

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELLE CAROLINE PEITER

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUAS**

PALOTINA

2017

GABRIELLE CAROLINE PEITER

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologias de Bioprodutos Agroindustriais, do Programa de Pós-graduação em Tecnologias de Bioprodutos Agroindustriais, do Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivonete Rossi Bautitz

PALOTINA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P377 Peiter, Gabrielle Caroline
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para
determinação de glifosato e ampa em águas / Gabrielle Caroline
Peiter – Palotina, 2017.
75f.

Orientadora: Ivonete Rossi Bautitz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias de
Bioprodutos Agroindustriais.

1. Glifosato. 2. EFS. 3. CLAE-UV-VIS. I. Bautitz, Inonete
Rossi. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 632.93:632.51



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós-Graduação TECNOLOGIAS DE BIOPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

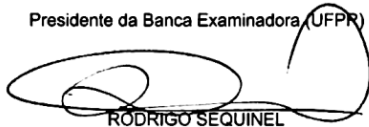
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em TECNOLOGIAS DE BIOPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GABRIELLE CAROLINE PEITER** intitulada: **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUAS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

PALOTINA, 16 de Março de 2017.


IVONETE ROSSI BAUTITZ

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


RÓDRIGO SEQUINEL

Avaliador Externo (UFPR)


MARIA CRISTINA MILINSK

Avaliador Externo (UFPR)

Dedico esse trabalho aos meus
queridos e amados pais, que mesmo com
todas as dificuldades sempre estiveram
ao meu lado.

Ao meu noivo, por sua paciência,
companheirismo e por ser um exemplo
para mim.

A minha irmã, tão diferente e tão
igual a mim.

A minha sogra por ter me acolhido
como filha.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida, amor incondicional, saúde e fé para alcançar mais essa conquista.

A minha orientadora Ivonete Rossi Bautitz, minha sincera gratidão, sua liderança, conhecimento e generosidade tem sido motivo de inspiração constante. Obrigada pelas oportunidades, pela paciência, confiança e amizade.

Aos meus pais pelo total apoio, ao meu noivo por sempre estar presente, minha irmã que presenciou e respeitou o meu silêncio, aos meus amigos Anne, Emilio e Mayara que sempre me proporcionaram momentos de descontração e torceram por mim.

A equipe do Bloco de Química da UFPR – Setor Palotina, Aline Bavaresco, Guilherme Lenz, Larissa Bortoli, Maiara Aguiar e Raquel Vilvert, pela amizade, incentivo e ajuda em todos os momentos.

A todos os professores da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, que contribuíram para o meu crescimento acadêmico/profissional.

Ao grupo GECromA pelas oportunidades, trocas de informações e aporte financeiro.

Aos colegas de laboratório pela agradável convivência.

Ao PGADS pela coleta das amostras de água.

A CAPES – Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa jornada, que me acompanharam, choraram, riram, sentiram, participaram, aconselharam, dividiram; as suas companhias, as suas palavras e mesmo as ausências foram expressões de amor profundo. As alegrias de hoje também são suas, pois seus amores, estímulos e carinhos foram armas para essa minha vitória.

Tudo o que damos ao mundo
retorna e ressoa. O mundo é um lugar
que faz eco.

OSHO, 1990

RESUMO

O uso de pesticidas tem aumentado consideravelmente para atender às necessidades socioeconômicas de muitos países, entretanto, o uso indiscriminado desses produtos químicos tem contribuído para a contaminação de organismos e ecossistemas. Os herbicidas a base de glifosato são muito utilizados devido ao custo relativamente baixo e excelente eficiência na eliminação de ervas daninhas. Além de sua elevada eficácia esse herbicida é classificado como pouco tóxico sendo rapidamente convertido ao seu principal metabólito, embora, estudos apontem possíveis efeitos deletérios para organismos e o ambiente. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método analítico para a determinação de glifosato e seu metabólito AMPA em águas superficiais, utilizando o procedimento de extração em fase sólida e derivatização por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis (CLAE-UV-Vis). O desenvolvimento do método foi feito avaliando-se algumas condições cromatográficas e a que apresentou melhor resolução dos picos dos analitos foi fase móvel com composição inicial de tampão KH_2PO_4 :acetonitrila (70:30) até 2 minutos, com aumento de acetonitrila a uma razão de 15 % min^{-1} até 5 minutos (25:75), mantendo essa proporção até 17 minutos, fluxo de 0,8 mL min^{-1} , coluna de fase reversa (C18) e detecção no comprimento de onda 206 nm. Nessas condições foram obtidos tempos de retenção de 3,5 para glifosato e 7,0 para AMPA. O procedimento de extração em fase sólida mostrou-se eficiente na extração e pré-concentração de GLY e AMPA com porcentagens de recuperação de 83 a 88% e 88 a 91%, respectivamente. A reação de derivatização possibilitou a detecção dos analitos pela técnica de CLAE-UV-Vis. Alguns fatores importantes no processo de derivatização foram avaliados e a condição que apresentou os melhores resultados foi razão molar de 1:25, tempo de agitação de 5 minutos, tempo de reação de 20 minutos em temperatura ambiente. Os limites de detecção e quantificação da metodologia proposta foram de 10,0 e 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para GLY e 6,0 e 18,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AMPA, respectivamente. Além disso, o método proposto apresentou boa seletividade, linearidade, precisão e exatidão, mostrando-se como uma alternativa para a verificação do atendimento da legislação quanto aos valores máximos permitidos. As concentrações de GLY e AMPA nas amostras de água superficial estão abaixo do limite de detecção da metodologia proposta.

Palavras-chave: Glifosato. EFS. CLAE-UV-Vis.

ABSTRACT

The use of pesticides has increasing considerably to meet the socioeconomic needs of many countries, however, the indiscriminate use of chemicals has contributed to a contamination of organisms and ecosystems. Glyphosate-based herbicides are widely used because of the low cost and excellent weed elimination efficiency. In addition to its high efficacy, this herbicide is classified as low toxic and is rapidly converted to its main metabolite, however, studies point to possible deleterious effects on organisms and the environment. In this context, the objective of this paper was to develop and validate an analytical method for the determination of glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters, using the procedure of solid-phase extraction and derivatisation by high-performance liquid chromatography with UV-Vis detector (HPLC-UV-Vis). The development of the method was performed through the evaluation of some chromatographic conditions and the one with the best peak resolution of the analytes was the mobile phase with initial composition of KH_2PO_4 : acetonitrile (70:30) up to 2 minutes, with increase of acetonitrile in the proportion of 15 % min^{-1} up to 5 minutes (25:75), maintaining this ratio up to 17 minutes, with detection at wavelength 206 nm and flow of 0.8 mL min^{-1} and reversed phase column (C18). Under these conditions retention times of 3.5 for glyphosate and 7.0 for AMPA were obtained. The solid-phase extraction procedure was efficient at GLY and AMPA pre-concentration and extraction with recovery percentages of 83-88% and 88-91%, respectively. The derivatization reaction enabled the detection of the analytes by the HPLC-UV-Vis technique. Some important factors in the derivatisation process were evaluated and the condition that presented the best results was molar ratio of 1:25, a stirring time of 5 minutes, a reaction time of 20 minutes at room temperature. The limits of detection and quantification of the proposed methodology were 10.0 and 25.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for GLY and 6.0 and 18.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ for AMPA, respectively. In addition, the proposed method presented good selectivity, linearity, precision and accuracy, showing itself as an alternative for verifying compliance with the legislation regarding maximum permitted values. The concentrations of GLY and AMPA in the surface water samples are below the limit of detection of the proposed methodology.

Key-words: Glyphosate. SPE. HPLC-UV-Vis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – VENDAS DE AGROTÓXICOS DOS PRINCIPAIS ESTADOS CONSUMIDORES BRASILEIROS.....	17
FIGURA 2 – CLASSES MAIS VENDIDAS DE AGROTÓXICOS NO BRASIL.....	18
FIGURA 3 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO GLY.....	19
FIGURA 4 – CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO DO GLIFOSATO.....	20
FIGURA 5 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO AMPA.....	20
FIGURA 6 – CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO DO AMPA.....	21
FIGURA 7 – ROTAS DE DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO GLY.....	22
FIGURA 8 – ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	29
FIGURA 9 – REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DE GLY E AMPA COM FMOC-Cl.....	30
FIGURA 10 – PONTOS DE COLETA DE AMOSTRA DE ÁGUA SUPERFICIAL.....	37
FIGURA 11 – PONTO DE COLETA DA AMOSTRA TESTEMUNHA.....	38
FIGURA 12 – SISTEMA DE FILTRAÇÃO DAS AMOSTRAS (A) E SISTEMA DE EFS (B).....	38
FIGURA 13 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO AGENTE DERIVATIZANTE FMOC-Cl.....	43
FIGURA 14 – CROMATOGRAMAS COM INDICAÇÃO DE PICOS CORRESPONDENTES AO FMOC-Cl E FMOC-OH.....	44
FIGURA 15 – CROMATOGRAMAS REFERENTES A DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RETENÇÃO DO PRODUTO DERIVATIZADO GLY-FMOC.....	44
FIGURA 16 – CROMATOGRAMAS REFERENTES A DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RETENÇÃO DO PRODUTO DERIVATIZADO AMPA-FMOC.....	45
FIGURA 17 – CROMATOGRAMA REFERENTE A CONDIÇÃO CROMATOGRÁFICA OTIMIZADA: Fase móvel: tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹ (pH 5,5):acetonitrila, com eluição por gradiente. A composição inicial foi KH ₂ PO ₄ :acetonitrila (70:30) até 2 minutos, com aumento de acetonitrila a uma razão de 15 % min ⁻¹ até 5 minutos (25:75), mantendo essa proporção até 17 minutos, com detecção no comprimento de onda 206 nm e fluxo de 0,8 mL min ⁻¹ , coluna de fase reversa (C18).....	47
FIGURA 18 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO EM DIFERENTES REGIÕES DOS PICOS DE GLY-FMOC E AMPA-FMOC.....	52

FIGURA 19 – CROMATOGRAMAS REFERENTES A AMOSTRA TESTEMUNHA E DA MATRIZ FORTIFICADA COM CONCENTRAÇÃO DE 10,0 mg L ⁻¹ DE GLY E AMPA.....	53
FIGURA 20 – CURVAS ANALÍTICAS PARA O GLY E AMPA. Condições cromatográficas: Fase móvel: tampão fosfato 0,05 mol L ⁻¹ (pH 5,5):acetonitrila, com eluição por gradiente. A composição inicial foi KH ₂ PO ₄ :acetonitrila (70:30) até 2 minutos, com aumento de acetonitrila a uma razão de 15 % min ⁻¹ até 5 minutos (25:75), mantendo essa proporção até 17 minutos, com detecção no comprimento de onda 206 nm e fluxo de 0,8 mL min ⁻¹ , coluna de fase reversa (C18).....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – EFEITOS DO GLIFOSATO EM ORGANISMOS.....	24
TABELA 2 – OCORRÊNCIA DE GLY E AMPA EM AMBIENTES AQUÁTICOS.....	26
TABELA 3 – LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO DE GLY EM ALGUMAS CULTURAS.....	27
TABELA 4 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE GLY E AMPA EM AMOSTRAS DE ÁGUA.....	28
TABELA 5 – CARTUCHOS E CONDIÇÕES TESTADAS PARA EFS DE GLY E AMPA.....	39
TABELA 6 – PARÂMETROS DE IDENTIFICAÇÃO DE CADA COMPOSTO	47
TABELA 7 – VARIAÇÃO DOS TEMPOS DE RETENÇÃO COM ALTERAÇÕES DA PORCENTAGEM DE ACETONITRILA NA FASE MÓVEL.....	48
TABELA 8 – EFEITO DA RAZÃO MOLAR ENTRE GLY:FMOC E AMPA:FMOC.....	49
TABELA 9 – TEMPO DE REAÇÃO E ÁREA DO PICO DE GLY-FMOC E AMPA-FMOC REFERENTES AO PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO.....	50
TABELA 10 – RESULTADOS DE EXTRAÇÃO DE GLY E AMPA POR EFS.....	51
TABELA 11 – PARÂMETROS DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DE GLY E AMPA.....	54
TABELA 12 – ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA PRECISÃO PARA GLY	55
TABELA 13 – ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA PRECISÃO PARA AMPA	55
TABELA 14 – PRECISÃO INSTRUMENTAL REFERENTE A INJEÇÃO DE PADRÕES DE GLY E AMPA	56
TABELA 15 – ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE GLY EM AMOSTRAS DE ÁGUA.....	57
TABELA 16– ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE AMPA EM AMOSTRAS DE ÁGUA.....	57
TABELA 17 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PARA GLY E AMPA.....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	15
1.1.2	Objetivos Específicos	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	AGROTÓXICOS	15
2.2	HERBICIDA GLIFOSATO.....	17
2.2.1	Características físico-químicas do GLY e AMPA.....	18
2.2.2	Modo de ação e degradação ambiental do GLY	21
2.2.3	Formas de contaminação humana e ambiental e efeitos toxicológicos do GLY.....	23
2.2.4	Ocorrência de GLY e AMPA em ambientes aquáticos	25
2.2.5	Legislação referente a limites máximos permitidos para GLY e AMPA	26
2.3	DETERMINAÇÃO DE GLY E AMPA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	27
2.4	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	30
2.4.1	Seletividade	31
2.4.2	Linearidade.....	32
2.4.3	Limite de detecção e quantificação.....	32
2.4.4	Precisão.....	34
2.4.5	Exatidão.....	34
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	REAGENTES	35
3.2	PREPARO DE SOLUÇÕES	36
3.3	EQUIPAMENTOS.....	36
3.4	AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL	36
3.5	EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE GLY E AMPA	39
3.6	REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DE GLY E AMPA	39
3.7	ANÁLISE QUÍMICA DE GLY E AMPA.....	40
3.8	PARÂMETROS AVALIADOS NA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE GLY E AMPA.....	40
3.8.1	Determinação da Seletividade	40
3.8.2	Determinação da Linearidade.....	40

3.8.3	Determinação da Precisão	41
3.8.4	Determinação da Exatidão	41
3.8.5	Determinação do Limite de detecção e quantificação	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE GLY E AMPA POR CLAE UV-VIS.....	42
4.1.1	Determinação do tempo de retenção de GLY e AMPA	42
4.1.2	Estudo da composição da fase móvel para as análises cromatográficas.....	45
4.2	ESTUDO DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DE GLY E AMPA	48
4.2.1	Efeito da razão molar entre GLY:FMOC e AMPA:FMOC	48
4.2.2	Influência do tempo de reação no processo de derivatização	49
4.3	AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ...	51
4.4	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE GLY E AMPA.....	52
4.4.1	Avaliação da seletividade do método analítico	52
4.4.2	Avaliação da linearidade do método analítico	53
4.4.3	Avaliação da precisão do método analítico	54
4.4.4	Avaliação da exatidão do método analítico	56
4.4.5	Avaliação do limite de detecção e quantificação do método analítico	58
4.4.6	Determinação de GLY e AMPA em amostras de água superficial	58
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	ANEXO A – RELATÓRIO DE ENSAIO GLY E AMPA	75

1 INTRODUÇÃO

A atividade agrícola brasileira ampliou-se e modernizou-se consideravelmente ao longo do tempo. A demanda cada vez maior por esses produtos ocorre devido ao aumento da necessidade de produção de alimentos, provocada pela expansão da população mundial. Diversos fatores podem interferir no potencial produtivo das culturas agrícolas, dentre eles destaca-se a incidência de plantas daninhas.

As plantas daninhas possuem alta capacidade de competir por espaço, luz e nutrientes com plantas cultivadas, levando a perdas de qualidade e produtividade das culturas. Assim, devido ao aumento da necessidade de produção foram necessárias formas de combater esses grupos considerados infestantes na ocupação do agrossistema. Como alternativas de controle, atualmente, o uso de herbicidas predomina devido à grande eficiência destes, porém quando utilizados de maneira indiscriminada podem acarretar riscos à saúde e ao ambiente.

Um dos herbicidas mais empregados mundialmente é o glifosato. Tamanho sucesso de vendas se deve a grande eficiência na eliminação de ervas daninhas, baixa toxicidade e sua rápida conversão ao seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA). Apesar do glifosato ser classificado como pouco tóxico existem indícios de que promove a contaminação da água e do solo provocando efeitos deletérios à saúde humana, a outros organismos e ao ambiente (IBÁÑEZ et al., 2005; MERCURIO et al., 2014; SÉRALINI, 2014).

Dessa forma, faz-se necessário o monitoramento de glifosato e AMPA em amostras ambientais, em função de sua ampla utilização e dos riscos associados. Esse monitoramento deve ser feito por meio de metodologias analíticas validadas, que permitam mensurar essa contaminação e assim gerar dados confiáveis para nortear tomadas de decisão por órgãos competentes.

Dentre as técnicas empregadas para fazer o monitoramento a cromatografia é frequentemente utilizada por apresentar alta seletividade e sensibilidade, destacando-se a cromatografia líquida e a cromatografia à gás acopladas a diferentes detectores. O detector de espectrometria de massas é bastante utilizado por possibilitar a detecção de baixos níveis desses compostos além da análise qualitativa extremamente confiável. Entretanto, esses sistemas de cromatografia acoplados com detectores de espectrometria de massas são de custo elevado e

disponibilidade limitada na maioria dos pequenos laboratórios de pesquisa brasileiros.

Nesse contexto, buscou-se o desenvolvimento de uma metodologia analítica eficiente e confiável para a determinação de GLY e AMPA utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis por ser uma técnica amplamente disponível.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método analítico para a determinação de glifosato (GLY) e AMPA, seu principal metabólito, em águas utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de absorção molecular no ultravioleta e visível (UV-Vis).

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar diferentes condições cromatográficas para análise de GLY e AMPA.
- b) Estudar a reação de derivatização de GLY e AMPA.
- c) Avaliar a extração e pré-concentração dos analitos por meio do procedimento de extração em fase sólida.
- d) Verificar os parâmetros de validação: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.
- e) Determinar a presença de GLY e AMPA em amostras de água superficial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGROTÓXICOS

Agrotóxico é definido como “produto e agente de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” (BRASIL, 1989; US EPA, 2016). Dessa forma, agrotóxicos são substâncias as quais visam o controle de organismos considerados indesejáveis.

