

**CATIÚSCIA WEINERT MIZUSCHIMA**

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE  
GLIFOSATO E AMPA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA UTILIZANDO  
HPLC-DAD**

**Pelotas  
2021**

**CATIÚSCIA WEINERT MIZUSCHIMA**

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE  
GLIFOSATO E AMPA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA UTILIZANDO  
HPLC-DAD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharias e Ciências Ambientais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Rio-grandense, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo dos Santos Vaz

**Pelotas  
2021**

**CATIÚSCIA WEINERT MIZUSCHIMA**

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE  
GLIFOSATO E AMPA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA UTILIZANDO  
HPLC-DAD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharias e Ciências Ambientais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Rio-grandense, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Dissertação defendida e aprovada em: 23 de março de 2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bernardo dos Santos Vaz  
Orientador  
(IFSul - Campus Pelotas)

Prof. Dr. Pedro José Sanches Filho  
(IFSul - Campus Pelotas)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Geller  
(IFSul - Campus Lajeado)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Brauer Zaicovski  
(IFSul - Campus CAVG)

Este trabalho é dedicado primeiramente a Deus que sempre esteve presente mesmo quando me fiz ausente, é dedicado também, ao meu esposo Dioni e ao meu filho Pedro por todo apoio e compreensão.

## **AGRADECIMENTO**

A conclusão deste trabalho é muito gratificante, e durante esta trajetória pude contar com o apoio de pessoas que se tornaram muito importantes.

Agradeço a Deus por me dar força e disposição mesmo diante de tantas adversidades.

Agradeço aos meus pais, pois tudo que sou e represento se deve aos valores passados por eles até os dias de hoje.

Agradeço aos meus sogros por toda a dedicação a mim e à minha família.

Agradeço ao meu esposo, pelo incentivo, dedicação e compreensão que me fizeram começar, que me permitiram continuar e chegar até aqui.

Agradeço ao meu filho por todo o companheirismo, amizade e compreensão, que sempre esteve disposto a ajudar para que eu pudesse me dedicar aos meus compromissos.

Agradeço ao IFSul por todo o suporte que garantiu a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao PPGECA por todo o suporte, orientação e compreensão, que foram extremamente importantes para a conclusão deste trabalho.

Agradeço a todos os professores que estiveram envolvidos, que se fizeram presentes e contribuíram para este trabalho.

Agradeço aos meus colegas de sala de aula, que por vezes fizeram o fardo mais leve. Agradeço aos que foram meus colegas e aqueles que permanecem meus amigos.

Agradeço ao meu orientador, que sempre participou e contribuiu com conhecimento, paciência, tempo e disposição para atender às minhas demandas e as demandas que envolveram este trabalho. Que desde o início foi o maior incentivador para que tudo começasse e fosse concluído. Que sempre se preocupou não só com a Catiúscia mestranda, mas também com a Catiúscia ser humano. Obrigada pela enorme ajuda, obrigada por entender e respeitar minhas limitações e devaneios. Obrigada por todos os ensinamentos e amizade. Obrigada a sua família, esposa e filhos, por todo o tempo que o senhor dedicou a este trabalho.

Fecho este ciclo, saio daqui alguém melhor do que entrou, grata por tudo, consciente de que a ajuda dos outros nos faz avançar e consciente de que sempre posso melhorar, evoluir, aprender e sonhar.

Obrigada!

