‘desvio padrão relativo’ encontrados para o AMPA (Quadro3) foram: 4,18 % para a concentração de 156,25 µg/L, 6,27% para a concentração de 625 µg/L e 1,58% para a concentração de 5000 µg/L. Já os valores de exatidão encontrados para esse mesmo analito (Quadro 3) foram: 95,38 % para a concentração de 156,25 µg/L, 99,43% para a concentração de 625 µg/L e 99,16% para a concentração de 5000 µg/L.

Quadro 3 - Valores de precisão e exatidão para as concentrações de 156,25 µg/L, 625 µg/L e 5000 µg/L

Concentração (µg/L)	PRECISÃO (DPR%)	EXATIDÃO (%)
156,25	4,18	95,38
625	6,27	99,43
5000	1,58	99,16

Fonte: Autor

- Limite de detecção e limite de quantificação

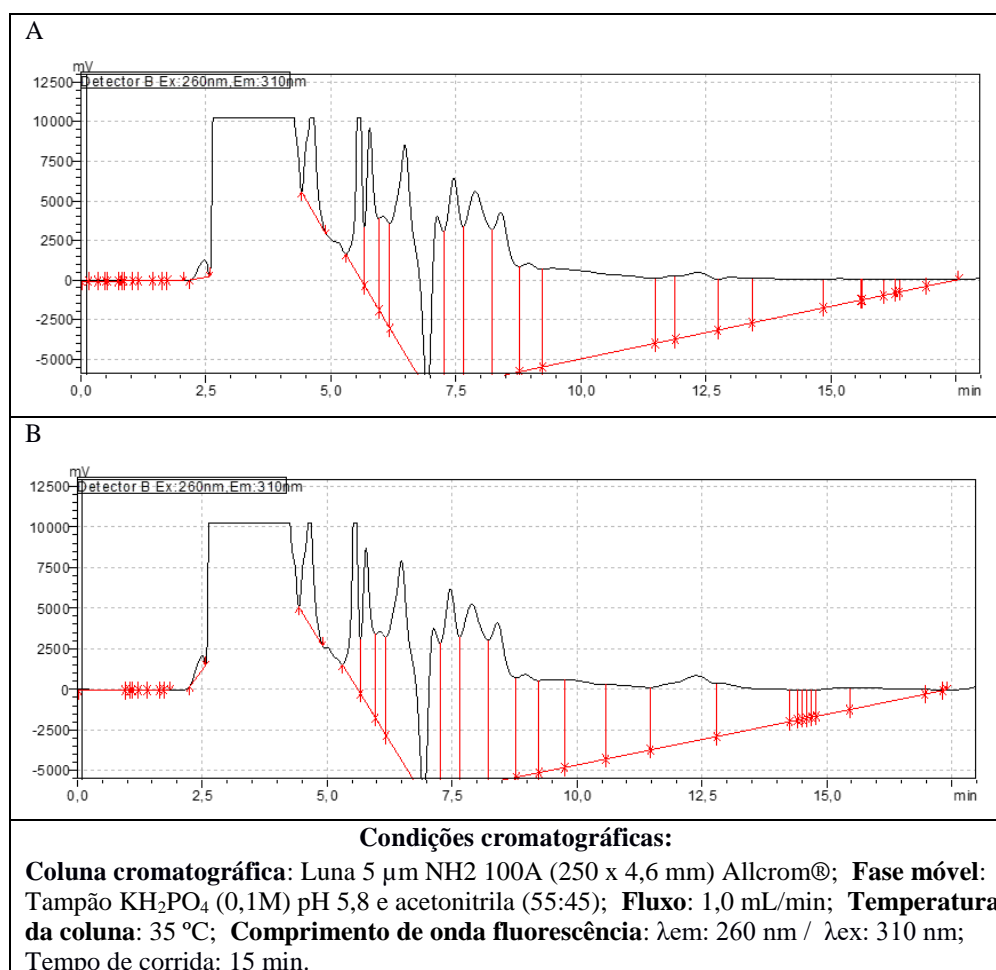
Os limites de detecção e quantificação encontrados para o glifosato foram 2,12 µg/L e 6,4 µg/L, respectivamente. Já os limites de detecção e quantificação encontrados para o AMPA foram, respectivamente, 42,9 µg/L e 129,9 µg/L.

4.2. MÉTODO 1: ANÁLISES EM URINA

Analisou-se o glifosato na concentração de 600 $\mu\text{g/L}$ e o branco, composto por urina isenta de glifosato, adicionada de derivatizante FMOC-Cl e tampão tetraborato de sódio. Esta análise primária ocorreu para que fosse possível avaliar a capacidade do método em detectar os analitos de interesse sem interferência (seletividade).

Ao analisar os cromatogramas representados na Figura 13A e 13B, foi possível observar que ambos os cromatogramas (branco e glifosato 600 $\mu\text{g/L}$) apresentaram-se idênticos, demonstrando uma dificuldade do método em detectar o analito de interesse na presença de interferentes da urina. Dessa forma, as análises subsequentes tornaram-se impossibilitadas, visto que, não foi possível a detecção do pico representativo do glifosato.

Figura 13 - Cromatograma do branco para o glifosato em urina (A) e da solução de glifosato 600 $\mu\text{g/L}$ em urina (B) para o método 1.