Em geral, os agrotóxicos inibem a atividade de uma enzima na célula dos organismos alvos e, com isso, promovem uma série de eventos que causam a morte

ou inibição do desenvolvimento do organismo em poucos dias ou semanas (GONÇALVES et al., 2002; BUCHANAN et al., 2000).

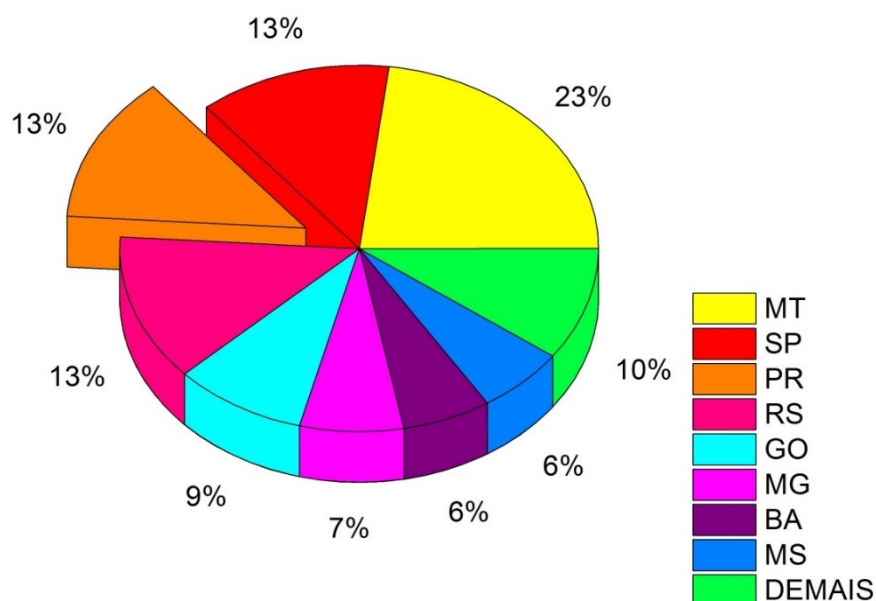
Entre 2000 e 2010 as vendas brasileiras dos agentes químicos em geral cresceram 190%, enquanto as vendas globais ficaram em 93% (ANVISA, 2012). Uma grande parcela desses agentes químicos corresponde a agrotóxicos.

O aumento do uso de agrotóxicos no Brasil iniciou por volta de 1950 com a “Revolução Verde” que tinha como interesse aumentar a produção agrícola de países menos desenvolvidos através de várias tecnologias como o melhoramento genético, o uso extensivo de produtos químicos e a automação das lavouras por meio de maquinário (MOREIRA et al., 2002; BOZIKI et al, 2011).

Em 2008, o Brasil passou a ocupar a primeira posição mundial entre os países que mais utilizam agrotóxicos, movimentando cerca de US\$ 7 bilhões (ANDEF, 2009). Desde então, percebe-se um crescimento considerável no consumo, pois em 2011 houve um aumento de 16,3% das vendas, alcançando US\$ 8,5 bilhões, e em 2013, esse percentual subiu para 18%, representando US\$ 11,5 bilhões (ANVISA, 2012; SINDIVEG, 2014).

Os estados brasileiros que apresentam maior consumo de agrotóxicos estão em regiões com elevada intensidade de monoculturas de soja, milho, cana, algodão e arroz. Nesse cenário, o Paraná, juntamente com São Paulo e Rio Grande do Sul, destaca-se como segundo maior consumidor de agrotóxicos do país (FIGURA 1) (SINDIVEG, 2016).

FIGURA 1 – VENDAS DE AGROTÓXICOS DOS PRINCIPAIS ESTADOS CONSUMIDORES BRASILEIROS



FONTE: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal - SINDVEG (2016).

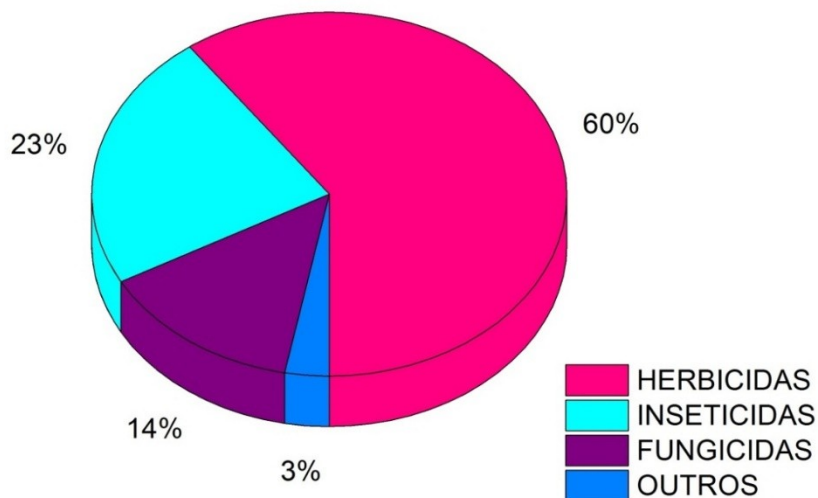
O uso de agrotóxicos na agricultura proporciona muitos benefícios tais como, o aumento da produção agrícola, aumento do lucro dos agricultores, a melhoria da qualidade dos produtos, a redução do trabalho manual e conseqüentemente dos custos com a produção, a diminuição das perdas de alimentos armazenados, além do controle da população de animais vetores de doenças (COUTINHO, 2005).

Entretanto, além dos benefícios os agrotóxicos trouxeram problemas relacionados à contaminação de organismos e do ambiente. Os impactos na segurança alimentar e nutricional dos seres humanos por ingerir a água e os alimentos contaminados também devem ser considerados (CARNEIRO et al., 2015).

2.2 HERBICIDA GLIFOSATO

Os agrotóxicos mais vendidos no mercado brasileiro são os herbicidas, representado 60% do total (FIGURA 2). Dentre os herbicidas mais utilizados, o GLY representa 45% das importações da classe, devido ao uso nas culturas de soja, milho, algodão, entre outras (SINDIVEG, 2016).

FIGURA 2 – CLASSES MAIS VENDIDAS DE AGROTÓXICOS NO BRASIL



FONTE: Elaborado pela autora a partir de dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal - SINDVEG (2016).

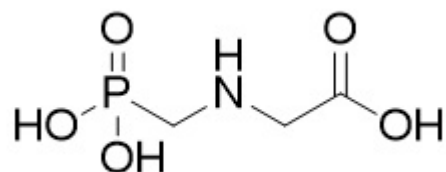
O GLY é um dos herbicidas mais utilizados na agricultura e isso se deve à sua elevada eficiência no controle de plantas invasoras. Pertencente ao grupo químico das glicinas, ele é classificado como não seletivo, sistêmico, pós-emergente e de amplo espectro (US EPA, 1993) e seu principal metabólito é o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (MONSANTO, 1980).

Sua atividade herbicida foi descoberta em 1970 por John E. Franz, cientista da Companhia Monsanto. Começou a ser comercializado em 1974, patenteado para uso herbicida com o nome comercial de Roundup® (WILLIAMS et al., 2000; DUKE; POWLES, 2008). Desde o início de sua comercialização mais de 100 formulações à base de GLY têm sido utilizadas em todo o mundo com aplicação em áreas agrícolas e não agrícolas, como acostamentos de estradas de rodagem e ferrovias, controle de vegetação embaixo de linhas de transmissão, etc. (CCME, 2012).

2.2.1 Características físico-químicas do GLY e AMPA

O GLY é caracterizado como um ácido fraco por pertencer ao grupo das glicinas substituídas, apresenta o nome químico N-(fosfometil) glicina, fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (M.M= 169,1 g/mol) (WHO, 1994) cuja estrutura é apresentada na FIGURA 3.

FIGURA 3 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO GLY

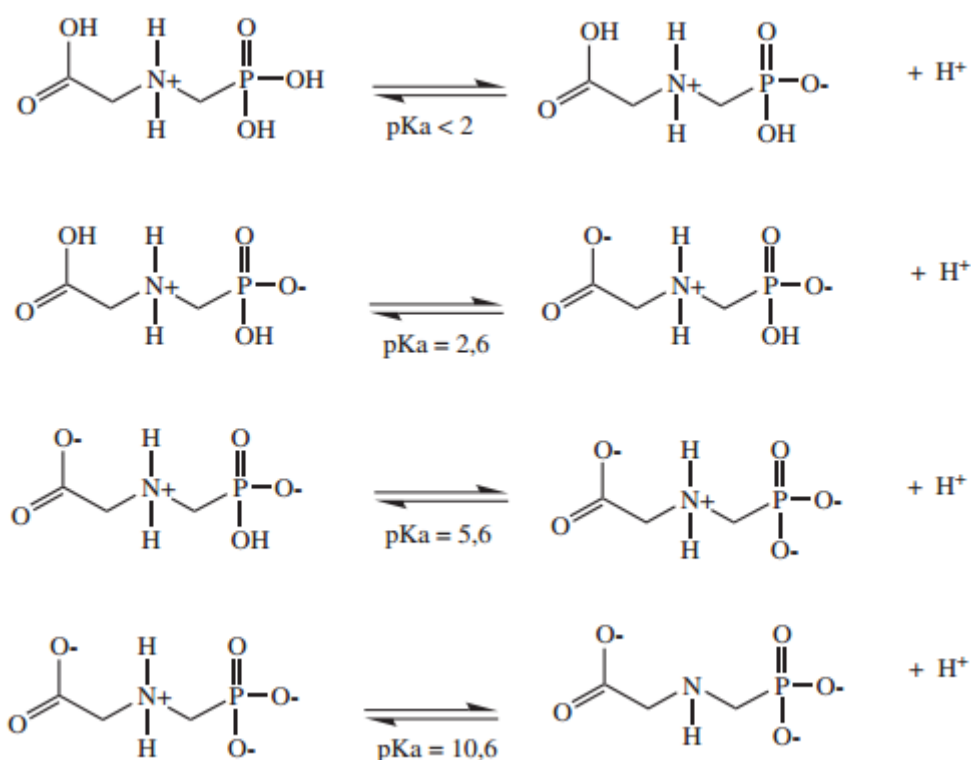


FONTE: Knuutila e Knuutila, (1979).

Em condições ambiente esse composto é um sólido cristalino, incolor e inodoro. Segundo Franz et al. (1997), o GLY apresenta pouca volatilidade, devido à baixa pressão de vapor ($7,5 \times 10^{-8}$ mm Hg) funde-se a $189,9$ °C, densidade de $0,5$ g/cm³ e apresenta-se bastante estável na presença de luz e até mesmo em temperaturas superiores a 60 °C. Apresenta baixa solubilidade em solventes orgânicos comuns e bastante solúvel em água (12 g/L a 25 °C) (IARC MONOGRAPHS, 2015). Este herbicida tem um coeficiente elevado de adsorção no solo ($K_d = 61$ g/cm³), apresentando dessa forma baixa mobilidade e um coeficiente de partição octanol/água muito baixo ($\log K_{ow} = -2,8$), o que indica baixa tendência de bioacumulação (IPCS, 1994).

O GLY apresenta um comportamento zwitteriônico, o que faz com que em determinadas condições, tenha uma capacidade de troca aniônica e em outra catiônica. Os valores de literatura para o pK_a do GLY são: $pK_{a1} = <2$; $pK_{a2} = 2,6$; $pK_{a3} = 5,6$; $pK_{a4} = 10,6$ (FIGURA 4). Tais constantes indicam o grau de dissociação do herbicida em função do pH (SPRANKLE, 1975).

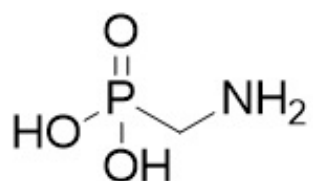
FIGURA 4 – CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO DO GLIFOSATO



FONTE: Coutinho (2005).

As propriedades físico-químicas do AMPA são semelhantes ao do GLY e sua estrutura pode ser observada na FIGURA 5.

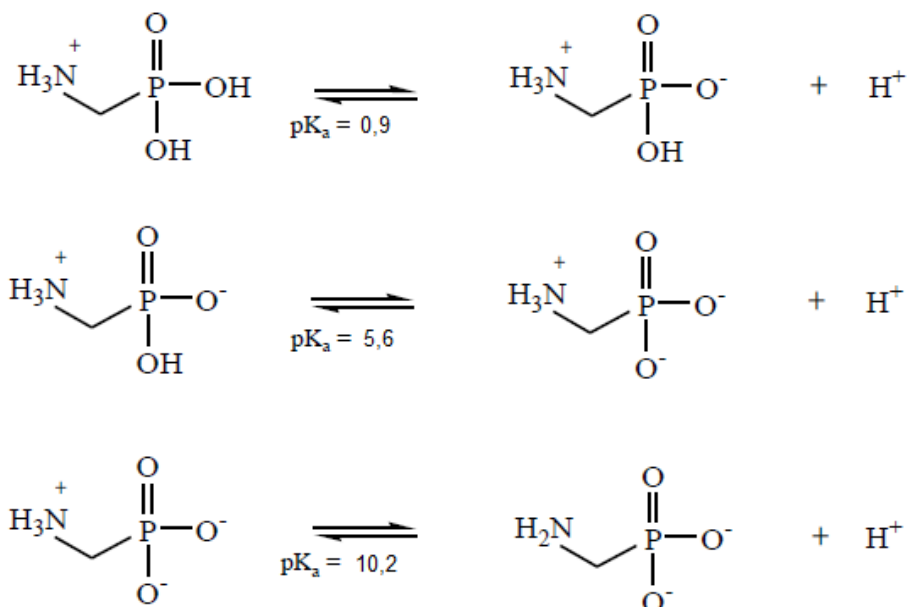
FIGURA 5 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO AMPA



FONTE: Amarante Junior (2002).

Esse composto possui fórmula molecular $\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$ (M.M., = 111,0 g/mol) e pode ser encontrado na forma de pequenos cristais incolores em temperatura ambiente. Apresenta muita solubilidade em meio aquoso e pouca em solventes orgânicos e quando solubilizado em água pode ser encontrado em diferentes formas, protonado ou não, pois possui diferentes valores de pK_a : $\text{pK}_{a1} = 0,9$; $\text{pK}_{a2} = 5,6$; $\text{pK}_{a3} = 10,20$ (FIGURA 6) (SMIT et al., 2001).

FIGURA 6 – CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO DO AMPA



FONTE: Silva (2011).

2.2.2 Modo de ação e degradação ambiental do GLY

Por ser um herbicida sistêmico, após sua aplicação o GLY é imediatamente translocado através do floema para todas as partes da planta. Sua ação inibe a rota enzimática do ácido chiquímico, impedindo a ação da enzima 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase (EPSPs) por competição pela fosfoenolpiruvato (PEP), suspendendo assim a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais para o desenvolvimento da planta (JAWORSKI, 1972; OLIVEIRA, 2001).

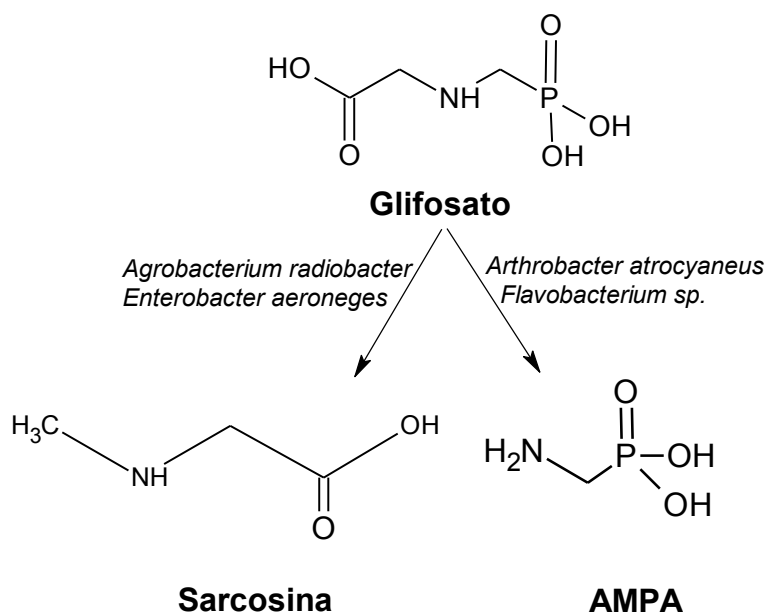
A atividade da enzima desempenha um papel fundamental na produção do intermediário corismato, necessário para a biossíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (STEINRUCKEN; AMRHEIN, 1980; WILLIAMS et al., 2000). A inibição desses aminoácidos ocasionada pelo GLY afeta a síntese proteica levando assim a morte celular. Ponderando-se que esta via está ausente em animais, sugeriu-se que o uso do GLY seria seguro e inofensivo para os seres humanos (WILLIAMS; WATSON; DESESSO, 2012).

Após a aplicação, o GLY pode ser absorvido pela planta ou metabolizado e degradado por micro-organismos do solo. Segundo Locke et al. (2008), a fotodegradação e degradação química não são significativas na dissipação de GLY em solos. A persistência do GLY no ambiente e sua taxa de degradação dependem

de características minerais do solo (PRATA; LAVORENTI, 2000). Na literatura os dados de degradação do GLY no solo variam de menos de uma semana até alguns meses, dependendo dos teores de argila e matéria orgânica, das condições climáticas (IPCS, 1994) e do nível de atividade microbiana (TONI et al., 2006). O GLY possui em média, meia-vida (tempo necessário para que metade da quantidade aplicada do produto seja degradada) no solo de 32 dias, podendo variar entre 2 a 197 dias (RAGAB et al., 1985; OPPENHUIZEN; GOURE, 1993; HEINONEN-TANSKI et al., 1985; MESSTDAGH, 1979; DANHAUS, 1984; GIESY et al., 2000). No que diz respeito à meia-vida de GLY em águas Mallat et al. (1998) relatam meia-vida de 60 horas para águas subterrâneas e 100 horas para água de rio. Já a meia-vida do AMPA no solo é estimada em 145 dias, podendo variar de 76 a 240 dias (OPPENHUIZEN; GOURE, 1993; GUSTAFSON; BLEEKE, 2000) e em águas, a meia-vida do metabolito é de 2 a 5 dias (CAPRI, 2010).

O processo de degradação do GLY no solo pode ocorrer por duas rotas diferentes (FIGURA 7).

FIGURA 7 – ROTAS DE DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO GLY



FONTE: Adaptado de Dick e Quinn (1995).