***“Tudo posso naquele que me fortalece”.***

Filipenses 4: 13

## RESUMO

O glifosato é um herbicida organofosforado de amplo espectro com maior volume de produção e utilização no mundo. A discussão sobre os efeitos na saúde humana, contaminação do solo e ecossistemas aquáticos têm sido uma questão central na sociedade atual a respeito da continuidade do uso desta substância no meio ambiente. Visando a proteção da saúde humana, foram estipulados níveis máximos permitidos de glifosato em água potável, que são determinados por diferentes agências e países, o que torna indispensável um método confiável e eficiente para a determinação do glifosato e seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA). Cromatografia Líquida de alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) é pouco utilizado na determinação de glifosato e AMPA, mas amplamente empregado em análises de outros agrotóxicos. A falta de grupos cromóforos ou fluoróforos no glifosato envolve uma etapa de derivatização, sendo que o composto mais utilizado é o 9-cloroformato de fluorenilmetil (FMOC-Cl). Com base nessas informações, este trabalho teve por objetivo desenvolver uma metodologia para determinação de glifosato e seu metabólito AMPA em amostras ambientais de água, derivatizadas com FMOC-Cl empregando a técnica cromatográfica HPLC-DAD. O método desenvolvido para determinação de glifosato e AMPA em amostras ambientais de água nestas condições, alcançou o LD para glifosato e AMPA, de 0,007 e 0,006 mg.L<sup>-1</sup> e LQ para glifosato e AMPA de 0,035 e 0,019 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. É considerado um método de alta repetibilidade devido à sua precisão. A partir dele foi possível determinar a presença de glifosato nas amostras de um dos ambientes investigados, contendo a concentração de 0,078 mg.L<sup>-1</sup>, valor acima do limite permitido pela resolução CONAMA 357/2005 de 0,065 mg.L<sup>-1</sup>.

**Palavras-Chave:** Qualidade da Água, CONAMA, Pesticidas, Cromatografia Líquida, CLAE.

## ABSTRACT

Glyphosate is a broad spectrum organophosphate herbicide with the highest production and use volume in the world. The discussion about the effects on human health, soil contamination and aquatic ecosystems has been a central issue in today's society regarding the continued use of this substance in the environment. In order to protect human health, maximum permitted levels of glyphosate in drinking water have been stipulated, which are determined by different agencies and countries, which makes a reliable and efficient method for the determination of glyphosate and its aminomethylphosphonic acid metabolite (AMPA) indispensable. High Performance Liquid Chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) is little used in the determination of glyphosate and AMPA, but widely used in the analysis of other pesticides. The lack of chromophore groups or fluorophores in glyphosate involves a derivatization step, the most used compound being fluorenylmethyl 9-chloroformate (FMOC-Cl). Based on this information, this work aimed to develop a methodology for the determination of glyphosate and its metabolite AMPA in environmental water samples, derivatized with FMOC-Cl using the HPLC-DAD chromatographic technique. The method developed to glyphosate and AMPA determination in environmental water samples reached the LD for glyphosate and AMPA, of 0,007 and 0,006 mg.L<sup>-1</sup>, and LQ for glyphosate and AMPA 0,035 e 0,019 mg.L<sup>-1</sup>, respectively. It is considered a high repeatability method due to its precision. It was possible to determine glyphosate in the samples of one of the investigated environments, containing a concentration of 0.078 mg.L<sup>-1</sup>, a value above the limit allowed by CONAMA resolution 357/2005 of 0.065 mg.L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** Water quality, CONAMA, Pesticides, Liquid Chromatography, CLAE.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Produtividade e área plantada de arroz safra 2018/2019	18
<b>Figura 2</b> – Estrutura química do glifosato	20
<b>Figura 3</b> – Possíveis vias de contaminação do glifosato após aplicação	21
<b>Figura 4</b> – Via de metabolização por microorganismos do glifosato	22
<b>Figura 5</b> – Derivatização de glifosato e AMPA com FMOC-Cl	27
<b>Figura 6</b> – Comprimento de onda de absorção no UV para FMOC-glifosato	28