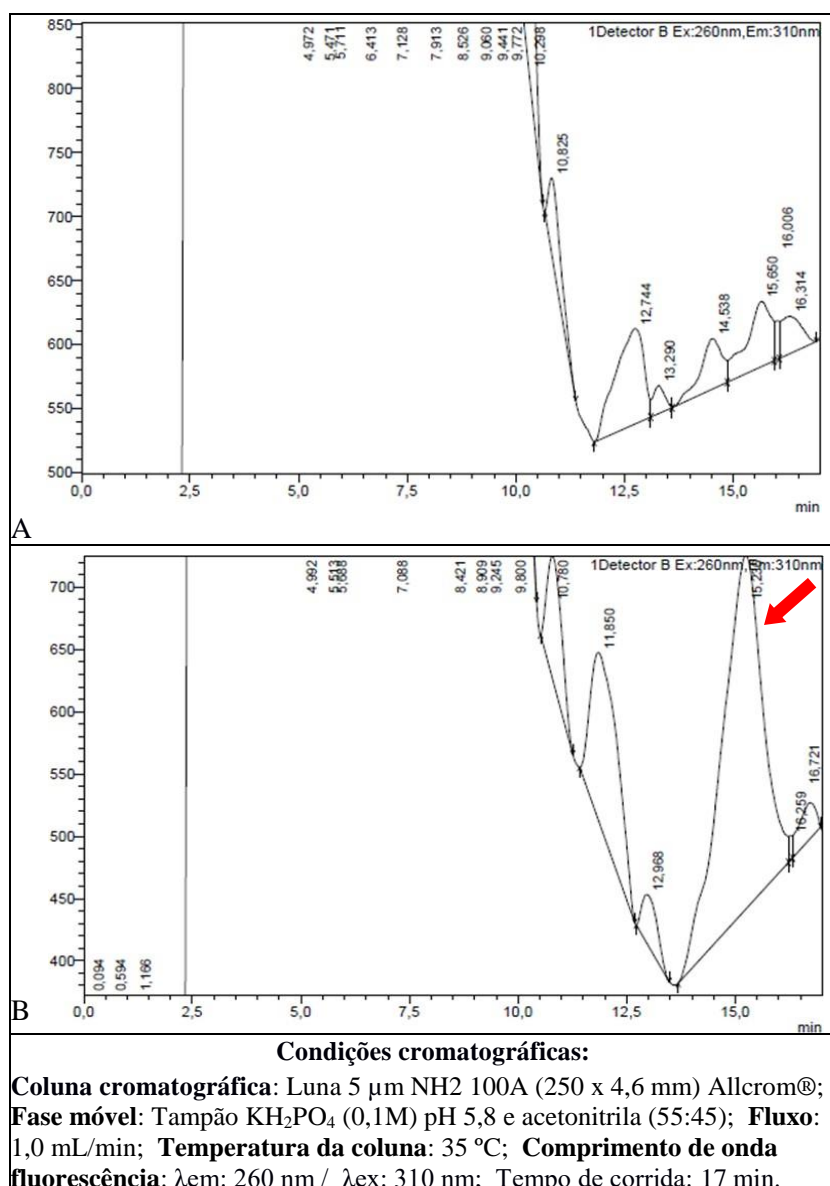
Fonte: Autor

4.3. MÉTODO 2: ANÁLISES EM URINA

Analisou-se o glifosato na concentração de 600µg/L e o Branco, composto por urina isenta de glifosato, adicionada de derivatizante FMOC-Cl e tampão tetraborato de sódio. Esta análise primária ocorreu para que fosse possível avaliar a capacidade do método em detectar os analitos de interesse sem interferência (seletividade).

Na Figura 13A observou-se a presença de diversos picos no cromatograma que representam os produtos da reação de derivatização e substâncias encontradas na urina. Já na Figura 13B, observou-se a presença de um pico em destaque no tempo de 15,2 min (seta vermelha) representando teoricamente o glifosato.

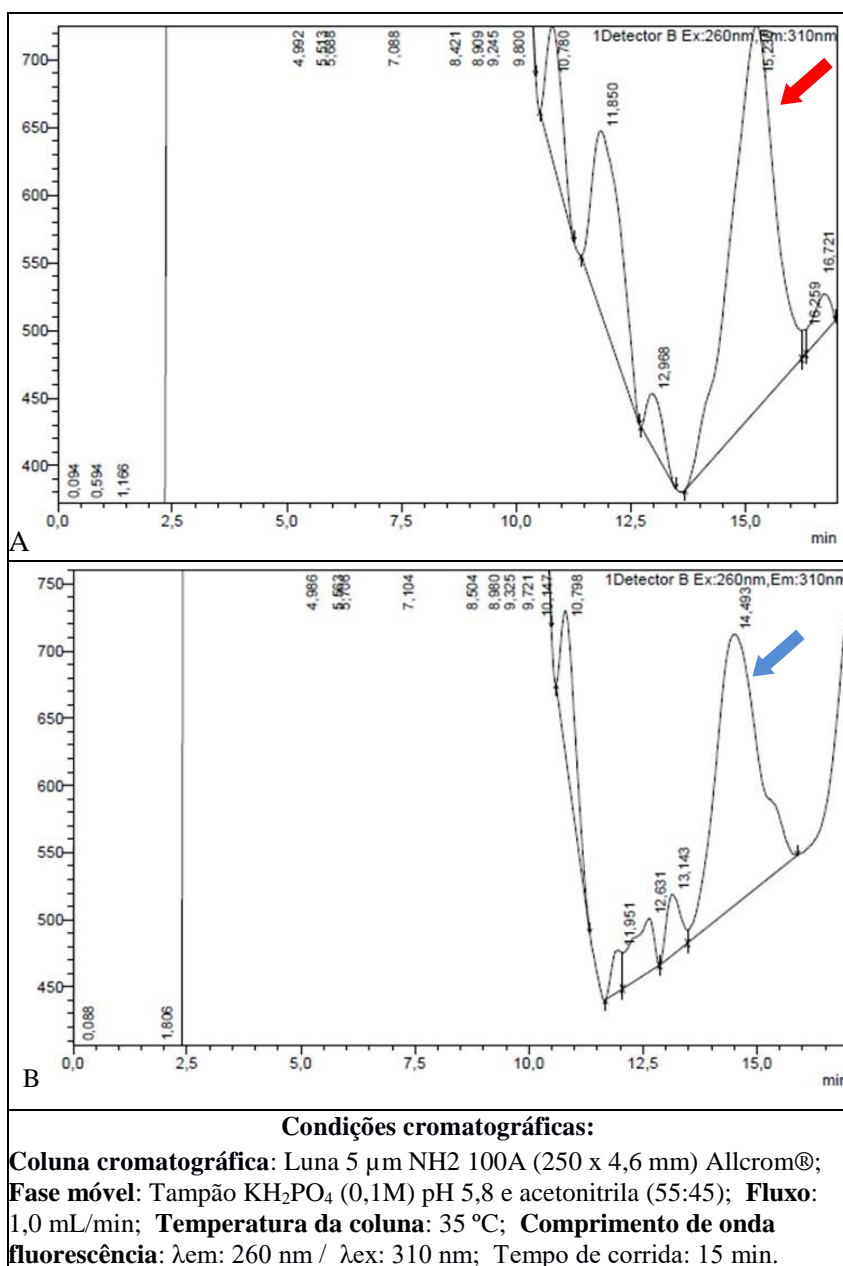
Figura 14 - Cromatograma do branco para o glifosato em urina (A) e da solução de glifosato 600 µg/L em urina (B) para o método 2.



Fonte: Autor

Na Figura 14A, o pico observado foi encontrado no tempo de 15,2 min (seta vermelha) e sua área foi de 17652967 mV. Já na Figura 14B, o pico observado foi encontrado no tempo de 14,5 min (seta azul) e sua área foi de 12419805 mV. Dessa forma, percebe-se que a área correspondente ao pico de 600 µg/L de glifosato foi 1,42 vezes maior que a área correspondente ao pico de 300 µg/L de glifosato, demonstrando uma ausência de proporcionalidade dos resultados de área em relação à concentração do glifosato e descartando a hipótese que o pico encontrado seja do glifosato.

Figura 15 - Cromatograma da solução de glifosato 600 µg/L em urina (A) e da solução de glifosato 300 µg/L em urina (B) para o método 2.