A primeira consiste na transformação do GLY em sarcosina por ação da enzima C-P liase produzida pelas bactérias *Agrobacterium radiobacter* ou *Enterobacter aeroneges*: a sarcosina entra no metabolismo destes micro-organismos degradando-se, no entanto, esta rota é pouco citada na literatura. Já a segunda rota

consiste na transformação do GLY em AMPA pela ação das bactérias *Arthrobacter atrocyaneus* e da *Flavobacterium* sp., que quebram a ligação entre carbono e nitrogênio da molécula de GLY (GALLI; MONTEZUMA, 2005; BORGGAARD; GIMSING, 2008).

2.2.3 Formas de contaminação humana e ambiental e efeitos toxicológicos do GLY

Os agrotóxicos estão sendo cada vez mais utilizados, visando melhorar o processo de produção dos alimentos, porém seu uso indiscriminado tem causado diferentes tipos de contaminação. A contaminação direta dos seres humanos ocorre por intoxicações acidentais ou suicidas após ingestão de formulações a base de GLY. Essa contaminação pode ocasionar desde problemas de ulcerações orofaríngeas, vômitos, angústia respiratória, arritmia cardíaca, insuficiência renal, toxicidade hepática, alterações no estado de consciência e até mesmo a morte. (SRIBANDITMONGKOL et al., 2012; ZOUAOUI et al., 2013).

Outra forma de contaminação humana por via direta ocorre pela ingestão de alimentos. Considerando que o GLY é utilizado na produção de frutas, cereais, sementes oleaginosas e outros produtos resíduos desse agrotóxico são consumidos diariamente pela população. Vale ressaltar que a presença de resíduos de agrotóxicos não ocorre apenas em alimentos *in natura*, mas também em muitos produtos alimentícios processados pela indústria, como biscoitos, salgadinhos, pães, cereais matinais, lasanhas, pizzas e outros que têm como ingredientes o trigo, o milho e a soja, por exemplo. Ainda podem estar presentes nas carnes e leites de animais que se alimentam de ração com traços de agrotóxicos, devido ao processo de bioacumulação (CARNEIRO et al., 2015).

A contaminação dos ambientes aquáticos pode-se apresentar como outra rota possível de ingestão humana do GLY, pois embora considerado com pouca mobilidade no solo estudos comprovam a contaminação dos corpos d'água. A contaminação das águas subterrâneas ou superficiais pode ser causada pelo escoamento superficial dos agrotóxicos dissipados na água da chuva, sendo estes levados às partes mais baixas da topografia, podendo chegar até os rios, riachos, lagos e tanques de açudes (VEIGA et al., 2006).

A contaminação do solo pode ocorrer de forma direta, quando o produto é aplicado ou pulverizado por meio da aviação agrícola e também de forma indireta

por meio da percolação, chegando até mesmo aos lençóis freáticos. Além disso, pode ocorrer a volatilização dos compostos utilizados no meio rural os quais podem ser transportados por correntes aéreas depositando-se no solo e na água, distantes das áreas onde foram originalmente usados (BARREIRA et al., 2002).

O herbicida GLY é classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em classe toxicológica IV (pouco tóxico) e em classe de periculosidade ambiental III (perigoso ao meio ambiente), entretanto, sua classificação de toxicidade vem sendo revisada. Em março de 2015, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), órgão da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicou a Monografia da IARC volume 112, na qual, após a avaliação da carcinogenicidade de cinco ingredientes ativos de agrotóxicos classificou o herbicida glifosato e os inseticidas malationa e diazinona como prováveis agentes carcinogênicos para humanos (Grupo 2A) e os inseticidas tetraclorvinfós e parationa como possíveis agentes carcinogênicos para humanos (Grupo 2B). Este estudo foi feito por uma equipe de pesquisadores de 11 países, incluindo o Brasil (INCA, 2015). Diante disso, em agosto de 2015 a ANVISA decidiu em reunião da Diretoria Colegiada fazer a reavaliação toxicológica de cinco ingredientes ativos de agrotóxicos utilizados no Brasil: glifosato, lactofen, abamectina, carbofurano e thiran (ANVISA, 2015). Até o momento essa reavaliação ainda não foi concluída.

Diversos estudos demonstram que a exposição a herbicidas a base de GLY apresentam vários efeitos aos organismos (Tabela 1).

TABELA 1 – EFEITOS DO GLIFOSATO EM ORGANISMOS

(continua)

Efeitos	Referências
Alterações biológicas como estresse oxidativo, alteração no ciclo celular, na cadeia transportadora de elétrons, danos citogenéticos, danos às células hepáticas e células hipocámpais e desregulação endócrina em humanos	GEHIN et al., 2006; EL-SHENAWY, 2009; LARSEN et al., 2012; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013; MARC et al., 2002, 2003, 2004; PEIXOTO, 2005; LUEKEN et al., 2004; MONROY et al., 2005; GASNIER et al., 2009; CLAIR et al., 2012; BENEDETTI et al., 2004; ÇAGLAR et al., 2008; LARSEN et al., 2014; MESNAGE et al., 2015; WALSH et al., 2000; RICHARD et al., 2005; BENACHOUR et al., 2007; CATTANI et al., 2014
Autismo	NEVISON, 2014; SAMSEL et al., 2015
Problemas renais crônicos	JAYASUMANA et al., 2014
Apoptose e necrose de células humanas placentárias, umbilicais e embrionárias	BENACHOUR et al., 2009
Ocorrência de linfomas e células danificadas da placenta humana.	CHANG et al., 2011

(conclusão)

Efeitos	Referências
Indução à proliferação de células humanas de câncer de mama	THONGPRAKASANG et al., 2013
Obesidade, infertilidade, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, desordens intestinais, intolerância ao glúten, depressão e diabetes.	SAMSEL et al., 2013, 2013, 2015
Redução de populações de aves e anfíbios	COX, 1998; SULLIVAN 1990
Risco de desenvolvimento de câncer de mama nas fêmeas e danos ao sistema gastrointestinal, rins e fígado de ratos.	SÉRALINI et al., 2014
Modificações metabólicas do fígado em filhotes de ratos	RIEG, 2016
Efeitos genotóxicos em ovos do jacaré-de-papo-amarelo	POLETTA et al., 2009
Malformação de embriões de vertebrados	PAGANELLI et al., 2010
Efeitos genotóxicos no peixe neotropical <i>Prochilodus lineatus</i>	CAVALCANTE et al., 2008
Distúrbios no sistema reprodutivo de pato selvagem <i>Anas platyrhynchos</i>	OLIVEIRA et al., 2007
Genotoxicidade; mudanças histopatológicas; problemas no desenvolvimento sexual e maior proporção de hermafroditas em peixes sapos e crustáceos	ANNETT et al., 2014
Diminuição do peso corporal, da libido, do volume das ejaculações, da concentração de esperma, e aumento da quantidade de espermatozoides anormais ou mortos em coelhos	YOUSEF et al., 1995
Induziu à necrose e à apoptose de células de testículos de ratos	CLAIR et al., 2012

FONTE: A autora (2016).

2.2.4 Ocorrência de GLY e AMPA em ambientes aquáticos

Apesar da forte tendência do GLY em ligar-se às partículas de solo e apresentar uma taxa de degradação elevada, ao se transformar no seu principal metabólito AMPA, sua enorme solubilidade torna-o passível de atingir águas superficiais.

Estudos comprovam que o GLY e AMPA foram detectados em vários ambientes aquáticos como água de rio, águas superficiais, estações de tratamento de esgoto, águas subterrâneas entre outros conforme apresentado na Tabela 2.

TABELA 2 – OCORRÊNCIA DE GLY E AMPA EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Amostra	Concentração máxima GLY ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração máxima AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referências
Águas de rio	1600	-	AVIGLIANO et al., 2015
	41	-	FREIRE et al., 2012
Águas superficiais	1	6	IPCS, 1994
	1,082	1,925	BOTTA et al., 2009
	7,60	2,3	APARICIO et al., 2013
	427	41	SCRIBNER et al., 2007
	50	48,9	HORTH et al., 2009
	41,8	14,7	STRUGER et al., 2015
	0,484	0,175	IBÁÑEZ, et al., 2005
Águas subterrâneas	0,304	0,087	IBÁÑEZ, et al., 2005
	4,7	2,6	SCRIBNER et al., 2007
	24	19	HORTH et al., 2009
	0,042	2,87	VAN STEMPVOORT et al., 2014
Água de abastecimento público	3,3	2,9	DELMONICO et al., 2013
Água de lavoura de arroz irrigado	144,00	113,6	MATTOS et al., 2002

FONTE: A autora (2016).

2.2.5 Legislação referente a limites máximos permitidos para GLY e AMPA

Os agrotóxicos vêm sendo cada vez mais utilizados pelo homem visando aumentar e melhorar o processo de produção de alimentos, porém, o seu uso descontrolado tem causado vários problemas ambientais como a contaminação do solo e da água e efeitos nocivos principalmente aos seres vivos (PERES; MOREIRA, 2003). Nesse sentido, os órgãos competentes regulamentam limites máximos visando à preservação da saúde humana e ambiental.

Em âmbito nacional o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), na resolução nº 357/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água, estabelece para águas doces classe 1 e 2 limite máximo de GLY de $65 \mu\text{g L}^{-1}$, e para águas doces classe 3 limite máximo de $280 \mu\text{g L}^{-1}$. Outra resolução do CONAMA a nº 396/2008 que dispõe sobre a classificação para o enquadramento das águas subterrâneas, estabelece limite máximo de GLY+AMPA em água para consumo

humano de $500 \mu\text{g L}^{-1}$. A portaria do Ministério da Saúde n° 2914 de 12 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e padrão de potabilidade também estabelece limite máximo de GLY+AMPA de $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Já em âmbito internacional, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) estabelece limite de $700 \mu\text{g L}^{-1}$ para GLY em água potável.

A ANVISA também estabelece os limites máximos de resíduos (LMR) de GLY em alimentos, conforme a Tabela 3.

TABELA 3 – LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO DE GLY EM ALGUMAS CULTURAS

Culturas	Modalidade de Emprego	LMR (mg/Kg)
Algodão	Pós-emergência	3,0
Arroz	Pós-emergência	0,2
Banana	Pós-emergência	0,02
Café	Pós-emergência	1,0
Cana-de-açúcar	Maturador	1,0
Cana-de-açúcar	Pós-emergência	1,0
Citros	Pós-emergência	0,2
Feijão	Pós-emergência	0,05
Maça	Pós-emergência	0,2
Milho	Pós-emergência	1,0
Soja	Dessecante	10,0
Soja	Pós-emergência	10,0
Uva	Pós-emergência	0,2

FONTE: ANVISA (2009).

2.3 DETERMINAÇÃO DE GLY E AMPA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

O uso extensivo de herbicidas a base de GLY promove a contaminação de ambientes aquáticos. A determinação desses contaminantes, normalmente encontrados em baixas concentrações, tende a ser facilitada por meio de procedimentos de extração e pré-concentração que permitem a posterior detecção utilizando técnicas analíticas validadas. Os principais métodos de extração e quantificação de GLY e AMPA em águas são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE GLY E AMPA EM AMOSTRAS DE ÁGUA

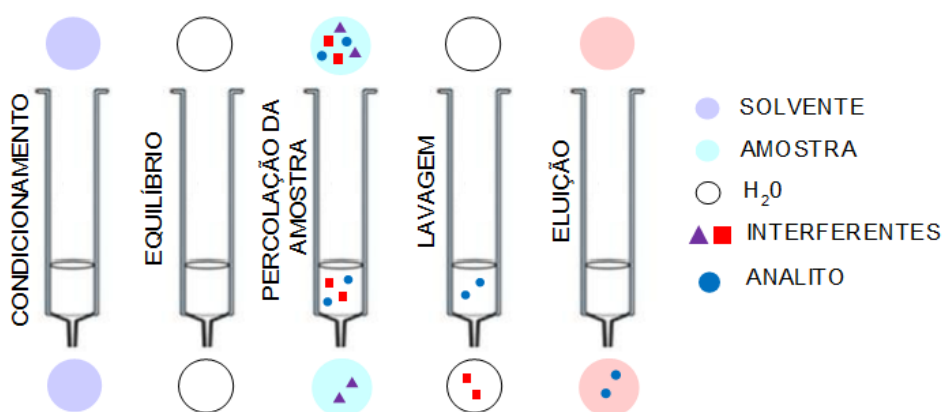
Matriz	Extração/ Pré- concentração	Agente Derivatizante	Técnica Analítica- Detecção	Referências
Água superficial e subterrânea	EFS	FMOC	CLAE-EM/EM	IBÁÑEZ et al., 2005
	EFS	FMOC	CLAE-EM/EM	SANCHIS et al., 2012
	EFS	FMOC	CLAE-EM/EM	HANKE et al., 2008
	EFS	FMOC	CLAE-EM/EM	DAOUK et al., 2013
	EFS	FMOC	CLAE-EM	LEE et al., 2002
	Evaporador rotativo	FMOC	CLAE-EM	GREY et al., 2001
Água superficial	EFS	FMOC	CLAE- Fluorescência	HIDALGO et al., 2004
	EFS	FMOC	CLAE- Fluorescência	NEDELKOSAKA; LOW, 2004
	-	FMOC	CLAE- Fluorescência	RAMIREZ et al., 2014
	EFS	FMOC	CLAE- Fluorescência	CORBERA et al., 2006
	Éter dietílico	FMOC	CLAE- Fluorescência	FREUZE et al., 2007
	-	OPA	CLAE- Fluorescência	DE MIRANDA et al., 2014
	EFS	FMOC	CLAE- Fluorescência	MA et al., 2014
	-	TFAA, TFE, TFA, HFB	CG-EM	RAMWELL et al., 2014
Água potável	EFS	FMOC	CLAE- Fluorescência	KUSTERS; GERHARTZ, 2010
Água	-	FMOC	CLAE-UV	PERUZZO et al., 2008
	-	CNBF	CLAE-UV	QIAN et al., 2009
	-	-	CLAE-UV	LI et al., 2009
	Membrana líquida suportada	TsCl	CLAE-UV	KHROLENKO et al., 2005
	Evaporação	MOBS-F	CLAE-UV	SUN et al., 2010
	EFS	HFB, TFAA	CG-EM	KJAER et al., 2005
	EFS	TFAA, TFE	CG-EM	BORJESSON; TORSTENSSON, 2000
	-	TFA, TFAA, TMOA	CG-IC-EM	KUDZIN et al., 2002
EFS	OPA, MERC	CI- Fluorescência	MALLAT; BARCELÓ, 1998	
Água potável e subterrânea	-	-	CLAE-ICP/EM	GUO et al., 2005
Água subterrânea	-	-	CI- EM/EM	VAN STEMPVOORT et al., 2014

FONTE: A autora (2016).

A extração em fase sólida (EFS) atualmente tem sido um dos procedimentos mais utilizadas em preparo de amostras. A sua versatilidade permite ser utilizada para muitos fins, entre os quais estão extração, limpeza da amostra e concentração do analito. O processo se dá por adsorção dos componentes da amostra sobre uma

fase sólida e subsequentemente eluição com um solvente adequado. A vantagem dessa técnica é que ela pode proporcionar pré-concentrações muito elevadas, característica muito importante na análise de traços. A fase sólida utilizada na EFS é geralmente constituída por um material polimérico ou sílica modificada com propriedades físicas e químicas adequadas de acordo com as espécies químicas presentes na amostra. O processo de extração de fase sólida pode ser dividido em: condicionamento, equilíbrio, percolação da amostra, lavagem e eluição dos analitos (FIGURA 8) (THURMAN et al., 1998).

FIGURA 8 – ETAPAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA



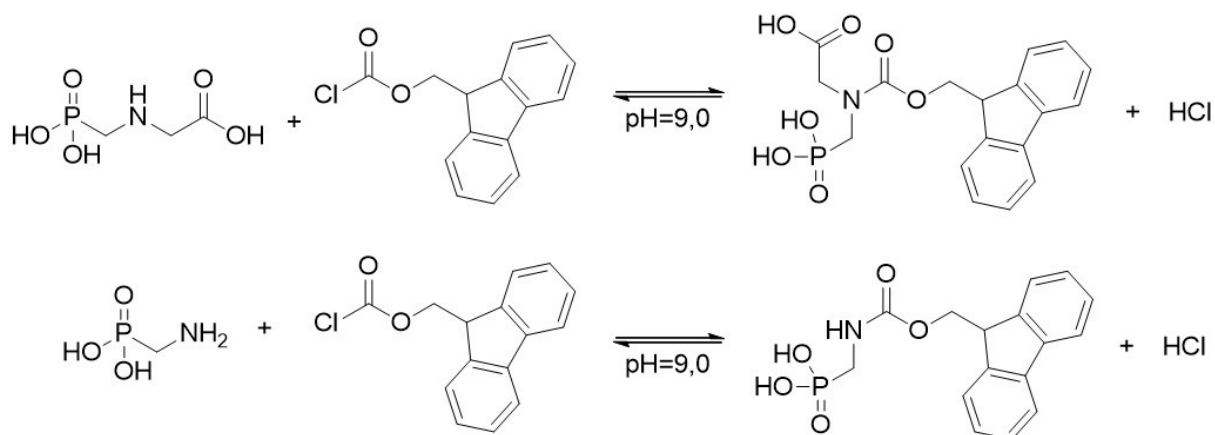
FONTE: Adaptado de Lanças (2004).

O procedimento de EFS é muito utilizado para extração e pré-concentração de GLY e AMPA (Tabela 4). Além disso, a determinação de GLY e AMPA normalmente é feita por técnicas cromatográficas. A técnica de cromatografia líquida é a mais utilizada entretanto, devido à molécula de GLY apresentar propriedades que dificultam a sua determinação como, alta solubilidade em água, baixa solubilidade em solventes orgânicos e ausência de grupos cromóforos, a determinação por cromatografia necessita de adaptações que permitam a detecção.

Devido a ausência de grupos cromóforos são necessários utilizar técnicas de derivatização para detecção de GLY e AMPA por detectores convencionais (QIAN et al., 2009). A derivatização é um processo químico para modificar compostos, a fim de gerar novos produtos com melhores propriedades cromatográficas (SCHUMMER et al., 2009). A derivatização de GLY e AMPA normalmente é feita utilizando agentes derivatizantes como: 9-cloroformato de fluorenilmetil (FMOC-Cl), o-ftalaldeído (OPA),

4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto (CNBF), cloreto de p-toluenosulfonila (TsCl). O FMOC é o agente derivatizante mais citado na literatura para a derivatização de GLY e AMPA (FIGURA 9).