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Propriedades físico-químicas do glifosato	20
<b>Tabela 2</b> – Parâmetros a serem considerados na validação analítica	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AMPA** – Ácido Aminometilfosfônico
- BSTFA** – N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamida
- CE** – Capillary Electrophoresis
- CNBF** – 4-cloro-3,5-dinitrobenzócotrifluoreto
- CONAMA** – Conselho Nacional do Meio Ambiente
- DAD** – Diode Array Detector
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- EPA** – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
- EPSPS** – 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
- FL** – Fluorescência
- FMOC-CI** – 9-cloroformato de fluorenilmetil
- FMOC-OH** – 9-fluorenylmethanol
- FMOC-GLIFOSATO** – Glifosato derivatizado com 9-cloroformato de fluorenilmetil
- FMOC-AMPA** – AMPA derivatizado com 9-cloroformato de fluorenilmetil
- GC** – Gas Chromatography
- HILIC** – Hydrophilic-Interaction Chromatography
- CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- HPLC** – High Performance Liquid Chromatography
- LC** – Liquid Chromatography
- LLE** – Liquid-Liquid Extraction
- MS/MS** – Tandem Mass Spectrometry
- OPA-MERC** – Ortoftaldeído-mercaptoetanol
- RDC** – Resolução de Diretoria Colegiada
- SPE** – Solid-Phase Extraction
- SPME** – Solid Phase Micro Extraction
- TLC** – Thin-Layer Chromatography
- TMCS** – Trimetilclorosilano
- UV** – Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>1.1 OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
1.1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>1.2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>18</b>
<b>2.1 O HERBICIDA GLIFOSATO</b>	<b>18</b>
<b>2.2 PROPRIEDADES E MODO DE AÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2.3 TOXICIDADE</b>	<b>21</b>
<b>2.4 LEGISLAÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>2.6 DERIVATIZAÇÃO</b>	<b>25</b>
<b>2.7 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO</b>	<b>28</b>
2.7.1 SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE	29
2.7.2 LINEARIDADE	30
2.7.3 EFEITO DA MATRIZ	30
2.7.4 FAIXA DE TRABALHO	30
2.7.5 PRECISÃO	31
2.7.6 EXATIDÃO	31
2.7.7 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	32
2.7.8 ROBUSTEZ	32
<b>3. REFERÊNCIAS</b>	<b>33</b>
<b>4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E/OU TECNOLÓGICA</b>	<b>42</b>
<b>4.1 ARTIGO Nº 1</b>	<b>42</b>
<b>4.2 ARTIGO Nº 2</b>	<b>43</b>
<b>4.3 ARTIGO Nº 3</b>	<b>65</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>87</b>
<b>6. ANEXOS</b>	<b>88</b>
<b>6.1 NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO SUBMETIDO</b>	<b>88</b>
<b>7. APÊNDICES</b>	<b>94</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O glifosato [N-(fosfonometil) glicina] é um herbicida organofosforado de amplo espectro, não seletivo e de pós-emergência. Amplamente utilizado no combate às ervas daninhas, ele atua na inibição da 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), uma enzima chave na biossíntese de aminoácidos aromáticos (SHILO *et al.*, 2016), que são essenciais para a sobrevivência das plantas. É o herbicida com maior volume de produção, usado em mais de 750 produtos diferentes, e mundialmente utilizado na agricultura, silvicultura, áreas urbanas e em aplicações domésticas (GUYTON *et al.*, 2015; IARC, 2017).

O glifosato tem sido foco de intensa pesquisa científica e inovação de produtos, o número de publicações científicas e patentes relacionadas a ele aumentou para quase 20.000 em 40 anos, sendo a maioria nos últimos 15 anos (DUKE, 2018). Além disso, a discussão sobre os efeitos na saúde humana, contaminação do solo e ecossistemas aquáticos causados por glifosato, têm sido uma questão central na mídia e cenário político mundial, onde se debate a respeito da continuidade do uso desta substância no meio ambiente (CARLES *et al.*, 2019).

Glifosato e herbicidas à base de glifosato podem contaminar organismos, incluindo seres humanos, ecossistemas e também alimentos e rações (GASNIER *et al.*, 2009). Já foi possível, inclusive, detectar glifosato em amostras de sangue e urina coletadas de trabalhadores agrícolas, indicando assim, a absorção desta substância pelo corpo (GUYTON *et al.*, 2015; IARC, 2017). Alguns estudos associam a exposição humana ao glifosato à incidência de doenças como câncer (IARC, 2017; THONGPRAKAISANG *et al.*, 2013), a danos no DNA e efeitos mutagênicos e reprotóxicos nas células humanas e de organismos vivos (GASNIER *et al.*, 2009).

