



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
Departamento de Farmacologia

KAROLYNE GRAMLICH DE MELO

**Determinação de glifosato em amostras de urina humana pela
derivatização com cloroformato de 9-fluorenilmetilo por cromatografia
líquida com detecção de fluorescência**

Campinas, 2018

KAROLYNE GRAMLICH DE MELO

**DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO EM AMOSTRAS DE URINA
HUMANA PELA DERIVATIZAÇÃO COM CLOROFORMATO DE 9-
FLUORENILMETILO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA COM
DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Farmacologia

ORIENTAÇÃO: PROF. DR. PAULO CÉSAR PIRES ROSA

COORIENTAÇÃO: PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
KAROLYNE GRAMLICH DE MELO,
E ORIENTADO PELO PROF. DR. PAULO CÉSAR PIRES ROSA
E COORIENTADO PELO PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

Campinas, 2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-3371/2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M491d Melo, Karolyne Gramlich de, 1991-
Determinação de glifosato em amostras de urina humana pela derivatização com cloroformato de 9-fluorenilmetilo por cromatografia líquida com detecção por fluorescência / Karolyne Gramlich de Melo. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Paulo César Pires Rosa.

Coorientador: Gilberto de Nucci.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Glifosato. 2. Agrotóxicos. 3. Extração em fase sólida. 4. Urina. 5. Cromatografia líquida. I. Rosa, Paulo César Pires, 1976-. II. De Nucci, Gilberto, 1958-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Determination of glyphosate in human urine samples by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate by liquid chromatography with fluorescence detection

Palavras-chave em inglês:

Glyphosate Agrochemicals
Solid phase extraction Urine
Chromatography, Liquid

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Paulo César Pires Rosa [Orientador]

Natalícia de Jesus Antunes

Fábio Ferreira Perazzo

Data de defesa: 22-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA NÍVEL MESTRADO

KAROLYNE GRAMLICH DE MELO

ORIENTADOR: PAULO CÉSAR PIRES ROSA

COORIENTADOR: GILBERTO DE NUCCI

MEMBROS:

1. PROF. DR. PAULO CÉSAR PIRES ROSA

2. PROF. DR. FÁBIO FERREIRA PERAZZO

3. DRa. NATALÍCIA DE JESUS ANTUNES

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/02/2018

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais por tudo o que fizeram por mim ao longo da vida. Desejo poder ter sido merecedora do esforço dedicado por eles em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação.

Dedico ao meu namorado Eronildo, que sempre esteve presente ao meu lado, aconselhando e apoiando em todos os momentos. Te agradeço por todos estes anos como amigo, namorado e confidente. Amo você!

Ao meu amigo Alberto, por ser esta pessoa maravilhosa, estando sempre ao meu lado desde o começo de minha jornada aqui em Campinas. Com toda certeza sua presença diária ao meu lado fez toda a diferença para chegar até aqui e nossos ótimos momentos de descontração e retardices que só a gente entende.

As minhas amigas Rita (que mesmo longe, sempre esteve presente me apoiando e ajudando no que fosse necessário), Ludmila (melhor parceira de laboratório) e Camila (que tem se tornado uma ótima amiga a cada dia, mesmo não tendo colocado meu nome em sua dissertação. Te perdoo Camiis) por serem parceiras maravilhosas dentro e fora da Unicamp.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Paulo César P. Rosa por ter me recebido e me dado incentivo e ter sido paciente na orientação, além de seus valiosos ensinamentos. Desejo poder contribuir à ciência e ao mundo acadêmico com a mesma ética que me transmitiu.

À minha família, por todo amor, carinho, compreensão e incentivo, por compreenderem minha ausência em certos momentos. Muito obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas e seus professores, por toda a ajuda e por oferecer as melhores condições para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e FAEPEX, pelo apoio financeiro que possibilitou minha dedicação exclusiva para o desenvolvimento do trabalho.

A todos os meus amigos do Departamento de Farmacologia pela amizade e por bons momentos de descontração.

A Associação dos Produtores Rurais de Soja e Milho (Aprosoja) do estado do Mato Grosso, pela parceria, apoio financeiro e contribuição na seleção e na realização das coletas das amostras dos voluntários incluídos neste estudo.

Ao Prof. Dr. Angelo Zanaga Trapé, a bióloga Siomara Regina Jacobucci e Profa Dra Célia R. Garlipp do Laboratório de Toxicologia e Amostras Biológicas/FCM-Unicamp pela parceria e contribuição durante várias etapas do projeto.

Aos secretários Cidinha, Maísa e Gustavo por todo o auxílio e disposição sempre que precisei.

Agradeço ainda a todos os profissionais da academia Cinética Fitness, por terem me oferecido bons momentos de descontração e sempre cuidando de minha saúde e bem-estar com todo carinho e atenção possível.

A todos vocês, meu mais sincero respeito e agradecimento.

Cada um de vocês foi muito importante na realização deste trabalho. Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Nada é tão nosso quanto os nossos sonhos”.

Friedrich Nietzsche

Resumo

Os agrotóxicos são produtos utilizados no controle de fauna e flora que podem interferir negativamente na produção agrícola. No Brasil há uma vasta produção de grãos, tais como milho, soja e feijão e que são utilizados agrotóxicos com o intuito de melhorar e garantir a produção dos mesmos. Entretanto, sabe-se que a exposição a longo prazo com os agrotóxicos pode determinar impactos à saúde, como possíveis intoxicações. Desta forma, considerando os riscos ambientais e saúde, é de supra importância o desenvolvimento de metodologias eficazes e seguras para avaliar e determinar o nível de exposição de agricultores e pecuaristas em contato direto com agrotóxicos. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica para a determinação de glifosato em amostras de urina por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-FL). O procedimento de extração das amostras foi realizado por cartuchos de extração de fase sólida (SPE), apresentando recuperações entre 69,7 e 86,9%. A metodologia analítica foi validada, avaliando-se sua linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade. A faixa de trabalho estava compreendida entre 1,15 e 120,0 ng/mL. O método é linear com coeficiente de determinação 0,9993. O limite de detecção foi de 0,34ng/mL e o limite de quantificação 1,15ng/mL. O método utilizado na análise de 90 amostras de urina provenientes de trabalhadores rurais que tiveram exposição e contato direto ao pesticida glifosato na região de Nova Mutum-MT, onde foram coletadas amostras no período pré, durante e pós exposição. Em todas as amostras foram encontrados resíduos de glifosato no dia da exposição, com faixa de concentração de 1,65 ng/mL e 7,13ng/mL. É importante ampliar as possibilidades de análise em outras matrizes ambientais e humanas (solo, ar, sangue) para auxiliar em uma avaliação mais ampla de possíveis efeitos sobre a saúde da população e sobre o meio ambiente naquela região. Os dados deste estudo são de grande relevância para o planejamento de estratégias de biomonitoramento na região, visto que eventuais exposições humanas podem gerar impactos negativos na saúde de trabalhadores rurais e outros membros da comunidade, bem como possíveis intoxicações.

Palavras-chaves: Glifosato, Agrotóxicos, Extração de Fase Sólida, Urina, CLAE.

Abstract

Pesticides are intended to control pest, weeds and plant diseases carriers that can negatively interfere on agricultural production. In Brazil, pesticides have often been used to improve and ensure its vast production of grains (e.g. corn, soybeans and beans), however, the pesticide exposure can lead to acute poisoning or even long-term health effects. Therefore, the study and development of new methodologies for the evaluation and determination of the exposure level has become crucial, especially for those who have direct contact with such chemicals. In view of the environmental and health risks, the aim of the present work was the development of an analytical methodology for the glyphosate determination in urine samples through a High-Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection (HPLC-FL) approach. The sample extractions were performed using continuous phase extraction cartridges (SPE) and presented a set recovery between 69.7 and 86.9%. The analytical methodology was validated considering its linearity, precision, accuracy, sensitivity and selectivity: the method presented a good linearity with determination coefficient of 0.993, the working range of the assay was from 1.15 to 120.0 ng / mL, detection limit was 0.34 ng/mL and the quantification limit was 1.15 ng / mL. A total of 90 urine samples were collected from farm workers of Nova Mutum (Mato Grosso State, and from Brazil) before, during and after the exposure/direct contact with glyphosate; all after-exposition sample measurements indicated pesticide residues ranged from 1.65 ng / mL to 7.13 ng / mL. To improve and expand the knowledge about the impact of pesticides in that region, it is essential, in future works, to broaden the scope of analysis to other human and environmental sources such as soil, air and blood. The results obtained in this work showed great relevance for the development of a biomonitoring strategy, once the exposure of farm workers and other members of the community to pesticide can generate negative health impacts.

Keywords: Glyphosate, Agrochemicals, Solid Phase Extraction, Urine, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Estrutura, equilíbrio químico e constantes de dissociação do glifosato.....	20
Figura 2. Derivatização do glifosato utilizando o Fmoc-Cl.....	28
Figura 3. Reação simplificada da derivatização do glifosato e AMPA e seus respectivos derivados.....	29
Figura 4. Cromatógrafo líquido de alta eficiência moderno.....	32
Figura 5. Processo absorção e emissão de fluorescência.....	33
Figura 6. Diagrama de energia dos orbitais moleculares para o formaldeído.....	34
Figura 7. Diagrama de Jablonski.....	35
Figura 8. Frequências e comprimentos de onda do espectro eletromagnético.....	37
Figura 9. Funcionamento de um detector de fluorescência.....	37
Figura 10. Localização da região de Nova Mutum (a). Localização de Nova Mutum no Estado do Mato Grosso (b). Localização do Estado do Mato Grosso no Brasil (c)	45
Figura 11. Cromatógrafo utilizado para as análises. a) Fase móvel; b) Detector UV; c) Detector de fluorescência; d) Controlador da bomba; e) Bomba de pressão e fluxo; f) injetor; g) Local das amostras e h) Coluna cromatográfica.....	49
Figura 12. Gráfico de distribuição dos resíduos em função da resposta analítica.....	56
Figura 13. Região no cromatograma situada entre 0,0 e 5,00min, apresentando: o cromatograma do pico do excesso do Fmoc-Cl e do glifosato	57
Figura 14. Cromatograma obtido do LC-MS/MS na concentração de 2ng/mL de glifosato em matriz.....	58
Figura 15. Cromatograma obtido do LC-MS/MS na concentração de 5ng/mL de glifosato em matriz.....	59
Figura 16. Fatores de níveis empregados para garantir melhor ocorrência da reação de derivatização.....	60
Figura 17. Curvas analíticas que serão utilizadas para a determinação de glifosato em água e em urina.....	61

Figura 18. Gráfico de resíduos.....	61
Figura 19. Cromatograma para análise do branco na presença do agente derivatizante Fmoc-Cl e ausência de glifosato.....	62
Figura 20. Análise da seletividade do método na análise da matriz sem a presença de glifosato e derivatizante.....	63
Figura 21. Glifosato em matriz na concentração de 50ng/mL para a avaliação da seletividade do método.....	63
Figura 22. Amostras de urinas armazenadas.....	68
Figura 23. Trabalhadores preenchendo os formulários.....	68
Figura 24. Amostra com sinal positivo para a presença de glifosato.....	69

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Propriedades físico-químicas do herbicida glifosato.....	19
Tabela 2. Efeitos agudos ocasionados pela intoxicação de glifosato.....	24
Tabela 3. Limites e modos de cultura para o glifosato.....	26
Tabela 4. Classes toxicológicas dos agrotóxicos com base na DL ₅₀	26
Tabela 5. Classificação toxicológica para diferentes formulações de glifosato.....	27
Tabela 6. Métodos analíticos para a determinação de glifosato.....	30
Tabela 7. Comparação entre as técnicas analíticas mais utilizadas na determinação de glifosato.....	31
Tabela 8. Propriedades de alguns detectores aplicados na técnica HPLC.....	36
Tabela 9. Informações das amostras de urina coletadas.....	46
Tabela 10. Tabela contendo dados para o preparo da curva analítica matrizada.....	52
Tabela 11. Tabela contendo dados para preparo das amostras fortificadas e para estudo da recuperação.....	54
Tabela 12. Avaliação dos valores LD e LQ	62
Tabela 13. Avaliação da repetitividade e precisão intermediária com matriz fortificada. Médias, coeficientes de variação (CV, %) e desvio padrão.....	64
Tabela 14. Precisão instrumental referente a injeção de glifosato em matriz.....	65
Tabela 15. Ensaio de recuperação com matriz para a repetitividade e precisão intermediária do método.....	66
Tabela 16. Estudo da estabilidade de curta e longa duração em amostras de urina no intervalo de 0h-72h.....	66
Tabela 17. Avaliação da Estabilidade de longa duração e análise pós-processamento.....	67
Tabela 18. Estudo da estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento em amostras de urina.....	67
Tabela 19. Resultados das amostras coletadas no dia da exposição ao glifosato.	69

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

EPA	Agência de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency)
EPI	Equipamento de Proteção Individual (Individual Protection Equipment)
EPR	Erro Padrão Relativo (Relative Standard Error)
GC/MS	Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas (Gas Chromatography - Mass Spectrometry)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC LC	Cromatografia Líquida (Liquid Chromatography)
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (Liquid chromatography–Mass spectrometry)
LMR	Limites Máximos de Resíduos (Limito of Residues)
LD	Limite de Detecção (Limit of Detection)
LQ	Limite de Quantificação (Limit of Quantification)
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto, Seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)
Fmoc-Cl	Cloroformato de 9-fluorenilmetilo (9-Fluorenylmethyl Chloroformate)
SPE	Extração de Fase Sólida (Solid Phase Extraction)
UV	Ultravioleta (Ultraviolet)
HPLC-FL	Cromatografia Líquida com detecção por fluorescência (Liquid Chromatography by Fluorescence)
AMPA	Ácido aminometilfosfônico (Aminomethylphosphonic Acid)
DL ₅₀	Dose letal (Lethal Dose)
ND	Não disponível (Not Available)
UNA	Uso não alimentar (Non-food Use)
TFAA	Ácido anidrido trifluoacético (Trifluoroacetic Anhydride)
TFE	Trifluoroetanol (Trifluoroethanol)

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Agricultura no Brasil.....	18
2.2 Glifosato.....	19
2.3 Toxicocinética, toxicodinâmica no organismo humano.....	21
2.4 Legislação brasileira para o glifosato.....	25
2.5 Determinações analíticas de glifosato.....	27
2.6 Detecção por fluorescência.....	32
2.7 Validação de metodologia analítica.....	38
2.7.1 Seletividade.....	3
2.7.2 Linearidade.....	3
2.7.3 Sensibilidade.....	3
2.7.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	3
2.7.5 Precisão.....	34
2.7.6 Exatidão.....	35
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos Específicos	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 Instrumentação.....	42
4.2 Reagentes e materiais.....	43
4.3 Padrões analíticos.....	43
4.4 Área da coleta.....	43
4.5 Coleta das amostras.....	44
4.6 Preparo das soluções de trabalho.....	45
4.7 Preparo da fase móvel.....	48
4.8 Seleção da coluna cromatográfica e otimização das condições cromatográficas.....	48
4.9 Avaliação das condições ótimas de trabalho.....	49
4.10 Preparo de amostras.....	50

4.11 Validação do método na determinação/quantificação de resíduos do pesticida em urina.....	51
4.11.1 Linearidade.....	51
4.11.2 Seletividade e sensibilidade.....	53
4.11.3 Análise dos solventes e reagentes pelo método de extração com cartuchos SPE.....	53
4.11.4 Ensaio de fortificação e extração com o método de extração para avaliação da precisão, exatidão e recuperação.....	53
4.11.5 Limite de detecção e limite de quantificação.....	54
4.11.6 Estabilidade do analito em matriz biológica e ciclos de congelamento e descongelamento.....	55
4.11.7 Teste F.....	55
5. RESULTADOS.....	57
5.1 Otimização das Condições Cromatográficas.....	57
5.2 Avaliação das Condições Ótimas de Trabalho.....	59
5.3 Resultados da validação do método por detecção por fluorescência para a determinação de glifosato.....	60
5.3.1 Linearidade.....	60
5.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	61
5.3.3 Branco.....	61
5.3.4 Seletividade.....	62
5.3.5. Sensibilidade.....	63
5.3.6 Precisão.....	63
5.3.7 Exatidão e Recuperação.....	65
5.3.8 Estudo de Estabilidade de Curta e Longa Duração e Ciclos de Congelamento e Descongelamento.....	66
5.4 Resultados das Amostras.....	67
6. DISCUSSÕES.....	70
7. CONCLUSÃO	74
8. REFERÊNCIAS.....	76
9. APÊNDICE.....	83

1. Introdução

A agricultura com o passar dos anos se tornou cada vez mais dependente do uso de agrotóxicos. Isso porque a demanda foi se tornando maior devido a necessidade do aumento da produção agrícola acendida pelo aumento da população¹.

Os agrotóxicos podem ser divididos em três classes principais: fungicidas, inseticidas e herbicidas. Nos últimos anos, os herbicidas representaram cerca de 45% dos agrotóxicos comercializados mundialmente² já que muitas produções agrícolas se tornaram dependente do uso de agrotóxicos, como a soja transgênica.

Embora seu uso seja de grande relevância no aumento e qualidade da produção agrícola, estes compostos podem se tornar uma fonte importante de poluição ambiental quando liberados em áreas de cultivo, transporte e até mesmo no armazenamento. Além disso, em grande parte, muitos destes compostos podem e são usados indiscriminadamente em quantidades superiores do que o recomendado pelo receituário agrônômico, para garantir a eficácia do tratamento^{4,5}.

Deste modo, considerando todos os produtos usados como agrotóxicos, o glifosato entre as formulações disponíveis, é o produto mais vendido no mundo e no Brasil, está em primeiro lugar entre os herbicidas mais utilizados, ocupando este ranking desde 2008. O glifosato é o princípio ativo de diversos herbicidas de amplo espectro, o que significa que estes compostos atingem uma grande variedade de plantas. Este composto vem sendo amplamente utilizado desde os anos 70 para o controle de pós-emergente em vários tipos de culturas e em praticamente todas as partes do mundo⁶.

Este herbicida tem sido comercializado em três tipos de formulações. São elas: glifosatoisopropilamônio, glifosato-sesquisódio e glifosato-trimesium. Quando está na forma de sal de amônio ou sódio, o glifosato é um organofosforado que não afeta o sistema nervoso da mesma forma que outros compostos pertencentes a este grupo, em geral, inseticidas inibidores da enzima colinesterase, e por isso, apresenta baixa toxicidade em mamíferos⁷.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica a partir da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-FL) para o glifosato em amostras de urina em agricultores da região de Nova Mutum (MS) que fazem o uso do glifosato nas culturas de soja e que possam estar sujeitos à contaminação pelo glifosato.

2. Revisão da Literatura

2.1 Agricultura no Brasil

Devido à crescente demanda pela produção de alimentos e conseqüentemente na necessidade de maiores áreas de cultivo, o uso equipamentos mais tecnológicos para potencializar a produção agrícola tem se tornado cada vez mais necessário, bem como o maior uso de agrotóxicos¹.

Os herbicidas, por exemplo, são amplamente utilizados na agricultura no controle de plantas invasoras e no aumento na produção agrícola. Deste modo, o processo produtivo agrícola está cada vez mais condicionado ao uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos podendo trazer riscos à saúde, visto que o homem é seu principal receptor. De qualquer forma, estas substâncias são consideradas de extrema importância para o desenvolvimento econômico e agrícola do país⁸.

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente, o Brasil é o maior consumidor de produtos agrotóxicos do mundo. Em decorrência desta importância, tanto em relação à sua toxicidade quanto à escala de uso no Brasil, os agrotóxicos possuem uma ampla cobertura legal e regulatória no país, com um grande número de normas legais.

Dentre as principais culturas produzidas, a soja tem ocupado um espaço cada vez mais em destaque. Esta monocultura exige, além de grandes áreas de cultivo, o uso de defensores agrícolas. Além disso, no final dos anos 90, houve uma expansão agrícola representativa em regiões do Cerrado do centro-oeste, alcançando áreas de floresta e de pastos⁹.

O progresso da fronteira agrícola fez com que ambientes que, até recentemente, possuíam poucos impactos em relação a degradação ambiental e desmatamento em grandes áreas, atualmente vem sofrendo perdas da diversidade de fauna e flora devido a utilização dos agrotóxicos. Estudos têm confirmado a implicação de poluentes, bem como os agrotóxicos, sobre a fauna aquática^{10,11,12,13,14}.