FIGURA 9 – REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DE GLY E AMPA COM FMOC-Cl



FONTE: Adaptado de Madikizela (2010).

O GLY, assim como o AMPA, apresenta a função amina secundária e primária respectivamente, as quais são bons grupos nucleofílicos. O FMOC-Cl é um éster de cloroformato, que por possuir um átomo de cloro como grupo de saída, se torna um ótimo eletrófilo. O mecanismo da reação de derivatização se dá pelo ataque nucleofílico da função amina no carbono da carboxila do FMOC-Cl. Como é uma reação de adição-eliminação, a amina ataca o carbono carboxílico, gerando um intermediário tetraédrico. Na sequência, esse intermediário refaz a ligação dupla C=O, liberando o grupo de saída. Como o átomo de cloro é melhor grupo de saída do que a amina, o cloro sai e o produto resultante é o GLY-FMOC ou o AMPA-FMOC (VOLLHARDT et al., 2013).

2.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação de um método analítico é fundamental para implementar um sistema de controle de qualidade, bem como para gerar dados confiáveis. Resultados analíticos não confiáveis podem comprometer decisões importantes e causar prejuízos financeiros. A validação do método é feita para garantir que a metodologia analítica seja exata, reprodutível e flexível sobre uma faixa específica na qual uma substância será analisada. No Brasil, assim como em outros países faz-

se necessário a validação da metodologia analítica para o registro de novos produtos, para análises qualitativa e quantitativa de métodos oficiais, rastreabilidade dos resultados, entre outros, assim esses órgãos oferecem documentos oficiais que devem ser adotados no processo de validação. Um processo de validação bem definido assegura a conformidade com as exigências legais e garante que o método seja adequado para o uso desejado (SKOOG et al., 2008; RIBANI et al., 2004).

A definição de validação depende do órgão e do autor, entretanto a maioria segue a mesma linha de raciocínio. Segundo a ANVISA (2003), “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”.

“A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (USP, 1999).

Segundo a World Health Organization (WHO, 1992), a validação é a “avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado”.

Para a validação de metodologia analítica são normalmente avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. Há vários procedimentos distintos para validação, dependendo da finalidade do processo. No Brasil, duas agências disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, a Resolução da ANVISA RE nº 899 de 2003 e o documento do Instituto nacional de metrologia, qualidade e tecnologia (INMETRO) DOQ-CGCRE-008 de 2003.

2.4.1 Seletividade

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação do método e deve ser avaliada constantemente. A seletividade é realizada para avaliar se possíveis interferentes eluem no mesmo tempo de retenção do composto de interesse, no caso de técnicas cromatográficas. A seletividade garante então que o pico de resposta seja exclusivamente do analito (RIBANI et al., 2004; LANÇAS et al., 2004; THOMPSON et al., 2002).

Existem várias formas de se evidenciar a seletividade do método. A primeira é fazendo a comparação da matriz isenta com a matriz adicionada da substância alvo, garantindo que nenhum interferente elua no tempo de retenção dos analitos (ICH, 1995). Outra maneira é através dos testes de pureza de pico, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos, por exemplo, os quais são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (ANVISA, 2003). A seletividade pode ser avaliada ainda por meio de outra técnica analítica, como por exemplo, espectrometria de massas, espectroscopia no infravermelho ou bioensaios específicos (JENKE, 1998).

2.4.2 Linearidade

A linearidade corresponde a capacidade de um método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo apropriado (ANVISA, 2003; LANÇAS et al., 2004; ICH, 1995). É avaliada por meio de uma curva de calibração (curva analítica) a qual descreve matematicamente por meio de uma equação de reta (Equação 1) a correlação entre o sinal analítico medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada (SKOOG et al., 2008).

(1)

Onde:

y = sinal analítico;

x = concentração do analito;

a = coeficiente angular;

b = coeficiente linear.

A ANVISA recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações distintas (ANVISA, 2003).

2.4.3 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito detectado, mas, não necessariamente quantificado (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003; ICH, 1995). Para métodos instrumentais, o LD, pode ser determinado de três maneiras

diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica.

O método visual é feito com adição de concentrações conhecidas do analito na matriz, de modo que seja possível distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível, ou utilizando parâmetros de detecção no método de integração (RIBANI et al., 2004).

O método de relação sinal-ruído é aplicado somente em procedimentos que mostram o ruído da linha de base. Para determinar esse método utilizam-se amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e um branco (matriz isenta do analito). Estabelecendo assim uma relação entre o sinal obtido nas amostras com a presença e na ausência do analito, da qual pode-se identificar o composto de interesse. As relações comumente aceitas são de 3:1 e 2:1, como estimativas de LD (RIBANI et al.; 2004).

O método baseado em parâmetros da curva analítica consiste na relação de três (3) vezes o desvio padrão do ruído da linha de base (SKOOG et al., 2008; RIBANI et al., 2004; ANVISA, 2003), o qual pode ser determinado pela Equação 2:

$$- \quad (2)$$

Onde:

s = desvio padrão da resposta;

S = inclinação da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão utilizando condições experimentais estabelecidas (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003; ICH, 1995). O LQ assim como o LD pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou o método baseado nos parâmetros da curva analítica. O LQ segue o mesmo princípio do LD, porém com a relação sinal/ruído de 10:1 (Equação 3), ou seja:

$$- \quad (3)$$

Onde:

s = desvio padrão da resposta;

S = inclinação da curva analítica.

2.4.4 Precisão

A precisão é a dispersão entre os resultados de ensaios independentes obtidos em condições estipuladas (THOMPSON et al., 2002; INMETRO, 2003; ANVISA, 2003). Normalmente é avaliada em termos de desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), e pode também ser expressa pelo intervalo de confiança da média (RIBANI et al., 2004).

A precisão em validação é avaliada em três níveis distintos: repetibilidade ou repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade representa a concordância entre resultados de medições consecutivas de um mesmo método, para a mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, usando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo (LANÇAS, 2004). O INMETRO recomenda pelo menos sete ou mais repetições para a estimativa do desvio padrão. Já a ICH e a ANVISA sugerem no mínimo 9 determinações cobrindo o intervalo linear do método, ou seja: três níveis de concentrações (baixo, médio e alto).

A precisão intermediária representa a concordância entre resultados do mesmo laboratório, mas em diferentes dias, por diferentes analistas, usando diferentes equipamentos (LANÇAS, 2004).

A reprodutibilidade representa a concordância entre resultados de medições consecutivas de um mesmo método, para a mesma amostra, mas em diferentes laboratórios, por diferentes analistas, usando diferentes equipamentos (LANÇAS, 2004).

2.4.5 Exatidão

A exatidão expressa a proximidade da concordância entre um valor encontrado e o valor aceito como referência (SKOOG et al., 2008; THOMPSON et al., 2002; LANÇAS, 2004; SKOOG et al., 2008). O número de ensaios recomendado para avaliar a exatidão varia segundo a legislação, mas normalmente é recomendado no mínimo nove determinações envolvendo três concentrações diferentes (ICH, 1995; ANVISA, 2003). Já o INMETRO não recomenda um mínimo de determinações.

Os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos e ensaios de recuperação (INMETRO, 2003).

Os materiais de referência certificados (MRC) acompanham um certificado que possui um valor de concentração de um determinado analito ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza associada. Assim é muito importante que o fornecimento desses MRC seja realizado por organismos reconhecidos e confiáveis, como o National Institute of Standards and Technology - NIST, Laboratory of the Government Chemist - LGC, etc. (THOMPSON, 2002; INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004).

Outra abordagem para avaliação da exatidão consiste em comparar um método em desenvolvimento com outro que é considerado referência, cuja incerteza é muito bem conhecida (RIBANI et al., 2004).

Já a recuperação consiste na “fortificação” da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado (LANÇAS, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O preparo de amostras e as análises químicas de GLY e AMPA foram realizados no laboratório de Análise Instrumental e Controle de Qualidade no Bloco de Química da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

A coleta das amostras de água foi realizada pelo programa de pós-graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

3.1 REAGENTES

Nesse trabalho foram empregados os seguintes reagentes e solventes: água ultrapura; acetonitrila (CH_3CN) (Vetec); metanol (CH_3OH) (Vetec); fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (Lafan); tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (Impex); hidróxido de potássio (KOH) (Vetec); hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec); ácido clorídrico (HCl) (Impex); padrão de glifosato 99,7% de pureza ($\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$)

(Sigma-Aldrich); padrão de AMPA $\geq 98.0\%$ ($\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$) (Sigma-Aldrich); padrão de cloroformiato de 9-fluorenilmetila ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClO}_2$) (Sigma-Aldrich).

3.2 PREPARO DE SOLUÇÕES

As soluções estoque de GLY e AMPA foram preparadas nas concentrações de 100 mg L^{-1} em água ultrapura. As demais soluções foram preparadas por diluição da solução estoque.

A solução tampão borato, usada no meio reacional da derivatização, foi preparada na concentração de 5% por meio da adição de 5,0 gramas em 100 mL de água ultrapura. O pH da solução tampão borato foi ajustado para 9,0 com hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução tampão fosfato usada como fase móvel foi preparada na concentração $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e o pH foi ajustado para 5,5 com hidróxido de potássio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. Após preparada essa solução foi sonicada por 40 minutos.

A solução estoque de cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) foi preparada na concentração $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ em acetonitrila. As demais soluções foram preparadas por diluição da solução estoque.

A solução de NaOH e HCl foram preparadas nas concentrações de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em água ultrapura.

3.3 EQUIPAMENTOS

Nesse trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos: cromatógrafo líquido marca *Thermo Scientific*, modelo *Ultimate 3000*, composto por módulo de bomba, auto injetor e detector *Dionex Ultimate 3000*. Bomba de vácuo marca *Prismatec*, modelo 131; lavadora ultrassônica marca *Sanders Medical*, modelo *Soniclean 2*; purificador de água Marca *Elga Lab Water*, modelo *Purelab Classic* (Tipo I, $18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$); medidor de pH marca *Tecnopon*, modelo *Mpa-210* e uma balança analítica marca *Shimadzu*, modelo *Ay-220*.

3.4 AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL

As amostras de água superficial foram coletadas em 5 açudes localizados em propriedades rurais da região de Palotina - PR. A amostragem e preservação das

amostras foram feitas de acordo com a NBR 9898 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1987). As amostras simples foram retiradas de três pontos amostrais (FIGURA 10) e homogeneizadas para formar uma amostra composta em frascos de 2 L de polietileno.

FIGURA 10 – PONTOS DE COLETA DE AMOSTRA DE ÁGUA SUPERFICIAL



FONTE: A autora (2016).

A amostra testemunha foi coletada em um açude onde a probabilidade da ocorrência de GLY era menor, devido à ausência de culturas agrícolas nos arredores, bem como a presença de mata ciliar (FIGURA 11).

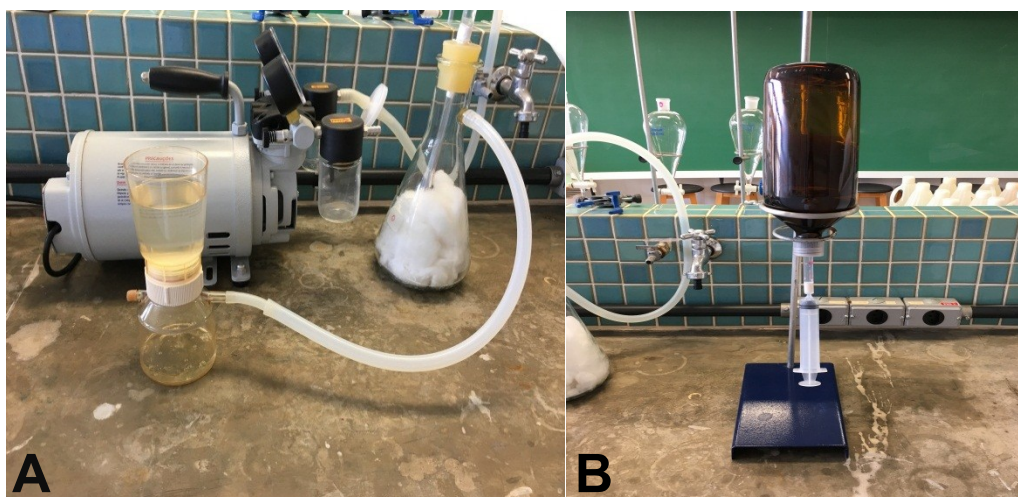
FIGURA 11 – PONTO DE COLETA DA AMOSTRA TESTEMUNHA



FONTE: A autora (2016).

Após a coleta os frascos foram condicionados em caixas térmicas com gelo e encaminhados ao laboratório onde as amostras foram imediatamente filtradas, primeiramente em papel de filtro e em seguida com membranas de celulose regenerada de 0,45 μm (Schleicher & Schuell) (FIGURA 12 A). Experimentos controle foram feitos para verificar a adsorção de GLY nos agentes filtrantes. Após a filtração as amostras foram percoladas em cartuchos de EFS (FIGURA 12 B) e em seguida o eluato foi derivatizado e analisado. As coletas foram feitas mensalmente iniciando em setembro/2016 e finalizando em janeiro/2017, totalizado 5 amostras de cada açude. Esse período foi escolhido por ser a época de maior aplicação de herbicidas a base de GLY, período em que se inicia o cultivo da soja.

FIGURA 12 – SISTEMA DE FILTRAÇÃO DAS AMOSTRAS (A) E SISTEMA DE EFS (B)



FONTE: A autora (2016).

3.5 EXTRAÇÃO/PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE GLY E AMPA

A extração e a pré-concentração de GLY e AMPA foram feitas utilizando o procedimento de extração em fase sólida (EFS). Devido as baixas concentrações dos analitos normalmente encontradas em matrizes ambientais faz-se necessária a realização de uma etapa de extração/pré-concentração. Nesse trabalho optou-se pela extração em fase sólida por ser o procedimento mais relatado na literatura.

Para o desenvolvimento do procedimento de extração em fase sólida foram testados alguns cartuchos e condições conforme apresentado na Tabela 5.

TABELA 5 – CARTUCHOS E CONDIÇÕES TESTADAS PARA EFS DE GLY E AMPA

Cartuchos	Condicionamento (3 mL)	Equilíbrio (3 mL)	Percolação (5 mL)	Lavagem (3 mL)	Eluição (5 mL)
Strata TM -X- A Strata TM -X Oasis HLB [®] Sep-Pac [®]	Metanol	Água ultrapura	Padrão	Água ultrapura	ACN 5% NaCl 0,1mol L ⁻¹ HCl 0,1mol L ⁻¹ HCl 0,5mol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 50mM

Fonte: A autora (2016).

A pré-concentração foi avaliada com um padrão na concentração de 50 µg L⁻¹ e volume de 100 mL. Após a percolação no cartucho a eluição foi feita com um volume de 1 mL, a fim de verificar um fator de concentração de 100 vezes.

3.6 REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DE GLY E AMPA

A reação de derivatização foi realizada utilizando 1,0 mL de padrão ou amostra de GLY ou AMPA com 1,25 mL de FMOC-Cl em meio tamponado com tetraborato de sódio 5% (0,25 mL). Essa proporcionalidade de volume entre a fase orgânica (FMOC-Cl em Acetonitrila) e a fase aquosa (amostra + tampão) foi mantida devido as características tanto de GLY (pouco solúvel em fase orgânica) como de FMOC-Cl que apresenta pouca solubilidade em água. As concentrações de FMOC-Cl e analito variaram dependendo da razão molar estudada. Em contrapartida, o volume e a concentração de tampão borato permaneceram iguais em todos os experimentos. A reação de derivatização foi realizada à temperatura ambiente sob agitação por 5 minutos em béqueres de polietileno. Experimentos controle foram feitos para verificar a possível adsorção do produto derivatizado em superfícies de

vidro, fenômeno relatado na literatura (NEDELKOSKA; LOW, 2004). Após o tempo de equilíbrio foi feita a injeção no cromatógrafo.

3.7 ANÁLISE QUÍMICA DE GLY E AMPA

A determinação de GLY e AMPA foi feita utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado com detector de arranjo de fotodiodos (*diode array detector* - DAD) e amostrador automático termostatizado. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de fase reversa C18 (ACE 250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 μm ; temperatura do forno 30 $^{\circ}\text{C}$; comprimento de onda de detecção 206 nm; fluxo de 0,8 mL min^{-1} ; volume de injeção 20 μL ; fase móvel: tampão fosfato e acetonitrila em diferentes proporções.

3.8 PARÂMETROS AVALIADOS NA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE GLY E AMPA

3.8.1 Determinação da Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela pureza do pico do analito com o auxílio do detector de arranjo de diodos e também por meio de comparação entre a matriz isenta do herbicida com a matriz contendo o analito (padrão). Um padrão de GLY e AMPA na concentração 10 mg L^{-1} foi adicionado na amostra testemunha e após 10 minutos foi feita a filtração, derivatização e a injeção no cromatógrafo.

3.8.2 Determinação da Linearidade

A linearidade foi avaliada com base na curva analítica feita a partir de soluções estoque de GLY e AMPA na concentração 100 mg L^{-1} diluindo-a para as seguintes concentrações 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 mg L^{-1} e 0,5; 1,0; 5,0; 2,5; 10,0 mg L^{-1} , respectivamente. Cada padrão foi derivatizado em triplicata e injetado. Construiu-se um gráfico da área do pico x concentração do analito, que forneceu o coeficiente de correlação (r) da reta obtida e os coeficientes angular e linear.

3.8.3 Determinação da Precisão

Nesse trabalho a precisão foi avaliada por meio da repetibilidade. Foram feitos 9 padrões de cada analito em três níveis de concentração (2,5; 10,0 e 20,0 mg L⁻¹), pelo mesmo analista, sob as mesmas condições experimentais em um curto intervalo de tempo. A precisão instrumental foi avaliada por meio do tempo de retenção e área do pico de 10 injeções do padrão 2,5 mg L⁻¹. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV) das medidas, determinado pela Equação 4:

$$- \quad (4)$$

Onde:

s = desvio padrão das medições;

x = média aritmética das medições.

3.8.4 Determinação da Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, fortificando-se a amostra testemunha com diferentes concentrações de padrão de GLY e AMPA, e determinando-se em seguida a concentração do analito adicionado. Foram feitas determinações em triplicata em três níveis de concentração (2,5; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹) para ambos os analitos e a porcentagem de recuperação foi calculada segundo a Equação 5:

$$- \quad (5)$$

Onde:

C1 = concentração obtida

C2 = concentração adicionada.