Por isso, visando a proteção da saúde humana, foram estipulados níveis máximos permitidos de glifosato em água potável, que são determinados por diferentes agências e países. Na União Europeia o limite é de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; nos Estados Unidos o limite é de  $700 \mu\text{g.L}^{-1}$ , conforme a determinação da Agência de Proteção Ambiental (EPA) (WANG, Shizong *et al.*, 2016). No Brasil, conforme a portaria de consolidação do Ministério da Saúde, n.º 05/2017, o valor residual máximo permitido de glifosato e seu metabólito o ácido aminometilfosfônico (AMPA) para água potável é de  $500 \mu\text{g.L}^{-1}$  (BRASIL, 2011). E conforme a resolução do

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/2005, são estabelecidos para águas doces de classe um e classe três os valores residuais máximos de glifosato de  $65 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $280 \mu\text{g.L}^{-1}$  respectivamente (BRASIL, 2005).

Diante desse panorama, torna-se indispensável um método confiável e eficiente para a determinação do glifosato em amostras ambientais (QIAN *et al.*, 2009), que assegure um monitoramento ambiental adequado, tendo em vista a saúde humana e ambiental. Dadas as condições de monitoramento ambiental para glifosato, é importante ressaltar que frequentemente ao investigar a sua ocorrência, inclui-se também seu principal produto de degradação, o AMPA (EHLING e REDDY, 2015).

Entre as técnicas mais utilizadas para determinação de glifosato e AMPA em matrizes ambientais, estão a cromatografia líquida e a gasosa. Contudo, se comparada à cromatografia gasosa a líquida é mais vantajosa, devido à característica iônica e de baixa volatilidade do glifosato e AMPA, que favorece a técnica (DRUART *et al.*, 2011). A cromatografia líquida é, inclusive, a técnica mais adequada para a detecção de herbicidas fosfônicos e do tipo aminoácido em baixas concentrações (OKADA *et al.*, 2019).

Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), do inglês high performance liquid chromatography (HPLC), os detectores mais utilizados para quantificação do glifosato são o de fluorescência (FL) e ultravioleta (UV) (KACZYŃSKI e ŁOZOWICKA, 2015). Além desses, há também o detector de arranjo de diodos (DAD) que é pouco utilizado na determinação de glifosato e AMPA, mas amplamente empregado em análises de HPLC para determinar resíduos de outros agrotóxicos (ABBASPOUR *et al.*, 2019; CORAZZA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019; XI *et al.*, 2016). O DAD é especialmente útil na análise de amostras com matrizes complexas por obtenção de espectros de UV e avaliação da pureza dos picos nos cromatogramas (TUZIMSKI, 2009). A técnica analítica que emprega HPLC-DAD tem um custo de instrumentação relativamente baixo e ainda assim é suficientemente seletiva e sensível para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras que foram purificadas e concentradas antes análise cromatográfica (ABBASPOUR *et al.*, 2019; TUZIMSKI e REJCZAK, 2016).

Relativo à detecção de glifosato e AMPA, a falta de grupos cromóforos ou fluoróforos dificulta o uso de métodos convencionais (OKADA *et al.*, 2019), como por exemplo o DAD. Em razão disso, a maioria dos métodos analíticos para

determinação desses compostos envolvem uma etapa de derivatização, pré-coluna ou pós-coluna, com a finalidade de aumentar a seletividade e sensibilidade do método, através da redução do caráter polar das moléculas de glifosato e AMPA, aumentando a retenção e melhorando a separação cromatográfica (GHANEM *et al.*, 2007). Para a derivatização o reagente pré-coluna mais utilizado é o 9-cloroformato de fluorenilmetil (FMOC-Cl) (CARRETTA *et al.*, 2019; DRUART *et al.*, 2011; KOSKINEN; MAREK e HALL, 2016).

O FMOC-Cl tem baixa solubilidade e estabilidade quando em água, sendo necessário seu preparo com solvente orgânico miscível com água, a acetonitrila é um exemplo de solvente orgânico utilizado nesse caso (OKADA *et al.*, 2019). Embora o FMOC-Cl seja um reagente amplamente utilizado para derivatização, ele provoca efeitos indesejados durante sua reação em matriz aquosa, que é a formação de subprodutos de derivatização, tais como o 9-fluorenylmethanol (FMOC-OH), produto da hidrólise e descarboxilação do FMOC-Cl, que podem danificar a coluna cromatográfica em caso de precipitação, o que poderá reduzir a eficiência de ionização da molécula podendo afetar a robustez e sensibilidade do método em geral (HANKE; SINGER e HOLLENDER, 2008).