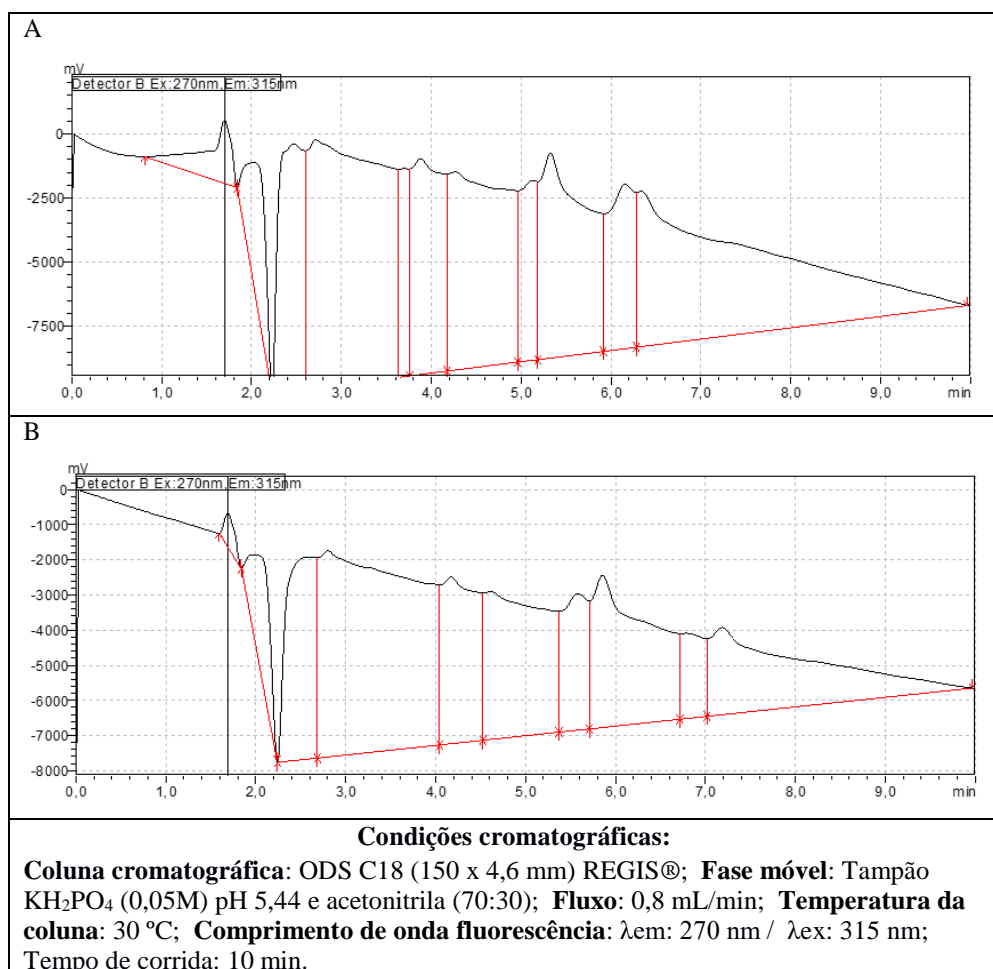
Fonte: Autor

4.4. MÉTODO 3: ANÁLISES EM URINA

Analisou-se o glifosato na concentração de 600 µg/L e o Branco, composto por urina isenta de glifosato, adicionada de derivatizante FMOC-Cl e tampão tetraborato de sódio. Esta análise primária ocorreu para que fosse possível avaliar a capacidade do método em detectar os analitos de interesse sem interferência (seletividade).

Ao analisar os cromatogramas representados nas Figuras 15A e 15B, foi possível observar que ambos os cromatogramas (branco e glifosato 600 µg/L) apresentaram-se idênticos, demonstrando uma dificuldade do método em detectar o analito de interesse na presença de interferentes da urina. Dessa forma, as análises subsequentes tornaram-se impossibilitadas, visto que, não foi possível a detecção do pico representativo do glifosato.

Figura 16 - Cromatograma do branco para o glifosato em urina (A) e da solução de glifosato 600 µg/L em urina (B) para o método 3.



Fonte: Autor

4.5. MÉTODO 4: ANÁLISES EM URINA

Analisou-se o glifosato na concentração de 600 µg/L e o Branco, composto por urina isenta de glifosato, adicionada de derivatizante FMOC-Cl e tampão tetraborato de sódio. Esta análise primária ocorreu para que fosse possível avaliar a capacidade do método em detectar os analitos de interesse sem interferência (seletividade). Nessa metodologia foram testados diferentes cartuchos de extração em fase sólida (C18, N+ e HBL) a fim de avaliar a capacidade de cada cartucho em extrair e concentrar o glifosato, permitindo que tal analito fosse detectado pelo HPLC. Além disso, foram avaliadas duas soluções eluentes distintas (acetonitrila e ácido acético 10%) para o cartucho N+ a fim de verificar qual dessas soluções apresentaria melhor capacidade de eluição da amostra.

Figura 17 - Cartucho N+ eluído com Acetonitrila (esquerda) e cartucho N+ eluído com ácido acético 10% (direita)



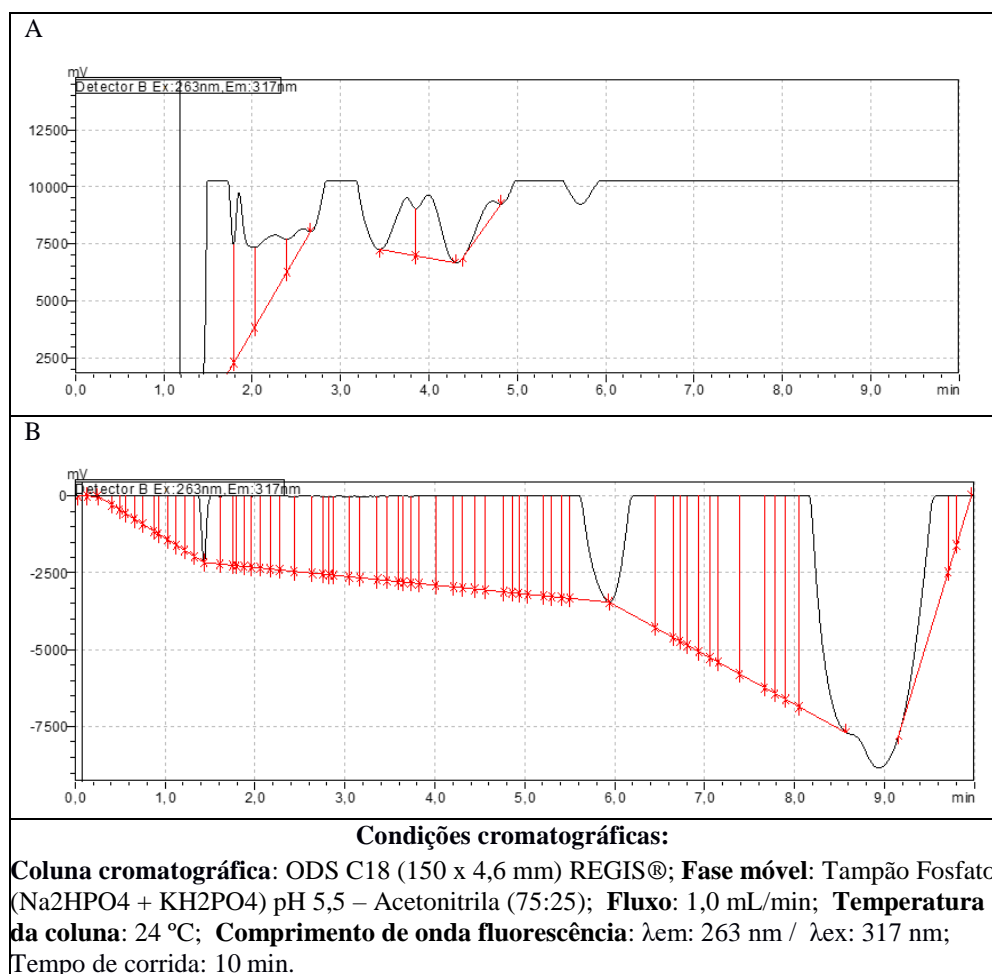
Fonte: Autor

A análise das soluções eluentes foi realizada a partir da observação de que a urina passada pelo cartucho permanecia retida no mesmo após a passagem da solução eluente utilizada no método (acetonitrila) como observado na Figura 16 (esquerda). Utilizando-se como base a metodologia de Ducos modificado por Paula usada para análise do ácido trans, transmucônico (PAULA; SILVEIRA; ALVAREZ-LEITE, 2003), que também faz uso de cartucho NH₂, decidiu-se investigar a capacidade de eluição do ácido acético 10%. Dessa forma, foi possível observar que o ácido acético apresentou uma melhor eluição da urina do que a acetonitrila, visto que, a retenção da urina no cartucho foi bem menor como observado na Figura 16 (direita).