3.8.5 Determinação do Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação instrumentais para AMPA foram avaliados a partir do método baseado nos parâmetros da curva analítica por meio

das equações (2) e (3) descritas no item 2.4.3. Em contrapartida, os limites de detecção e quantificação instrumentais para GLY foram determinados pelo método de diluições sucessivas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

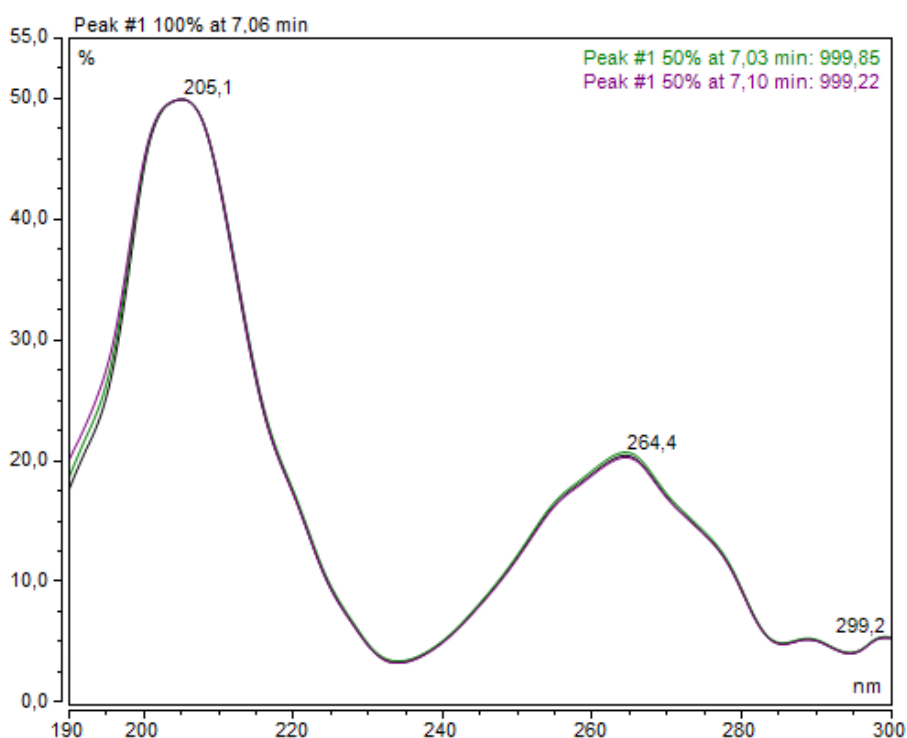
4.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE GLY E AMPA POR CLAE UV-VIS

O desenvolvimento do método para determinação de GLY e AMPA foi baseado em condições propostas pela literatura (PERUZZO et al., 2008), porém a metodologia foi adaptada e otimizada.

4.1.1 Determinação do tempo de retenção de GLY e AMPA

A derivatização de GLY com FMOC-Cl gerou o produto GLY-FMOC, o qual absorve radiação ultravioleta. Entretanto, o derivatizante (FMOC-Cl) e o produto de sua reação com a água (FMOC-OH), também absorvem. O derivatizante FMOC-Cl tem sido muito utilizado por apresentar bandas de absorção na região do ultravioleta, conforme observa-se no espectro de absorção (FIGURA 13).

FIGURA 13 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO AGENTE DERIVATIZANTE FMOC-Cl

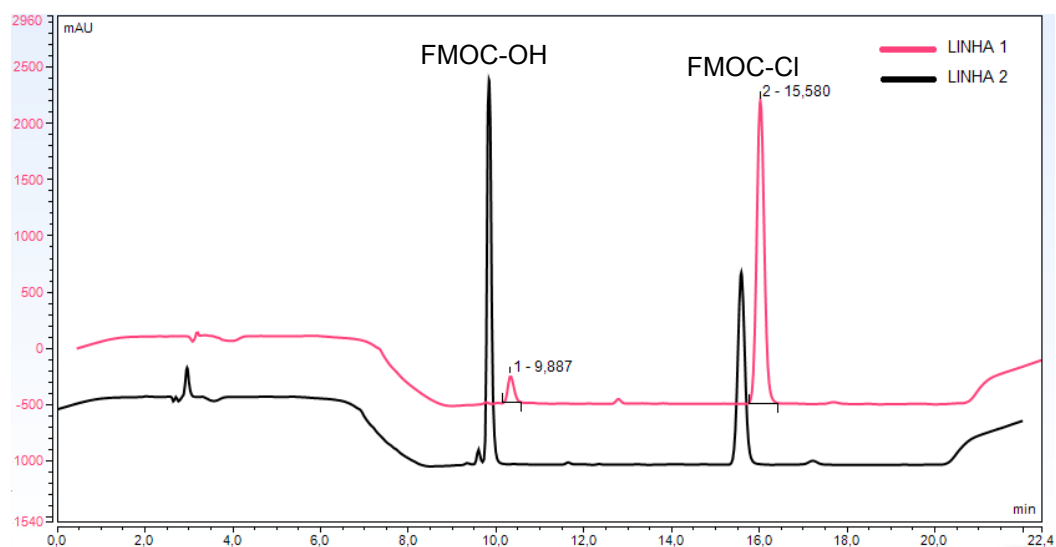


FONTE: A autora (2016).

O tempo de retenção dos compostos que estão presentes no meio reacional foram determinados por meio da injeção de FMOC-Cl e FMOC-Cl + tampão aquoso em corridas separadas. Dessa forma, foi possível observar nos cromatogramas o pico referente ao FMOC-Cl (FIGURA 14 Linha 1) com tempo de retenção de aproximadamente 15,5 min., bem como o seu produto de reação com a água, o FMOC-OH com tempo de retenção 9,8 min. (FMOC-Cl + tampão aquoso) (FIGURA 14 Linha 2).

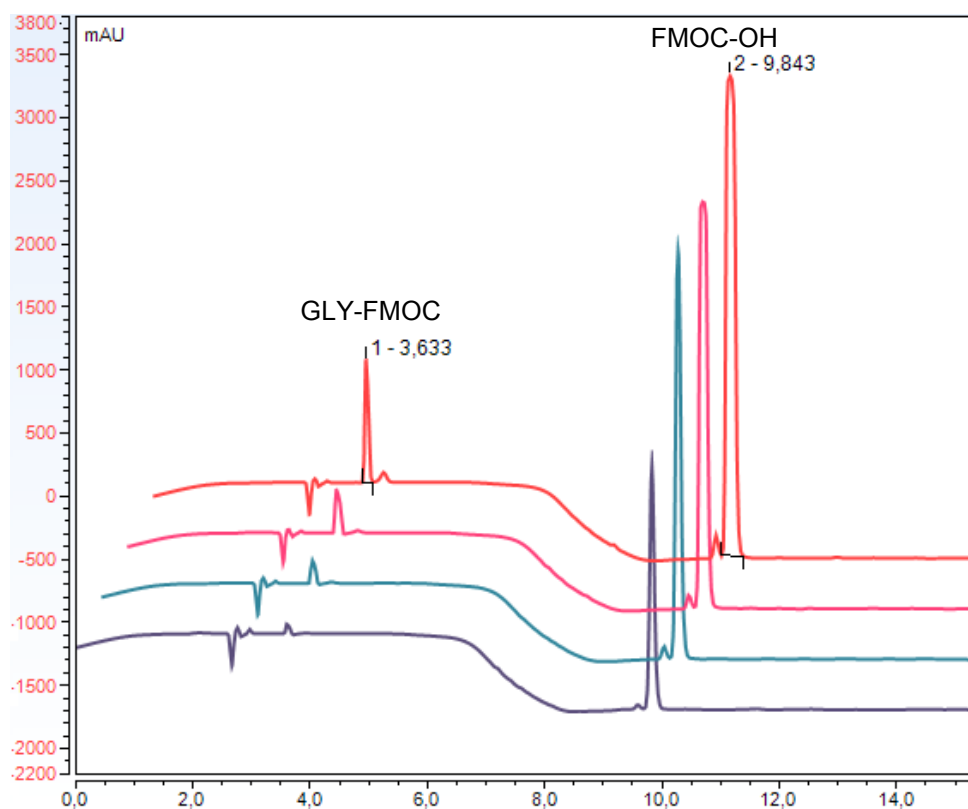
A determinação do tempo de retenção do GLY-FMOC foi feita com adição do herbicida ao meio, pois foi verificado o aparecimento de pico aos 3,6 minutos. Essa hipótese foi confirmada com adição de diferentes concentrações de GLY (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 mg L⁻¹) no meio reacional conforme apresentado na FIGURA 15.

FIGURA 14 – CROMATOGRAMAS COM INDICAÇÃO DE PICOS CORRESPONDENTES AO FMOC-CL E FMOC-OH



FONTE: A autora (2016).

FIGURA 15 – CROMATOGRAMAS REFERENTES A DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RETENÇÃO DO PRODUTO DERIVATIZADO GLY-FMOC

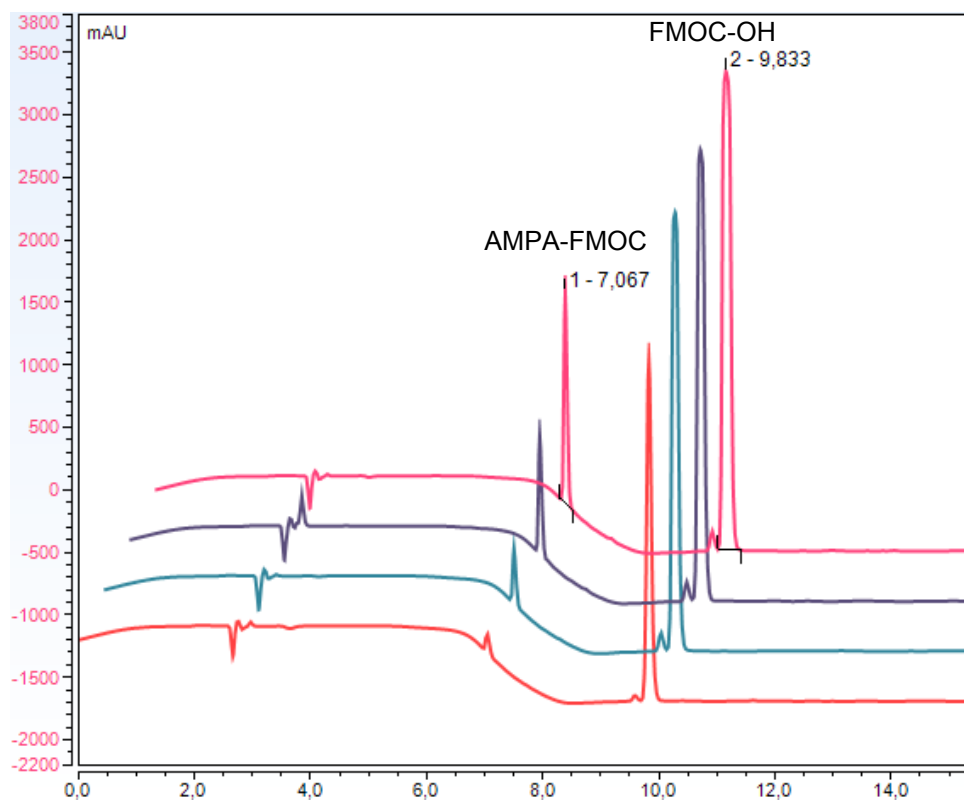


FONTE: A autora (2016).

O mesmo raciocínio foi usado para a determinação do tempo de retenção do metabólito AMPA. A adição de AMPA ao meio reacional em diferentes

concentrações (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 mg L⁻¹) resultou no aparecimento de um pico com tempo de retenção de 7,0 minutos (FIGURA 16).

FIGURA 16 – CROMATOGRAMAS REFERENTES A DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RETENÇÃO DO PRODUTO DERIVATIZADO AMPA-FMOC



FONTE: A autora (2016).

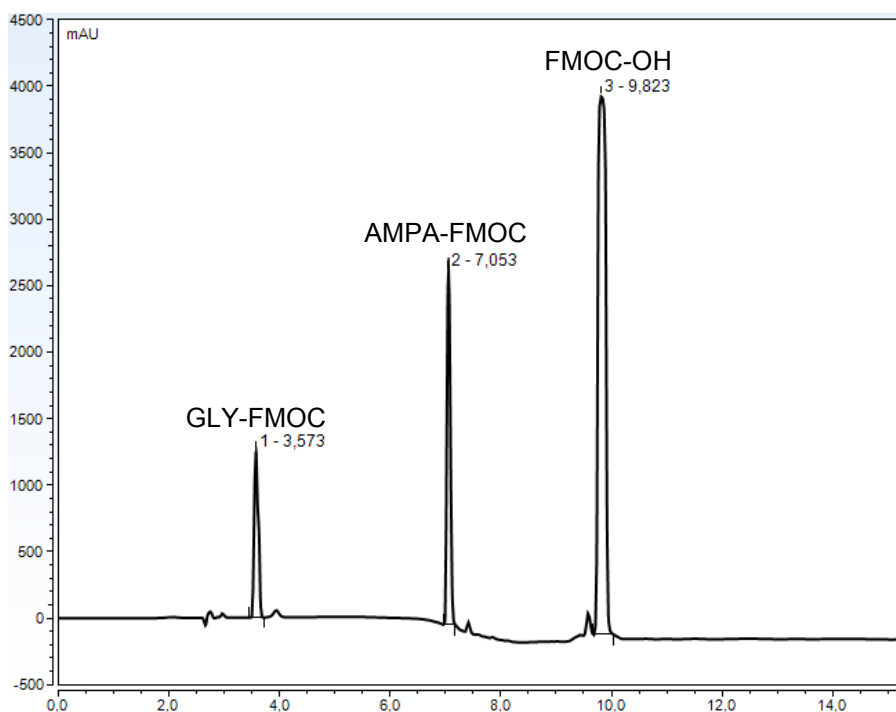
4.1.2 Estudo da composição da fase móvel para as análises cromatográficas

A literatura relata a utilização de tampão fosfato (KH_2PO_4) e acetonitrila como fase móvel na determinação de GLY e AMPA. A composição da fase móvel interfere de modo direto no tempo de retenção dos analitos (AGRAFIOTOU et al., 2011), uma vez que, compostos em equilíbrios químicos podem existir de formas diferentes em determinado meio aquoso (AFSAH-HEJRI et al., 2013). Assim a estrutura do GLY é afetada pelo pH do meio, pois este composto apresenta diferentes valores de pK_a . Dessa forma, a utilização de tampão na fase móvel tem sido utilizada para aumentar a sensibilidade, garantindo que os analitos estejam apenas em uma forma molecular (COLLINS et al., 2006). Além de controlar o pH do meio, a utilização de tampão aumenta a força iônica da fase móvel, devido a presença de eletrólitos que altera a

retenção dos analitos, interferindo em sua constante de ionização (AFSAH-HEJRI et al., 2013).

Dessa forma, iniciou-se os estudos com KH_2PO_4 0,05 mol/L (pH 5,5):ACN na proporção 70:30 com eluição isocrática; primeiramente com o analito GLY. Entretanto, como além de GLY-FMOC o derivatizante FMOC-Cl e seu produto de reação com água (FMOC-OH) também absorvem radiação e geram picos no cromatograma, foi necessário utilizar a eluição por gradiente, para diminuir o tempo de análise. Além disso, haveria o acréscimo de mais um analito na mesma corrida, o metabólito AMPA. Algumas condições cromatográficas utilizando gradiente foram avaliadas e a condição KH_2PO_4 : acetonitrila (70:30) até 5 minutos, com aumento de proporção de acetonitrila a uma razão de $4,5\% \text{ min}^{-1}$ até 15 minutos (25:75), mantendo nessa condição até o final da análise (20 minutos), foi a condição que apresentou melhor resolução para o pico do GLY. Entretanto, com o início do estudo do analito AMPA verificou-se que o pico do metabólito não apresentava-se bem resolvido e necessitou-se avaliar uma nova condição de gradiente. A melhor condição de gradiente avaliada para ambos os analitos foi KH_2PO_4 :ACN (70:30) até 2 minutos, com aumento de acetonitrila a uma razão de $15\% \text{ min}^{-1}$ até 5 minutos (25:75), mantendo essa proporção até 17 minutos. Nessa condição os picos referentes à GLY e AMPA eluíram com boa resolução, conforme mostrado na FIGURA 17 e evidenciado na Tabela 6.

FIGURA 17 – CROMATOGRAMA REFERENTE A CONDIÇÃO CROMATOGRÁFICA OTIMIZADA: Fase móvel: tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 5,5):acetonitrila, com eluição por gradiente. A composição inicial foi KH₂PO₄:acetonitrila (70:30) até 2 minutos, com aumento de acetonitrila a uma razão de 15 % min⁻¹ até 5 minutos (25:75), mantendo essa proporção até 17 minutos, com detecção no comprimento de onda 206 nm e fluxo de 0,8 mL min⁻¹, coluna de fase reversa (C18).



FONTE: A autora (2016).

TABELA 6 – PARÂMETROS DE IDENTIFICAÇÃO DE CADA COMPOSTO

Composto	t _R	Área	Resolução	Número de pratos
GLY	3,573	109,2316	24,56	7878
AMPA	7,053	197,4883	14,11	52507
FMOC-OH	9,823	648,5776	n.a	21080

FONTE: A autora (2016).

O estudo da eluição de GLY e AMPA por meio de gradiente permitiu verificar o efeito da proporção de ACN na fase móvel, a qual variou de 30 a 75%. Dessa forma, a eluição tanto de GLY como de AMPA, a partir da coluna de fase reversa, foi mais rápida com porcentagens crescentes de solvente orgânico, resultado o que já era esperado para esse tipo de coluna (MADIKIZELA, 2010). Quando a fase móvel continha 30% de acetonitrila, observaram-se tempos de retenção mais longos para ambos os analitos. Isto significa que a fase móvel era fraca para eluir tanto o GLY como AMPA a partir desta coluna. Observou-se que à medida que a concentração

de acetonitrila aumentou os tempos de retenção para ambos os analitos diminuíram (Tabela 7).