2.2 Glifosato

Um dos herbicidas mais populares e utilizados no mundo é o glifosato, sintetizado pela primeira vez em 1970 pela Monsanto. Sua comercialização foi se expandindo cada vez mais, sendo este, o herbicida mais vendido no mundo tendo registro em órgãos reguladores em mais de 120 países¹⁵, representando aproximadamente 60% do mercado mundial de herbicidas não-seletivos, o que significa que ele mata indistintamente plantas daninhas de folhas largas ou estreitas^{9,16}. O seu sucesso se deve ao fato de que ele apresenta um vasto espectro de ação, o que possibilita um ótimo controle de plantas daninhas¹⁵. Além disso, o Roundup, como é conhecido comercialmente, possui alta eficiência no controle de plantas.

O glifosato [N-(fosfonometil) glicina] possui fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (m.m.=169,1g/mol), densidade aparente de 0,5g/m³, temperatura de fusão de 200°C e ótima estabilidade na presença de luz e em temperaturas superiores a 60°C. Além disso, o herbicida possui alta solubilidade em água (12g/L, 25°C) e pouco solúvel em solventes orgânicos, como a acetona e etanol, seus sais se encontram na forma de sólidos cristalinos em temperatura ambiente^{17,18,19}. Suas propriedades físico-químicas estão resumidas na tabela 1.

Fórmula molecular	$C_3H_8NO_5P$
Massa molar	169,1g/mol
Densidade	0,5g/m ³
Ponto de ebulição	200°C
Solubilidade em água	12g/L, 25°C
Volatilidade	Não volátil
	Acetona:0,078g/L
	Diclorometano: 0,233g/L
Solubilidade em solventes orgânicos	Acetato de etila 0,012g/L
	Hexano: 0,026g/L
	Metanol: 0,231g/L
CAS (Chemical Abstracts Service)	1071-83-6

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do herbicida glifosato⁷.

O glifosato é um organofosforado pertencente ao grupo dos aminoácidos fosfonados e assim como seu precursor, a glicina, apresenta comportamento zwitteriônico. O grupo carboxílico presente nestes compostos apresentam caráter mais fortemente ácido que o grupo amônio²⁰. Em baixos valores de pH (abaixo de 0,8), o glifosato se apresenta com uma protonação no sítio da amina. Em sua primeira constante de dissociação (pH 0,8) tem-se 50% das moléculas possuindo esta protonação e as demais com uma dissociação no grupo fosfato. Deste valor até o pH 2,2, a forma molecular predominante, com uma dissociação de PO₂H e uma protonação em NH₂⁺, onde, em pH 2,2, 50% do composto já apresenta duas dissociações, ainda que mantenha uma protonação no grupo amina. Na faixa de pH entre 2,2 e 5,4, este agrotóxico apresenta predominantemente a forma com suas duas dissociações e com três dissociações a partir de pH 5,5. Do pH 5,5 até 10,2, este composto apresenta três dissociações e acima de pH 11,0 o glifosato apresenta-se totalmente dissociado^{7,20}. As estruturas moleculares, equilíbrio químico e dissociações estão apresentados na figura 1.

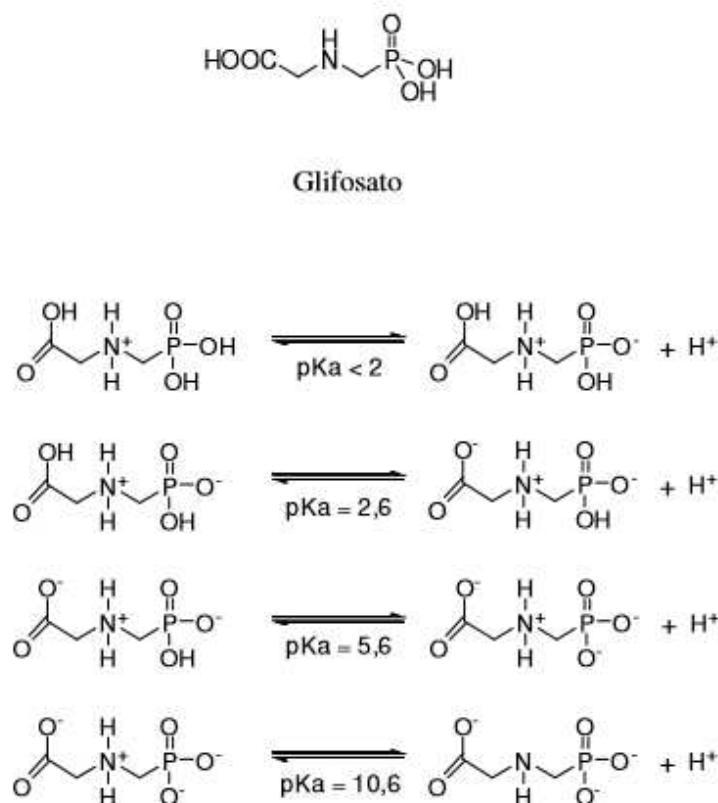


Figura 1. Estrutura, equilíbrio químico e constantes de dissociação do glifosato⁷.

2.3 Toxicocinética e toxicodinâmica no organismo humano

Existem na literatura diversos estudos que descrevem a cinética do glifosato e seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA). Por apresentarem valores de pK_a baixo, ambos são absorvidos no lúmen intestinal. Além disso, cerca de 15-36% da dose oral administrada repetidamente ou unicamente, é absorvida majoritariamente no intestino delgado. Desta maneira, tanto o glifosato como o AMPA são mal absorvidos, mesmo em condições favoráveis²¹.

Quando absorvidos, ambos são distribuídos pelo organismo, onde a concentração plasmática de pico é encontrada em sua maior parte após duas horas de sua administração por via oral em seres humanos. É importante dizer que o glifosato sofre pouca biotransformação no organismo em mamíferos, representando cerca de 0,5-1%, que é convertido em AMPA, pelo metabolismo de bactérias, onde este não é metabolizado no organismo^{21,22}. Por esse motivo, não foi surpreendente quando, em seus estudos, Mesnage *et al.*, 2012²³, não conseguiu detectar o metabólito AMPA em nenhuma das amostras biológicas analisadas.

Quando se trata de risco em potencial, existe um consenso geral de que a exposição deverá se basear na quantidade de herbicida absorvida pelo organismo. Como já mencionado, o glifosato é pouco absorvido pelo organismo humano e mesmo que ocorra, o organismo não metabolizará este composto, indicando que ele não é biologicamente transformado ou fragmentado em diferentes compostos químicos que possam oferecer riscos toxicológicos ao nosso organismo²⁴.

É sabido que para as substâncias que são mal absorvidas pelo trato gastrointestinal, no organismo humano, as fezes representam grande parte da via de eliminação destes compostos. Os níveis de glifosato absorvidos pelo organismo são rapidamente eliminados através da urina, praticamente inalterado. Em casos onde foram constatadas intoxicações por este herbicida, o tempo de meia-vida de eliminação deste composto foi de 2-3 horas, dependendo da quantidade exposta^{21,22}.

Múltiplos estudos sobre a eliminação do glifosato, relataram que por ser um composto que não apresenta acumulação, não houve nenhum efeito significativo após doses orais repetidas de glifosato e AMPA, em relação a administração de uma única dose em camundongos. No caso de sua eliminação dos ossos, pode ser explicada devido à interação

reversível entre o ácido fosfônico, presente no glifosato e AMPA, com os íons cálcio²¹. Ainda em relação a cinética do glifosato, estudos sobre a fisiologia humana, os autores Silbernagel e Despopoulos (2006) consideram um volume diário de urina de 2litros para uma pessoa adulta com massa corporal média de 60kg. Entretanto, este pressuposto apresenta uma grande variabilidade, já que a excreção pode ser maior ou menor dependendo da quantidade de líquido que as pessoas beberam e também, a excreção por outras rotas, como por exemplo, a transpiração que pode ser significativa.

Como já dito, a reabsorção sistêmica do glifosato no intestino é bastante reduzida. Trabalhos publicados por Anado'n, (2009) sugerem uma taxa de absorção de cerca de 20%, o que indica que essa ingestão possa ter sido até cinco vezes maior que a dose interna resultante. Este cálculo pode ser obtido a partir da fórmula:

$$Dose\ Externa\ \left(\frac{\mu g}{kg}\ x\ massa\ corporal\right) = \frac{100\ x\ dose\ interna}{\% absorção\ oral} \quad \text{Equação 1}$$

Seguindo o exemplo de Niemann *et al.* (2015) isso quer dizer que, se uma dose interna de 12μg de uma quantidade totalmente ingerida de 60μg, equivale a uma dose externa de 1μg/kg, isto é, 0,001mg/kg de massa corporal representaria 0,2% da dose diária aceitável. No mesmo estudo, ao realizar análises de urina de operadores e consumidores que tiveram contato direto com o pesticida glifosato, os agricultores apresentaram níveis de exposição de até 233ng/mL, no dia da exposição. Os autores deste estudo constataram que alguns agricultores não tiveram concentrações de glifosato detectáveis nas amostras de urina. De maneira geral, a taxa de valores detectáveis foi de 60% no dia da aplicação e 27% até o terceiro dia após a aplicação.

Ao realizar estudos farmacocinéticos de glifosato em macacos, Wester *et al.* (1991) foram capazes de recuperar aproximadamente 95% das doses de glifosato administradas por via intravenosa.

Em contrapartida, outros estudos analisaram amostras de urinas de aplicadores de glifosato no dia antes, durante e 5 dias após a exposição ao pesticida. Os resultados mostraram que nenhuma das amostras coletadas foram encontrados níveis detectáveis e quantificáveis de glifosato para um limite de detecção de 10ng/mL²⁹.

Cowell e Steinmetz (1990) analisaram as urinas de 15 participantes, onde as urinas foram coletadas por um período de cinco dias (antes, no dia e os três dias após a aplicação). Os resultados revelaram que quatro dos quinze trabalhadores tinham níveis detectáveis de glifosato a partir do dia da aplicação. Contudo, nos outros dias, não foram encontrados valores detectáveis, onde a concentração mais alta encontrada foi de 14ng/mL e a maior dose sistêmica estimada foi de 0,0006mg/kg com um limite de detecção do método de 10ng/mL.

Em seus trabalhos, Wester *et al.* (1991) revelou que uma outra possível via de exposição ao glifosato pelo contato dérmico. Entretanto, outros estudos revelaram que a superfície de pele de animais e de humanos realizados *in vitro*, indicaram uma absorção percutânea menor do que 2%²⁸.

O mecanismo de ação do glifosato e suas formulações ainda são pouco conhecidos. Uma das razões se deve ao fato de que existe uma grande variedade de sais de glifosato. Além disso, há uma grande variedade de produtos inertes e concentrações presentes nestes produtos, o que torna ainda mais difícil elucidar seu modo de ação³².

O glifosato não inibi a enzima acetilcolinesterase, apesar de ser classificado como organofosforado. Por isso, não oferece efeitos decorrentes ao acúmulo de acetilcolina no organismo²². O glifosato proporciona o aumento dos níveis de consumo de oxigênio, da atividade ATP-ase, interrompe a atividade da enzima aromatase, responsável pela produção de estrógenos, gera alteração dos níveis de RNAm e reduz os níveis hepáticos do citocromo P450. Devido a redução dos níveis de P450, há uma interferência no metabolismo de alguns fármacos, que pode acarretar em uma predisposição para porfirias³³.

Em relação a efeitos agudos provocados pelo glifosato em seres humanos, a tabela 2 apresenta algumas manifestações clínicas presentes por esta intoxicação.

Região	Sintomas
Cardiovascular	Choque, disritmia, taquicardia, palpitações, arritmia ventricular, hipotensão, bradicardia e parada cardíaca.
Sistema nervoso central	Alteração da consciência e estado mental, letargia.
Dermatológico	Irritação, piloereção, eritema, dermatite de contato.
Endócrino	Acidose metabólica, hipertermia, elevação da amilase sérica e desidrogenase láctica.
Ocular	Conjuntivite, edema periorbitário.
Genitounrinário	Necrose tubular aguda, insuficiência renal, hematúria, oligúria, anúria.
Hematopoético	Leucocitose.
Respiratório	Hipóxia, lesão pulmonar aguda, irritação, erosão das mucosas do trato respiratório, sensibilidade na via respiratória superior, broncoespasmo.
Gastrointestinal	Náuseas, vômitos, hiperemia da mucosa, odinofagia, aumento da salivação erosão, ulceração, gastrite.

Tabela 2. Efeitos agudos ocasionados pela intoxicação de glifosato²².

Embora a toxicidade do glifosato seja considerada baixa, DL₅₀ 5.600mg/kg (oral aguda em ratos) e 5.000mg/kg (dermal aguda em ratos), alguns autores têm sugerido que este herbicida possa apresentar alguns efeitos crônicos^{21,22}. De acordo com Brasil, 2003, a dose diária aceitável por massa corpórea do glifosato é de 0,042mg/kg.

Os efeitos crônicos do glifosato foram estudados a partir de ratos expostos oralmente a este herbicida por um tempo de 24 meses na faixa de concentração entre 0 e 30.000mg/kg. Os resultados destes estudos revelaram que 8.000mg/kg ou 409mg/kg/dias foi estabelecido como as concentrações em que são observados efeitos adversos. Estes estudos

foram importantes para classificar o glifosato na categoria “E”, categoria que não apresenta evidências de carcinogenicidade em humanos, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA)^{33,36}.

2.4 Legislação brasileira sobre o glifosato

No Brasil, o glifosato apresenta uma ampla cobertura legal e regulatória no país, onde o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), publicou normas estabelecendo limites máximos de resíduos para o glifosato em culturas. Tipos de culturas empregadas, modos de emprego, limites e intervalo de segurança estão resumidos na tabela 3. No caso da soja, por exemplo, o limite máximo de resíduos (LMR) de glifosato levou em conta os resultados de análises feitas por laboratórios credenciados nas redes oficiais da Anvisa e/ou Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A saber: Instituto Adolfo Lutz (SP); Embrapa/Meio Ambiente, Jaguariúna (SP); Unicamp, Campinas (SP); e CEPPA, Curitiba (PR). Estas análises seguiram metodologias validadas internacionalmente e apresentaram resultados com o limite máximo de resíduos de glifosato que foi estabelecido pelo Ministério da Saúde.

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança
Algodão	Pós-emergente	3,0	ND
Ameixa	Pós-emergente	0,2	17 dias
Arroz	Pós-emergente	0,2	ND
Aveia preta	Dessecante	20,0	4 dias
Azevém	Dessecante	10,0	4 dias
Banana	Pós-emergente	0,02	30 dias
Cacau	Pós-emergente	0,1	30 dias
Café	Pós-emergente	1,0	15 dias
Cana-de-açúcar	Maturador	1,0	30 dias
Cana-de-açúcar	Pós-emergente	1,0	ND
Citros	Pós-emergente	0,2	30 dias
Coco	Pós-emergente	0,1	15 dias

Feijão	Pós-emergente	0,05	ND
Fumo	Pós-emergente	UNA	UNA
Maçã	Pós-emergente	0,2	15 dias
Soja	Dessecante	10,0	7 dias
Soja	Pós-emergente	10,0	ND

Tabela 3. Limites e modos de cultura para o glifosato³⁴. (ND-não disponível; UNA- uso não alimentar).

A Anvisa estabeleceu uma ingestão diária de 0,042mg/kg de massa corpórea³⁴. Em relação a modalidade de emprego, o glifosato também pode ser utilizado em margens de rodovias e ferrovias, áreas sob a rede de transmissão elétrica, pátios industriais e oleodutos e aceiros. Este órgão ainda estabeleceu uma classificação toxicológica dos agrotóxicos com base na DL₅₀ e que está apresentada na tabela 4. Foram estabelecidos também a classificação toxicológica para o glifosato de acordo com suas formulações exibida na tabela 5.

Classe	Classificação	Cor da faixa do rótulo presente na embalagem
I	Extremamente tóxico (DL ₅₀ menor que 50 mg/kg de peso vivo)	Vermelho
II	Altamente tóxico (DL ₅₀ de 50 mg a 500 mg/kg de peso vivo)	Amarelo
III	Medianamente tóxico (DL ₅₀ de 500 mg a 5.000 mg/kg de peso vivo)	Azul
IV	Pouco tóxico (DL ₅₀ maior que 5.000 mg/kg de peso vivo)	Verde

Tabela 4. Classes toxicológicas dos agrotóxicos com base na DL₅₀¹. ¹A dose letal (DL₅₀) é a dose de uma substância, expressa em mg/kg de peso vivo, necessária ingerir ou administrar para provocar a morte de pelo menos 50% da população em estudo³⁴.

Formulação	Classe toxicológica	CAS
Glifosato - sal de isopropilamina	IV	38641-94-0
Glifosato - sal de potássio	III	39600-42-5 ou 70901-12-1
Glifosato - sal de amônio	IV	114370-14-8

Tabela 5. Classificação toxicológica para diferentes formulações de glifosato³⁴.

Em relação a legislação de limites aceitos de glifosato em água, a Brasil, 2003, estabeleceu limites da classe III de 0,28mg/L em corpos d'água. Em águas potáveis destinadas ao consumo humano a concentração limite deste herbicida é de 0,500mg/L.

2.5 Determinações analíticas para o glifosato

Nos últimos anos, vários trabalhos relataram impactos negativos no uso urbano tendo sua aplicabilidade em ruas, calçadas e asfaltos, já que são superfícies impermeáveis podendo gerar riscos em escala local¹⁸.

Desta maneira, devido ao vasto uso deste pesticida, tem-se a importância em desenvolver e aplicar metodologias confiáveis para o monitoramento do glifosato nas lavouras e afins. Sendo assim, um dos trabalhos de Helle e Chmelka. (2013) relataram que a determinação do glifosato geralmente é realizada utilizando a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplado à sistemas multidimensionais de detecção seletiva em massa (MS/MS). Porém, devido ao fato do herbicida glifosato ser um composto orgânico de alta polaridade, ausência de grupos cromóforos e valores de pK_a de 0,78; 2,29; 5,96 e 10,98³⁷ há a dificuldade de separá-lo e aplicar parâmetros cromatográficos adequados, a partir de técnicas cromatográficas como a cromatografia gasosa (CG), Cromatografia Líquida (LC) e equipamentos com detecção por UV-vis^{38,39,40,41}.

Por isso, a derivatização com cloreto de 9-fluorrenilmetiloxycarbonilo (Fmoc-Cl) (Figura 2) é uma técnica recomendada para se alcançar a sensibilidade e seletividade, objetivando a melhora na separação cromatográfica dos analitos, seguido da detecção por fluorescência ou por espectrometria de massa⁴².

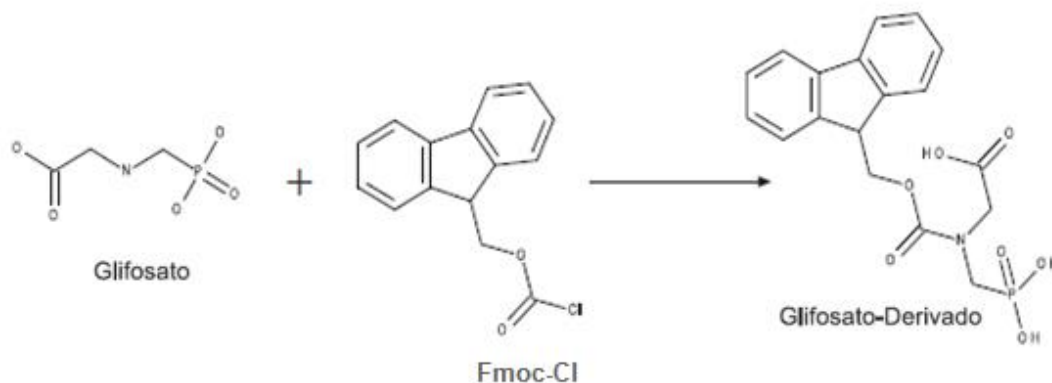


Figura 2. Derivatização do glifosato utilizando o Fmoc-Cl⁴².

A derivatização é uma reação química utilizada para alterar a propriedade de uma substância, tornando-a com propriedades cromatográficas melhoradas⁴³. É sabido que para amostras de água a derivatização combinada com injeção direta no sistema de análise é realizada com sucesso. Porém, para análise de resíduos de glifosato e AMPA em alimentos, Helle e Chmelka (2013) propuseram em seu método a derivatização com Fmoc-Cl utilizando o sistema de extração SPE com o intuito de garantir a purificação dos compostos permitindo que a determinação/análise fosse precisa e confiável.