4.5.1. Análises em cartucho HLB

O cromatograma representado pela Figura 17 Apresenta diferentes picos dispostos entre os tempos de retenção de 1 minuto a 6 minutos. Já o cromatograma representado pela Figura 17B apresenta-se quase totalmente zerado com exceção da formação de 3 depressões nos tempos de 1,5 min, 6,0 min e 9,0 min. Ao comparar esses dois cromatogramas (Figuras 17A e 17B), foi possível observar que os mesmos se apresentaram totalmente diferentes em relação aos picos encontrados, impossibilitando uma comparação dos mesmos quanto à presença do glifosato e demonstrando uma incapacidade do cartucho testado em extrair e concentrar o glifosato.

Figura 18 - Cromatograma do branco em urina (A) e da solução de glifosato 600 µg/L em urina (B) usando cartucho HBL oásis para o método 4.

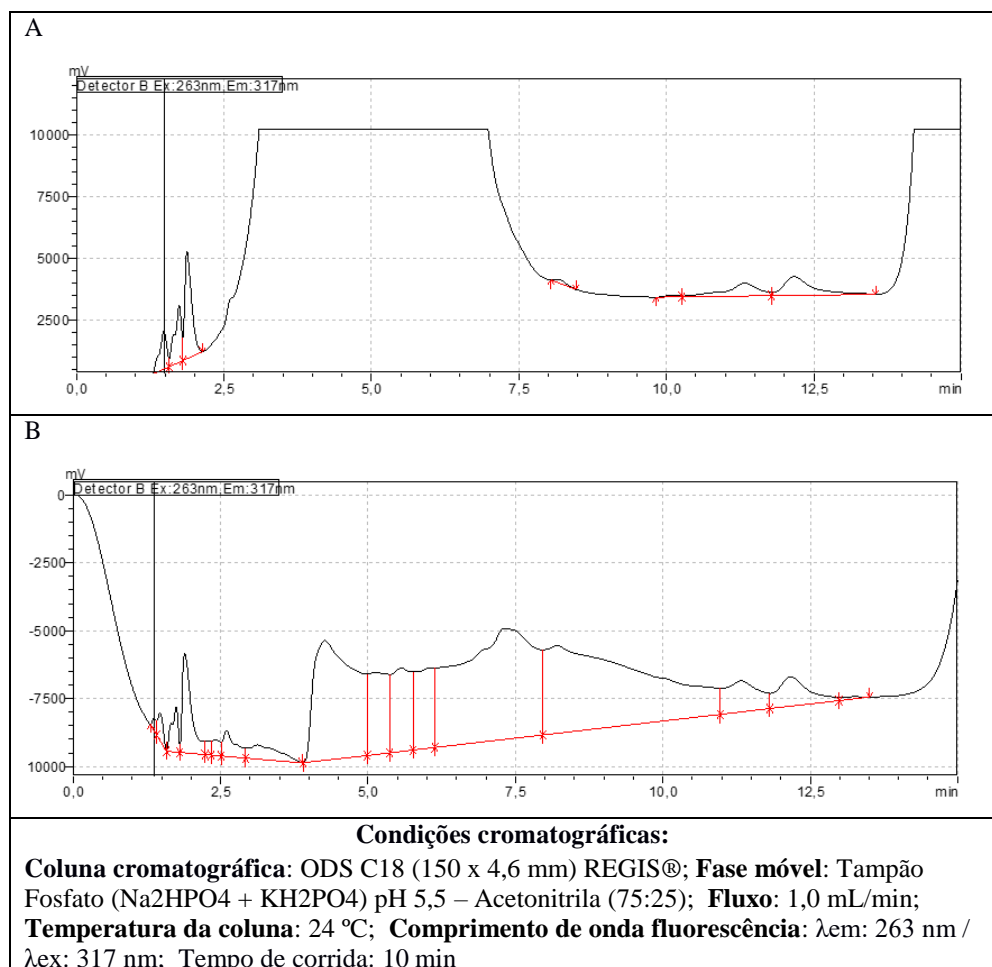


Fonte: Autor

4.5.2. Análises em cartucho C18

O cromatograma representado pela Figura 18A apresenta três picos dispostos no início do mesmo (antes do tempo de 2,5 min) e um platô que se estende de 2,5 min a 7,5 min. Já o cromatograma representado pela Figura 18B apresenta os três picos iniciais similares ao cromatograma da figura 18A e outros diferentes picos dispostos entre os tempos de retenção de 2,5 min a 12 min. Ao comparar esses dois cromatogramas (Figuras 18A e 18B), foi possível observar que os mesmos se apresentaram diferentes em relação aos picos encontrados a partir de 2,5 min, impossibilitando uma comparação dos mesmos quanto à presença do glifosato e demonstrando uma incapacidade do cartucho testado em extrair e concentrar o glifosato.

Figura 19 - Cromatograma do branco em urina (A) e da solução de glifosato 600 µg/L em urina (B) usando cartucho C18 para o método 4