TABELA 7 – VARIAÇÃO DOS TEMPOS DE RETENÇÃO COM ALTERAÇÕES DA PORCENTAGEM DE ACETONITRILA NA FASE MÓVEL

Acetonitrila (%)	Tempo de retenção GLY (min)	Tempo de retenção AMPA (min)
30	3,9	8,7
55	3,5	7,4
75	-	7,0

FONTE: A autora (2016).

4.2 ESTUDO DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DE GLY E AMPA

A determinação de GLY e AMPA por meio da técnica de CLAE-UV-Vis ocorre devido à reação de derivatização, uma vez que esses analitos não possuem grupos cromóforos.

A reação de derivatização pode ser afetada por alguns fatores como, por exemplo, a duração do processo de derivatização (tempo de reação), o tempo de homogeneização, o pH do meio reacional, a concentração do tampão borato e a concentração do reagente derivatizante (FMOC-Cl), ou seja, a razão molar entre o derivatizante e o analito. Nesse estudo somente os fatores tempo de reação e concentração de derivatizante foram estudados, pois os outros fatores já estão bem estabelecidos na literatura.

4.2.1 Efeito da razão molar entre GLY:FMOC e AMPA:FMOC

A razão estequiométrica entre o analito e o reagente de derivatização afeta a formação do produto derivatizado. Uma vez que FMOC-Cl não reage somente com os analitos presentes em uma amostra, mas também com outras substâncias como aminas, aminoácidos e com a água, formando FMOC-OH, um excesso de derivatizante deve ser adicionado à amostra. Esses subprodutos formados podem interferir nos passos subsequentes da preparação da amostra, dessa forma, sua geração deve ser minimizada. Por outro lado, a falta de agente derivatizante pode diminuir a formação dos compostos alvo (GLY-FMOC e AMPA-FMOC). Assim, a influência da concentração de FMOC-Cl na reação de derivatização foi estudada.

O efeito da razão molar entre GLY:FMOC e AMPA:FMOC nas proporções: 1:10, 1:25, 1:50 e 1:100 foi investigado. Sendo a resposta avaliada por meio da área do pico cromatográfico e observou-se que somente na razão molar 1:10 houve uma diminuição de aproximadamente 35% no rendimento da derivatização (Tabela 8). Por outro lado, nas outras razões molares a área do pico manteve-se praticamente inalterada. Em contrapartida, a área do pico foi ligeiramente maior na razão molar 1:10 para o produto AMPA:FMOC, mantendo-se constante nas demais razões testadas.

TABELA 8 – EFEITO DA RAZÃO MOLAR ENTRE GLY:FMOC E AMPA:FMOC

Razão Molar	Área do pico GLY:FMOC	Área do pico AMPA:FMOC
1:10	19,9280	53,0170
1:25	30,4436	50,2439
1:50	29,8398	50,2739
1:100	31,4770	50,2567

FONTE: A autora (2016).

A literatura apresenta diferentes resultados referentes a melhor razão molar entre GLY:FMOC. Segundo Nedelkoska et al. (2004), a razão molar de 1:1 de GLY:FMOC apresenta baixo rendimento do produto formado. Catrinck et al. (2014) relataram que a razão 1:5 é eficiente para geração do produto derivatizado, porém para Nãsholm et al. (1987) a melhor razão apresenta-se com os valores superiores a 1:8. Por outro lado, alguns autores relatam a utilização de razões molares bem maiores como de 1:200 (MALMER; SCHROEDER, 1990) a 1:10⁵ (MOYE et al., 1980).

Considerando que a concentração do derivatizante não deve ser baixa para não afetar o rendimento do produto formado, nem muito alta devido ao excesso de FMOC-Cl e de seus subprodutos no meio reacional a razão molar 1:25 de GLY:FMOC e AMPA:FMOC foi definida para os demais experimentos, uma vez que proporcionou um bom rendimento do composto alvo.

4.2.2 Influência do tempo de reação no processo de derivatização

O tempo de reação no processo de derivatização é um fator importante para assegurar que os analitos sejam completamente convertidos nas formas

derivatizadas para que assim possam ser detectados. Dessa forma, o tempo de equilíbrio necessário para a reação de derivatização foi avaliado para os analitos GLY e AMPA. A Tabela 9 apresenta os tempos de reação avaliados e as respectivas áreas dos picos cromatográficos de GLY-FMOC e AMPA-FMOC.

TABELA 9 – TEMPO DE REAÇÃO E ÁREA DO PICO DE GLY-FMOC E AMPA-FMOC REFERENTES AO PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO

Tempo de reação	Área do pico GLY	Área do pico AMPA
5 min	3,3479	11,3350
20 min	6,2539	11,7738
45 min	6,3546	11,7244
60 min	6,3511	11,7271
24 horas	6,2820	11,6287

FONTE: A autora (2016).

O tempo de reação 5 minutos resultou em um produto derivatizado com área de pico aproximadamente 35% inferior ao produto gerado ao final dos demais tempos testados, na reação de derivatização entre GLY e FMOC-Cl. Para melhorar o rendimento da reação entre GLY e FMOC-Cl foram investigados ainda os tempos de 20,0; 45,0; 60,0 minutos e 24,0 horas. Como observado na Tabela 8, os tempos de reação de 45,0; 60,0 min. e 24,0 horas proporcionaram rendimento comparável ao tempo de 20 min. Em contrapartida, para o analito AMPA não houve diferença significativa na área do pico em todos os tempos de reação avaliados.

Os experimentos controle feitos para verificar o efeito de adsorção do produto derivatizado indicaram que existe adsorção significativa (dado não mostrado) em frascos de vidro, e dessa forma as reações de derivatização foram feitas em frascos de polietileno.

A literatura apresenta valores de tempo de reação que variam de minutos a horas. Segundo Báez et al. (2014); Corbera et al. (2006); Hidalgo et al. (2004) e Nedelkoska et al. (2004), o tempo de reação de 30 minutos foi suficiente para o equilíbrio da reação. Enquanto Hanke et al. (2008) relataram que o tempo ideal para o processo de derivatização foi de 2 horas. Já Ibáñez et al. (2006) e Peruzzo et al. (2008) utilizaram tempos de equilíbrio de reação de 24 horas.

Esse tempo de reação se faz necessário para possibilitar a substituição do cloro na estrutura de FMOC-Cl pela molécula de GLY e AMPA (CATRINCK et al.,

2014). Deste modo, considerando que o estudo feito está condizente com valores relatados na literatura foi escolhido o tempo de reação de 20 minutos para os demais experimentos.

4.3 AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A avaliação da extração e pré-concentração de GLY e AMPA foi feita testando alguns cartuchos e eluentes. Entretanto, apenas a condição que utilizou cartucho StrataTM-X- A e o eluente HCl 0,1 mol L⁻¹ apresentou recuperação aceitável. O cartucho StrataTM-X- A possui resina polimérica aniônica forte tem sido mais indicado para esses analitos. Foram avaliados 2 níveis de concentração dos analitos (5 e 10 mg L⁻¹) e as recuperações variaram de 83 a 88 % para GLY e de 88 a 91 % para AMPA. O teste feito para avaliar a recuperação em conjunto dos dois analitos também apresentou bons resultados (83-98 para GLY e 78 a 70 para AMPA) (Tabela 10). Os níveis da recuperação alcançados com esse cartucho estão dentro da faixa considerada aceitável de 70-120% com coeficiente de variação menor que 20% (GARP, 1999; SANCO, 2013).

TABELA 10 – RESULTADOS DE EXTRAÇÃO DE GLY E AMPA POR EFS

Nível de Concentração (mg L ⁻¹)	Recuperação GLY (%) n=3	CV (%)	Recuperação AMPA (%) n=3	CV (%)	Recuperação GLY e AMPA (%) n=3	CV (%)
5	83	2,1	88	1,3	(83-78)	(3,0-1,2)
10	88	3,4	91	4,3	(98-70)	(0,6- 2,2)

FONTE: A autora (2016).

Resultados similares para recuperação de GLY e AMPA utilizando o procedimento de EFS com resina de troca iônica foram obtidos por Vreeken et al. (1998) com recuperações superiores a 94 % e Corbera et al. (2006) com índices maiores que 96 %. Enquanto que Miles et al. (1986) obtiveram recuperações entre 76 a 111 % para GLY e 80 e 100 %, para AMPA.

Os resultados dos testes feitos para verificar a pré-concentração (dado não mostrado) demonstram que foi possível obter um fator de concentração de 100 vezes. Esse resultado foi muito importante, pois normalmente os contaminantes

estão em concentrações menores que os limites de detecção instrumentais de alguns equipamentos. Assim, a etapa de pré-concentração pelo procedimento EFS com troca iônica possibilitou o monitoramento de concentrações de GLY e AMPA em águas, permitindo a detecção dos valores máximos estabelecidos pelo CONAMA e pelo Ministério da Saúde.

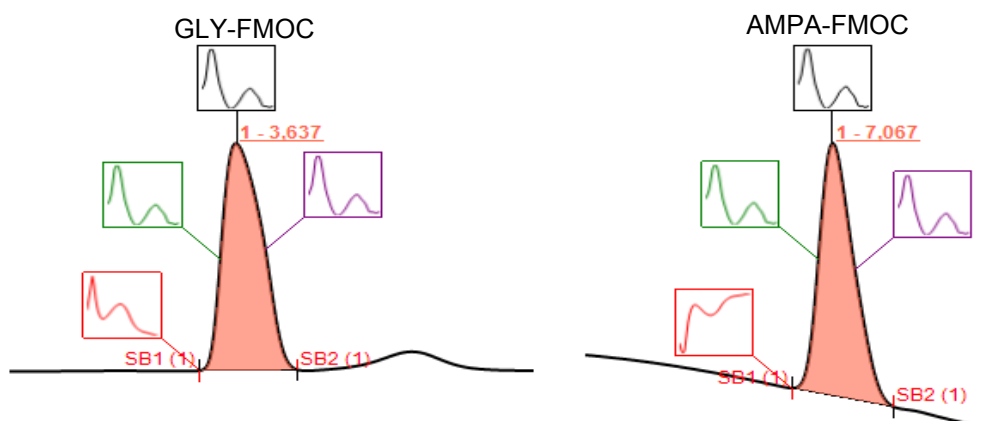
4.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE GLY E AMPA

A validação da metodologia analítica para determinação de GLY e AMPA foi feita considerando os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

4.4.1 Avaliação da seletividade do método analítico

A pureza dos picos cromatográficos referentes a GLY e AMPA foi evidenciada por meio dos espectros de absorção em diferentes regiões do pico (FIGURA 18). Esses espectros obtidos com o auxílio do detector de arranjo de diodos permitem verificar a similaridade entre eles, demonstrando assim, que os picos referentes a GLY e AMPA não estão coeluidando com outras substâncias.

FIGURA 18 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO EM DIFERENTES REGIÕES DOS PICOS DE GLY-FMOC E AMPA-FMOC

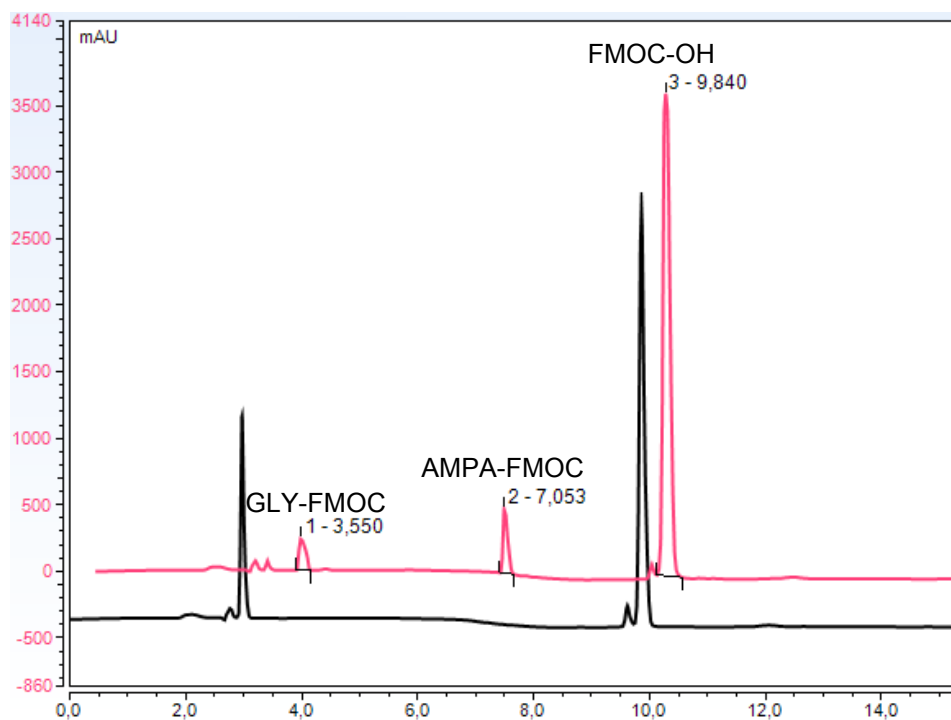


FONTE: A autora (2016).

A seletividade do método foi avaliada também por meio da comparação dos cromatogramas referentes à matriz isenta dos analitos (amostra testemunha) (FIGURA 19 Linha preta) com a matriz fortificada (FIGURA 19 Linha rosa). A análise

desses cromatogramas evidencia a seletividade do método, pois nenhum pico foi observado no tempo de retenção de GLY (3,5 minutos) e nem do AMPA (7,0 minutos) na amostra testemunha.

FIGURA 19 – CROMATOGRAMAS REFERENTES A AMOSTRA TESTEMUNHA E DA MATRIZ FORTIFICADA COM CONCENTRAÇÃO DE 10,0 mg L⁻¹ DE GLY E AMPA

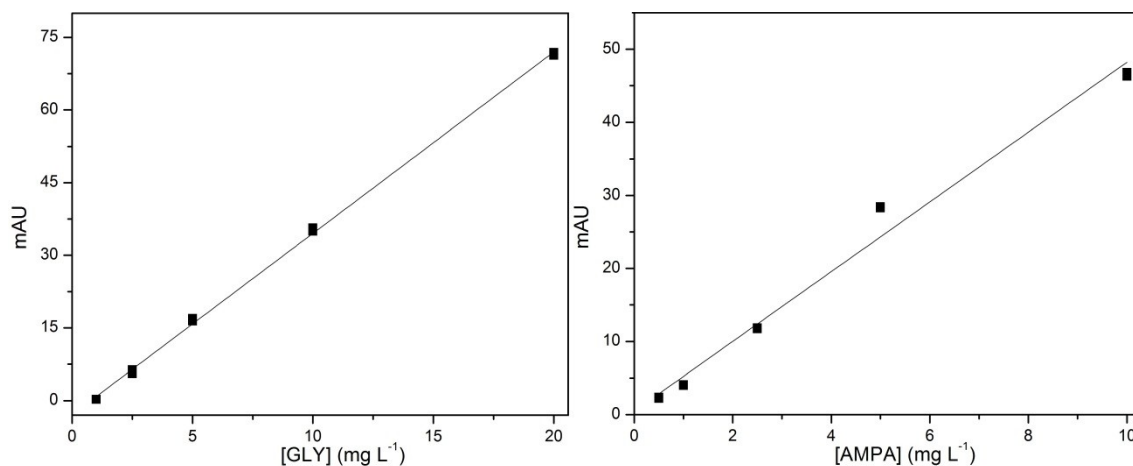


FONTE: A autora (2016).

4.4.2 Avaliação da linearidade do método analítico

A linearidade permite verificar se os resultados referentes as áreas dos picos são proporcionais as concentrações do analito, dentro de uma faixa de aplicação. Dessa forma, foram construídas curvas analíticas para ambos os analitos (FIGURA 20) e os parâmetros referentes às curvas estão apresentados na Tabela 11.

FIGURA 20 – CURVAS ANALÍTICAS PARA O GLY E AMPA. Condições cromatográficas: Fase móvel: tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 5,5):acetonitrila, com eluição por gradiente. A composição inicial foi KH₂PO₄:acetonitrila (70:30) até 2 minutos, com aumento de acetonitrila a uma razão de 15 % min⁻¹ até 5 minutos (25:75), mantendo essa proporção até 17 minutos, com detecção no comprimento de onda 206 nm e fluxo de 0,8 mL min⁻¹, coluna de fase reversa (C18).



FONTE: A autora (2016).

TABELA 11 – PARÂMETROS DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DE GLY E AMPA

Parâmetros	GLY	AMPA
Coefficiente de correlação (r)	0,9996	0,9922
Equação da reta (y=ax +b)	y=3,7357x-2,7783	y=4,7748x+0,4648
Desvio padrão da regressão	0,3039	0,8540
Faixa de concentração (mg L ⁻¹)	1-20	0,5-10
Número de pontos	5	5

FONTE: A autora (2016).

O coeficiente de correlação mostra a qualidade de uma curva analítica, pois quanto mais próximo o valor for de 1,0 menor tende a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos parâmetros da regressão linear. Logo um coeficiente de correlação de 0,99 pode ser considerado como uma relação boa dos dados na regressão linear (ANVISA, 2003). Dessa forma, podemos salientar que o método analítico apresenta linearidade na faixa estudada, pois para ambos os analitos o coeficiente de correlação apresentou valores correspondentes a 0,99.

4.4.3 Avaliação da precisão do método analítico

A precisão de um método reflete na proximidade de concordância entre os resultados dos testes mutuamente independentes e pode ser expressada em termos

de desvio padrão e desvio padrão relativo ou coeficiente de variação. Os resultados dos ensaios de precisão estão apresentados na Tabela 12 para GLY e na Tabela 13 para AMPA.

TABELA 12 – ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA PRECISÃO PARA GLY

Nível de Concentração (mg L ⁻¹)	Concentração GLY (mg L ⁻¹)	Média (%)	Desvio padrão	CV%
2,5	2,4400	2,3819	0,1146	4,81
	2,2499			
	2,4559			
10,0	10,1852	10,2013	0,0882	0,86
	10,1222			
	10,2965			
20,0	19,9736	19,8702	0,0031	0,45
	19,8201			
	19,8169			

FONTE: A autora (2016).

TABELA 13 – ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA PRECISÃO PARA AMPA

Nível de Concentração (mg L ⁻¹)	Concentração AMPA (mg L ⁻¹)	Média (%)	Desvio padrão	CV%
2,5	2,3684	2,3710	0,0144	0,60
	2,3866			
	2,3581			
10,0	10,8533	10,8617	0,0321	0,30
	10,8345			
	10,8972			
20,0	19,4680	19,3487	0,1064	0,55
	19,2632			
	19,3151			

FONTE: A autora (2016).