Trabalhos revelaram que reações de derivatização com a proporção de 1:1 de analito e Fmoc-Cl são ineficazes⁴⁴. Nos estudos realizados por Cantrinck *et al.* (2014) foram utilizadas proporções maiores do Fmoc-Cl em relação ao analito, e pode se concluir que proporções mais elevadas do agente derivatizante houve aumento significativo de absorção na faixa de detecção UV a 210nm.

Como já dito, para realizar análises por UV-Vis de glifosato e AMPA também é necessária à reação de derivatização, já que estes compostos não apresentam grupos cromóforos. Entretanto, além de reações de derivatização requererem um longo tempo para a homogeneização, essas técnicas cromatográficas possuem alto custo. Por isso, é necessário à otimização de técnicas simples e eficientes para a derivatização de glifosato com Fmoc-Cl para análises cromatográficas.

A molécula de glifosato apresenta ligações covalentes do tipo C=O e P=O. Estas ligações podem obter absorbância no intervalo ultravioleta de 198nm a 202nm³⁸. Deste modo, os demais componentes do meio reacional não interferem na absorbância,

comprovando a importância da derivatização do glifosato para maior sensibilidade da técnica utilizada⁴¹.

A análise cromatográfica e variações na absorvância após a reação de derivatização não são influenciadas por diferentes tempos de reação, de tal forma que após a homogeneização pode-se iniciar imediatamente sua análise^{38,44}. Em outra abordagem, Ghanem, 2007, também realizou a derivatização com Fmoc-Cl em glifosato e AMPA e analisados por cromatografia líquida (CL), sendo este o primeiro método realizado em resíduos de esgoto.

Outra abordagem para a derivatização do glifosato envolve a utilização da mistura de anidrido trifluoacético (TFAA) e trifluoroetanol (TFE) em excesso (figura 2), que é conhecida em converter o glifosato e AMPA em apenas uma única etapa de reação, onde seus derivados são suficientemente voláteis para análises em GC/MS⁴⁵.

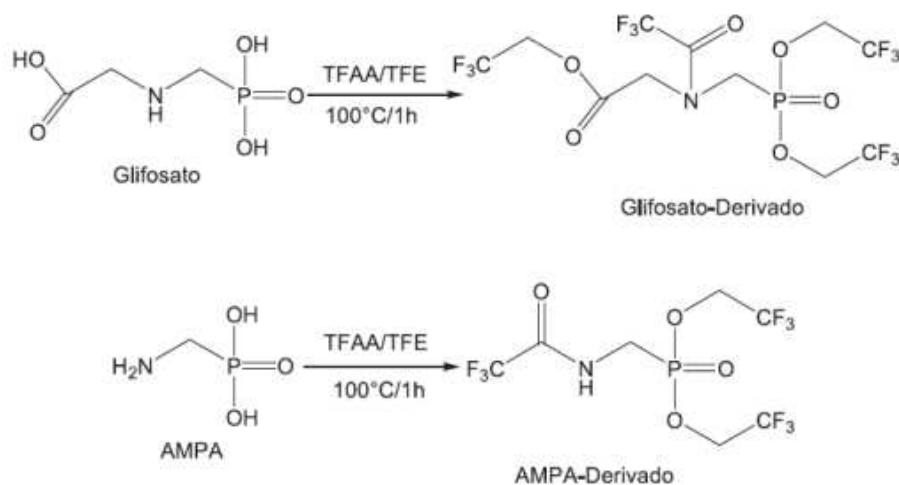


Figura 3. Reação simplificada da derivatização do glifosato e AMPA e seus respectivos derivados¹⁶.

Além dos trabalhos já mencionados acima, existem inúmeras análises com o herbicida glifosato com técnicas analíticas e metodologias desenvolvidas descritos em diferentes matrizes e que pode ser observado na tabela 6.

Matriz	Analito	Extração	Técnica analítica	Recuperação (%)	LD	Referências
Urina	Glifosato	LLE	HPLC-MS/MS	69-78%	1 µg/L	46
Urina	Glifosato, atrazina e TCP	SPME	HPLC-FL	85-117%	0,9 µg/L	47
Urina	Glifosato	LLE	GC-MS/MS	95%	0,15 µg/L	48
Água e solo	Glifosato e AMPA	LLE	GC-MS/MS	85-111%	0,1 µg/L	40
Água de esgoto	Glifosato e AMPA	LLE	HPLC-FL	-	0,1 µg/L	18
Soja e milho	Glifosato e AMPA	SPE	LC-MS/MS	85-118%	0,5 µg/L	39
Água de esgoto	Glifosato e AMPA	SPE	LC-ESI-MS/MS	63-70%	20 µg/L	44
Cereais	Glifosato	SPE	HPLC-FL	86%	0,5 µg/L	49
Cenoura, água e solo	Glifosato, AMPA e glufosinato	LLE	GC-FPD	91-106%	-	50
Água	Glifosato e AMPA	SPE (troca iônica)	HPLC-FL	-	14 µg/L	51
Urina	Glifosato e outros organofosforados	QuEChERS	LC-MS/MS	61-125%	-	52
Água	Glifosato, AMPA e glufosinato	SPE	HPLC-FL	92-107%	0,2 µg/L	53

Tabela 6. Métodos analíticos para a determinação de glifosato. LLE- extração líquido-líquido; SPE- extração em fase sólida; SPME- micro extração com simples gota; HPLC-FL- cromatografia líquida de alta performance com detector de fluorescência; LC-MS/MS- cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; LC-ESI-MS/MS- cromatografia líquida eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas; GC-FPD- cromatografia gasosa com detector fotométrico de chamas; GC-MS/MS- cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas.

As técnicas analíticas mais utilizadas para a determinação de glifosato encontradas na literatura são: cromatografia gasosa, cromatografia líquida e eletroforese capilar. Todas são extremamente úteis para as análises em resíduos de agrotóxicos, apesar de apresentarem vantagens e desvantagens, listadas na tabela 7.

Técnica	Vantagens	Desvantagens	Soluções analíticas
GC	- Alta sensibilidade e seletividade; - Alto poder de separação dos analitos;	- Inadequado para substâncias polares e de baixa volatilidade; - Alto consumo de gases de alta pureza	- Derivatização
LC	- Grande variedade de fases móveis e estacionárias; - Capacidade de automação e miniaturização; - Aplicação para qualquer solução orgânica, independente da volatilidade e estabilidade térmica	- Eficiência e seletividade insuficiente; - Uso excessivo de solventes e toxicidade de fase móvel;	- Desenvolvimento de coluna mais eficientes e seletivas - Derivatização
EC	- Alta resolução dos picos e poder de separação; - Baixo consumo de solventes tóxicos e de custo elevado - Capacidade de automação e miniaturização;	- Inadequados limites de detecção	- Pré-Concentração da amostra; - Desenvolvimento de metodologias com combinação de detectores com alta seletividade

Tabela 7. Comparação entre as técnicas analíticas mais utilizadas na determinação de glifosato¹⁹. GC- Cromatografia gasosa; LC- Cromatografia líquida; EC- Eletroforese capilar.

2.6 Detecção por Fluorescência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) é uma das principais técnicas empregadas para o monitoramento de compostos não voláteis e/ou termicamente estáveis por apresentar alta seletividade e sensibilidade em diferentes detectores. Com esta técnica tornou-se possível a detecção da maioria dos compostos e a análise de traços em amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos, petróleo⁵⁴. A figura 4 apresenta um diagrama de um cromatógrafo líquido moderno.

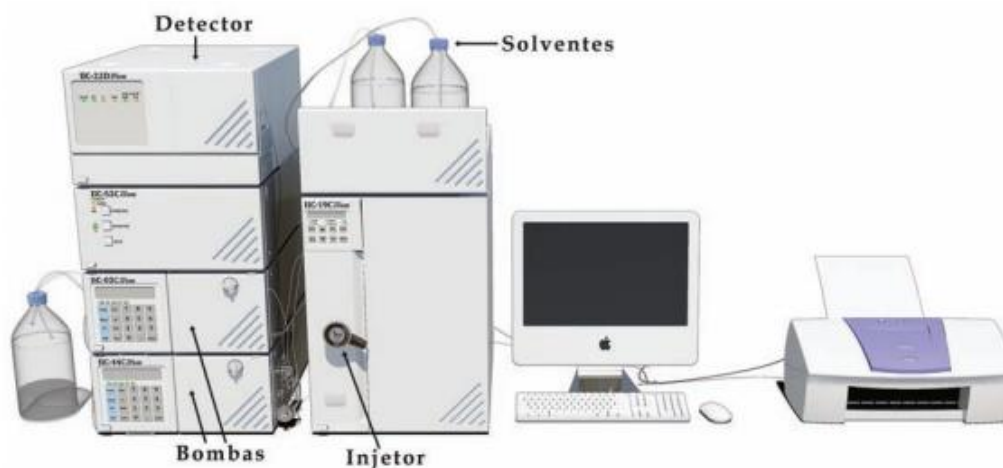


Figura 4. Cromatógrafo líquido de alta eficiência moderno¹⁹.

Embora o detector de espectrometria de massas seja amplamente utilizado por possibilitar a detecção de baixos níveis de concentração, esses sistemas são de custo elevado, tornando sua disponibilidade limitada em boa parte dos laboratórios de pesquisas brasileiras. Desta maneira, o desenvolvimento de metodologias analíticas eficientes e confiáveis pode ser realizada utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência por ser uma técnica amplamente disponível e de sensibilidade de 10 a 1000 vezes maior se comparada com a detecção por UV-vis⁵⁴.

As moléculas apresentam uma determinada configuração eletrônica onde a energia total é a menor possível. O estado em que esta molécula se apresenta é chamado de estado fundamental. Ao incorporar radiação, esta molécula absorve esta energia assumindo uma nova configuração de maior energia, chamado de estado excitado. Ao voltar para o estado fundamental esta molécula pode ou não liberar a energia absorvida. A transição em que se

observa a emissão de fótons é chamado de fluorescência. A figura 5 apresenta o processo de absorção e emissão de fótons⁵⁵.

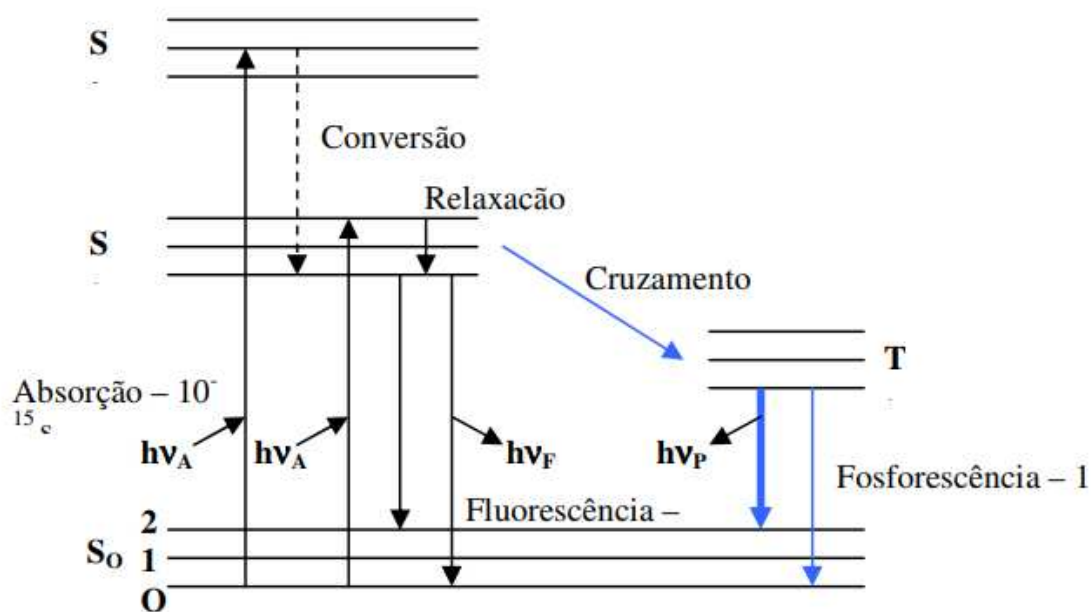


Figura 5. Processo absorção e emissão de fluorescência⁵⁵.

Para entender o funcionamento destas transições, faz-se necessário o entendimento sobre os orbitais moleculares. A ligação σ pode ser formada a partir dos orbitais atômicos s ou por um s e um p. Este é chamado de orbital σ . O orbital π é formado a partir da sobreposição de dois orbitais atômicos p. Ao absorver energia necessária para que seja possível requerer a passagem de um elétron π para um orbital não ocupado é conhecido como π^* , e a transição é conhecida como $\pi \rightarrow \pi^*$. Uma molécula pode apresentar ainda elétrons não ligados (orbitais moleculares n/ não-ligantes). Esta transição é conhecida como $n \rightarrow \pi^*$. Geralmente a energia destas transições apresentam a seguinte ordem:

$$n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$$

Existem dois tipos importantes de orbitais na espectroscopia de absorção e fluorescência, são eles: HOMO, que representa o orbital molecular ocupado de maior energia e LUMO, o orbital molecular não ocupado de menor energia. Estes dois orbitais se referem ao estado fundamental da molécula. A figura 6 apresenta as possíveis transições para o formaldeído⁵⁵.

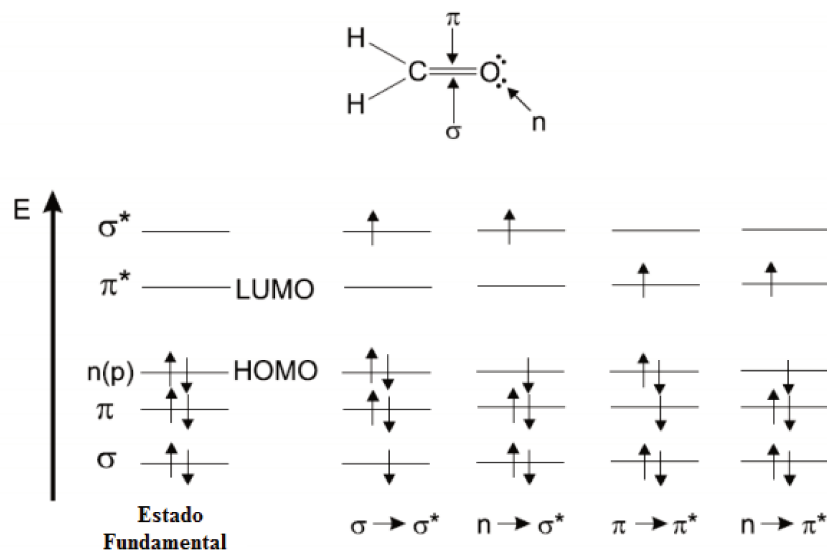


Figura 6. Diagrama de energia dos orbitais moleculares para o formaldeído⁵⁵.

Quando ocorre a excitação da transição $n \rightarrow \pi^*$, um elétron é removido do átomo de oxigênio indo para o orbital π^* , onde este encontra-se entre os átomos de carbono e oxigênio. Para a molécula de formaldeído, os orbitais ligantes e não-ligantes são localizados em pares de átomos. A sobreposição de orbitais π permite que os elétrons estejam deslocalizados. Como não há sobreposição entre os orbitais σ e π , o sistema de elétrons entre eles pode ser considerado independentes. Desta maneira, quanto maior for o sistema de elétrons π , menor será a energia de transição $\pi \rightarrow \pi^*$, ou seja, isto quer dizer que maior será o comprimento de onda da banda de absorção correspondente⁵⁵. A figura 7 ilustra o diagrama de Jablonski, onde a fluorescência ocorre em energias menores ou comprimentos de onda maiores.

O tempo de vida de fluorescência e o rendimento quântico é a motivo do número de fótons emitidos em relação ao número de fótons absorvidos. Compostos com alto rendimento quântico apresentam uma emissão visivelmente brilhante. Este tempo determina o tempo em que os fluoróforos estará disponível para que ele interaja ou difunda-se no meio disponibilizando a informação de sua emissão⁵⁵.

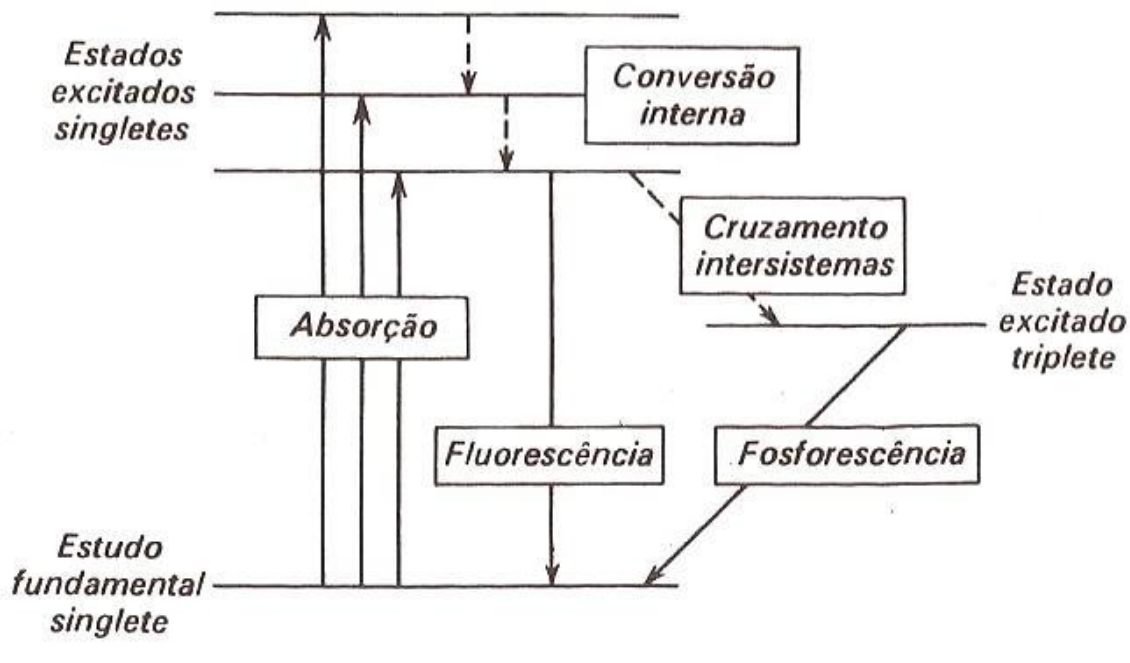


Figura 7. Diagrama de Jablonski¹⁰¹.

A partir do diagrama de Jablonski, pode-se definir uma taxa de emissão radiativa de um fluoróforo dada por Γ e não radioativa dada por k_{nr} . Ambas as taxa são responsáveis pela despopulação do estado excitado. A equação 2 indica que quanto menor for o valor a taxa não radioativa, maior será o valor do rendimento quântico, onde $0 \leq \Phi \leq 1$. O rendimento quântico pode ser tão próximo da unidade quanto menor for a taxa de decaimento não radiativo. A fração de fluoróforos que decaem através da emissão de fótons é dada pela equação 2.

$$\Phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad \text{Equação 2}$$

Os detectores de fluorescência apresentam grandes vantagens em relação a outros métodos de espectroscopia, já que possuem maior sensibilidade, um amplo espectro de análise e o erro inerente à medição é praticamente constante em todo o intervalo de resposta. A taxa de emissão de fluorescência é tipicamente na ordem de 10^{-8} segundos e a taxa de do tempo de vida da fluorescência é de 10^{-9} s. Além disso, espera-se uma alta intensidade de fluorescência de compostos que sejam conjugados simetricamente ou que não podem gerar estruturas fortemente iônicas. Outro fator relevante sobre o uso destes detectores se refere a

qualidade da fase móvel empregada, pois caso haja impurezas provenientes deste solvente o detector pode absorver, diminuindo a sensibilidade do mesmo para os componentes da amostra. Do mesmo modo, os detectores de fluorescência ainda possuem outras vantagens em relação aos outros detectores que também são utilizados pela técnica HPLC¹⁹. A tabela 8 resume estas propriedades.