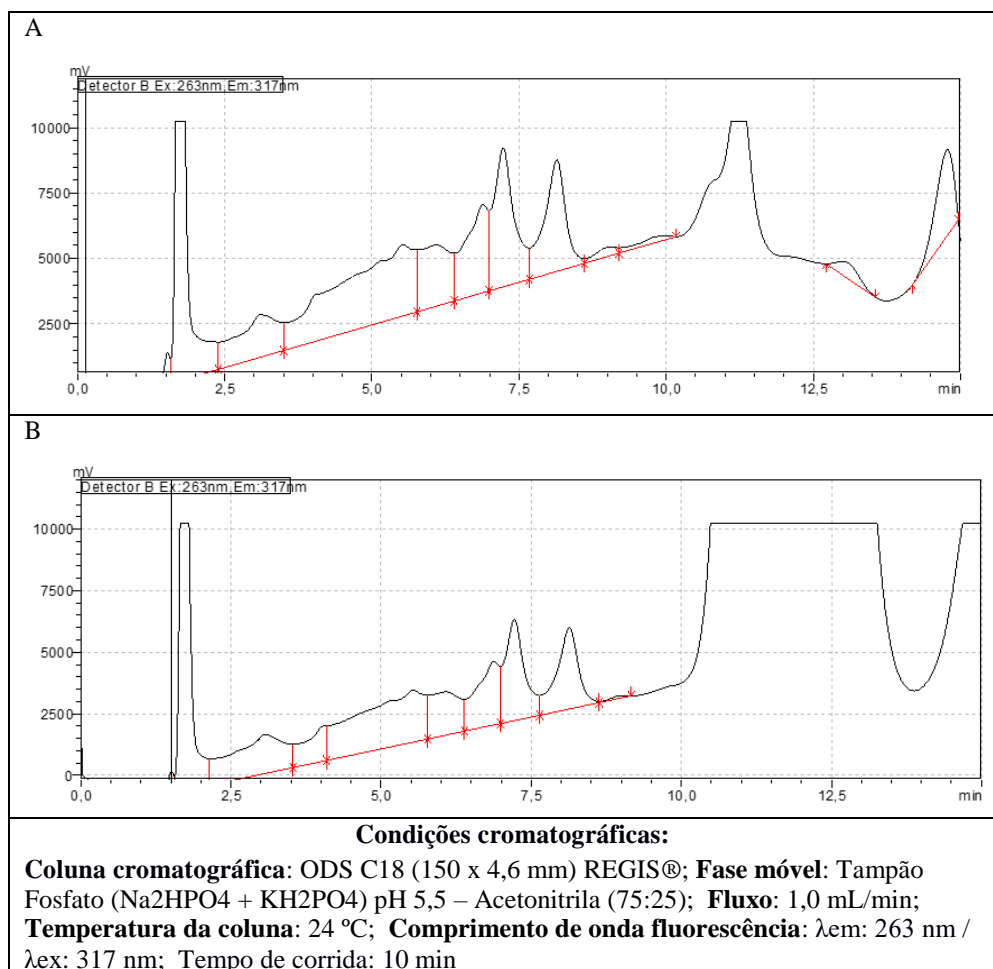


Fonte: Autor

4.5.3. Análises em cartucho N+

O cromatograma representado pela Figura 19A apresenta diferentes picos dispostos entre os tempos de retenção de 1 minuto a 13 minutos. Já o cromatograma representado pela Figura 19B apresenta diferentes picos dispostos entre os tempos de retenção de 1 minuto a 8 minutos e a presença de um platô que se estende de 10 minutos a 12,8 minutos. Ao comparar esses dois cromatogramas (Figuras 19A e 19B), foi possível observar que os mesmos se apresentaram bastante similares em relação aos picos encontrados com exceção do platô presente no cromatograma da Figura 19B. Mesmo com a similaridade dos cromatogramas, a presença do platô na Figura 19 impossibilitou uma comparação dos mesmos quanto à presença do glifosato, demonstrando uma incapacidade do cartucho testado em extrair e concentrar o glifosato.

Figura 20 - Cromatograma do branco em urina (A) da solução de glifosato 600 µg/L em urina (B) usando cartucho NH2 para o método 4.



Fonte: Autor

5. DISCUSSÃO

5.1. MÉTODO 1: ANÁLISES EM ÁGUA ULTRAPURA

Com relação à seletividade do método para os analitos avaliados (glifosato e AMPA) em água ultrapura observou-se que o método analisado apresentou seletividade, visto que, não foi identificada a presença de interferentes próximos aos tempos de retenção dos compostos. Garantindo que a área quantificada no cromatograma para o glifosato e o AMPA correspondesse exclusivamente à quantidade do analito injetada no HPLC.

No caso da análise da capacidade do método em gerar resultados de área diretamente proporcionais à concentração dos analitos, pode-se afirmar que este método apresenta a capacidade de analisar proporcionalmente a área do glifosato e do AMPA. Uma vez que, ao avaliar duas concentrações de ambos os analitos (glifosato e AMPA) onde o valor da concentração mais alta era duas vezes maior que o valor da concentração mais baixa, foi observado que o valor da área encontrado para a concentração mais alta também era duas vezes maior do que o encontrado para a concentração mais baixa.

Com relação à linearidade do método analítico para o glifosato e o AMPA tem-se que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo segundo a RDC 166 de 2017 da ANVISA. Já que, o coeficiente de determinação (R^2) encontrado para as curvas de calibração de ambos os analitos foi maior que 0,99.

Quanto à precisão, o método analítico avaliado pode ser considerado preciso. Visto que, conforme preconizado pela Comissão Européia (SANCO/SANTE N° 11813 de 2017) os valores de coeficiente de variação para resíduos de agrotóxicos devem estar abaixo de 20%. Dessa forma, ao terem sido encontrados, para as três concentrações avaliadas em ambos os analitos, valores de coeficiente de variação abaixo dos 20% pode-se considerar a precisão do método em questão.

Em relação à exatidão do método analítico, todas as recuperações avaliadas nas três concentrações determinadas para o glifosato e o AMPA apresentaram valores dentro da faixa aceita pela literatura para análise de resíduos de agrotóxicos que se encontra entre 70% a 120% de acordo com a Comissão Européia (SANCO/SANTE N° 11813 de 2017).

Segundo a PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO N° 5, DE 28 DE SETEMBRO DE 2017 ficou estabelecido que o valor máximo permitido (VMP) de glifosato, somado ao seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA), é de 0,5 mg/L de água. Dessa forma, é

possível afirmar que os limites de detecção e quantificação do glifosato e do AMPA para este método encontraram-se muito abaixo do valor máximo permitido, possibilitando que tal método seja utilizado para a análise de resíduos de glifosato em água.

O método 1 originalmente foi desenvolvido para análise de glifosato e AMPA em água, dessa forma, já se esperava que as análises realizadas em laboratório fossem satisfatórias.

5.2. MÉTODO 1: ANÁLISES EM URINA

Como o método 1 apresentou-se satisfatório para a análise de glifosato e AMPA em água ultrapura cogitou-se que esta metodologia também fosse capaz de analisar esses analitos em urina. Porém, o método 1 não foi adequado para a análise do glifosato na matriz urina pois não foi possível identificar o pico correspondente ao glifosato. Isto pode ter ocorrido pelo fato de a urina ser uma amostra biológica complexa, demandando como uma etapa preliminar no procedimento analítico técnicas de extração necessárias para eliminar interferentes que sejam incompatíveis com o sistema cromatográfico (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; PINHO, 2009). As técnicas de extração mais comumente utilizadas são extração líquido-líquido e EFS (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Como este método realiza apenas a filtração da urina, a ausência de uma etapa de limpeza pode ter contribuído para a não seletividade do método.

5.3. MÉTODO 2: ANÁLISES EM URINA

O método 2 originalmente foi desenvolvido para análise de glifosato em sangue. Assim como o método 1, o método 2 não se apresentou satisfatório para análise de glifosato e AMPA em urina. Apesar deste, inicialmente, ter demonstrado seletividade na comparação do branco com a urina batizada, posteriormente quando foi avaliada a capacidade do método de gerar resultados de área diretamente proporcionais à concentração do analito este se apresentou falho, não fornecendo proporcionalidade entre as concentrações e as áreas analisadas e, dessa forma, descartando a hipótese do pico encontrado como sendo do analito de interesse.