Os experimentos feitos para avaliar a precisão do método por meio da repetibilidade demonstraram que existe concordância entre os resultados encontrados para os três níveis de concentração avaliados. Os coeficientes de variação variaram de 0,45 a 4,81 para GLY e de 0,30 a 0,60 para AMPA, valores muito abaixo do que é estabelecido na literatura para análise de traços (20%) (RIBANI et al., 2004).

Carbo et al. (2008), Cerqueira et al. (2011) e Ribeiro et al. (2013) também avaliaram a precisão por meio da repetibilidade em métodos analíticos para determinação de pesticidas e obtiveram valores inferiores a 18%, resultados considerados satisfatórios para análise desses resíduos.

A repetibilidade é normalmente confundida com precisão instrumental. A primeira, como já mencionado, envolve várias medições de algumas soluções preparadas da mesma forma a partir de uma única amostra, diferente da precisão instrumental, que avalia as medições de injeções repetitivas de uma única solução (RIBANI et al., 2004). A precisão instrumental foi verificada nesse trabalho por meio da injeção sucessiva de um padrão. Os valores referentes ao CV para tempo de retenção e área do pico para GLY e AMPA foram inferiores a 1% (Tabela 14).

TABELA 14 – PRECISÃO INSTRUMENTAL REFERENTE A INJEÇÃO DE PADRÕES DE GLY E AMPA

	Concentração (mg L ⁻¹)	GLY			AMPA		
		Média (n=10)	Desvio padrão	CV %	Média (n=10)	Desvio padrão	CV %
Tempo de retenção	2,5	3,6080	0,0010	0,0292	7,0418	0,0015	0,1549
Área do pico	2,5	6,3223	0,0585	0,9257	11,7121	0,0528	0,4510

FONTE: A autora (2016).

Observa-se que o equipamento utilizado possui boa precisão instrumental, pois tanto os valores de área como os tempos de retenção variaram de forma pouco significativa. Valores semelhantes para precisão instrumental, com CV referente ao tempo de retenção menor que 1% foram obtidos também na determinação de pesticidas utilizando um equipamento equivalente (RIBEIRO et al., 2013). Equipamentos modernos de cromatografia líquida apresentam normalmente precisão elevada garantindo mais confiabilidade aos dados gerados.

4.4.4 Avaliação da exatidão do método analítico

A exatidão tem por finalidade garantir que o valor medido esteja próximo do valor declarado e foi avaliada por testes de recuperação. A exatidão do método ficou evidenciada por meio das porcentagens de recuperação alcançadas, que variaram de 98 a 107% com CV menor que 2% para GLY (Tabela 15), apresentando faixas

similares para AMPA as quais variaram de 98 a 116% com CV menor que 5% (Tabela 16). Esses resultados são considerados excelentes visto que encontram-se na faixa de recuperação entre 70-120%, recomendada pelo Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP, 1999).

TABELA 15 – ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE GLY EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Nível de Concentração (mg L ⁻¹)	Concentração GLY (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Média (%)	CV%
2,5	2,2842	107	107	0,91
	2,2898	107		
	2,2798	107		
5,0	4,9767	103	101	1,66
	5,0833	101		
	5,1370	100		
10,0	11,0664	97	98	0,77
	10,9033	99		
	11,0159	98		

FONTE: A autora (2016).

TABELA 16– ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE AMPA EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Nível de Concentração (mg L ⁻¹)	Concentração AMPA (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Média (%)	CV%
2,5	2,4175	99	98	0,91
	2,4554	97		
	2,4184	99		
5,0	3,9723	114	116	3,46
	4,0182	113		
	3,7726	120		
10,0	9,1825	117	115	4,25
	9,2212	117		
	9,9172	109		

FONTE: A autora (2016)

Trabalhos de Börjesson et al. (2000), Souza et al. (2006) e De Abreu et al. (2008) também avaliaram a exatidão de métodos analíticos para determinação de GLY e AMPA os quais apresentaram faixa de recuperação para GLY/AMPA

semelhantes variando de 103-75% para amostras de água, 102-85% para amostras de solo.

4.4.5 Avaliação do limite de detecção e quantificação do método analítico

Os limites de detecção e quantificação instrumentais (LDI e LQI) para AMPA foram determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica, o qual é considerado estatisticamente mais confiável. Já o LDI e o LQI para GLY foram determinados visualmente, pelo método de diluições sucessivas, comparando-se a resposta do branco com as respostas das diluições do ponto inferior da curva (Tabela 17). Ressalta-se ainda que os limites de detecção e quantificação da metodologia analítica (LDM e LQM) obtidos por meio do procedimento de pré-concentração estão muito abaixo dos valores máximos permitidos pela legislação vigente (Tabela 17).

TABELA 17 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PARA GLY E AMPA

Analito	LDI (mg L ⁻¹)	LQI (mg L ⁻¹)	LDM (µg L ⁻¹)	LQM (µg L ⁻¹)
GLY	1,0	2,5	10,0	25,0
AMPA	0,6	1,8	6,0	18,0

FONTE: A autora (2016).

4.4.6 Determinação de GLY e AMPA em amostras de água superficial

O universo amostral desse estudo foi composto por 25 amostras coletadas mensalmente em 5 açudes durante 5 meses. Em todas as análises feitas a concentração tanto de GLY como de AMPA ficou abaixo do LD da metodologia.

Entretanto, em 5 amostras foi possível verificar pico no tempo de retenção do GLY. Dessa forma, no intuito de comparar a metodologia proposta com um método aplicado por um laboratório credenciado, uma amostra foi enviada para análise. Segundo o laudo emitido (ANEXO A) a concentração de GLY+AMPA está abaixo de 150 µg L⁻¹. O resultado da análise foi condizente com os valores obtidos pela metodologia desse estudo, evidenciando assim que o método proposto é eficiente e confiável podendo ser utilizado para verificar se as concentrações de GLY e AMPA encontram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, o desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de GLY e AMPA em águas utilizando a técnica de extração em fase sólida e derivatização seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos foi realizado com êxito.

GLY e AMPA foram extraídos e pré-concentrados com cartuchos Strata™ -X-A e níveis de recuperação de 83-88% e 88-91% foram alcançados, respectivamente. O fator de pré-concentração obtido permitiu sensibilidade adequada para a verificação dos valores máximos permitidos estabelecidos pela legislação brasileira, pois foram alcançados limites de detecção e quantificação de 10,0 e 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para GLY e 6,0 e 18,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AMPA. Na reação de derivatização as condições que demonstraram melhor rendimento foram, razão molar de 1:25 entre GLY:FMOOC e AMPA:FMOOC com tempo de agitação de 5 minutos, tempo de reação de 20 minutos em temperatura ambiente. O procedimento de validação do método proporcionou confiabilidade analítica as medidas, uma vez que os resultados da avaliação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão foram satisfatórios. Em todas as amostras de água de açude a concentração tanto de GLY como de AMPA ficou abaixo do limite de detecção da metodologia proposta.

O método proposto para a detecção de resíduos de GLY e AMPA em águas apresentou-se como uma alternativa para o monitoramento desses contaminantes, principalmente por possibilitar a utilização de um equipamento mais barato e disponível comparado com a técnica de cromatografia acoplada ao detector de espectrometria de massas, normalmente aplicada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAFIOTOU, P.; RÀFOLS, C.; CASTELLS, C.; BOSCH, E.; ROSÉS, M. Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition in the chromatographic retention of ionizable compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4995-5009, 2011.

ALFAH-HEJTI, L.; JINAP, S. MIRHOSSEINI, H. Influence of different mobile phase compositions on detection of ochratoxin A. **Food Control**, v. 31, p. 244-250, 2013.

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

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografia GO1 Glifosato da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2009. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[19554-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[19554-1-0].PDF)> Acesso em: 13 set. 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Seminário Anvisa: mercado e regulação de agrotóxicos**, 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b064b7804c1890a395ccd5dc39d59d3e/Semin%C3%A1rio+ANVISA+Mercado+e+Regula%C3%A7%C3%A3o+de+Agrot%C3%B3xicos+2012+%5BSomente+leitura%5D.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 08 set. 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Sala de imprensa: Anvisa irá reavaliar glifosato e outros quatro agrotóxicos utilizados no país**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu++noticias+anos/2015/anvisa+ira+reavaliar+glifosato+e+outros+quatro+agrototoxicos+utilizados+no+país>>. Acesso em: 18 jun. 2016.

APARICIO, V. G.; GERÓNIMO, E.; MARINO, D.; PRIMOST, J.; CARRIQUIRIBORDE, P.; COSTA, J. L. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, Los Angeles, v.93, n. 1, p.1866–1873, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9898**: preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores - Procedimento. Rio de Janeiro, 1987. Disponível em: abntcolegao.com.br/ufpr. Acesso em: 21 ago. 2016.

Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP). **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (apostila)**, 1999.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL (ANDEF). Tecnologia em primeiro lugar: o Brasil a caminho de se tornar o maior produtor mundial de grãos. **Revista Defesa Vegetal**, 2009.

AVIGLIANO, E.; SCHENONE, N. F. Human health risk assessment and environmental distribution of trace elements, glyphosate, fecal coliform and total coliform in Atlantic Rainforest mountain rivers (South America). **Microchemical Journal**, v. 122, p. 149-158, 2015.

BÁEZ, M. E.; FUENTES, E.; ESPINA, M. J.; ESPINOZA, J. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in aqueous soil matrices: A critical analysis of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization reaction and application to adsorption studies. **Journal of separation science**, v. 37, n. 21, p. 3125-3132, 2014.

BARREIRA, L. P.; PHILIPPI JUNIOR, A. A problemática dos Resíduos de Embalagens de Agrotóxicos no Brasil. In: **XXVIII Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental**. Cancún: Aidis, 2002. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico26/iv-001.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2017.

BENACHOUR, N.; SIPAHUTAR, H.; MOSLEMI, S.; GASNIER, C.; TRAVERT, C.; SÉRALINI, G. E. Time and dose-dependent effects of Roundup on human embryonic and placental cells. **Arch Environmental Contamination Toxicology**, v. 53, p. 126-133, 2007.

BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G.E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chemical Research Toxicology**, v. 22, p. 97–105, 2009.

BENEDETTI, A.L.; DE LOURDES VITURI, C.; TRENTIN, A.G.; DOMINGUES, M.A.; ALVAREZ-SILVA, M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. **Toxicology Letters**, v.153, n. 2, p. 227-32, 2004.

BIZZO, H. R. et al. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.

BORGGGAARD, O. K.; GIMSING, A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. **Pest Management Science**, v. 64, n. 2, p. 441-456, 2008.

BÖRJESSON, E.; TORSTENSSON, L. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. **Journal Chromatography A**, v. 886, p. 207-216, 2000.

BOTTA, F. et al. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. **Chemosphere**, v. 77, n. 2, p. 133–139, 2009.

BOZIKI, D; BEROLDT, L.; PRINTES, R.C. Situação atual da utilização de agrotóxicos e destinação de embalagens na área de proteção ambiental estadual

rota sol, rio grande de sul brasil. **Revista VITAS – Visões Transdisciplinares sobre Ambiente e Sociedade**, n.01, 2011.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989: Dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União República Federativa**, Brasília, DF, 11 jul. 1989. Seção 1, p.60.

BRASIL. Resolução CONAMA, nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, n. 53, de 18 de março de 2005, seção 1, p. 58-63.

BRASIL. Resolução CONAMA, nº 396, de 03 de Abril de 2008. Classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas. **Diário Oficial da União**, nº 66, de 7 de abril de 2008, Seção 1, páginas 64-68.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 de dezembro de 2011.

BRITO, N. M; AMARANTE J., O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. Biochemistry and molecular biology of plants. Maryland: **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, MD, p. 610-628, 2000.

ÇAGLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 57–62, 2008.

CAPRI, E; VICARI, A. Environmental fate and behaviour of glyphosate and its main metabolite. **Eiges**, 2010.

CARBO, L.; SOUZA, E.; DORES, E.; RIBEIRO, M. L. Determination of pesticides multiresidues in shallow groundwater in a cotton-growing region of Mato Grosso, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 1111-1117, 2008.

CARNEIRO, F. F.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. D. S.; FRIEDRICH, K.; BURIGO, A. C. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Parte 1. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2015.

CATRINCK, T. C.; 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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 1194-1199, 2014.

CATTANI, D.; CAVALLI, V. L. D. L. O.; RIEG, C. E. H.; DOMINGUES, J. T.; DALCIM, T.; TASCA, C. I.; ZAMONER, A. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320, p. 34-45, 2014.

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 655, n. 1-2, p. 41-46, 2008.

CAVALLI, V. L. et al. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 65, p. 335-346, 2013.

CCME - Canadian Council of Ministers of the Environment . **Scientific Criteria Document for the Development of the Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life – Glyphosate**. Ottawa, Environment Canada, 2012.

CERQUEIRA, M. B. R. et al. Validação de método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida. **Química Nova**, v. 34, n.1, p.156-159. 2011.

CHANG, F-C.; SIMCIK, M. F.; CAPELZ, P.D. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 548-555, 2011.

CLAIR, E.; MESNAGE, R.; TRAVERT, C.; SÉRALINI, G.E. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 2, p. 269-279, 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas – SP: Editora da UNICAMP, p. 452, 2006.

CORBERA, M.; HIDALGO, M.; SALVADÓ, V. Extraction and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA using anion-exchange solid phases. **Microchimica Acta**, v. 153, n. 3-4, p. 203-209, 2006.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; DO AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismos de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

COX, C. Glyphosate (Roundup). **Journal of Pesticide Reform**, v. 18, n. 3, 1998.

DANHAUS, R.G. Dissipation of Glyphosate in USA Field Soils Following Multiple Applications of Roundup Herbicide; Report MSL-3352. **Monsanto Company**, St. Louis, MO, USA. Unpublished work, 1984.

DAOUK, S.; DE ALENCASTRO, L. F.; PFEIFER, H. R. The herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in the Lavaux vineyard area, western Switzerland: proof of widespread export to surface waters. Part II: The role of infiltration and surface runoff. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 48, n. 9, p. 725-736, 2013.

DE ABREU, A. B. G.; DE R. DA MATTA, M. H.; MONTAGNER, E. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 5, 2008.

DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V. L., Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 335–346, 2013.

DELMONICO, E. L. **Desenvolvimento de metodologia de extração e determinação de ácido aminometilfosfônico e glifosato em água de abastecimento público**. 120f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

DE MIRANDA COLOMBO, Sandro; MASINI, Jorge Cesar. A sequential-injection reversed-phase chromatography method for fluorimetric determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid. **Analytical Methods**, v. 6, n. 2, p. 490-496, 2014.

DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Applied Microbiology Biotechnology**, Frankfurt, v.43, n.3 p.545-550, 1995.

DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once in a century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

EL-SHENAWY, N. S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 28, n.3, p. 379–385, 2009.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. Glyphosate: unique global herbicide. **American Chemical Society**, Washington. p. 69. 1997.

FREIRE, R.; SCHNEIDER, R. M.; FREITAS, F. H.; BONIFÁCIO, C. M.; TAVARES, C. R. G. Monitoring of toxic chemical in the basin of Maringá stream. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 34, n. 3, p. 295-302, jul./Set., 2012.

FREUZE, I.; JADAS-HECART, A.; ROYER, A; PIERRE-YVES, C. Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water. **Journal Chromatography A**, v. 1175, p. 197-206, 2007.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. Alguns aspectos da utilização do herbicida GLY na agricultura. **ACADCOM, Monsanto do Brasil Ltda**, 2005.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M.C.; SERALINI, G.E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184-191, 2009.

GEHIN, A.; GUYON, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p. 27–34, 2006.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup (R) herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 167, p. 35-120, 2000.

GONÇALVES, A. H.; SILVA, J. B.; SOUZA, I. F.; PURCINO, A. A. C. Subdoses de sulfosate sobre a inibição da atividade da EPSPs em plantas de milho. **Planta Daninha**, v. 20, n. 3, p. 465-470, 2002.

GREY, L.; NGUYEN, B.; YANG, P. Liquid chromatography/electrospray ionization/isotopic dilution mass spectrometry analysis of n-(phosphonomethyl) glycine and mass spectrometry analysis of aminomethyl phosphonic acid in environmental water and vegetation matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 6, p. 1770-1780, 2001.

GUO, Z.; CAI, Q.; YANG, Z. Determination of glyphosate and phosphate in water by ion chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry detection. **Journal Chromatography A**, v. 1100, p. 160-167, 2005.

GUSTAFSON, D. I.; BLEEKE, M. S. Recalculation of degradation rates of AMPA in us and Canadian glyphosate terrestrial dissipation studies. Unpublished report MSL-16713. **MONSANTO Company**, St. Louis, 2000.

HANKE, I.; SINGER, H.; HOLLENDER, J.. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 391, n. 6, p. 2265-2276, 2008.

HEINONEN-TANSKI, H.; ROSENBERG, C.; SILTANEN, H.; et. al. The effect of annual use of pesticides on soil microorganisms, pesticide residues in the soil and barley yields. **Pesticides News**, n. 16, p. 341–348, 1985.

HIDALGO, C.; RIOS, C.; HIDALGO, M.; SALVADÓ, M.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. **Journal Chromatography A**, v. 1035, p. 153-157, 2004.

HORTH, H.; BLACKMORE, K., 2009. Survey of Glyphosate and AMPA in Groundwaters and Surface Waters in Europe. **Pesticides News**, n.33, 1996, p. 28-

29. Disponível em: <<http://www.pan-uk.org/pestnews/actives/glyphosa.htm>> Acesso em: 23 out. 2016.

IARC MONOGRAPHS-112. **Glyphosate, 2015**. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-10.pdf>>. Acesso em: 23/08/2016.

IBÁÑEZ, M.; ÓSCAR, P. J.; SANCHO, J. V.; LÓPEZ F. J.; HERNÁNDEZ, F. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, p. 145–155, 2005.

IBÁÑEZ, M.; ÓSCAR, P. J.; SANCHO, J. V.; LÓPEZ F. J.; HERNÁNDEZ, F. Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1, p. 51-55, 2006.

ICH - International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, **Q2A (CPMP/ICH/381/95)**, 1995.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Posicionamento do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos Agrotóxicos**. Ministério da Saúde, INCA, 2015. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2016.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre Validação de métodos analíticos – DOC CGRE-008**. Brasília, 2003.