Característica	UV-vis	Índice de Refração	Fluorescência	Eletroquímico
Modo de operação	Absorbância de luz na faixa do UV-vis	Mudanças no índice de refração da fase móvel	Emissão fluorescente após excitação de luz	Oxidação ou redução em potencial fixo
Seletividade	Seletivo	Universal	Altamente seletivo	Seletivo
Limite mínimo detectável (g/mL)	10^{-9} e 10^{-10}	10^{-7}	10^{-9} até 10^{-12}	10^{-12}
Sensibilidade à temperatura	Baixa	Alta	Baixa	Média
Sensibilidade à fase móvel	Não	Não	Não	Sim
Utilidade com gradientes	Sim	Não	Sim	Não
Tipos de compostos	Compostos que absorvem na região de trabalho	Compostos em geral	Compostos ou derivados que fluorescem	Espécies que se oxidam ou se reduzem

Tabela 8. Propriedades de alguns detectores aplicados na técnica HPLC¹⁹.

Os compostos fluorescentes (fluoróforos) são divididos em duas classes; intrínsecos e extrínsecos. Fluoróforos intrínsecos são compostos que emitem luz naturalmente. Já os fluoróforos extrínsecos emitem luz geralmente na faixa de comprimento de onda do espectro visível, ou seja, entre o infravermelho e o ultravioleta⁵⁵. Para compostos orgânicos, a fluorescência ocorre tipicamente em estruturas aromáticas alifáticos contendo carbonila ou

duplas ligações altamente conjugadas e estruturas rígidas⁵⁴. A figura 8 apresenta as frequências e comprimentos de onda do espectro eletromagnético.

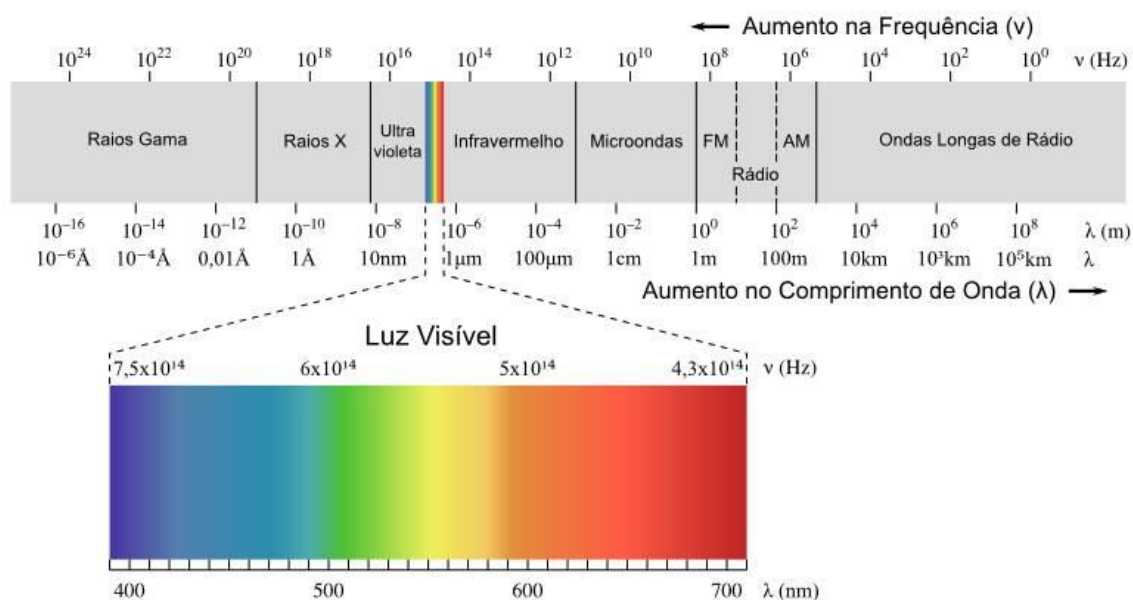


Figura 8. Frequências e comprimentos de onda do espectro eletromagnético⁵⁴.

Em relação ao funcionamento dos detectores de fluorescência, estes se baseiam em uma lâmpada de excitação seguida por um filtro ou rede de difração por onde passa somente o comprimento de onda excitante. Um outro filtro secundário é escolhido para eliminar o comprimento de onda excitante, mas deixa passar o comprimento de onda emitido pela amostra⁵⁴. A figura 9 apresenta o esquema de funcionamento do detector de fluorescência.

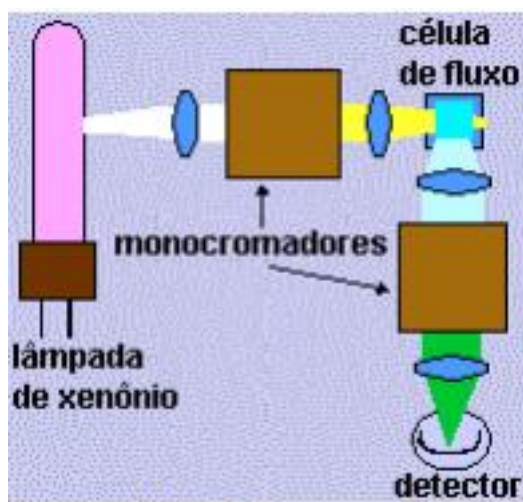


Figura 9. Funcionamento de um detector de fluorescência¹⁹.

2.7 Validação de Metodologia Analítica

Validação analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos⁵⁶. A validação de métodos bioanalíticos deve conter ensaios de precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade⁵⁷.

2.7.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar os analitos de interesse na presença de componentes presentes na amostra e que podem interferir na sua determinação em amostra complexa. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Por isso, a seletividade precisa estar assegurada para que não sejam comprometidos os resultados dos parâmetros da linearidade, precisão e exatidão. A seletividade pode ser avaliada comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância padrão, onde, neste caso, nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção do analito de interesse⁵⁸.

2.7.2 Linearidade

É a capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras, em um intervalo de concentração. Um dos modelos matemáticos utilizado para avaliar a linearidade é descrever esta dependência e o ajuste desta equação por método dos mínimos quadrados ordinários⁵⁹. A equação da reta que relaciona os parâmetros de regressão a e b é dada por:

$$y = ax + b \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

y = Área do pico;

x = Concentração;

a = Inclinação da curva de calibração (sensibilidade);

b = Interseção com o eixo y , quando $x=0$.

O coeficiente de determinação (r^2) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo obtido. A faixa de trabalho de um método é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito onde foi possível ser demonstrado a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificados no ensaio⁵⁹.

2.7.3 Sensibilidade

A sensibilidade demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e que pode ser expressa pela inclinação da reta de regressão de calibração⁵⁹.

2.7.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, devido a presença de erros muito grandes⁵⁸. O LD pode ser obtido a partir de parâmetros da curva analítica que é expressa da seguinte forma:

$$LD = \frac{PDa \times 3,3}{IC} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

PDa = Desvio padrão do coeficiente linear da equação;

IC = Coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis⁵⁹. O LQ pode ser obtido através dos parâmetros da curva analítica e que é expressa como:

$$LD = \frac{PDa \times 10}{IC} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

PDa = Desvio padrão do coeficiente linear da equação;

IC = Coeficiente angular da curva analítica.

2.7.5 Precisão

A precisão de um método avalia a homogeneidade nos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra em condições definidas. Geralmente é definida por meio da repetitividade e reprodutibilidade sendo expressas pelo coeficiente de variação relativo (CV) e que pode ser expresso como⁵⁹:

$$cv(\%) = \frac{S}{x} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

S = Estimativa do desvio-padrão absoluto;

x = Média aritmética do número de medições das determinações.

2.7.6 Exatidão

A exatidão é medida como a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceita como convencionalmente verdadeiro. A avaliação da exatidão pode ser realizada através de ensaios de recuperação⁵⁹.

Para a validação de métodos bioanalíticos, a exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 5 (cinco) replicatas em, pelo menos, 5 (cinco) concentrações que abrangem a faixa de trabalho em níveis de baixa, média e alta concentração⁵⁷. A exatidão é expressa pelo erro padrão relativo (EPR):

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

Equação 7

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Este projeto propõe desenvolver e validar metodologia analítica para a determinação de amostras de urinas que podem conter resíduos de glifosato, de agricultores e produtores rurais na região norte do Mato Grosso, que tiveram exposição a longo prazo (maior que um ano) ao pesticida glifosato empregando como preparo de amostra método de extração em fase sólida e determinação analítica por método cromatográfico.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Desenvolver metodologia analítica por cromatografia líquida com detector de fluorescência para o glifosato;

3.2.4. Otimização dos parâmetros instrumentais para a detecção e quantificação dos agrotóxicos empregando todos os sistemas citados anteriormente empregando o método extração por cartucho SPE;

3.2.5. Elaborar planejamento experimental empregados para a otimização dos métodos;

3.2.6. Avaliar a precisão, exatidão, seletividade e sensibilidade do método analítico para a detecção e quantificação do analito de interesse;

3.2.7. Aplicar a metodologia proposta em amostras de urina e verificar a existência ou não do agrotóxico estudado considerando as concentrações acima do limite de quantificação estabelecido a ele.

4. Materiais e Métodos

Este trabalho foi realizado nos laboratórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

4.1 Instrumentação

1. Centrífuga refrigerada Jouan CR 4i, Thermo Electron Corporation (Ohio, USA);
2. Ultra-som Ultronique - Q3.0/40;
3. Balança analítica de precisão modelo Adventurer Ohaus modelo AR2140, com resolução de 0,0001g, calibrada junto à RBC (Rede Brasileira de Calibração),
4. Micropipeta eletrônica Peguepet, com faixa de trabalho de 100 a 1000 μ L, calibrada junto à RBC (Campinas, SP);
5. Micropipeta eletrônica Labmatesoft, com faixa de trabalho de 10 a 100 μ L, calibrada junto à RBC, (Campinas, SP);
6. Micropipeta eletrônica Pequpet , com faixa de trabalho de 100 a 5000 μ L, calibrada junto à RBC, (Campinas-SP);
7. Agitador orbital tipo vortex, modelo AP-56, Phoenix (Araraquara- SP);
8. Freezer Electrolux, modelo DC49A, com capacidade para atingir temperatura de -30° C (Estocolmo, Suécia);
9. Sistema de purificação de água Direct-Q UV3 Millipore (Molsheim, França);
10. Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência LC-6AD, Waters, composto por: injetor automático modelo 717*plus* Autosampler; detector fluorescência 2475; e Sistema de aquisição de dados através do software Waters Empower™ 3 (G. Bookham, Reino Unido).
11. Coluna cromatográfica Kromasil C18 (150mm x 4,6 mm) Thermo Electron Corporation.

4.2 Reagentes e Materiais

1. Acetonitrila grau HPLC, pureza mínima 99,0%, Lichrosolv, Merck (Darmsdat, Alemanha);
2. Cloroformato de 9-fluorenilmetilo 99,0%, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA);
3. Metanol grau HPLC, pureza mínima 99,0%, J. T. Baker (Xalostoc, México);
4. Ácido fórmico 85%, Êxodo Científica (Ohio, EUA);
5. Tetraborato de sódio decahidratado 99,0% (Sigma- Aldrich);
6. Fosfato de Potássio Bifásico PA. 99.0% ACS. Êxodo Científica (Hortolândia-SP);
7. Fosfato de Sódio monobásico anidro 99,0%. Vetec (Sigma- Aldrich);
8. Vials 9mm-12x32mm, 2mL. Flowsupply
9. Água destilada;
10. Água purificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade 18,2 MW cm);
11. Tubo de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 45 mL (Sarstedt, Alemanha);
12. Tubo de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
13. Tubos de centrífugos graduados de 2,0 mL de polipropileno, tipo Eppendorf (Sarstedt, Alemanha);
14. Balões volumétricos calibrados junto à RCB de 10, 25, 50, 100 e 1000 mL.
15. Espátulas metálicas;
16. Garrafas lavadeiras;
17. Proveta de 1000 mL;
18. Grades para tubo de 2,0 e 50 mL;
19. Cartuchos SPE Waters OASIS, HLB Catridge, 30 µm Particle Size (Massachusetts, EUA);
20. pHmêtro Kasvi, modelo K39-2014B (Sarstedt, Alemanha).

4.3 Padrões Analíticos

Todos os padrões analíticos utilizados neste trabalho apresentam grau de pureza superior a 98% e foram adquiridos, a partir de doação da empresa Syngenta®, da Sigma-Aldrich (Sant Louis, EUA).

As soluções analíticas estoque do agrotóxico glifosato foram preparadas através da dissolução em água de 10mg de padrão para um volume final de solução de 10mL.

4.4 Área da Coleta

A área da coleta das amostras corresponde ao município de Nova Mutum, região localizada no Estado do Mato Grosso, 242km ao norte de Cuiabá, capital do estado. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)⁶⁰, a cidade possui 42.607 habitantes.

De acordo com a Prefeitura Municipal de Nova Mutum, a principal fonte da economia é a agricultura, focando na produção de soja, milho e algodão, sendo esta, a segunda região de maior produção de grãos do estado e um dos maiores do Brasil. A figura 10 apresenta a região de onde foram coletadas as amostras de urina.

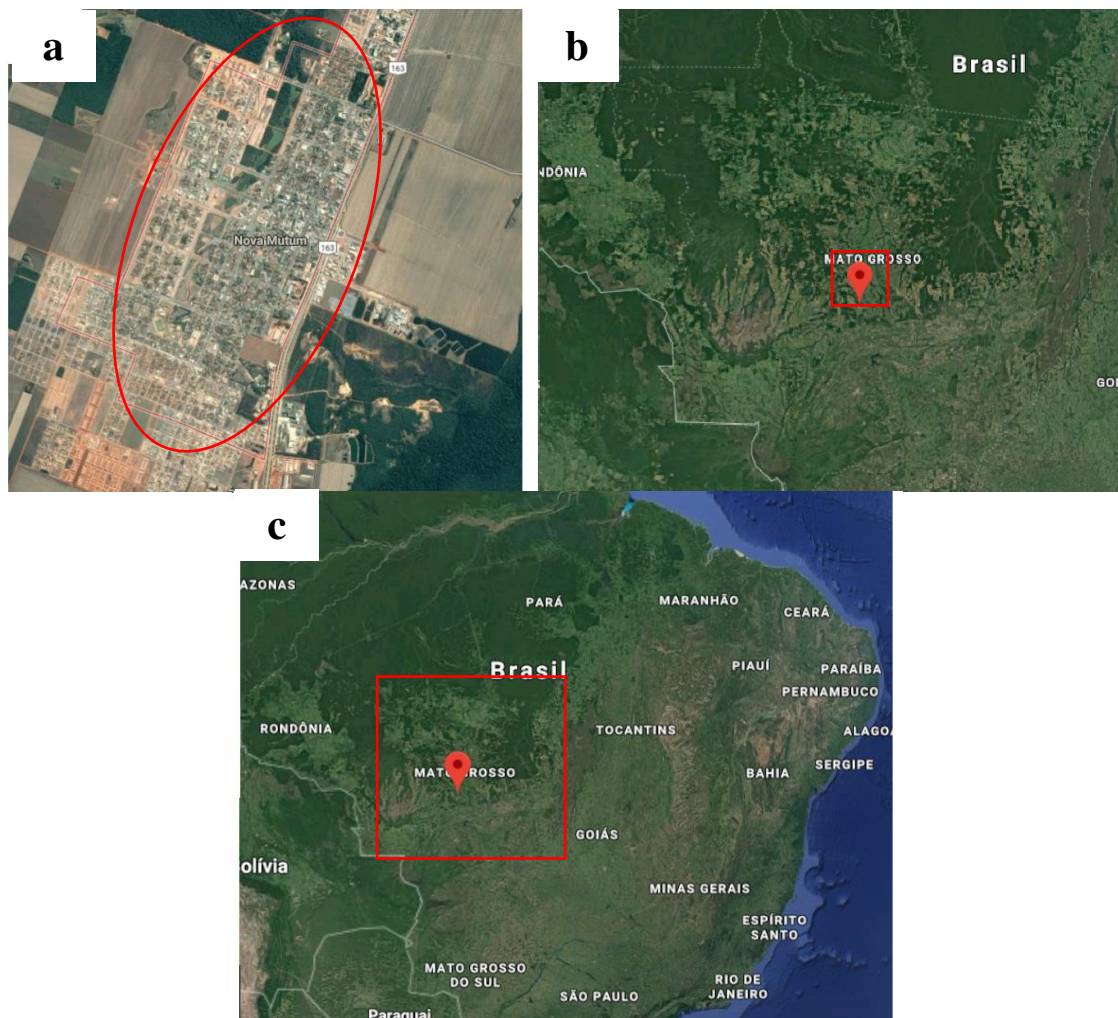


Figura 10. Localização da região de Nova Mutum (a). Localização de Nova Mutum no Estado do Mato Grosso (b). Localização do Estado do Mato Grosso no Brasil (c). Fonte: Imagens Google Maps.

4.5 Coleta das amostras

As amostras de urinas foram obtidas de agricultores e produtores rurais que tiveram exposição em longo prazo (maior que um ano) ao pesticida glifosato, na região norte do Mato Grosso, na cidade de Nova Mutum. As amostras foram coletadas e armazenadas em frascos plásticos e congeladas em freezer numa temperatura de -20°C até o momento das análises. Estas amostras possuem estabilidade de seis meses (tabela 9). Além disso, estas amostras foram classificadas em três tipos: pré, alta e pós. Pré representa antes da exposição dos indivíduos aos agrotóxicos. Alta representa o período durante a exposição e contato direto aos pesticidas. Pós informa o período após a exposição.

Nº da Identificação	Amostra	Data da Coleta	Amostra	Data da Coleta	Amostra	Data da Coleta	Idade	Função	Tempo de Exposição	Uso de EPI
1	1 PRE	20/12/2016	1 ALTA	11/01/2017	1 POS	20/02/2017	34	Aplicador	4 anos	Sim
2	2 PRE	20/12/2016	2 ALTA	11/01/2017	2 POS	20/02/2017	24	Aplicador	5 anos	Sim
3	3 PRE	20/12/2016	3 ALTA	11/01/2017	3 POS	20/02/2017	40	Aplicador	5 anos	Sim
4	4 PRE	20/12/2016	4 ALTA	11/01/2017	4 POS	20/02/2017	50	Caldeiro	5 meses	Sim
5	5 PRE	20/12/2016	5 ALTA	11/01/2017	5 POS	20/02/2017	21	Caldeiro	1 ano 6 meses	Sim
6	6 PRE	20/12/2016	6 ALTA	11/01/2017	6 POS	20/02/2017	22	Caldeiro	1 ano	Sim
7	7 PRE	20/12/2016	7 ALTA	11/01/2017	7 POS	20/02/2017	28	Aplicador	7 anos	Sim
8	8 PRE	20/12/2016	8 ALTA	11/01/2017	8 POS	20/02/2017	33	Caldeiro	5 meses	Sim
9	9 PRE	20/12/2016	9 ALTA	11/01/2017	9 POS	20/02/2017	35	Aplicador	1 ano	Sim
10	10 PRE	20/12/2016	10 ALTA	11/01/2017	10 POS	20/02/2017	24	Aplicador	2 anos	Sim
11	11 PRE	20/12/2016	11 ALTA	11/01/2017	11 POS	20/02/2017	21	Caldeiro	5 anos	Sim
12	12 PRE	20/12/2016	12 ALTA	11/01/2017	12 POS	20/02/2017	29	Caldeiro	3 anos	Sim
13	13 PRE	20/12/2016	13 ALTA	11/01/2017	13 POS	NC/DP	21	Caldeiro	4 meses	Sim
14	14 PRE	20/12/2016	14 ALTA	11/01/2017	14 POS	20/02/2017	28	Aplicador	2 anos	Sim
15	15 PRE	20/12/2016	15 ALTA	11/01/2017	15 POS	20/02/2017	36	Agrícola Líder	6 anos	Sim
16	16 PRE	20/12/2016	16 ALTA	11/01/2017	16 POS	20/02/2017	50	Aplicador	4 anos	Sim
17	17 PRE	22/12/2016	17 ALTA	12/01/2017	17 POS	18/02/2017	20	Aplicador	1 ano	Sim

18	18 PRE	22/12/2016	18 ALTA	12/01/2017	18 POS	18/02/2017	21	Aplicador	6 meses	Sim
19	19 PRE	22/12/2016	19 ALTA	12/01/2017	19 POS	18/02/2017	27	Caldeiro	1 ano 9 meses	Sim
20	20 PRE	22/12/2016	20 ALTA	12/01/2017	20 POS	18/02/2017	33	Caldeiro	2 anos 4 meses	Sim
21	21 PRE	NC	21 ALTA	12/01/2017	21 POS	18/02/2017	25	Caldeiro	3 meses	Sim
22	22 PRE	22/12/2016	22 ALTA	12/01/2017	22 POS	18/02/2017	21	Caldeiro	3 meses	Sim
23	23 PRE	22/12/2016	23 ALTA	12/01/2017	23 POS	18/02/2017	26	Caldeiro	1 ano 6 meses	Sim
24	24 PRE	22/12/2016	24 ALTA	12/01/2017	24 POS	18/02/2017	21	Caldeiro	15 dias	Sim
25	25 PRE	22/12/2016	25 ALTA	12/01/2017	25 POS	18/02/2017	34	Aplicador	6 anos	Sim
26	26 PRE	22/12/2016	26 ALTA	12/01/2017	26 POS	18/02/2017	24	Aplicador	1 ano	Sim
27	27 PRE	22/12/2016	27 ALTA	12/01/2017	27 POS	18/02/2017	32	Aplicador	2 anos	Sim
28	28 PRE	22/12/2016	28 ALTA	12/01/2017	28 POS	18/02/2017	22	Aplicador	2 anos	Sim
29	29 PRE	22/12/2016	29 ALTA	12/01/2017	29 POS	18/02/2017	28	Aplicador	10 anos	Sim
30	30 PRE	22/12/2016	30 ALTA	12/01/2017	30 POS	18/02/2017	32	Motorista	7 meses	Sim

Tabela 9. Informações das amostras de urina coletadas, bem como data da coleta, idade, função, tempo de exposição e uso de EPS's dos trabalhadores participantes da pesquisa. NC- Não coletada; DP- Desligado da propriedade.