Estes resultados podem ter ocorrido pelo fato de que a matriz originalmente estudada para o método é o sangue e não a urina. Apesar de se tratarem de duas matrizes biológicas, as mesmas apresentam composições diferentes. O sangue é composto pelo

plasma e elementos celulares, sendo o plasma composto de água (90%), na qual estão imersos sais minerais, proteínas, gorduras, fatores de coagulação, hormônios, fibrinogênio e outras substâncias e os elementos celulares, que são os glóbulos vermelhos, os glóbulos brancos e as plaquetas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Já a urina é composta aproximadamente por 95% de água e 2 % de ureia, nos 3% restantes, podemos encontrar fosfato, sulfato, amônia, magnésio, cálcio, ácido úrico, creatina, sódio, potássio e outros elementos (NAKAMAE *et al.*, 1980). Dessa forma, os métodos de limpeza de matriz são diferentes para cada uma dessas matrizes, justificando a não funcionalidade do método (PINHO, 2009).

5.4.MÉTODO 3: ANÁLISES EM URINA

O método 3 originalmente foi desenvolvido para análise de glifosato em água. Similarmente aos métodos anteriores, este método não se apresentou satisfatório para análise de glifosato e AMPA em urina. Apesar de o método escolhido apresentar uma técnica de limpeza que frequentemente é utilizada para a limpeza de matrizes como a urina (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001), o mesmo não apresentou seletividade, ou seja, não foi capaz de detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Isto pode ter ocorrido pelo fato de a urina e a água serem matrizes completamente diferentes, fator que exige que o processo de limpeza seja diferente, mesmo que, a técnica utilizada, segundo a literatura, seja uma técnica ideal para a limpeza de urina (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Por se tratarem de matrizes diferentes, não só o cartucho utilizado no processo de EFS deve diferir, assim como os solventes das etapas de condicionamento, lavagem e eluição devem ser diferentes para garantir que a amostra seja eluída livre de interferentes (JARDIM, 2010). Dessa forma, ao se utilizar uma técnica não preconizada para a análise de glifosato e AMPA em urina, a função da técnica de EFS, que é a de eliminar os interferentes da matriz, não foi cumprida. Gerando como consequência a impossibilidade de identificação dos analitos de interesse (JARDIM, 2010).

5.5.MÉTODO 4: ANÁLISES EM URINA

Como descrito anteriormente, para essa metodologia foram testados diferentes cartuchos de EFS (C18, NH₂ e HLB) a fim de avaliar a capacidade de cada cartucho em extrair e concentrar o glifosato, permitindo que tal analito fosse detectado pelo HPLC. Estas avaliações ocorreram como uma alternativa ao método original, dado que, o cartucho preconizado pelo método (SPE Waters OASIS, HLB Catridge 500mg, 30 µm Particle Size) não se encontrava disponível para uso.

Além disso, com relação às análises com cartucho N+, foram testadas duas soluções eluentes distintas: a solução preconizada pelo método (acetronitrila 100%) e uma solução alternativa (ácido acético 10%). Já que, foi observado que a urina permanecia retida no cartucho EFS após a passagem da solução eluente preconizada pelo método. A utilização da solução alternativa foi baseada no método de limpeza da urina para análise do ácido trans, trans-mucônico desenvolvida por Ducos modificado por Paula (PAULA; SILVEIRA; ALVAREZ-LEITE, 2003), onde a eluição da urina ocorreu de forma adequada e com boa recuperação do componente estudado.

Ao realizar a comparação de ambas as soluções eluentes observou-se que a solução de ácido acético 10% foi mais eficaz para a eluição da urina em cartucho N+, isso se deve provavelmente pelo fato de se tratar de um cartucho composto por Amina quaternária cuja extração ocorre por troca aniônica e dessa forma, sua solução eluente deve ser composta por tampões ácidos ou tampões com alta força iônica, condição condizente com a solução de ácido acético 10% e contrária à solução de acetoneitrila 100% (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; JARDIM, 2010).

Com relação às análises em cartucho HLB, foi demonstrado que esse cartucho de EFS não se apresentou adequado para análise de glifosato em urina, visto que, os cromatogramas do branco e da urina batizada com glifosato apresentaram-se amplamente distintos, dificultando a análise comparativa dos mesmos e impossibilitando a reprodução do método. Isso pode ter ocorrido pelo fato de o cartucho HLB utilizado na análise, apesar de ter a mesma composição do cartucho utilizado no método original, ter um tamanho de partícula maior (60µm) do que a partícula do cartucho utilizado no método original (30µm).

Segundo Caldas e colaboradores (2011), o menor tamanho das partículas melhora o desempenho, proporcionando uma rápida transferência de massa, dessa forma, esse fator pode ter contribuído para a dificuldade na análise. Além disso, o HLB é composto por

poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona), sendo um cartucho indicado para a análise de agrotóxicos das classes organoclorados e triazina em água, onde as soluções de eluição recomendadas são metanol e água (DUTRA, 2014). Por não se tratar de um cartucho específico para a análise em matrizes como a urina e devido ao fato de a solução eluente não ser a preconizada para o cartucho a análise do glifosato pode ter sido prejudicada pela não eliminação dos interferentes da matriz.

Posteriormente foi realizada a análise em cartucho C18. Esse cartucho foi escolhido pois Segundo Carvalho e colaboradores (2008), os sorventes mais usados na SPE para extração de agrotóxicos em matrizes aquosas são: C18, usado na extração de herbicidas, inseticidas e organoclorados e os sorventes poliméricos, que têm sido usados para diversas classes de agrotóxicos. Porém, a análise de glifosato pela metodologia 4 utilizando cartucho C18 não se apresentou satisfatória, uma vez que, os cromatogramas do branco e da urina batizada com glifosato apresentaram-se amplamente distintos, dificultando a análise comparativa dos mesmos. Isto pode ter ocorrido porque, apesar de o cartucho C18 ser altamente recomendado para a análise de agrotóxicos e de a solução eluente (acetonitrila 100%) ser uma das soluções recomendadas para eluir os analitos nesse cartucho (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; CALDAS *et al*, 2011), a solução condicionante utilizada (metanol acidificado com ácido acético) era originalmente preconizada para o condicionamento de cartucho HLB. Como o solvente empregado no condicionamento depende do sorvente a ser ativado (JARDIM, 2010). A utilização de uma solução não preconizada para o condicionamento de cartucho C18 pode ter contribuído para os resultados negativos da análise.

Por último, foi realizada a análise em cartucho N+. Assim como os demais cartuchos testados, o cartucho N+ não se apresentou eficaz para a análise do glifosato. Apesar de os cromatogramas do branco e da urina batizada com glifosato apresentarem-se inicialmente muito similares, a partir do minuto 10 do cromatograma da urina batizada com glifosato observou-se a presença de um platô que dificultou a análise comparativa entre os cromatogramas. Isto pode ter ocorrido pelo fato de o cartucho N+ ser composto por Amina quaternária cujos analitos preconizados para serem analisados por este cartucho são: grupos funcionais carregados negativamente como ácidos orgânicos, vitaminas, ácidos graxos e fosfatos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; CALDAS *et al*, 2011). Logo, por não ser um cartucho preconizado para a análise de agrotóxicos, mais especificamente herbicidas, pode ter contribuído para os resultados negativos da análise.

6. CONCLUSÃO

É importante destacar a dificuldade metodológica em analisar o glifosato em matrizes biológicas, visto que existe uma escassez de estudos que demonstrem métodos de análise do glifosato nessas matrizes por HPLC. A grande dificuldade ocorre devido às propriedades físico-químicas do glifosato e do AMPA, além da ausência de grupos cromóforos.