Além disso, o excesso do FMOC-Cl utilizado no preparo da amostra pode provocar danos na coluna cromatográfica, e uma das estratégias utilizadas para remoção do excesso desse reagente além de outras impurezas orgânicas após a derivatização, é a inclusão de uma etapa de *clean-up* da amostra com solvente orgânico (CATRINCK *et al.*, 2014). Somado a isso, uma técnica de preparação de amostras com pré-concentração dos analitos, também tem potencial de reduzir ou eliminar possíveis compostos interferentes, o que poderá permitir a transferência dos analitos para uma fase de extração compatível com o instrumento de análise (CORAZZA *et al.*, 2019; XI *et al.*, 2016).

Com base nessas informações, este trabalho teve por objetivo otimizar uma metodologia para determinação de glifosato e seu metabólito AMPA em amostras ambientais de água, derivatizadas com FMOC-Cl, empregando a técnica cromatográfica HPLC-DAD.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar uma metodologia para determinação de glifosato e seu metabólito AMPA em amostras ambientais de água empregando a técnica cromatográfica HPLC-DAD.

### 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

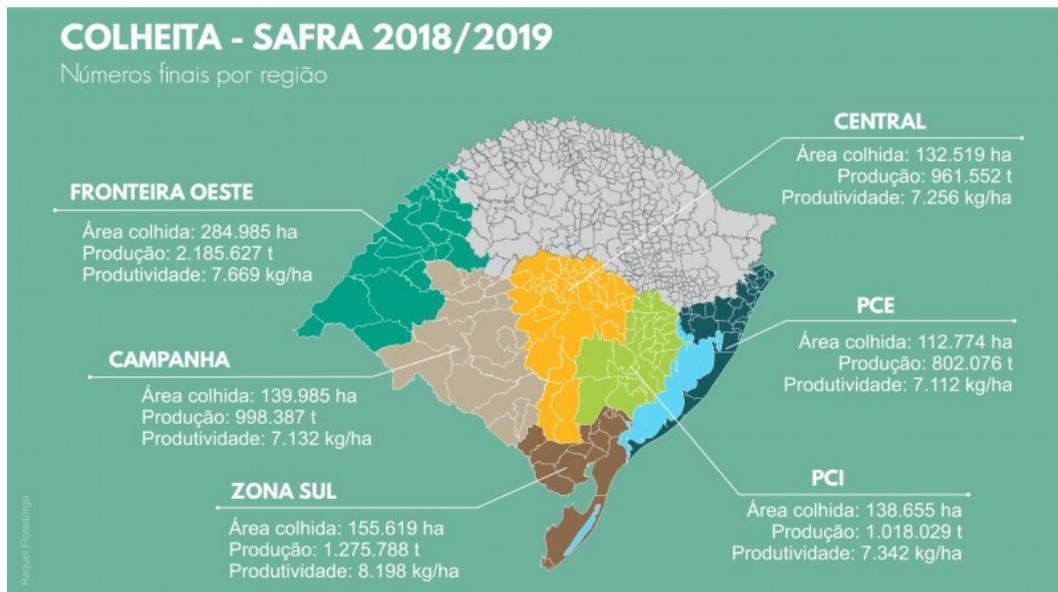
- Otimizar a reação de derivatização de glifosato e AMPA com FMOC-Cl;
- Otimizar o *clean-up* da amostra com solvente orgânico;
- Avaliar a eficiência de diferentes colunas analíticas na separação dos analitos de interesse do método;
- Validar os parâmetros do método: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão;
- Obter leituras de glifosato dentro da faixa de concentração determinada pela legislação brasileira vigente;
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras ambientais, naturais e/ou simuladas.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

O glifosato é um dos herbicidas mais utilizados ao redor do mundo (WANG, Shizong *et al.*, 2016; VAN STEMPVOORT *et al.*, 2014). Extensivamente utilizado na agricultura para o combate de ervas daninhas. Embora a aplicação deste herbicida se dê essencialmente sobre as plantas, parte dele acaba no solo onde é fortemente adsorvido, e lixiviado até o lençol freático podendo chegar até os corpos de água através do escoamento superficial. Por este motivo, as áreas agrícolas têm sido a principal via de obtenção de dados de monitoramento e vigilância relacionados à ocorrência de glifosato e AMPA em águas superficiais e subterrâneas (VAN STEMPVOORT *et al.*, 2014).