4.6 Preparação das Soluções de Trabalho

Preparou-se 100 mL de uma solução de trabalho de concentração 6,0 ng/mL, contendo o agrotóxico glifosato. Para isso, transferiu-se o volume adequado de cada solução estoque anteriormente preparada de cada agrotóxico, para um balão volumétrico de 100,0 mL, já contendo um pequeno volume de água, sendo, posteriormente, o volume completado com este mesmo solvente. A solução assim obtida foi armazenada em frascos âmbar, com capacidade de 40 mL, rotulados de forma indelével.

Essa solução principal foi utilizada para os ensaios de fortificação e também para o estudo de linearidade e confecção das curvas analíticas através de sua diluição, nas concentrações de 1,15; 2,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 e 120,00 ng/mL (soluções analíticas). Todas as soluções analíticas foram preparadas em água e armazenadas em freezer a - 20 °C. Antes da utilização das mesmas, estas foram retiradas do freezer, deixadas atingir a temperatura ambiente e, em seguida, agitadas para completa homogeneização.

4.7 Preparo de Fase Móvel

Em todos os experimentos a fase móvel foi composta por tampão fosfato e acetonitrila (75:25). A fração aquosa (tampão fosfato pH 5,5) foi preparada da seguinte forma:

1. Pesou-se 6,80g de fosfato de potássio monobásico em um béquer, denominada solução A;
2. Pesou-se 17,90g de fosfato de sódio dibásico dodeca-hidratado em outro béquer, denominada solução B;
3. Para cada solução, com o auxílio de um balão volumétrico de 0,5L, adicionou-se este mesmo volume de água milli-Q para cada béquer;
4. Em uma proveta de 0,5L, misturou-se 482mL da solução A e 18mL da solução B;
5. O pH foi ajustado sempre que necessário com uma solução de NaOH 0,5mol/L;
6. Armazenou-se em frasco âmbar de borossilicato de 1L
7. Desgaseificou-se a solução sempre antes de sua utilização.

4.8 Seleção da Coluna Cromatográfica e Otimização das Condições Cromatográficas

Neste trabalho foi avaliada a coluna cromatográfica Kromasil C18 (150mm x 4,6 mm) Thermo Electron Corporation, afim de investigar seu desempenho na separação do agrotóxico. A coluna foi avaliada quanto ao perfil do cromatograma obtido a partir da injeção de uma solução de concentração 100,0 ng/mL contendo o analito a ser estudado. As injeções foram realizadas no sistema FL sob as seguintes: volume de injeção 20 μ L, fluxo 1,0mL/min, temperatura do amostrador automático 24°C, faixa λ_{em} 263 nm a λ_{ex} 317⁴⁹. A figura 11 ilustra o cromatógrafo utilizado para a validação da metodologia e análise das amostras.

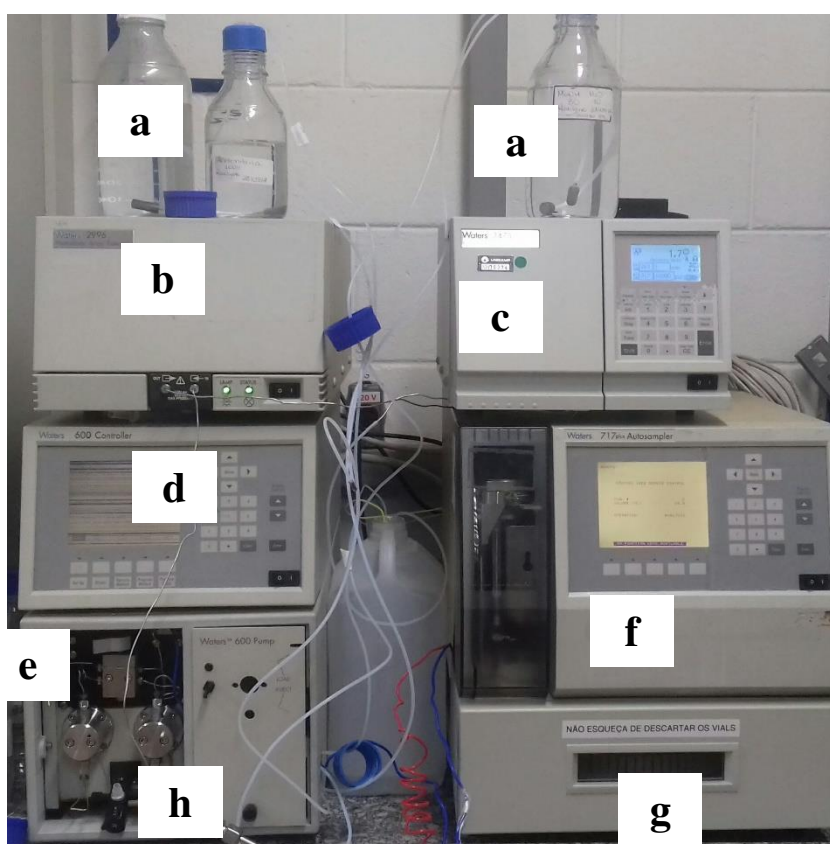


Figura 11. Cromatógrafo utilizado para as análises. a) Fase móvel; b) Detector UV; c) Detector de fluorescência; d) Controlador da bomba; e) Bomba de pressão e fluxo; f) injetor; g) Local das amostras e h) Coluna cromatográfica.

4.9 Avaliação das Condições Ótimas de Trabalho

Foram avaliados alguns fatores de níveis para avaliar as concentrações ótimas de trabalho para o Fmoc-Cl e o tampão borato pH 9, utilizados nas reações de derivatização para o glifosato em padrão na matriz.

a) Verificação da derivatização:

- Análise de 200ng/mL de Fmoc-Cl sem a presença dos analitos;
- Análise do analito na concentração de 100ng/mL com 400ng/mL de Fmoc-Cl.

b) Ocorrência da derivatização:

- Análise do analito na concentração de 100ng/mL de padrão com 400ng/mL de Fmoc-Cl e 0,01mol/L de tampão borato pH 9;
- Análise do analito na concentração de 100ng/mL de padrão com 400ng/mL de Fmoc-Cl e 0,125mol/L de tampão borato pH 9;
- Análise do analito na concentração de 100ng/mL de padrão com 400ng/mL de Fmoc-Cl e 0,2mol/L de tampão borato pH 9.

4.10 Preparo de Amostras

Para o preparo das amostras, as mesmas foram retiradas do freezer até atingir a temperatura ambiente decorrida da homogeneização das mesmas.

Pipetou-se 2 mL de urina, adicionou-se 0,4 mL da solução padrão de trabalho e 0,6 mL de acetonitrila (que ajuda na separação de compostos orgânicos presentes na urina). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos.

Pré-condicionou-se cartuchos SPE com 2mL de metanol acidificados com 100 μ L de ácido fórmico 0,1% (solução de metanol desgaseificada). Passou-se a amostras centrifugada que foi eluída posteriormente com 3 mL de acetonitrila.

Para a derivatização das amostras, foi adicionado uma concentração de 1,6 μ g/mL de Fmoc-Cl e 500 μ L de solução tampão borato pH 9 0,20mol/L para cada 1mL de amostra, de modo que a proporção glifosato e Fmoc-Cl fosse de 1:4. O preparo da solução de Fmoc-Cl foi realizado da seguinte forma:

1. Pesou-se 20mg \pm 0,5mg de padrão Fmoc-Cl em um tubo falcon de 15mL;
2. Pipetou-se 10mL de acetonitrila e acrescentou-se este volume no falcon com o Fmoc-Cl;

3. Homogeneizou-se a solução através de agitador magnético por 1 minuto;
4. A solução foi armazenada em freezer à -20°C até seu uso;
5. A solução apresenta estabilidade por até 7 dias congelada.

Para o preparo da solução de tampão borato pH 9,0 0,20mol/L, pesou-se $76,27\text{g} \pm 0,5\text{mg}$ de tetraborato de sódio diluído em 1L de água milli-Q que foi homogeneizado manualmente até a solubilização. O pH foi ajustado com NaOH 0,5mol/L sempre que necessário.

A reação de derivatização foi realizada em agitador ultrassom por 15 minutos a temperatura ambiente. Para garantir que não houvesse aumento de sinal do analito causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente, foi avaliado o efeito residual (*carryover*). Para isto, utilizou-se um padrão de glifosato em matriz numa concentração conhecida (50ng/mL) que foi inserida durante a análise das amostras no início, entre 5 em 5 amostras e no final da análise. Quando foi encontrado aumento de sinal em alguma destas amostras, a mesma foi reanalisada para assegurar a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos.

4.11 Validação do Método na Determinação/ Quantificação de Resíduos do Pesticida em Urina

A validação de todas as metodologias analíticas seguirá os critérios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária pela nova Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº27, de 17 de maio de 2012⁵⁷.

4.11.1 Linearidade

Para o estudo de linearidade e confecção da curva de calibração, as amostras de urina foram submetidas à análises em triplicata nas concentrações de 1,15; 2,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 e 120,00 ng/mL. O método utilizado é descrito a seguir:

1. $10\text{mg} \pm 0,5\text{mg}$ de padrão glifosato foi pesado em um tubo de centrífuga de 15mL;
2. Solubilizou-se em uma solução de 10mL contendo 8mL de urina e 2mL de acetonitrila. A mistura foi homogeneizada manualmente por 10 segundos;
3. Centrifugou-se a mistura por 10 minutos a 3000rpm;

4. Após centrifugação, passou-se a mistura em cartucho SPE, que foi previamente condicionado com 2mL de metanol acidificado com ácido fórmico 0,1%;
5. Para cada 1mL da mistura, eluiu-se o cartucho com 3mL de acetonitrila;
6. Derivatizou-se 10mL desta solução com 5mL de Fmoc-Cl 2mg/mL e 5mL tampão borato pH 9,0 0,20mol/L;
7. Colocou-se a reação em banho ultrassom por 15 minutos a temperatura ambiente;
8. Alíquotas de 120µL da mistura foram transferidas em tubos falcon de 15mL e completados com água até o volume de 15mL, sendo que cada nível de concentração (total de 9 níveis) foi preparado em seis replicatas; Esta solução foi utilizadas para a preparação de todos os níveis de concentração utilizados para a curva analítica;
9. Para cada nível de concentração, foi preparado 1mL de solução contendo água milli-Q e o volume adicionado de solução analítica mostrado na tabela 10, necessário em cada nível.

Concentração (ng/mL)	Concentração de Solução Analítica (ng/µL)	Volume de Solução de Trabalho Adicionado (µL)	Volume de Água adicionado (µL)
1,15	0,0015	1,15	998,85
2,0	0,002	2,0	998,0
5,0	0,005	5,0	995,0
10,0	0,010	10,0	990,0
25,0	0,025	25,0	975,0
50,0	0,050	50,0	950,0
75,0	0,075	75,0	925,0
100,0	0,100	100,0	900,0
120,0	0,120	120,0	880,0

Tabela 10. Tabela contendo dados para o preparo da curva analítica em matriz.

4.11.2 Seletividade e sensibilidade

O estudo de seletividade foi determinado juntamente com os ensaios de linearidade. Os cromatogramas foram analisados, quanto a presença de sinais dos íons do agrotóxico estudado.

A seletividade foi determinada comparando uma amostra de branco isenta de contaminação e outra com a contaminação de glifosato na concentração de 50ng/mL. Já a sensibilidade foi verificada a partir do coeficiente angular que é obtido a partir da curva analítica, o qual indica a variação da resposta em função da concentração do analito.

4.11.3 Análises dos solventes e reagentes pelo método de extração com cartuchos SPE

Este processo tem por relevância verificar a pureza dos solventes e reagentes, para que não haja risco de contaminações por resíduos do agrotóxico a ser estudado. Para o desenvolvimento deste método, foi realizado todo o processo normal de derivatização, fator de diluição e extração da amostra na ausência da urina. Esta solução foi designada o branco do reagente.

Desta forma, para o procedimento, solubilizou-se 10mg de glifosato em uma solução de 10mL contendo 8mL de água e 2mL de acetonitrila. A mistura foi homogeneizada manualmente por 10 segundos e centrifugada por 10 minutos a 3000rpm. Após centrifugação, passou-se a solução em cartucho SPE, que foi previamente condicionado com 2mL de metanol acidificado com ácido fórmico 0,1%. Para cada 1mL da solução, eluiu-se o cartucho com 3mL de acetonitrila.

Derivatizou-se 1mL desta solução com 0,5mL de Fmoc-Cl 2mg/mL e 0,5mL tampão borato pH 9,0 0,20mol/L. Colocou-se a reação em banho ultrassom por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi injetada no sistema CLAE-FL.

4.11.4 Ensaios de fortificação e extração com o método de extração com cartuchos SPE para avaliação da precisão, exatidão e recuperação

Estes estudos de fortificação e de recuperação tem o intuito de avaliar a eficiência do método de tratamento da amostra avaliando sua exatidão como um todo. A determinação é feita relacionando o valor encontrado pelo método e o valor real medido que foi inicialmente adicionado na matriz.

Desta forma, a partir das recuperações obtidas do pesticida, foi possível analisar a exatidão do método analítico, e com os valores de coeficientes de variação (CV%) obtidos, foi possível avaliar a repetitividade (precisão) e reprodutibilidade dos valores obtidos.

Determinou-se a precisão intracorrída e intercorrída para avaliar a proximidade dos resultados obtidos. A avaliação foi verificada por meio de seis replicatas nas concentrações de 5,0;10,0; 50,0; 70,0 e 120,0ng/mL. A precisão foi calculada por meio do CV% das áreas obtidas não devendo ser superior que 20%⁵⁹. Para a precisão intercorrída, este procedimento foi repetido após dois dias da primeira análise.

A exatidão foi determinada através da média experimental obtida a partir de seis replicatas do analito adicionados a matriz nas concentrações de 5,0;10,0; 50,0; 70,0 e 120,0ng/mL (Tabela 11). Além desta etapa, foram realizadas análises da precisão instrumental para dar maior confiabilidade nos resultados, e análise da matriz sem a contaminação do pesticida para verificar a ausência deste composto na matriz. Estas amostras foram denominadas de branco na matriz.

Concentração (ng/mL)	Concentração de Solução Analítica (ng/μL)	Volume de Solução de Trabalho Adicionado (μL)	Volume de Água adicionado (μL)
5,0	0,005	5,0	995,0
10,0	0,010	10,0	990,0
50,0	0,050	50,0	950,0
70,0	0,070	70,0	920,0
120,0	0,120	120,0	880,0

Tabela 11. Tabela contendo dados para preparo das amostras fortificadas e para estuda da recuperação.

4.11.5 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ):

O LD e LQ foram determinados a partir de 6 preparos de glifosato em matriz em sextuplicadas e preparadas de forma independentes.

4.11.6 Estabilidade do Analito em Matriz Biológica e Ciclos de Congelamento e Descongelamento

A avaliação da estabilidade do analito em matriz biológica é realizada reproduzindo-se as mesmas condições de armazenamento, preparo e análises do método proposto. Para isto, os estudos da estabilidade das amostras foram divididos em duas partes, estabilidade de curta e longa duração em diferentes amostras contaminadas com glifosato na concentração de 50,0ng/mL. As amostras (n=6) foram armazenadas em freezer a -25°C onde foram feitas as análises após o intervalo de 0, 6, 24 e 48 e 72horas.

Para os ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras (n=6) foram congeladas à temperatura de -25°C e mantidas por 24horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram congeladas novamente à mesma temperatura citada anteriormente, passando por três ciclos de degelo, no intervalo de 24horas cada ciclo, quantificando-se o analito nas amostras ao final do último ciclo. Para o estudo da estabilidade das amostras durante os ciclos de congelamento e descongelamento, as mesmas foram contaminadas a uma concentração de 50ng/ml.

Todas as amostras para ambos os estudos foram escolhidas de forma aleatória, podendo ser amostras classificadas em Pré, Alta ou Pós.

4.11.7. Análise de resíduos e Avaliação de correlação linear (Teste F).

A fim de garantir a confiabilidade dos dados obtidos, foi avaliado a adequabilidade de um modelo de regressão com base nos resíduos. O resíduo é dado pela diferença entre a variável resposta observada (área) em relação a variável resposta estimada. Além disso, a análise de resíduos deve refletir as propriedades impostas pelo termo de erro do modelo, como por exemplo, apresentar um modelo linear e não existir pontos atípicos (*outliers*) influentes⁵⁶. A figura 12 ilustra a avaliação dos resíduos.

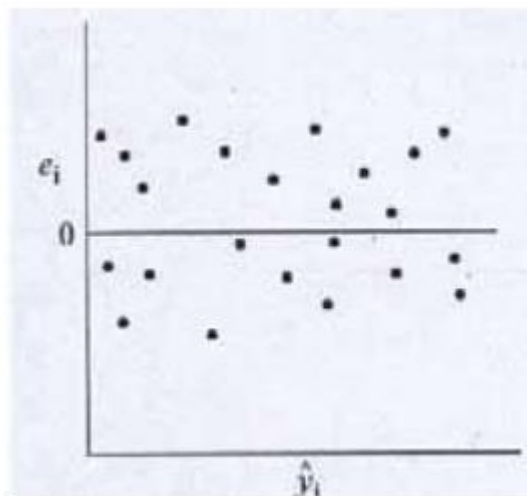


Figura 12. Gráfico de distribuição dos resíduos em função da resposta analítica⁵⁶.

O teste F é utilizado para comparar as precisões de dois conjuntos de dados. Neste trabalho o teste F foi aplicado para avaliar as precisões intradia e interdia e que é calculado da seguinte forma:

$$F = \frac{D_a}{D_b} \quad \text{Equação 8}$$

Onde o D_a e D_b representam os desvios padrões das duas análises. O maior valor de D deve estar sempre no numerador, de modo que o valor de F é sempre maior que a unidade. A significância é verificada do valor obtido de F tabelado (apêndice 1) que é calculada a partir dos números de graus de liberdade dos dois conjuntos de dados⁵⁶.

5. Resultados

5.1 Otimização das Condições Cromatográficas

Inicialmente foram desenvolvidas e otimizadas algumas condições analíticas para a metodologia proposta, bem como proporção de analito e derivatizante, como também a concentração mais adequada do tampão borato pH, que é essencial durante o processo de derivatização. Estes testes visaram otimizar, principalmente, a derivatização de glifosato de forma a garantir que todo o analito fosse derivatizado. O tempo empregado para as análises foi de 8,0min. A figura 12 apresenta o cromatograma do glifosato em matriz derivatizado com Fmoc-Cl. As amostras foram injetadas imediatamente após o processo de derivatização e possuem estabilidade de 5 dias quando congeladas.