Destaca-se também o impacto da ausência de metodologias que avaliem o glifosato em matrizes biológicas, uma vez que, não se tem conhecimento exato sobre os efeitos crônicos e subcrônicos desse ingrediente ativo e suas formulações no organismo humano.

De acordo com os dados obtidos pelo método 1 para água ultrapura pode-se dizer que o método foi implementado e validado por HPLC-Fluorescência na determinação de glifosato e AMPA em água ultrapura. Esse método demonstrou ser prático e preciso, obtendo bons resultados na avaliação da precisão, exatidão, seletividade e sensibilidade para o analito de interesse. Além disso, este método apresentou bons limites de detecção e quantificação tanto para o glifosato como para o AMPA, permitindo a quantificação de concentrações muito baixas desses analitos em água.

Os métodos avaliados (1, 2, 3 e 4) não foram sensíveis para detectar o glifosato e AMPA em amostras de urina, demonstrando uma necessidade de novos testes a partir de ajustes nos métodos selecionados, tendo sido esta uma etapa preliminar do desenvolvimento.

Os resultados fornecem uma ideia preliminar dos ajustes que devem ser realizados para que seja possível a implementação e validação de um método para análise de urina por HPLC-Fluorescência. No entanto, pesquisas a partir de novas metodologias também devem ser realizadas.

Dessa forma, a escassez de estudos sobre análise de glifosato em matrizes biológicas demonstra a importância da continuidade do estudo em questão, já que, o desenvolvimento e validação de uma metodologia que possibilite essa análise irão auxiliar no monitoramento dos níveis de exposição de trabalhadores rurais ao glifosato;

7. REFERÊNCIAS

ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. **World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision**. ESA Workingpaper. No. 12-03. FAO, Rome, 2012.

AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.589-593, 2002.

ANADÓN, A. et al. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology Letters**, [s.l.], v. 190, n. 1, p.91-95, out. 2009. Elsevier BV.

ANDREOTTI, G. et al. Glyphosate Use and Cancer Incidence in the Agricultural Health Study. **Journal of the National Cancer Institute**, [s.l.], v. 110, n. 5, p.509-516, 9 nov. 2017. Oxford University Press (OUP).

ANIFANDIS, G. et al. The Effect of Glyphosate on Human Sperm Motility and Sperm DNA Fragmentation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.1117-1124, maio 2018.

ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.458-479, 25 fev. 2014

ANVISA. **NOTA TÉCNICA Nº 23/2018**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/Nota+t%C3%A9cnica+23+de+2018+-+Glifosato/faac89d6-d8b6-4d8c-8460-90889819aaf7>. Acesso em: 10 mai 2019

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA): relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012**. Brasília. P. 33, outubro de 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/446359/Programa+de+An%C3%A1lise+de+ReR%C3%ADduos+de+Agrot%C3%B3xicos+-+Relat%C3%B3rio+2012+%282%C2%BA+etapa%29/3bc220f9-8475-44ad-9d96-cbbc988e28fa>. Acesso em: 05 fev. 2019

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 08 abr. 2019

Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

BAI, S. H. et al. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 23, n. 19, p.18988-19001, ago. 2016.

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 23, n. 19, p.18988-19001, ago. 2016.

BATTAGLIN, W.A. et al. Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. **Jawra Journal of The American Water Resources Association**, [s.l.], v. 50, n. 2, p.275-290, abr. 2014.

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.1-15, fev. 2016.

BENEDETTI, A. L. et al. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb®. **Toxicology Letters**, [s.l.], v. 153, n. 2, p.227-232, nov. 2004.

BOT, B. Le et al. **Optimization and performance evaluation of the analysis of glyphosate and AMPA in water by HPLC with fluorescence detection**. *Chromatographia*, [s.l.], v. 56, n. 3-4, p.161-164, ago. 2002.

BRAZ-MOTA, S. et al. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. **Chemosphere**, [s.l.], v. 135, p.53-60, set. 2015.

BRITO, Natilene Mesquita et al. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, n. 1, p.129-146, dez. 2003.

BROOKES, G.; TAHERIPOUR, F.; TYNER, W. E. The contribution of glyphosate to agriculture and potential impact of restrictions on use at the global level. **GM Crops & Food**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.216-228, out. 2017.

CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 9, p.1604-1617, set. 2011.

CARVALHO, Fernando P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.48-60, maio 2017.

CARVALHO, J. J. et al. Evaluation of a multiresidue method for measuring fourteen chemical groups of pesticides in water by use of LC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 392, n. 5, p.955-968, 31 ago. 2008.

CASSIGNEUL, A. et al. Fate of glyphosate and degradates in cover crop residues and underlying soil: A laboratory study. **Science of The Total Environment**, [s.l.], v. 545-546, p.582-590, mar. 2016.

CATRINCK, T. C. P. G. et al. A Simple and Efficient Method for Derivatization of Glyphosate and AMPA Using 9-Fluorenylmethyl Chloroformate and Spectrophotometric Analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 25, n. 7, p.1194-1199, 2014

CENGIZ, M. F.; BASANCELEBI, O.; KITIS, Y. E. Glyphosate residues in drinking waters and adverse health effects. **The Turkish Journal of Occupational / Environmental Medicine and Safety**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.247-258, 2017.

CHEKAN, J.R., COGAN, D.P., NAIR, S.K. Molecular basis for resistance against phosphonate antibiotics and herbicides. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.] v. 7, p. 28–36.2016.

DALLEGRAVE, E. et al. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formuLation in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, [s.l.], v. 81, n. 9, p.665-673, jul. 2007.

DIANA, J. **Agrotóxicos**. 2019. Coordenada por Toda Matéria. Disponível em: <<https://www.todamateria.com.br/agrotoxicos/>>. Acesso em: 08 jan. 2019.

DILL, G.M. et al. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management. Wiley, New York, pp 1–33, 2010.

DUTRA, Flávia Viana Avelar. **Materiais sorventes empregados em diferentes métodos de preparo de amostras**. 2014. 29 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal de São João Del-rei, São João Del-rei, 2014. Disponível em: <https://www.ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/coqui/TCC/Monografia-TCC-Flavia_V_A_Dutra-20141.pdf>. Acesso em: 31 maio 2019.

EINIG, T.; DEHNEN, W. Sensitive determination of the benzene metabolite S-phenylmercapturic acid in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 697, n. 1-2, p.371-375, abr. 1995

EPA. Environmental Protection Agency. **Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential**. EPA's Office of Pesticide Programs September 12, 2016. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/glyphosate_issue_paper_evaluation_of_carcinogenic_potential.pdf. Acesso em: 05 fev. 2019.

EPA. Environmental Protection Agency. **Pesticide Industry Sales and Usage Reports**. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf. Acesso em: 15 Jan. 2019

FAO. Food and Agriculture Organization . **Pesticides Use (2018)**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>. Acesso em 08 jan. 2019.

FARIA, R. R. **Simulação computacional da interação de quitosana com o herbicida glifosato para descontaminação ambiental**. 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17442/1/SimuLacaoComputacionalInteracao.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2019.

FLUEGGE, K.; FLUEGGE, K. Glyphosate Use Predicts Healthcare Utilization for ADHD in the Healthcare Cost and Utilization Project net (HCUP net): A Two-Way Fixed-Effects Analysis. **Polish Journal Of Environmental Studies**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.1489-1503, 2016.