Com relação à produção agrícola, o Brasil é um dos maiores produtores de grãos do mundo (CATTELAN e DALL'AGNOL, 2018) no cenário nacional o Rio Grande do Sul se destaca como o maior produtor de arroz, contribuindo com 80% da produção nacional (CONAB, 2020). Na safra de arroz 2018/2019, a Zona Sul do Rio Grande do Sul (Arroio Grande, Jaguarão, Pelotas, Rio Grande e Santa Vitória

do Palmar) obteve a maior de produtividade do estado com a segunda maior área plantada (Figura 1) (IRGA, 2020).



**Figura 1:** Produtividade e área plantada de arroz safra 2018/2019 (IRGA, 2020)

E é nessa região que localiza-se a Bacia Hidrográfica Mirim-São Gonçalo, na qual a Lagoa Mirim é o principal corpo hídrico, seguido da Lagoa dos Patos (conectada à Lagoa Mirim pelo Canal São Gonçalo), e pela Lagoa Mangueira (CALDEIRA, 2019). A partir destas informações é possível traçar um panorama da zona sul do Rio Grande do Sul, considerada uma das maiores regiões orizícolas do estado, tem a agricultura como uma das principais atividades econômicas, além de ser uma região abundante em recursos hídricos.

Em regiões como esta é comum a prática de agricultura intensiva atrelada ao sistema de monoculturas, e é justamente nesses locais que se têm uma maior aplicação de agrotóxicos, entre tantos, o glifosato e formulações contendo glifosato são utilizados tanto no preparo do solo para a semeadura, quanto para manutenção da cultura ao longo do seu desenvolvimento, exterminando ervas daninhas que possam competir por espaço e nutrientes dos cultivos. O uso indiscriminado de agrotóxicos pode provocar efeitos negativos que afetarão a saúde dos ecossistemas ali presentes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O HERBICIDA GLIFOSATO

O glifosato é um herbicida organofosforado de amplo espectro, não seletivo, de pós-emergência. Sua molécula [N- (fosfonometil) glicina], mais tarde denominada glifosato, foi sintetizada pela primeira vez em 1950 por Henri Martin, um pesquisador da pequena empresa farmacêutica suíça, Cilag (FRANZ; MAO e SIKORSKI, 1997). No entanto, neste período, não foram encontradas aplicações farmacêuticas, e a molécula passou a ser vendida para uma série de outras empresas, e amostras foram testadas para diversos tipos de usos possíveis (BENBROOK, 2016).

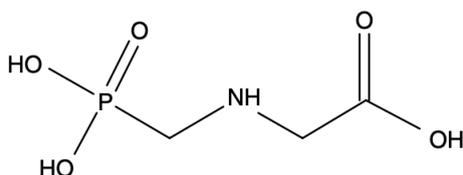
Foi então que, em 1970 a molécula foi re-sintetizada e testada pela Monsanto, e seu efeito herbicida foi descrito por Baird e colaboradores em 1971, seguido por vários outros, e sua patente foi reivindicada e obtida pela Companhia Monsanto em 1974, como invenção de John E. Franz e, a partir daí, foi introduzida como produto herbicida Roundup® (formulação do sal de isopropilamina de glifosato com um surfactante) (SZEKACS e DARVAS, 2012).

A comercialização do Roundup® começou em 1974 e em 2000, ao expirar sua patente, o uso do ingrediente ativo do herbicida (glifosato) passou a ser ainda maior, com produtos genéricos de diferentes formulações, agora fabricados por diversas empresas (BECKIE; FLOWER e ASHWORTH, 2020). A partir daí, as diversas formulações comerciais disponíveis de glifosato, passaram a apresentar-se também nas formas de sais de diamônio, monoamônio, potássio, trimetil sulfônio e sesquisódio, além da já conhecida apresentação em sal de isopropilamina (TRAVLOS; CHEIMONA e BILALIS, 2017).