Além disso, as condições cromatográficas determinadas na parte experimental a partir de um amplo estudo realizado nas literaturas disponíveis proporcionaram boa resolução e separação do pico do analito de interesse. A escolha da coluna cromatográfica, por exemplo, foi definida a partir de trabalhos que realizaram o mesmo tipo de coluna^{49,53}. Foram realizados alguns testes iniciais e após verificar a análise da determinação do padrão de glifosato em água, os testes foram seguidos com a coluna cromatográfica escolhida, onde esta permitiu um volume de injeção de 20 μ L.

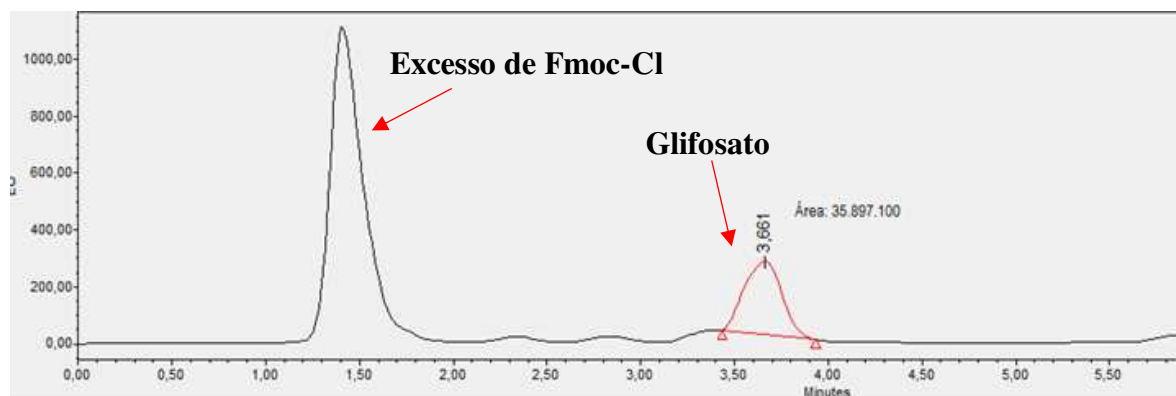


Figura 13. Região no cromatograma situada entre 0,0 e 5,00min, apresentando: o cromatograma do pico do excesso do Fmoc-Cl (à esquerda) e do glifosato (à direita).

O emprego da técnica com detecção por fluorescência permitiu a análise de glifosato sem comprometer a qualidade da resposta do agrotóxico. É importante dizer que a detecção por fluorescência se mostrou muito eficaz para a determinação de glifosato, pois inicialmente, além do desenvolvimento de uma metodologia analítica por detecção por fluorescência foi também desenvolvido outra metodologia por cromatografia líquida acoplada espectrometria de massas, onde esta não apresentou resultados satisfatórios comparados com o detector utilizado no desenvolvimento deste trabalho. Os resultados preliminares obtidos a partir do espectrômetro de massas mostraram grandes ruídos nos cromatogramas e que estes ruídos poderiam interferir consideravelmente na qualidade dos resultados durante a análise das amostras de urina. O método inicialmente utilizado no espectrômetro de massas seguiu os mesmos procedimentos de Cabrices e Schreiber (2007). As figuras 14 e 15 apresentam os cromatogramas de glifosato em matriz obtidos pelo espectrômetro de massas nas concentrações de 2 e 5ng/mL.

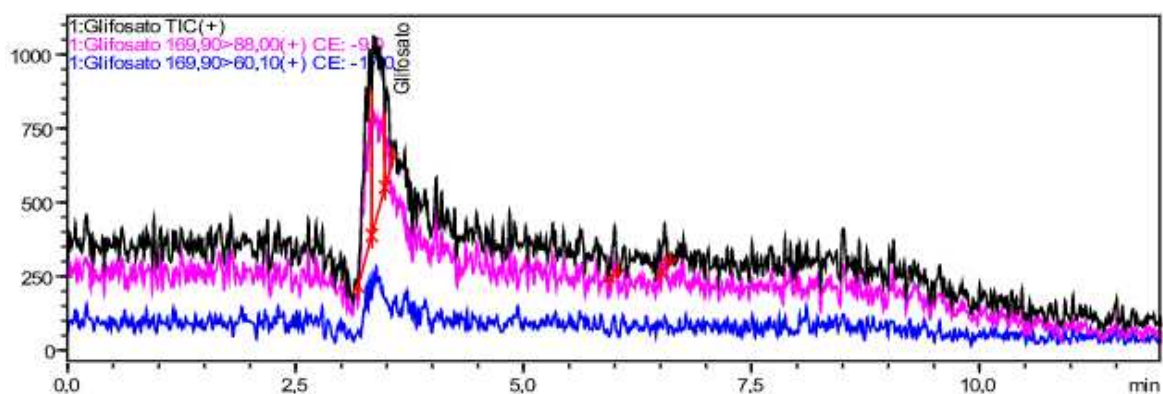


Figura 14. Cromatograma obtido do LC-MS/MS na concentração de 2ng/mL de glifosato em matriz.

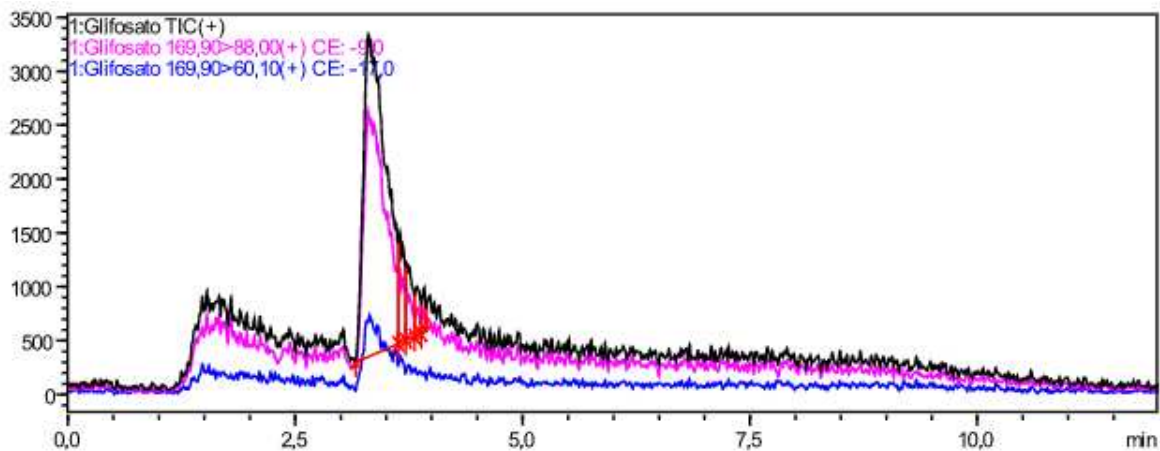


Figura 15. Cromatograma obtido do LC-MS/MS na concentração de 5ng/mL de glifosato em matriz.

Deste modo, estes resultados iniciais foram essenciais para a escolha em realizar o desenvolvimento de metodologia analítica pela detecção por fluorescência.

5.2 Avaliação das Condições Ótimas de Trabalho

Foram avaliados os fatores de níveis experimentais do glifosato para a otimização dos métodos cromatográficos. Ao realizar a verificação da reação de derivatização entre o glifosato e o Fmoc-Cl, a proporção de 1:4 de glifosato/Fmoc-Cl para as análises por HPLC-FL foi escolhida de modo a garantir que todo o glifosato presente fosse derivatizado³⁸. A figura 16 apresenta as concentrações de tampão borato pH 9 em relação as áreas dos picos cromatográficos.

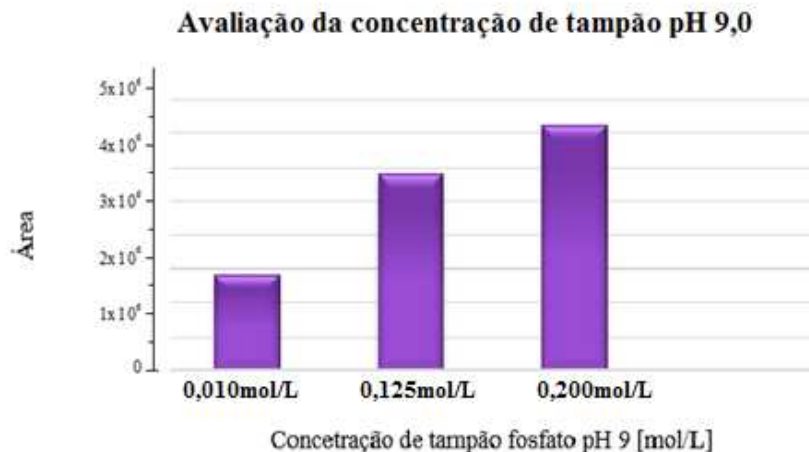


Figura 16. Fatores de níveis empregados para garantir melhor ocorrência da reação de derivatização.

5.3 Resultados da validação do método por detecção por fluorescência para a determinação de glifosato

5.3.1 Linearidade

O método apresentou-se linear com coeficientes de determinação acima de 0,999 em água e matriz, mostrando-se significativos dentro do intervalo de trabalho proposto. As equações lineares e os coeficientes de determinação foram: $y = 85214x + 54657$ e $r^2 = 0,9993$ (em água) e $y = 17145x + 1213,3$ e $r^2 = 0,9993$ (na matriz). A figura 17 mostra as curvas analíticas obtidas a partir destes resultados e a figura 18 apresenta o gráfico de resíduos.

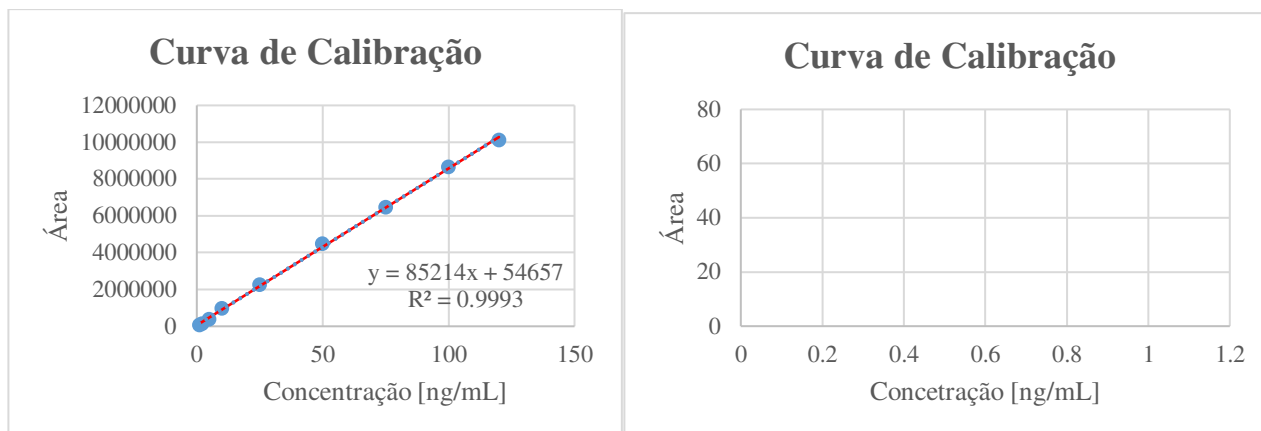


Figura 17. Curvas analíticas que serão utilizadas para a determinação de glifosato em água (esquerda) e em urina (direita).

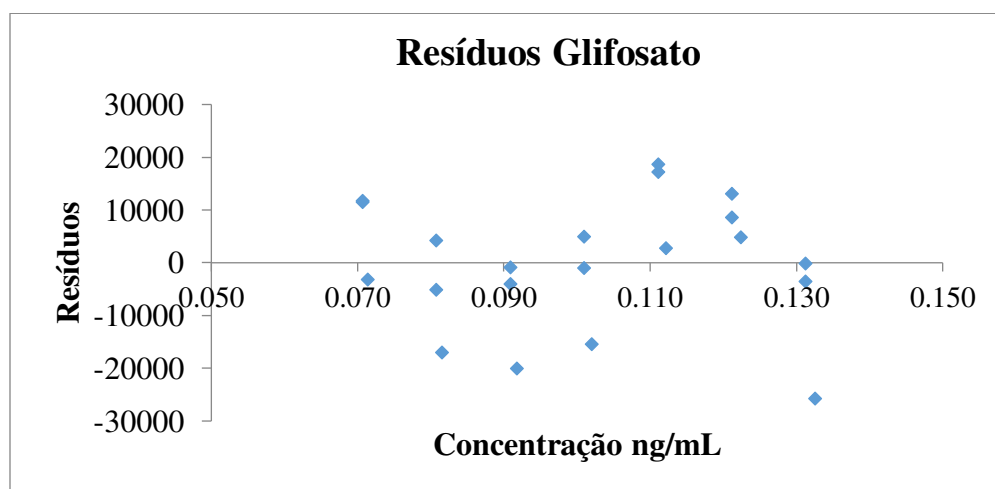


Figura 18. Análise de resíduos nas amostras.

5.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de glifosato obtido para o método proposto em amostras de urina foram de 0,34 ng/mL para LD e 1,15 ng/mL para LQ, mostrando que o método é adequado para a determinação e quantificação do glifosato já que o método utiliza uma ampla faixa de concentração, mas sem interferir a qualidade do coeficiente de determinação r^2 . A tabela 12 apresenta as áreas dos valores de LD e LQ obtidos experimentalmente, bem como o desvio padrão relativo (CV%).

LD (n=6)	Média das áreas	CV(%)	LQ (n=6)	Média das áreas	CV(%)
0,34ng/mL	7343,3	9,37	1,15ng/mL	22966,6	13,49

Tabela 12. Avaliação dos valores LD e LQ.

5.3.3 Branco

Ao analisar os cromatogramas no branco, não foi encontrado nenhum pico cromatográfico que possa coeluir com o analito de interesse, como mostra na figura 19.

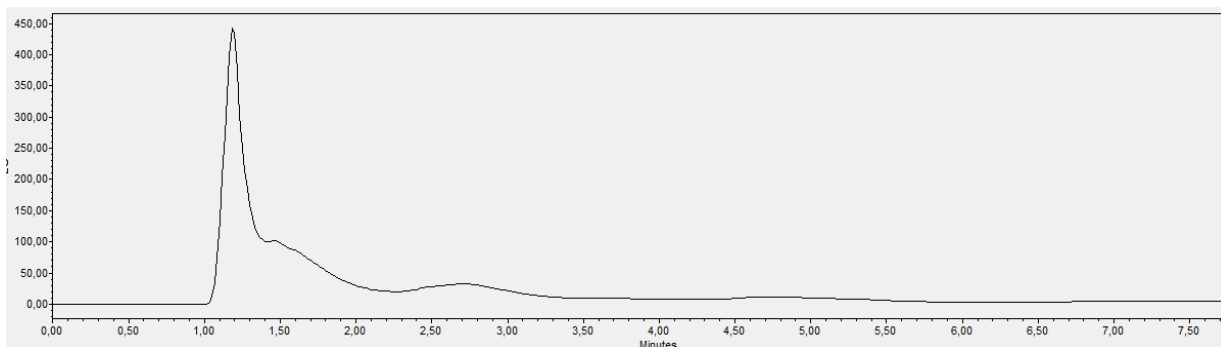


Figura 19. Cromatograma para análise do branco na presença do agente derivatizante Fmoc-Cl na ausência de glifosato.

5.3.4 Seletividade

O método mostrou-se seletivo, quando foi realizada a avaliação dos cromatogramas sem a contaminação de glifosato na matriz, onde foi possível concluir que não há picos cromatográficos que eluem no mesmo tempo de retenção do glifosato (3,7 minutos), como pode ser visto na figura 20. A figura 21 apresenta o cromatograma do glifosato em matriz em seu tempo de retenção.

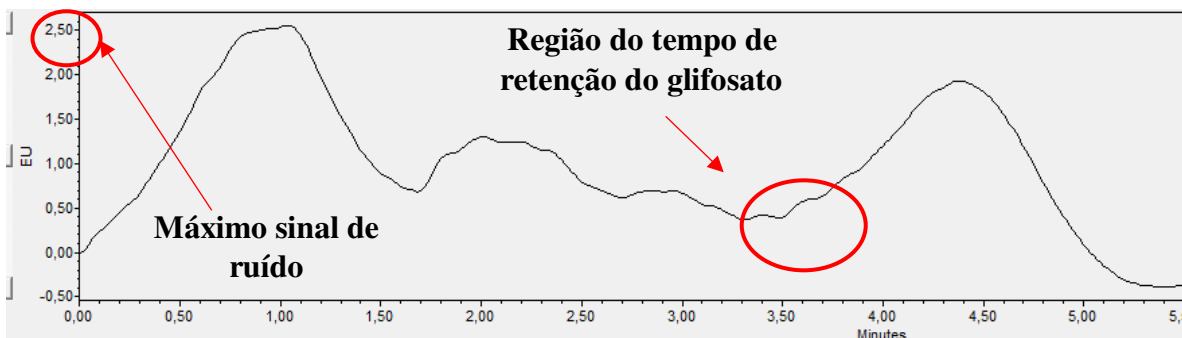


Figura 20. Análise da seletividade do método na análise da matriz sem a presença de glifosato e derivatizante.

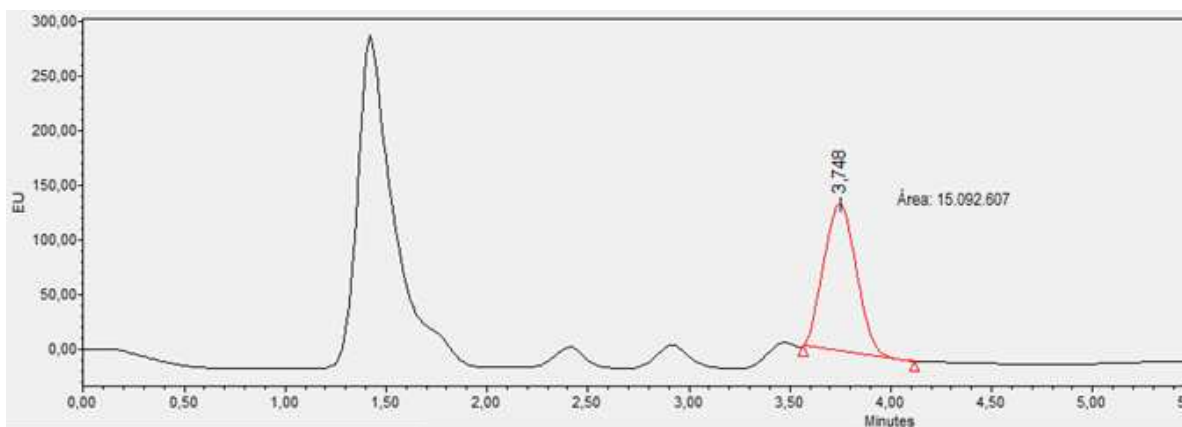


Figura 21. Glifosato em matriz na concentração de 50ng/mL para a avaliação da seletividade do método.

5.3.5. Sensibilidade

A sensibilidade do método foi realizada a partir do coeficiente angular da curva de analítica. Desta maneira, o glifosato apresentou uma sensibilidade de 17145 (matriz). Este valor representa que quanto maior for a inclinação da reta (tangente da curva), tão boa será a sensibilidade do método.

5.3.6 Precisão

A precisão do método foi avaliada a partir do grau de concordância entre os resultados obtidos de medições sucessivas do método, realizadas sob as mesmas condições de medição,

pelo mesmo analista, com o mesmo instrumento usado sob as mesmas condições e repetições em um curto intervalo de tempo.

A precisão intermediária é considerada sendo mais representativa das variabilidades dos resultados, indicando o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como analistas e/ou dias diferentes, por exemplo.

Para a avaliação da repetitividade, foi realizada em matriz fortificada em 5 níveis diferentes: 5; 10; 50; 70 e 120ng/mL em sextuplicata no mesmo dia e mesma analista. A precisão intermediária avaliou estes mesmos níveis de concentração em sextuplicata, porém dois dias depois da primeira avaliação com a mesma analista. Em ambos os casos foi verificado o desvio padrão e coeficiente de variação (CV), que não apresentam diferença estatística significativa⁵⁹. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 13.

Concentração (ng/mL)	Repetitividade n=6			Precisão Intermediária n=6			
	Média Concentração (ng/mL)	DP	CV (%)	Média Concentração (ng/mL)	DP	CV (%)	F
5	5,66	0,73	12,89	5,55	0,77	13,87	1,11
10	9,89	1,01	10,21	10,40	0,61	5,86	2,74
50	50,79	2,00	3,93	51,27	1,80	3,51	1,25
70	70,80	2,10	2,96	70,79	2,25	3,17	1,15
120	119,92	5,14	4,28	120,15	4,77	3,97	1,16

Tabela 13. Avaliação da repetitividade e precisão intermediária com matriz fortificada. Médias, coeficientes de variação (CV, %) e desvio padrão. DP-Desvio padrão; F-Correlação linear.