IPCS – International Programme on Chemical Safety. **Environmental health criteria 159: glyphosate**, 1994. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>>. Acesso em: 10 set. 2016.

JAWORSKI, E. G. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 1195-1198, 1972.

JAYASUMANA, C.; GUNATILAKE, S.; SENANAYAKE, P. Glyphosate, hard water and nephrotoxic metals: are they the culprits behind the epidemic of chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka? **International Journal Environmental Research Public Health**, v. 11, p. 2125-2147, 2014.

JENKE, D. R. Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. Part II. Guidelines for primary validation parameters. **Instrumentation science & technology**, v. 26, n. 1, p. 19-35, 1998.

JUNIOR, O. P. A.; SANTOS, T. C. R. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato. **Química Nova**, v. 25, n 3, p. 420-428, 2002.

KHROLENKO, M. V.; WIECZOREK, P. P. Determination of glyphosate and its 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. **Journal Chromatography A**, v. 12, p.111–117, 2005.

KJAER, J.; OLSEN, P.; ULLUM, M.; GRANT, R. Leaching of Glyphosate and Amino-Methylphosphonic Acid from Danish Agricultural Field Sites. **Journal Environmental Quality**, v. 34, p. 608-620, 2005.

KNUUTTILA, P.; KNUUTTILA, H. The crystal and molecular structure of N-(phosphonomethyl)-glycine (glyphosate). **Acta Chemical Scandinavia B**. v.33, p.623-626, 1979.

KUDZIN, Z. H.; GRALAK, D. K.; DRABOWICZ, J.; LUCZAK, J. Novel approach for the simultaneous analysis of glyphosate and its metabolites. **Journal Chromatography A**, v. 947, p. 129-141, 2002.

KÜSTERS, M.; GERHARTZ, M. Enrichment and low-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in drinking water after cleanup by cation exchange resin. **Journal of separation science**, v. 33, n. 8, p. 1139-1146, 2010.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. 6. ed. São Carlos: RiMa Editora, 2004.

LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE). In: **Métodos cromatográficos de análise**. RiMa Editora, 2004.

LARSEN, K.; NAJLE, R.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 811-818, 2012.

LARSEN, K.; NAJLE, R.; LIFSCHITZ, A.; MATÉ, M. L.; LANUSSE, C.; VIRKEL, G. L. Effects of sublethal exposure to a glyphosate-based herbicide formulation on metabolic activities of different xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. **International Journal of Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 307-318, 2014.

LEE, E. A.; ZIMMERMAN, L. R.; BHULLAR, B. S.; THURMAN, E. M. Linker-Assisted Immunoassay and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Analysis of Glyphosate. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 4937-4943, 2002.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5 ed. São Paulo: Átomo, 2008.

LI, X.; XU, J.; JIANG, Y.; CHEN, L.; XU, Y.; PAN, C. Hydrophilic-interaction liquid chromatography (HILIC) with DAD and mass spectroscopic detection for direct

analysis of glyphosate and glufosinate residues and for product quality control. **Acta Chromatographica**, v. 21, n. 4, p. 559-576, 2009.

LOCKE, M. A.; ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Integrating soil conservation practices and glyphosate-resistant crops: impacts on soil. **Pest Management Science**, New York, v.64, n. 4, p.457–469, 2008.

LUEKEN, A.; JUHL-STRAUSS, U.; KRIEGER, G.; WITTE, I. Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H₂O₂) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. **Toxicology Letters**, v. 147, p. 35–43, 2004.

MA, J. M.; GONG, W. J, et al. Determination of glyphosate in water by high performance liquid chromatography-fluorescence detection with pre-column derivatization and solid-phase extraction. **Chinese Journal of Health Laboratory Technolog**, v. 24. p. 2599-2601, 2014.

MADIKIZELA, L. M. **Optimisation of HPLC-based methods for the separation and detection of herbicide glyphosate and its major metabolite in water**. M.Tech. thesis, Durban University of Technology, Durban, South Africa, 2010.

MALLAT, E.; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography–post-column derivatization with fluorescence detection. **Journal Chromatography A**, v. 823, p. 129-136, 1998.

MALMER, M. F.; SCHROEDER, L. A. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with methanesulfonic acid hydrolysis and 9-fluorenylmethylchloroformate derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 514, p. 227-239, 1990.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BOULBEN, S.; HUREAU, D.; DURAND, G.; BELLÉ, R. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chemical Research Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 326–331, 2002.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; DURAND, G.; BELLÉ, R. Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, p. 8–12, 2003.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BELLÉ, R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. **Biology of the Cell**, v. 96, n. 3, p. 245–249, 2004.

MATTOS, M. L. T.; PERALBA, M. C. R.; DIAS, S. L. P.; PRATA, F.; CAMARGO, L. Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. Pesticidas: **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, n. 1, p. 145-154, 2002.

MERCURIO, P.; FLORES, F.; MUELLER, J. F.; CARTER, S.; NEGRI, A. P. Glyphosate persistence in seawater. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, p. 385–390, 2014.

MESNAGE, R.; ARNO, M.; COSTANZO, M.; MALATESTA, M.; SÉRALINI, G. E.; ANTONIOU, M. N. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. **Environmental Health**, p. 14 - 70, 2015.

MESSTDAGH, P. Field Soil Dissipation Studies of Roundup Conducted in Sweden and France; Report MLL-30.033. **Monsanto Company**, St. Louis, MO, USA. Unpublished work, 1979.

MILES, C. J.; WALLACE, L. R.; MOYE, H. A. Determination of glyphosate herbicide and(aminomethyl) phosphonic acid in natural waters by liquid chromatography using pre-column fluorogenic labeling with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 69, n. 3, p. 458-461, 1986.

MONROY, C. M.; CORTÉS, A.C.; SICARD, D.M.; GROOT DE RESTREPO, H. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. **Biomédica**, v. 25, n. 3, p. 335-345, 2005.

MONSANTO DO BRASIL. **Herbicida Roundup: manual técnico**. São Paulo, 1980.

MOREIRA, J. C. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 7/2, p. 299-311, mar./abr. 2002.

MOYE, H. A.; JOHN, P. A. S. A critical comparison of pre-column and post-column fluorogenic labeling for the HPLC analysis of pesticide residues. **Pesticide Analytical Methods**, v. 6, p 89-102, 1980.

NÄSHOLM, T.; SANDBERG, G.; ERICSSON, A. Quantitative analysis of amino acids in conifer tissues by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection of their 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives. **Journal of Chromatography A**, v. 396, p. 225-236, 1987.

NEDELKOSKA, T. V.; LOW, G. K-C. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, p. 145-153, 2004.

NEVISON, C.D. A comparison of temporal trends in United States autism prevalence to trends in suspected environmental factors. **Environmental Health**. 2014

OLIVEIRA JR., R. S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: OLIVEIRA JR., R. S.; CONSTANTIN, J. **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 207-260.

OLIVEIRA, A. G.; TELLES, L. F.; HESS, R. A.; MAHECHA, G. A.B.; OLIVEIRA, C. A. Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*. **Reproductive Toxicology**, v. 23, p. 182–191, 2007.

OPPENHUIZEN, M.E.; GOURE, W.F. The Terrestrial Field Dissipation of Glyphosate in Canadian Soils; Report MSL-12605. **Monsanto Company**, St. Louis, MO, USA. Unpublished work, 1993.

PAGANELLI, A.; GNAZZO, V.; ACOSTA, H.; LÓPEZ, S. L.; CARRASCO, A. E. Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. **Chemical research in toxicology**, v. 23, n. 10, p. 1586–1595, 2010.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p. 1115–1122, 2005.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio: Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 1, p. 61-66, 2008.

POLETTA, G. L.; LARRIERA, A.; KLEINSORGE, E.; MUDRY, M. D. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research**, v. 672, p. 95–102, 2009.

PRATA, F.; LAVORENTI, A. Comportamento de herbicidas no solo: influência da matéria orgânica. **Revista Biociência**, Taubaté, v. 6, n. 2, p. 17-22, jul./dez. 2000.

QIAN, K.; TANG, T.; SHI, T.; WANG, F.; LI, J.; CAO, Y. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 222-226, 2009.

RAGAB, M.T.H.; ABDEL-KADER, M.K.H.; STILES, D.A. Fate of glyphosate in sandy loam soil and analysis for residues in field-grown crops. **Proceedings of the Nova Scotian Institute of Science**, v. 35, n. 6, p. 67-70, 1985.

RAMIREZ, C. E.; BELLMUND, S.; GARDINALI P. R. A simple method for routine monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters using lyophilization and LC-FLD+MS/MS. Casestudy: canals with influence on Biscayne National Park. **Science of the Total Environment**, vol. 496, p. 389–401. 2014.

RAMWELL, C. T.; KAH, M.; JOHNSON, P. D. Contribution of household herbicide usage to glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in surface water drains. **Pest management Science**, v. 70, n. 12, p. 1823-1830, 2014.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C.B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, A. C. A et al. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: Validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. **Química Nova**, p. 284-290, 2013.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 716-720, 2005.

RIEG, E. H. **Consequências da exposição materna à formulação comercial contendo glifosato nos parâmetros bioquímicos e morfológicos em fígado e sangue periférico de ratos imaturos**. 122 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate's suppression of Cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases. **Entropy**, v. 15, p. 1416-1463, 2013.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate, pathways to modern diseases II: celiac sprue and gluten intolerance. Interdisciplinary. **Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 159–184, 2013.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. **Surgical Neurology International**, v. 45, n. 6, p. 1310-1355, 2015.

SANCHIS, J.; KANTIANI, L.; KANTIANI, L.; LLORCA, M.; RUBIO, F.; GINEBREDA, A.; FRAILE, J.; FARRÉ, M. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. vol. 402, p. 2335–2345. 2012.

SANCO - Commission of the European Communities, **Document n° SANCO/12571/2013**. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Bélgica, 2013. Disponível em: < http://www.eurlpesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf > Acesso em: 12 set. 2016.

SCRIBNER, E. A. Concentrations of glyphosate, its degradation product, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate in ground- and surface-water, rainfall, and soil samples collected in the United States, 2001–06: US **Geological Survey Scientific Investigations**. 2007.

SEE, H. H.; HAUSER, P. C.; IBRAHIM, W. A. W.; SANAGI, M. M. Rapid and direct determination of glyphosate, glufosinate, and aminophosphonic acid by online preconcentration CE with contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 31, n. 3, p. 575-582, 2010.

SÉRALINI, G. E.; CLAIR, E.; MESNAGE, R.; GRESS, S.; DEFARGE, N.; MALATESTA, M.; HENNEQUIN, D.; SPIROUX DE VENDOMOIS, J. Republished study: long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup tolerant genetically modified maize. **Environmental Sciences Europe**, v. 26, p. 1-17, 2014.

SILVA, E. R. **Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para determinação de GLY usando microdispositivos eletroforéticos fabricados em poliéster-toner**. 109f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

SINDIVEG. **Sindiveg registra crescimento no setor de defensivos em balanço final de 2013**. 5 ed., 2014 Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/sindiveg-news-ed-05-sindiveg-registra-crescimento-no-setor-de-defensivos-em-balanco-final-de-2013/>>. Acesso em: 10 set. 2016.

SINDIVEG. **Balanço 2015: Setor de agroquímicos confirma queda de vendas**. 13 ed., 2016. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/balanco-2015-setor-de-agroquimicos-confirma-queda-de-vendas/>>. Acesso em: 11 set. 2016.

SINDIVEG. **Defensivos Agrícolas: Importação de produtos técnicos e formulados cai em 2015**. 13 ed, 2016. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/defensivos-agricolas-importacao-de-produtos-tecnicos-e-formulados-cai-em-2015/>>. Acesso em: 11 set. 2016.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SMIT, C. E.; VAN DER LINDE, A.; SCHEEPMAKER, J. W. A. Glyfosaat–Risicobeoordeling voor het milieu voor de middelen Roundup Dry en Roundup Ready To Use. **CSR Adviesrapport 08461a00 (confidential)**, 2001.

SOUZA, T. A.; MATTA, M. H. R; MONTAGNER, E.; ABREU, A. B. G. Estudo da recuperação de GLY e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1372-1376, 2006.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W.F.; PENNER, D. Absorption, action and translocation of glyphosate. **Weed Science**, v.23, n.3, p.235-240, 1975.

SRIBANDITMONGKOL, P.; JUTAVIJITTUM, P.; PONGRAVEEVONGSA, P.; WUNNAPUK, K.; DURONGKADECH, P. Pathological and toxicological findings in glyphosate-surfactant herbicide fatality: a case report. **The American journal of forensic medicine and pathology**, v. 33, n. 3, p. 234-237, 2012.

STEINRUCKEN, H.C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 94, n. 4, p. 1207–1212, 1980.

STRUGER, J.; VAN STEMPVOORT, D. R.; BROWN, S. J. Sources of aminomethylphosphonic acid (AMPA) in urban and rural catchments in Ontario,

Canada: Glyphosate or phosphonates in wastewater?. **Environmental Pollution**, v. 204, p. 289-297, 2015.

SULLIVAN, T. P. Demographic responses of small mammal populations to a herbicide application in coastal coniferous forest: population density and resiliency. **Canadian Journal of Zoology**, v. 68, n. 5, p. 874-883, 1990.

SUN, Y.; WANG, C.; WEN, Q.; WANG, G.; WANG, H.; QU, Q.; HU, X. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by LC using a new labeling reagent, 4-methoxybenzenesulfonyl fluoride. **Chromatographia**, v. 72, n. 7-8, p. 679-686, 2010.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validation of chromatographic methods. **Pharmaceutical technology**, v. 22, n. 3, p. 104-120, 1998.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

THONGPRAKASANG, S.; THIANANAWAT, A.; RANGKADILOK, N.; SURIYO, T.; SATAYAVIVAD, J. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food Chemical Toxicology**, v. 59, p. 129-136, 2013.

THURMAN, E. M. MILLS, M. S. **Solid-phase extraction: Principles and practice**, Wiley-Interscience, 1998.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de GLY sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 829-833, 2006.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Glyphosate Registration Eligibility Decision (RED)**. Washington DC, United States of America, 1993.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **National Primary Drinking Water Regulation**. EPA 816-F-09-004. Washington DC, United States of America, 2009.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Basic Information about Pesticide Ingredients. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>>. Acesso em: 7 ago. 2016

USP - United States Pharmacopeia Convention; **US Pharmacopeia 24**, Validation of Compendial Methods 1225, Rockville, 1999.

VAN STEMPVOORT, D. R.; ROY, J. W.; BROWN, S. J.; BICKERTON, G. Residues of the herbicide glyphosate in riparian groundwater in urban catchments. **Chemosphere**, Canadá, v. 95, p. 455-463, out. 2014.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; DE CASTRO FARIA, M. V. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.11, n. 22, p. 2391-2399, nov. 2006.

VOLLHARDT, P; SCHORE, N, E. **Química Orgânica: Estrutura e Função**. 6ª ed. Porto Alegre: Bookman Editora, 2013.

VREEKEN, R. J.; SPEKSNIJDER, P.; BOBELDIJK-PASTOROVA, I.; NOIJ, T. H. Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 794, n. 1, p. 187-199, 1998.

WALSH, L.P.; MCCORMICK, C.; MARTIN, C.; STOCCO, D.M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory protein expression. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 8, p. 769-776, 2000.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations**; Thirty-second report. Technical Report Series, No.823, Genebra, 1992.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Glyphosate**: Environmental Health Criteria 159; Genebra, 1994.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WILLIAMS, A. L.; WATSON, R. E.; DESESSO, J. M. Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B**, v. 15, n. 1, p.39-96, 2012.

YOUSEF, M. I.; SALEM, M. H.; IBRAHIM, H. Z.; HELMI, S.; SEEHY, M. A.; BERTHEUSSEN, K. Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. **Journal Environment Science e Health Part B**, v. 30, n. 4, p. 513-534, 1995.

ZOUAOU, 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. **Forensic Science International**, v. 226, n. 1/3, p. e20/e25, 2013.

ANEXO A – RELATÓRIO DE ENSAIO GLY E AMPA



Allabor Laboratórios Ltda.
 Av. Parigot de Souza, 190, Jardim Porto Alegre - Toledo - PR
 CEP: 85906-070
 CNPJ: 07.877.969/0001-94
 Insc. Est.: 9042151715
 +55 (45) 2103-7400 | www.allabor.com.br

Relatório de Ensaio
 1204435.00/16

Nome do Estabelecimento		CNPJ		Telefone	SIF	Reg. no Laboratório
IVONETE ROSSI BAUTITZ					--	222219/16
Endereço		Município/UF	CEP	E-mail		
UFPR, RUA PIONEIRO, 2153		PALOTINA/PR	85.950-000	gabi_peiter@hotmail.com		
Material para Ensaio				Marca	COA	
ÁGUA				NA	NA	
Lacre	Lote	Turno	Data de Fabricação	Data de Validade		
NA	NA	Não Informado	N.I.	N.I.		
Temperatura na Coleta	Data/Hora da Coleta	Data de Remessa	Local de Coleta	Responsável pela Coleta		
24°C	17/11/2016 05:30	17/11/2016	MARIPA	RONALDO		
Data/Hora de Recebimento da Amostra		Temperatura Aferida (Superfície)	Data de Início da Análise	Data Final da Análise		
17/11/2016 20:00		3.0°C	18/11/2016	02/12/2016		
Observações da Coleta:						

Observações Iniciais
 CHUVA NAS ÚLTIMAS 24 HRS: NÃO. Registro: NA

Resultados dos Ensaio

Resultados dos Ensaio Terceirizados nº 343976/16

Ensaio (Código)	Resultado	Unidade	Valor Referência	Referência Metodologia
FQ093 - Glifosato+AMPA	<0,15	mg/L	----	EPA 300.0: 193, 300.1: 1999, POP PA 032 – Rev. 12

Observações Finais

Os resultados deste relatório referem-se exclusivamente à amostra submetida ao(s) ensaio(s) e condições especificadas, não sendo extensivo a quaisquer lotes.

A reprodução deste só poderá ser total da aprovação, por escrito do emitente.

Amostra ensaiada, segue o plano de amostragem conforme descrito no MC-Manual de Coleta.

Data de Emissão: 02/12/2016



Digitally signed by JANAINA
 DARTORA:02758230917
 Date: 2016.12.02 18:02:59 BRST
 Reason: Certificação Digital
 Location: Allabor

Janaina Dartora CRQ-PR 09202011
 Responsável Técnica
 janaina.dartora@allabor.com.br