Atualmente o glifosato é um dos herbicidas mais utilizados em sistemas de cultivo agrícolas e não agrícolas em países desenvolvidos (HAGNER *et al.*, 2019), se não o mais utilizado no mundo (BECKIE; FLOWER e ASHWORTH, 2020; DUKE e POWLES, 2008; ZHAN *et al.*, 2018). Esse composto é frequentemente utilizado para controlar o crescimento de ervas daninhas tanto na agricultura, especialmente em culturas geneticamente modificadas (transgênicas), além da silvicultura, bem como nas margens de rodovias, ferrovias e áreas urbanas (TRAVLOS; CHEIMONA e BILALIS, 2017; VAN STEMPTVOORT *et al.*, 2014).

## 2.2 PROPRIEDADES E MODO DE AÇÃO

O glifosato [N - (fosfonometil) glicina],  $C_3H_8NO_5P$ , é um derivado de fosfonometil do aminoácido glicina, é um sólido cristalino branco e inodoro, composto por uma função amino básica e três locais ácidos ionizáveis (Figura 2) (DILL *et al.*, 2010).



**Figura 2:** Estrutura química do glifosato (BORGGAARD e GIMSING, 2008).

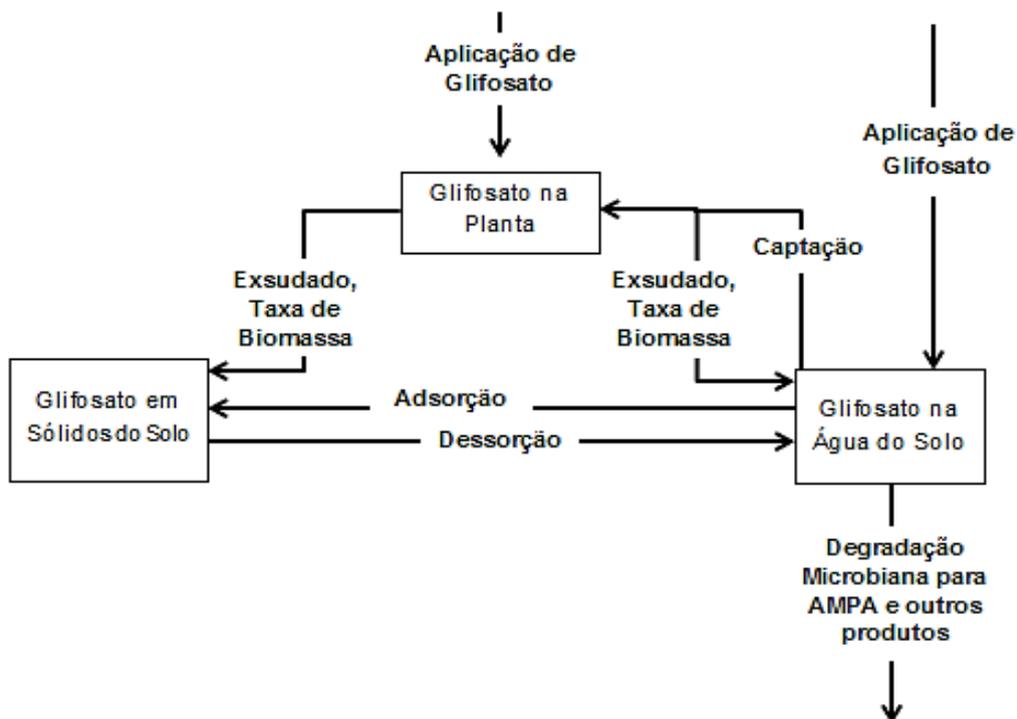
É uma substância química anfotérica que contém a função amino secundária básica no meio da molécula e sítios ácidos monobásicos (carboxílico) e dibásico (fosfônico) em ambas as extremidades (SZEKACS e DARVAS, 2012). O glifosato é altamente polar, não volátil e não possui grupos cromóforos ou fluoróforos (CHEN *et al.*, 2013). Algumas das propriedades físico-químicas relevantes do glifosato constam a seguir na Tabela 1.