Ao avaliar a correlação linear entre as precisões através do Teste F, obteve-se valores entre 1,11 e 2,74. Estes valores estavam abaixo do valor tabela indicando que os resultados não representam diferença estatística significativa.

Além da avaliação dos parâmetros repetitividade e precisão intermediária do método, também foi realizada a precisão instrumental. Para este estudo, foi preparada uma concentração de 10ng/mL de glifosato em matriz em 5 replicatas avaliando-se a

homogeneidade do tempo de retenção e as áreas dos picos dos cromatogramas obtidos e que estão apresentados na tabela 14.

	Concentração 10ng/mL		
Tempo de Retenção	Média (n=5)	Desvio padrão	CV (%)
	3,75	0,016	0,47
Área Média do Pico	218113,7	30050,27	13,77

Tabela 14. Precisão instrumental referente a injeção de glifosato em matriz.

5.3.7 Exatidão e Recuperação

A exatidão e recuperação do método foram obtidas através da comparação da concentração esperada e a presente na amostra, considerando as áreas dos picos antes e depois de terem passadas pelo cartucho SPE utilizado no processo de extração. As análises foram realizadas em 5 níveis (5, 10, 50, 70 e 120ng/mL) em seis replicatas e que estão apresentadas na tabela 15.

	Concentração (ng/mL)	Concentração Média Obtida (ng/mL)	Recuperação Média (%)	EPR (%)
Repetitividade n=6	5	5,66	84,57	12,89
	10	9,89	86,90	10,21
	50	50,79	69,70	3,93
	70	70,80	71,25	2,96
	120	119,92	75,30	4,28
Precisão intermediária n=6	5	5,55	86,66	13,87
	10	10,40	85,38	5,86
	50	51,27	71,16	3,51
	70	70,79	71,63	3,17
	120	120,15	75,75	3,97

Tabela 15. Ensaio de recuperação com matriz para a repetitividade e precisão intermediária do método.

5.3.8 Estudo de Estabilidade de Curta e Longa Duração e Ciclos de Congelamento e Descongelamento

Amostra	Concentração (ng/mL) n=6					CV (%)	Erro*
	0 horas	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas		
1	53,69	52,44	51,37	50,34	49,09	13,09	1,40
2	54,86	54,11	54,09	53,88	41,48	9,55	4,89
3	52,30	52,80	51,23	51,34	48,35	13,00	1,35
4	53,95	53,86	53,89	52,76	47,52	14,33	2,17
5	55,16	50,09	52,45	50,68	49,21	14,07	1,84
6	52,76	53,45	52,92	52,70	45,77	8,59	2,53

Tabela 16. Estudo da estabilidade de curta e longa duração em amostras de urina no intervalo de 0h-72h. Erro* – Intervalo de confiança de 95%.

Desvio (%)		
Amostra	Pós-processamento (20 horas)	Estabilidade Longa Duração (5 meses)
1	7,12	-0,88
2	3,48	-0,18
3	1,26	1,88
4	2,00	1,20
5	8,90	5,72
6	-0,66	-1,02

Tabela 17. Avaliação da Estabilidade de longa duração e análise pós-processamento.

Concentração (ng/mL)					
Amostra	Ciclos (n=6)				
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	CV (%)	Erro*
1	50,70	51,42	50,11	10,48	1,55
2	51,17	51,75	51,68	11,28	0,24
3	53,99	53,00	53,81	7,27	1,02
4	51,51	51,51	51,15	10,54	0,46
5	50,33	50,48	49,49	9,49	1,37
6	52,40	51,37	51,62	6,85	2,38

Tabela 18. Estudo da estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento em amostras de urina. Erro* - Intervalo de confiança de 95%.

Na análise dos dados das tabelas 15 e 16, mostraram que não houve variação superior a 15% entre os resultados, portanto, a estabilidade no período avaliado mostrou-se adequada de acordo com as normas vigentes da Anvisa RDC 27, 2012⁵⁷.

5.4 Resultados das Amostras

As amostras foram armazenadas em freezer até o momento de suas análises. As figuras 22 e 23 apresentam o armazenamento das amostras e o preenchimento dos formulários.



Figura 22. Amostras de urinas armazenadas.

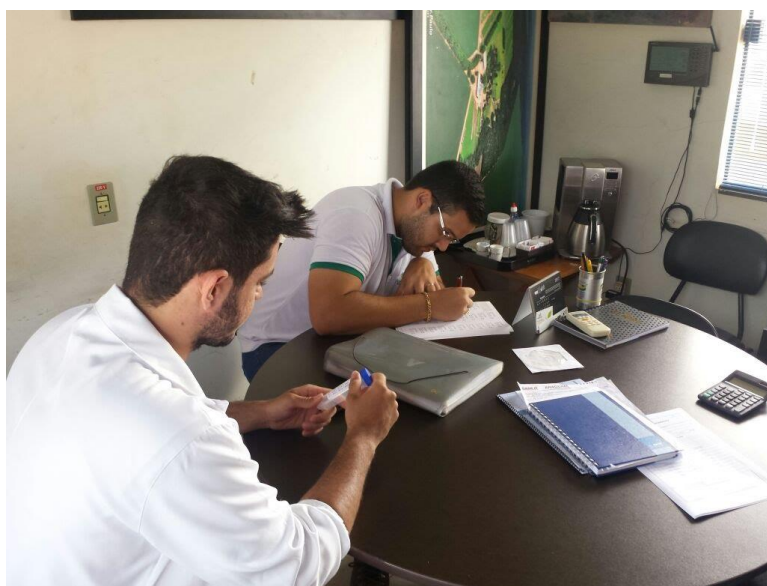


Figura 23. Trabalhadores preenchendo os formulários.

Após o desenvolvimento e validação do método para a determinação de glifosato em urina por HPLC-FL, este foi aplicado nas amostras de urina. A partir da técnica escolhida foi possível confirmar a presença de glifosato em 11 amostras de urina dos trabalhadores rurais que tiveram contato direto com o pesticida. A média geométrica das concentrações para todo o grupo de agricultores no dia da exposição ao glifosato foi de 3,58ng/mL. O maior valor encontrado no dia da exposição foi de 7,13ng/mL. A figura 24 apresenta o cromatograma de

uma amostra com resíduo de glifosato (6,41ng/mL). Os resultados completos para cada agricultor durante o período da exposição (ALTA) estão apresentados na tabela 19.

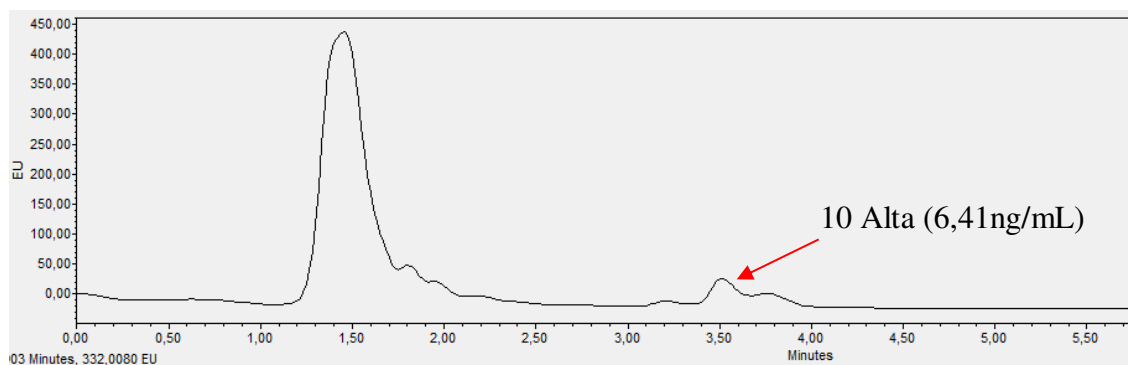


Figura 24. Cromatograma de uma amostra positiva com glifosato

Amostra	Resultado (ng/mL)	Amostra	Resultado (ng/mL)
1 ALTA	< 0,34	16 ALTA	2,57 (0,13)
2 ALTA	< 0,34	17 ALTA	< 0,34
3 ALTA	< 0,34	18 ALTA	< 0,34
4 ALTA	2,87 (0,07)	19 ALTA	7,13 (0,52)
5 ALTA	3,09 (0,09)	20 ALTA	< 0,34
6 ALTA	1,65 (0,10)	21 ALTA	2,87 (0,35)
7 ALTA	2,27 (0,22)	22 ALTA	< 0,34
6 ALTA	< 0,34	23 ALTA	< 0,34
9 ALTA	< 0,34	24 ALTA	< 0,34
10 ALTA	6,41 (0,28)	25 ALTA	4,19 (0,38)
11 ALTA	< 0,34	26 ALTA	< 0,34
12 ALTA	2,03 (0,27)	27 ALTA	< 0,34
13 ALTA	< 0,34	28 ALTA	< 0,34
14 ALTA	< 0,34	29 ALTA	< 0,34
15 ALTA	4,40 (0,22)	30 ALTA	< 0,34

Tabela 19. Resultados das amostras coletadas no dia da exposição ao glifosato. () Erro a 95% de confiança.

Para as amostras classificadas como PRÉ e PÓS, não foi encontrada nenhuma concentração quantificável pelo método.

6. Discussões

Visando cumprir os objetivos do trabalho, foi escolhida a cromatografia líquida com detecção por fluorescência para determinar glifosato nas amostras de urina, uma vez que é uma técnica simples, amplamente utilizada e recomendada por diversos autores para esta finalidade^{18,47,49,51,53}. Entretanto, como se trata de um composto ausente de grupos cromóforos, a cromatografia líquida com detecção por fluorescência tornou-se impossibilitada sem que o analito original fosse previamente alterado quimicamente para uma substância com maior fluorescência e, por isso, utilizou-se o Fmoc-Cl como agente derivatizante para a conversão do glifosato.

É importante ressaltar que mesmo não fazendo o uso de padrão interno, a qualidade das amostras não foi alterada. Mesmo assim, todos os preparos de amostras foram realizados, em pelo menos, duplicata. Desta maneira, foi possível corrigir erros técnicos de preparo de amostras. Além disso, a avaliação dos testes realizados para o efeito matriz e recuperação auxiliaram para a correção de possíveis erros das perdas na análise da amostra real. Nos casos em que foi verificado uma diferença significativa $\geq 10\%$ ⁵⁷ em alguma replicata, a análise foi refeita.

Em diversos trabalhos publicados, não foram utilizados padrão interno, sem comprometer a qualidade das amostras analisadas. Em seus estudos, Curwin *et al.* (2007) não fez a utilização de nenhum padrão interno, o que não comprometeu a qualidade de seus resultados, nem tão pouco a confiabilidade do mesmo, já que apresentou a linearidade, precisão e exatidão dentre de critérios estabelecidos por órgãos internacionais. Além disso, o mesmo autor também apresentou em seus resultados excelentes valores de recuperação (85-117%) durante as análises de amostras de urina. Do mesmo modo, outros autores também não utilizaram padrão interno em suas metodologias e também apresentaram resultados satisfatórios com bons valores de recuperação e baixos valores de LD^{18,49,51,53}, como já descritos na tabela 6.

A capacidade de separação da coluna C18 Kromasil, permitiu alcançar uma ótima resolução, uma vez que alguns interferentes presentes nas amostras eluíram em tempos diferentes do glifosato, que está demonstrado na figura 6. Além disso, nota-se que o analito foi completamente separado e que praticamente não há ruídos no intervalo de tempo visualizada. Este cromatograma evidencia a seletividade do método e que foi obtido para o agrotóxico estudado.

Em relação a concentração de tampão borato pH 9,0, que é auxilia na ocorrência da reação entre o Fmoc-Cl e glifosato, pode-se observar que houve um aumento significativo da área dos picos com o aumento da concentração de tampão borato para a ocorrência da derivatização (figura 9). A melhor resposta foi observada para a concentração de 0,20mol/L de tampão borato pH 9,0. Além disso, este valor de pH foi escolhido já que o mesmo já foi utilizado em outros trabalhos com o mesmo analito, mesmo detector^{38,49,53}.

O método apresentou um LD compatível com os métodos já existentes nas literaturas que apresentam valores de LD entre 0,1 e 1,0ng/mL para o glifosato em urina^{46,47,48}. O LQ obtido nesta metodologia analítica representa um valor bastante baixo do ponto de vista toxicológico, visto que no Brasil a ingestão diária aceitável (IDA) é de 42,00ng/mL. Desta maneira, para o propósito do trabalho, estes valores de LD e LQ foram suficientemente adequados para a quantificação de glifosato em amostras de urina.

Todos os níveis de concentração apresentaram CV menor que 15% para a repetitividade e precisão intermediária do método, demonstrando que a metodologia analítica apresenta precisão satisfatória para a faixa de trabalho avaliada.

O teste F realizado na análise da repetitividade e precisão intermediária mostrou que não apresentaram resultados com diferença estatística significativa entre as precisões em dias diferentes já que os valores estavam na faixa de 1,11 e 2,74, menor que o tabelado (5,05).

A técnica de separação utilizada com cartuchos SPE durante o preparo de amostras, adotada neste trabalho, tem sido empregada para análises com o mesmo analito na rotina de muitos trabalhos^{61,62,63,64,65,66}. Como pode ser notado, os valores de recuperação foram considerados satisfatórios apresentando boa precisão e exatidão com coeficientes de variação e EPR menores que 15%, podendo-se afirmar que os resultados obtidos se mostraram aceitáveis e estão dentro dos valores regulamentados⁵⁷, de modo que os resultados

estabelecidos são dados como aceitáveis para recuperação de amostras biológicas, e que se encontram no intervalo de 69,7-86,0%.

Embora não tenha sido possível obter nenhuma quantidade de resíduo de glifosato no período após a exposição, deve-se considerar que a coleta das amostras neste mesmo período foi realizada após 30 (trinta) dias a partir do dia de exposição e que o glifosato apresenta um tempo de eliminação no organismo humano entre 2,7 e 3,6 horas e também não apresenta acumulação no organismo²¹. Desta forma, nas concentrações que foram encontradas, só seria possível obter algum nível de resíduo no período pós-exposição, caso a coleta tivesse sido realizada em até 2 dias da exposição.

É importante dizer que o tempo em que estes trabalhadores ficaram expostos ao glifosato antes do estudo não influenciou em maior ou menor quantidade de resíduos, visto que o nível mais alto encontrado foi obtido do candidato nº 19 (7,13ng/mL) com tempo de exposição de 1 ano e 9 meses, enquanto que o candidato de nº29 com um tempo de exposição de 10 anos não obteve nenhum nível de resíduo quantificável.

Como estudos sugerem uma taxa de absorção de aproximadamente 20%, pode-se considerar que a ingestão possa ter sido até cinco vezes maior que a dose interna encontrada²⁶. Assim, o maior nível de resíduo encontrado, 7,13ng/mL, poderia equivaler a uma dose externa de até 0,003mg/kg, isto é 7,14% da dose diária aceitável.

Os voluntários escolhidos para o desenvolvimento deste trabalho, representados por um grupo de homens e mulheres com idade entre 20 e 60 anos, reproduzem a situação real da diversidade existente no ambiente de trabalho rural.

Desta maneira, é de grande relevância um estudo mais amplo e criterioso para avaliar o nível de exposição destes trabalhadores, que pode estar diretamente relacionado à impactos negativos a saúde, principalmente se a exposição for contínua e a longo prazo como foi verificado em diversos estudos.

Cowell e Steinmetz (1990) analisaram as urinas de 15 participantes, onde as urinas foram coletadas por um período de cinco dias (antes, no dia e os três dias após a aplicação). Os resultados revelaram que quatro dos quinze trabalhadores tinham níveis detectáveis de glifosato a partir do dia da aplicação. Contudo, nos outros dias, não foram encontrados valores detectáveis, onde a concentração mais alta encontrada foi de 14ng/mL e a maior dose sistêmica estimada foi de 0,0006mg/kg com um limite de detecção do método de 10ng/mL.

Em seus trabalhos, Wester *et al.* (1991) revelou que uma outra possível via de exposição ao glifosato pelo contato dérmico. Entretanto, outros estudos revelaram que a superfície de pele de animais e de humanos realizados *in vitro*, indicaram uma absorção percutânea menor do que 2%²⁸.

Como conclusão, este estudo propôs desenvolver uma metodologia capaz de quantificar glifosato em amostras de urina de modo a avaliar a exposição de um pequeno grupo de agricultores que trabalham diretamente com este agrotóxico. Todavia, faz-se necessários estudos mais profundos para avaliar o real risco que as diversas concentrações de glifosato encontradas em amostras de urina, podem trazer os trabalhadores rurais que o utilizam diariamente por um período prolongado.

7. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

7.1 O método foi desenvolvido e validado por CLAE-FL na determinação de glifosato em amostras de urina;

7.2 O método foi otimizado empregando-se no preparo de amostras extração por fase sólida;

7.3 O método por CLAE-FL demonstrou ser prático e preciso, mesmo sem a utilização de padrão interno, obtendo bons resultados na avaliação da precisão, exatidão, seletividade e sensibilidade para o analito de interesse;

7.4 O método apresentou bons limites de detecção e quantificação de 0,34 e 1,15ng/mL, respectivamente;

7.5 A metodologia desenvolvida foi aplicada as amostras de urina dos trabalhadores rurais com contato direto ao glifosato;

7.6 Neste estudo, 90 amostras foram analisadas a partir da metodologia desenvolvida e validada. Das amostras analisadas, 11(12%) foram encontrados níveis quantificáveis de glifosato;

7.7 A concentração mais alta de glifosato encontrado foi de 7,13ng/mL. Apesar de estarem presente resíduos de glifosato em algumas das amostras analisadas, nenhum dos casos ultrapassaram os valores permitidos, estabelecidos a níveis nacionais e internacionais. De acordo com órgãos reguladores nos Estados Unidos, consideram como Ingestão Diária Aceitável (IDA) de glifosato 1,75mg/kg/dia. Na União Europeia esse limite é de 0,3mg/kg/dia. O maior valor encontrado nas amostras foi de 0,007mg/kg, enquanto que no Brasil, de acordo com a Anvisa foi estabelecida uma IDA de 0,042mg/kg (42ng/mL).

7.8 Os resultados dão uma primeira ideia de que a extensão os trabalhadores do estudo estão expostos ao glifosato e o contato direto parece ser a principal fonte de exposição. No entanto,

um trabalho mais detalhado para distinguir entre diferentes situações de exposição, além do contato direto.

8. Referências

1. Jurado, A.; Fernandes, M.; Videira, R.; Peixoto, F.; Vicente, J. Herbicides: the Face and the Reverse of the Coin. An in Vitro Approach to the Toxicity of Herbicides in Non-Target Organisms. In: Kortekamp, A. (Ed.) Herbicides and Environment. 2011, p.3 -44. ISBN: 978-953-307-476-4, InTech, Disponível: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/herbicides-the-face-and-the-reverse-of-the-coin-an-in-vitro-approach-to-the-toxicity-of-herbicides-i>. Acesso em: 13 out.2017.
2. Qasem, J. R. Herbicides Applications: Problems and Considerations. In: Kortekamp, A. (Ed.). Herbicides and Environment. 2011, 643-664. ISBN: 978- 953-307-476-4, InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/herbicides-applications-problems-and-considerations>. Acesso em: 06 dez 2017.
3. Townsend, C. e Begon, M. Fundamentos em ecologia. Parte IV; Cap. 12.4 – A agricultura de monoculturas. ARTIMED. 2008.
4. Hayashi, M. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. Mutation research. 1998, 399(2):125-33. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9672655>>. Acesso em: 09 dez. 2017.
5. Ferraro, M.V.M.; Fenocchio, A. S.; Mantovani, M. S.; Ribeiro, C. O.; Cestari, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. Genetics and Molecular Biology. 2004, 27(1): 103-107.
6. Galli, A. J. B.; Montezuma, M. C. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. Ed. ACADCOM. 2005 Disponível em: <<http://www.monsanto.com.br/roundup/glifosato/indice.asp>> Acesso em: 30 out. 2017.