FORTES, C. et al. Occupational Exposure to Pesticides With Occupational Sun Exposure Increases the Risk for Cutaneous Melanoma. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, [s.l.], v. 58, n. 4, p.370-375, abr. 2016.

FUSILERO, Ma. A. et al. Weed management systems and other factors affecting the earthworm population in a banana plantation. **European Journal of Soil Biology**, [s.l.], v. 56, p.89-94, maio 2013.

GARCIA, F.P. et al. Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. **Journal of Research in Environmental Science and Toxicology**, [s.l.], v.1 n. 11, p. 279–293, 2017.

GARCÍA-PÉREZ, J. A. et al. Earthworm communities and soil properties in shaded coffee plantations with and without application of glyphosate. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 83,p.230-237, nov. 2014.

GASNIER, C. et al. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, [s.l.], v. 262, n. 3, p.184-191, ago. 2009.

GOMES, M. P. et al. Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 130, p.65-70, jun. 2016.

GREIM, H. et al. Evaluation of carcinogenic potential of the herbicide glyphosate, drawing on tumor incidence data from fourteen chronic/carcinogenicity rodent studies. **Critical Reviews in Toxicology**, [s.l.], v. 45, n. 3, p.185-208, fev. 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Brasil, 2015.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos - DOQ-CGCRE-008**. Rev. 04, jul 2011.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, Campinas, v. 2, n. 1, p.13-25. 2010.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia básica: Texto & Atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara KooganLtda, 2013. 538 p.

KIM, K.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 575, p.525-535, jan. 2017.

KOLLER, V. J. et al. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. **Archives of Toxicology**, [s.l.], v. 86, n. 5, p.805-813, fev. 2012.

KWIATKOWSKA, M. et al. DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 105, p.93-98, jul. 2017.

KWIATKOWSKA, M.; HURAS, B.; BUKOWSKA, B. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 109, p.34-43, fev. 2014

KWIATKOWSKA, M.; NOWACKA-KRUKOWSKA, H.; BUKOWSKA, B. The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.1101-1108, maio 2014.

LU, F.C. A Review of the Acceptable Daily Intakes of Pesticides Assessed by WHO. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.352-364, jun. 1995.

MAMY, L., BARRIUSO, E., GABRIELLE, B. Glyphosate fate in soils when arriving in plant residues. *Chemosphere*, [s.l.] v. 154, p. 425–433, JuL. 2016.

MAQUEDA, C. et al. Behaviour of glyphosate in a reservoir and the surrounding agricultural soils. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 593-594, n. 1, p.787-795, set. 2017.

MELO, K. G. de. **Determinação de glifosato em amostras de urina humana pela derivatização com Cloroformato De 9- Fluorenilmetilo por Cromatografia Líquida com detecção de Fluorescência**. 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/331789/1/Melo_KarolyneGramlichDe_M.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolidacao-n-5-de-28-de-setembro-de-2017.pdf>. Acesso em: 15 mai 2019.

MOSTAFALOU, S. et al. Protective effect of NAC against malathion-induced oxidative stress in freshly isolated rat hepatocytes. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 2, n. 1, p.79-88, mar. 2012.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives Of Toxicology**, [s.l.], v. 91, n. 2, p.549-599, 8 out. 2016.

MYERS, J. P. et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. **Environmental Health**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.255-268, fev. 2016.

National Pesticide Information Center. **Glyphosate General FactSheet**. Disponível em: <http://npic.orst.edu/factsheets/glyphogen.html>. Acesso em: 09 Jan. 2019

NAKAMAE, D. D. et al. EXAME DE URINA: TODO O RIGOR NA COLHEITA DE AMOSTRAS. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.51-57, abr. 1980.

OKADA, E.; COSTA, J. L.; BEDMAR, F. Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. **Geoderma**, [s.l.], v. 263, p.78-85, fev. 2016.

OSTEN, J. R.; DZUL-CAAMAL, R. Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in

Hopelchén, Campeche, Mexico. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.595-608, 3 jun. 2017.

PASCHOAL, Jonas Augusto Rizzato et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.1190-1198, 2008.

PAULA, F. C. S. de; SILVEIRA, J. N.; ALVAREZ-LEITE, E. M. Validação do método de Ducos modificado para a determinação do ácido trans,trans-mucônico urinário. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.63-69, mar. 2003.

PEITER, G. C. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de glifosato e AMPA em águas**. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologias de Bioprodutos Agroindustriais, Programa de Pós-graduação em Tecnologias de Bioprodutos Agroindustriais, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2017. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/47933/R%20-%20D%20-%20GABRIELLE%20CAROLINE%20PEITER.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 09 mar. 2019.

PINHO, G. P. de. **Efeito de componentes da matriz na análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa**. 2009. 120 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agroquímica, Programa de Pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/206/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 23 mai 2019.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.68-76, fev. 2001.

RICHMOND, M. E. Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. **Journal of Environmental Studies And Sciences**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.416-434, set. 2018.

ROMANO, M. A. et al. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Archives of Toxicology**, [s.l.], v. 86, n. 4, p.663-673, nov. 2012

SANCO. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed**. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf. Acesso em: 15 mai 2019.

SCHUMMER, C et al. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**, [s.l.], v. 77, n. 4, p.1473-1482, 15 fev. 2009.

SCRIBNER, E.A. et al., 2007. Concentrations of glyphosate, its degradation product, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate in ground- and surface-water, rainfall, and soil samples collected in the United States, 2001-06: U.S. **Geological Survey Scientific Investigations Report 2007-5122**, 111 p.

SIDOLI, P.; BARAN, N.; ANGULO-JARAMILLO, R. Glyphosate and AMPA adsorption in soils: laboratory experiments and pedotransfer rules. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 23, n. 6, p.5733-5742, 19 nov. 2015.

SINGH, B., SINGH, K. Microbial degradation of herbicides. **Critical Reviews in Microbiology**, [s.l.] v. 42, p. 245–261, 2016.

SMITH, M. T. et al. Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 124, n. 6, p.713-721, jun. 2016.

Soil Association, (2016). **The impact of glyphosate on soil health: the evidence to date**. Disponível em: <https://www.soilassociation.org/media/7202/glyphosate-and-soil-health-full-report.pdf>. Acesso em: 27 Jan. 2019

VAN BRUGGEN, A.H.C. et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 616-617, p.255-268, mar. 2018.

WANG, S. et al. (Bio)degradation of glyphosate in water-sediment microcosms – A stable isotope co-labeling approach. **Water Research**, [s.l.], v. 99, p.91-100, ago. 2016.

WHO. World Health Organization. **Agrochemicals, health and environment: directory of resources**. Disponível em: <http://www.who.int/heli/risks/toxics/chemicalsdirectory/en/index1.html>. Acesso em: 08 de Jan. 2019.

WHO. World Health Organization. **The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009**. Disponível em: http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf?. Acesso em: 15 jan. 2019.

ZHOU, C. et al. Does glyphosate impact on Cu uptake by, and toxicity to, the earthworm *Eisenia fetida*? **Ecotoxicology**, [s.l.], v. 21, n. 8, p.2297-2305, set. 20