7. Amarante Júnior, O. P.; Santos, T.C.R.; Brito, N.M.; Ribeiro, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova*. 2002, 25(4): 589-593.
8. Carneiro, F. F.; Pignati, W.; Rigotto, R, M.; Augusto, L. G. S.; Rizzolo, A.; Faria, N. M. X.; Alexandre, V. P.; Friedrich, K.; Mello, M. S. C. 2012. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO.
9. Carvalho, V.; Tura, L. A expansão do monocultivo de soja em Santarém e Belterra: injustiça ambiental e ameaça a segurança alimentar. Belém: FASE. 2006.
10. Bomabail, V.; A.W. D.; Gordon, E.; Batty, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*. 2001, 44: 383-392.
11. Valdes, S.A.C. Estudo da contaminação por agrotóxicos em aves da Família *Camprimgidae* no Parque Nacional das Emas (GO). Tese (Doutorado em ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP. 2007.
12. Bony, S.; Gille, C.; Bouchez, A.; Margoum, C.; Devaux, A. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. *Aquatic Toxicology*. 2008, 89: 197–203.
13. Mitchheltmore, C. L.; Chipman, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation research*, 1998, 399(2):135-47. ISSN 4412141454. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9672656> >. Acesso em: 06 dez 2017.
14. GRISOLIA, C. K.; Rivero, C. L.G.; Starling, F. L. R. M.; Silva, I. C. R.; Barbosa, A. C.; Dorea, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*. 2009, 32(1): 138-143.
15. Velini, E.D.; Alves, E.; Godoy, M.C.; Meschede, D.K.; Souza, R.T.; Duke, S.O. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest Manag Sci*. 2008, 64:489–496.

16. Souza, T.A.; Matta, M.H.R.; Montagner, E.; Abreu, A.B.G. Study of recovery and stability of derivatized glyphosate and AMPA in soil using natural resins. *Quím. Nova*. 2006, 29: 1372-1376.
17. Possidônio Junior, O.A.; Rodrigues, T. C.; Brito, N.; Ribeiro, M.L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova*. 2002(a), 25: 589-593.
18. Botta, F.; Lavisio, G.; Couturier, G.; Alliot, F, F.; Moreau-Guigon, E.; Fauchon, N.; Guery, B.; Chevreuil, M.; Blanchoud, H. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere*. 2009, 77:133-139.
19. Rodrigues, H.G.; Batista, M.T.A.; Fonseca, L.C.; Aversi-Ferreira, T.A. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos - Uma breve revisão. *Biotemas*, 2009, 22: 7-16.
20. Coutinho, C.F.B.; Mazo, L.H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato; Revisão. *Química Nova*. 2005, 28(6): 1038-1045.
21. Williams, G.M.; Kroes, R.; Munro, L.C. Safety Evaluation and pregnancy outcome. *American Journal os Perinatal*. 1990, 7: 36-38.
22. Alonzo, H.G.A. e Corrêa, C.L. Praguicidas. In: OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. 3e.d., São Paulo: Atheneu, 2008, p. 623-641.
23. Mesnage, R. Cytotoxicity on human cell of Cry1An and Cry1Ac Bt insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. *J. Appl Toxicol*. 2013, 33(7):695-699.
24. World Health Organization (WHO). Report of Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues, FAO Plant Protection and Protection Paper 178. 2004, Rome, Italy.
25. Silbernagel, S.; Despopoulos, A. *Taschenatlas der Physiologie*. Thieme, Stuttgart
Tortora, G.J.; Derrickson, B.H. *Anatomie und Physiologie*. Wiley-VCH, Weinheim. 2006.
26. Anadón n.; Martinez-Larranaga, M.R.; Martinez, M.A.; Castellano, V.J.; Martinez, M. Martin, M.; Nozal, M.J.; Bernal, J.L. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicol Lett*. 2009, 190:91-95.

27. Niemann, L.; Sieke, C.; Pfiel, R.; Solecki, R. A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure on operators and consumers. 2015, 10: 03-12.
28. Wester, R.C.; Melendres, J.; Sarason, R.; McMaster, J.; Maibach, H.I. Glyphosate skin binding, absorption, residual tissue distribution, and skin decontamination. *Fundam Appl Toxicol.* 1991, 16:725–732.
29. Lavy, T.; Cowell, J.; Steinmetz, J.R.; Massey, J.H. Conifer seedling nursery exposure to glyphosate. *Arch Environ Contam Toxicol* 1992, 22:6–13.
30. Cowell, J.E.; Steinmetz, J.R. Assessment of Forest Worker Exposures to Glyphosate during Backpack Foliar Applications of Roundup® Herbicide. Monsanto Report No. MSL-9656. St. Louis, 1990, MO:Monsanto Company.
31. Jauhiainen, A.; Rasanen, K.; Sarantila, R.; Nuutinen, J.; Kangas, J. Occupational exposure of forest workers to glyphosate during brush saw spraying work. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1991, 52:61–64.
32. Richard, S. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental health perspective.* 2005, 113(6): 716-720.
33. Granja, C.U. Reported human health effects from glyphosate. Uribe Cualla Toxicology Clinic. Bogota: Department of Putumayo. 2001, p.81.
34. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Legislação. Visa Legis. Resolução RE n899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_899_2003_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acessado em: 10 ago. 2017.
35. Environmental Protection Agency (EPA). Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticides/epa-releases-draft-risk-assessments-glyphosate>. Acesso em: 05 set. 2017.
36. Helle, N.; Chmelka, F., Automated Derivatization, Cleanup and LC–MS–MS Determination of Glyphosate and AMPA. *The Column* (2013).

37. Chamberlain, K.; Evans, A.A.; Bromilow, R.H. 1-Octanol/Water Partition Coefficient (K_{ow}) and pK_a , for Ionisable Pesticides Measured Metric Method by a pH Keith. *Pestic Sci.* 1996, 47: 265-271.
38. Catrinck, T. C. P. G.; Dias, A.; Aguiar, M. C. S.; Silvério, F. O.; Fidêncio, P. H.; Pinho, G. P. A Simple and Efficient Method for Derivatization of Glyphosate and AMPA Using 9-Fluorenylmethyl Chloroformate and Spectrophotometric Analysis. *J. Braz. Chem. Soc.* 2014, 25 (7): 1194-1199.
39. Faria, V.H.F. Glifosato: desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação em soja e milho e avaliação de parâmetros laboratoriais em trabalhadores expostos a agrotóxicos. Tese (mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte-MG. 2013
40. Borjesson, E., L. Torstensson J. New methods for determination of glyphosate and aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. *J. Chromatograph.* 2000, 886 (1-2): 207-216.
41. Patsias, J.; Papadopoulou, A.; Papadopoulou-Mourkidou, E. Automated trace level determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatizations *J. Chromatogr.* 2001, 932: 83-90.
42. Cabrices, O. G.; Schreiber, A. Automated Derivatization, SPE Cleanup and LC/MS/MS Determination of Glyphosate and Other Polar Pesticides *Anal. Chem.* 2007, 79:3794-3801.
43. Shummer, C.; Millet, M.; Delhomme, O.; Appenzeller, B. M. R.; Wennig, R. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. 2009, 77: 1473-1482.
44. Ghanem, A.; Philippe Bados, Lucien Kerhoas, Jacqueline Dubroca, and Jacques Einhorn*. Glyphosate and AMPA Analysis in Sewage Sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOC Derivatization on Strong Anion-Exchange Resin as Solid Support. *Anal. Chem.* 2007, 79: 3794-3801

45. Royer, A.; Beguin, S.; Tabet, J.C.; Hulot, S.; Reding, M.A.; Communal, P.Y. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in water by gas chromatography with tandem mass spectrometry after exchange ion resin purification and derivatization. Application on vegetable matrixes. *J Anal. Chem.* 2000, 72: 3826-3832.
46. Acquavella, J. F.; Bleeke, M. Gustin, C.; Alexander, B. H.; Baker, B.; Mandel, J. S.; Chapman, P. Glyphosate biomonitoring for farms and their families: results from the farm family exposure study. 2004, 112: 321-326.
47. Curwin, B.D., Hein, M.J., Sanderson, W.T., Striley, C., Heederick, D., Kromhout, H., Reynolds, S.J., Alavanja, M.C. Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa. *The Annals of Occupational Hygiene.* 2007, 51(1):53-65.
48. Hoppe, H.W., Schledorn, P., Kruger, M., Schrod, W., Lutz, W., Schehata, A. Detection of Glyphosate Residues in Animals and Humans. *J Environ Anal Toxicol.* 2014, 4: 1-5.
49. Hogendoorn, E. A.; Ossendrijver, F. M.; Dijkman, E.; Baumann, R. A. Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatograph.* 1999, 833: 67-73.
50. Kataoka, H.; Ryu, S.; Sakiyama, N.; Makita, M. Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Chromatogr.* 1996, 726: 253-258.
51. Lovdahl, M.J.; D.J. Pietrzyk. Liquid Chromatography and Postcolumn Indirect Detection of Glyphosate. *J. Chromatogr.* 1992, 602: 197-204.
52. Roca, M.; Yusà, V. Leon, N.; Pastor, A. Comprehensive analytical strategy for biomonitoring of pesticides in urine by liquid chromatography-orbitrap high resolution mass spectrometry. *J. Chromatography.* 2014, 1374: 66-76.
53. Sancho, J.V.; Hernandez, F.; Lopez, F.J; Hogendoorn, E.A.; Dijkman, E.; Zoonen, P.van. Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic

- acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography. *J. Chromatography*. 1996, 737: 75-83.
54. Collins, C. H. & Guimarães, L. F. L., Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins, C. H. & Braga, G. L.; *Introdução a Métodos Cromatográficos*, 3. ed., Ed. UNICAMP, São Paulo, 1988, p 179 - 243.
55. Skoog, D.A. Holler, F.J. Nieman, T.A. *Principles of Instrumental Analysis*, 5 ed. Aravaca. Madrid, 2001, p 219-244.
56. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Visa Legis. Resolução RE nº 166, de 17 de maio de 2017. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acessado em: 10 ago. 2017.
57. Brasil. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Legislação. Visa Legis. Resolução RE nº27, de 17 de maio de 2012. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_27_2012_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acessado em: 10 ago. 2017.
58. Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. 2004, 27(5): 771-780.
59. Brasil. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE-008. Ver. 02. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007. 24p.
60. Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Infográficos: Dados gerais do município de Nova Mutum. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?codmun=510622>. Acesso em: 03 jan. 2018.

61. Tseng, G.H. Simultaneous quantification of glyphosate, glufosinate, and their major metabolites in rice and soybean sprouts by gas chromatography with pulsed flame photometric. *J. Agric. Food Chem*, 2004, 52(13):4057-4063.
62. Orejuela, E. e Silva, M. Rapid and sensitive determination of phosphorus-containing amino acid herbicides in soil samples by capillary zone electrophoresis with diode laser induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. 2005, 26:4478-4485.
63. Li, B. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in food using high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. 2007, 25(4):486-490.
64. Krholenko, M.V. Wieczorek, P.P. Determination of glyphosate and metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. *J. Chromatography*. 2005, 1093(1-2):111-117.
65. Ibanez, M. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography couple to electrospray tandem spectrometry. *J. Chromatography A*. 2005, 1081(2):145-155.
66. Hernández, F.; Hidalgo, C. Sancho, J.V. Determination of glyphosate residues in plants by precolumn derivatization and couple-column liquid chromatography with fluorescence detection. *J. of AOAC int*. 2000, 83(3): 728-734.
67. Anastassiades, M. ; Kolberg , D. I.; Eichhorn, E.; Benkenstein , A.; Lukačević , S.; Mack , D.; Wildgrube, C.; Sigalov, I.; Dörk , D.; Barth , A. Quick Method for the Analysis of Residues of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination (QuPPE-Method). Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM). 2012. Version 7.
68. Baker, D. R. e Levi, M.; Capodanno, E. Highly polar pesticide multi-residue in food safety by LC-MS/MS. 2015.
69. Barcelo, D. e MALLAT. E. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-

- exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. *J. Chromatogr., A* 1998, 823:129-136.
70. Baylis, A. D. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Manag. Sci.* 2000, 56 (4):299-308.
71. Botero-Coy, A.M.; Sancho, J.V.; Hernández, F. Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. *J. Chromatography.* 2013, 1313:157-165.
72. Bové, J.; Prou, D.; Perier, C.; Przedborski, S. Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. *The american society for experimental neurotherapeutics, Inc.* 2005, 2: 484-494.
73. Brewster, D.W.; Warren, J.; Hopkins, W.E. Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantification of glyphosate-derived materials following a single oral dose. *Fundam Appl Toxicol.* 1991, 17:43–51.
74. Carvalho, L. B.; Schmit, R.; Agostineto, M. C.; Ansolin, H. H.; Andrade, T. C. G. R. 2015.Synergism of mixtures of glyphosate and PROTOX inhibitor herbicides for morning-glory control.
75. Cowel, J.E.; Kuntsman, J.L.; Nord, P.J.; Steinmetz J.R.; Wilson G.R. Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite: an interlaboratory study. *J. Agric. Food. Chem.* 1986, 34:955–960.
76. Deyrup, C. L.; Chang, S.; Weintraub, R. A.; Moyer, H. A. Simultaneous esterification and acylation of pesticides for analysis by gas chromatography. Derivatization of glyphosate and (aminomethyl)- phosphonic with fluorinated alcohols-perfluorinated anhydrides. 1985: 944-947.
77. Grieves, N.; Wynne, P.; Hewetson, J.; Mulders, J.; Peebles, B.; Rousserty, K.; Rawlinson, C, Trengove, R. The application of LC-UFMSMS to the analysis of pesticides residues in negative ion ESI. *The application notebook.*
78. Landrigan, P.J.; Trasande, L.; Callan, R.; Droller, D.; Sonawane, B.; Butler, R.N. Early Environmental Origins of Neurodegenerative Disease in Later Life. *Environ health perspect.*2005, 113: 1230-1233.

79. Lehotay, S.J.; Lightfield, A.R.; Fetcho-Harman, J.; Donoghues, D.J. Analysis of Pesticide Residues in Eggs by Direct Sample Introduction/Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. 2001, 49:4589-4596.
80. Lin, C.H.; Yan, P.V.; Kumar, H.P. Determination of pyrethroid metabolites in human urine using liquid phase microextraction coupled in-syringe derivatization followed by gas chromatography/electron capture detection. Anal. Bional. Chem. 2001, 401: 221-233.
81. Lukaszewski, T. The extraction and analysis of quaternary ammonium compounds in biological material by GC and GC/MS. J Anal Toxicol. 1985, 9: 101-108.
82. Martinez, V.J.L. Arrebola, L.F.J.; Gonzáles, R.M.J.; Garrinho F.A.; Fernández, M.J.L. Validation of a gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry based method for the quantification of pesticides in food commodities. 2006,20(3):365-75.
83. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Agrotóxicos. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acessado em: 07 fev. 2017.
84. Moye, H. A.; Deyrup, C. L. A single-step derivatization method for the gas chromatographic analysis of the herbicide and metabolite. 1984, 192-195.
85. Nogueira, D.A. Os produtos dos genes *T_{sc1}* e *T_{sc2}* em processos neurodegenerativos. Tese (doutorado em ciências bilógicas/genética) – Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo-SP. 2016.
86. Nwani, C. D. et al. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. Environmental toxicology and pharmacology, v. 31, n. 2, p. 314-22, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787700> >. Acesso em: 10 dez. 2017.
87. Pineiro, M.; Frias, C. F.; Gramacho, S. A. Gas chromatography-mass spectrometry and microwave-assisted derivatization for identification of glucose isomers: experience for post-graduate teaching of analysis and characterization of organic compounds. 2014, 176-180.

88. Posecion Junior, N.C.; Ostrea Jr., E.M. Bielawki, D.M. Quantitative Determination of Paraquat in Meconium by Sodium Borohydride-Nickel Chloride Chemical Reduction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008, 862: 93-99.
89. Possidônio Junior, O.A.; Rodrigues, T. C.; Brito, N.; Ribeiro, M.L. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: Breve revisão. *Quim. Nova.* 2002(b), 25: 420-428.
90. Prefeitura Municipal de Nova Mutum. Histórico de Nova Mutum. Disponível em: <http://www.novamutum.mt.gov.br/>. Acesso em: 03 jan. 2018.
91. Prestes, O.D.; Friggi, C.A.; Adaime, M.B.; Zanella, R. QuEChERS - A modern sample preparation method for pesticide multiresidue determination in food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry. *Quim. Nova* 2009, 32: 51-64.
92. Proença, P.; Vidinha, J.; Teixeira, H.; Castanheira, F.; Mendonça, M. C.; Sousa, E.; Mustra, C.; Franco, J.; Corte-Real, F.; Vieira, D. N. Determinations os Paraquat in blood and urine by Liquid Chromatography Eletrospray-Mass Spectrometry, Coimbra University Press, 2010, 329-334.
93. Queiroz, G. M. P.; Silva, M. R.; Bianco, R. J. F.; Pinheiro, A.; Kaufmann. Transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. *Quim. Nova.* 2011, 34(2): 190-195.
94. Roy, D. N.; Konar. Development of na analytical method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)-phosphonic acid residues in soil by nitrogen-selective gas chromatography. 1989, 441-443.
95. Rubia, C. A. Potencial de toxicidade dos herbicidas glifosato e imazetapir em *Colossoma Macropomum (pieces)*. Tese (mestrado em ciências ambientais) – Universidade Federal do Oeste do Pará. Santarém-PR. 2013.

96. Silva, M. D.; Peralba, M. C. R.; Mattos, M. L. T. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão. In: *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba. 2003, v.13, p. 19-28, jan./dez.
97. Steinborn, A.; Alder, L.; Michalski, B.; Zomer, P.; Bending, P.; Martinez, S. A.; Mol, H. G. J.; Class, T. J.; Pinheiro, N. C. Determination of Glyphosate Levels in Breast Milk Samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J. Agric. and Food Chem.* 2016, 64: 1414-1421.
98. Trent, T, Jordan, R. Determination of highly polar pesticides residues in food of plant origin, by an automated QuPPE solution. *The application notebook*, 2014, 2-4.
99. World Health Organization (WHO). 1994. Glyphosate. *Environmental Health Criteria*. Publication N° 159, Geneva, Switzerland.
100. Zouaoui, K.; Dulaurent, S; Gaulier, J.M.; Moesch, C.; Lachâtre, G. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: about 13 cases of acute intoxication. *J. Forense Sci. Intern.* 2013, 226: 20-25.
101. Moore, W.J.; *Físico-Química*; 4ª Ed.; Vol. 2; São Paulo; Editora Edgard Blücher, 1976; p. 705 - 706.

9. APÊNDICE

v1 →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	25	30
v2 ↓																	
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	242.98	243.90	245.95	248.02	249.05	249.26	250.10
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.46
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.70	8.66	8.64	8.63	8.62
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.86	5.80	5.77	5.77	5.75
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.62	4.56	4.53	4.52	4.50
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.94	3.87	3.84	3.83	3.81
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.51	3.44	3.41	3.40	3.38
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.22	3.15	3.12	3.11	3.08
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.01	2.94	2.90	2.89	2.86
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.85	2.77	2.74	2.73	2.70
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.72	2.65	2.61	2.60	2.57
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.62	2.54	2.51	2.50	2.47
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.53	2.46	2.42	2.41	2.38
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.46	2.39	2.35	2.34	2.31
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.40	2.33	2.29	2.28	2.25
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.35	2.28	2.24	2.23	2.19
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.31	2.23	2.19	2.18	2.15
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.27	2.19	2.15	2.14	2.11
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.23	2.16	2.11	2.11	2.07
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.20	2.12	2.08	2.07	2.04
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.18	2.10	2.05	2.05	2.01
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.15	2.07	2.03	2.02	1.98
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.24	2.20	2.13	2.05	2.01	2.00	1.96
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.22	2.18	2.11	2.03	1.98	1.97	1.94
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.09	2.01	1.96	1.96	1.92
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.07	1.99	1.95	1.94	1.90
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.17	2.13	2.06	1.97	1.93	1.92	1.88
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.04	1.96	1.91	1.91	1.87
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.03	1.94	1.90	1.89	1.85
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.01	1.93	1.89	1.88	1.84
35	4.12	3.27	2.87	2.64	2.49	2.37	2.29	2.22	2.16	2.11	2.07	2.04	1.96	1.88	1.83	1.82	1.79
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.92	1.84	1.79	1.78	1.74

Valores tabelados de F.