**Tabela 1:** Propriedades físico-químicas do glifosato.

<b>Densidade</b>	1,705 g.mL <sup>-1</sup> a 20 °C
<b>Solubilidade em Água</b>	10,5 g.L <sup>-1</sup> a 20 °C e pH 1,9, 12 g.L <sup>-1</sup> a 25 °C
<b>Constante de Dissociação</b>	pKa <sub>1</sub> = 2,3 (20 °C – ácido fosfônico) pKa <sub>2</sub> = 5,7 (20 °C – amina secundária) pKa <sub>3</sub> = 10,2 (25 °C – ácido carboxílico)
<b>Ponto de fusão</b>	184,5 °C
<b>Ponto de Ebulição</b>	~ 100 °C
<b>Ponto de Decomposição</b>	187 °C
<b>Insolúvel em</b>	acetona, etanol e xileno
<b>Constante da Lei de Henry</b>	2,1 x 10 <sup>-12</sup> atm·m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> a 25 °C

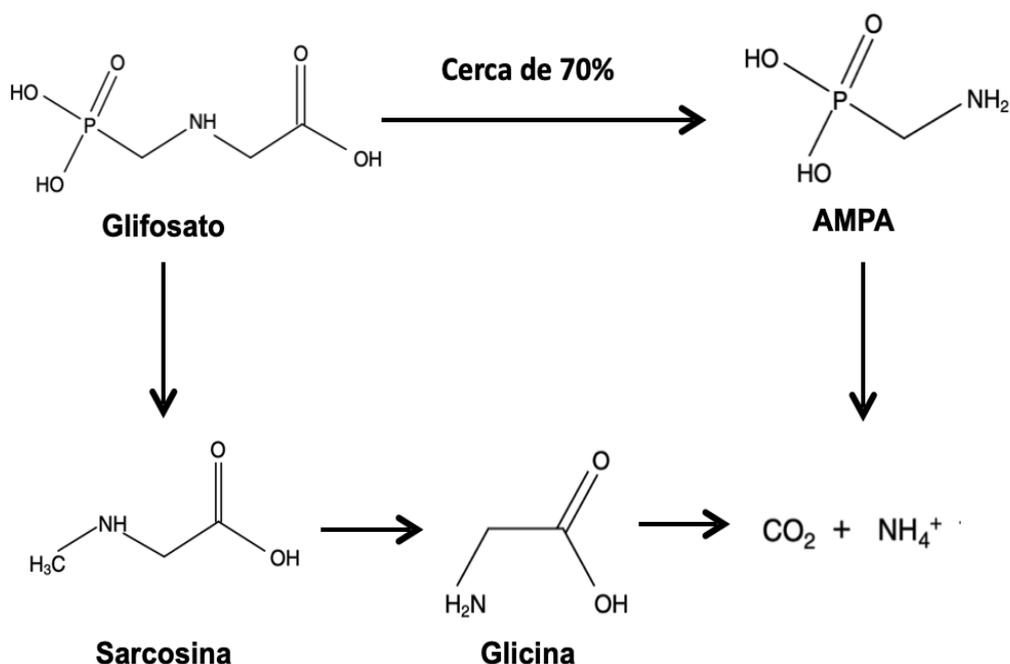
Fonte: (BAER e MARCEL, 2014).

Fisiologicamente ele atua inibindo a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), uma enzima chave na biossíntese de aminoácidos aromáticos, hormônios e outros metabólitos essenciais das plantas (DILL *et al.*, 2010; SHILO *et al.*, 2016). A fotossíntese e a respiração também são afetadas neste processo, e as plantas morrerão entre uma e três semanas (CHANG e LIAO, 2002). A eficácia do glifosato como fitotoxina se deve, em parte, ao seu baixo peso molecular e alta solubilidade em água, que ajuda sua rápida absorção e translocação pelos tecidos vegetais (ANADÓN *et al.*, 2009). Porém, após ser aplicado como *spray* foliar para controlar ervas daninhas, o glifosato pode acabar em diferentes partes do solo, em locais que não são seu alvo principal, chegando até outros compartimentos ambientais (Figura 3).



**Figura 3:** Possíveis vias de contaminação do glifosato após aplicação (KANISSERY *et al.*, 2019).

A metabolização do glifosato se dá a partir da ação de microorganismos do solo (DUKE, 2011), da qual resulta o AMPA (Figura 4), considerado o único metabólito significativo do glifosato (JÖNSSON; CAMM e HALL, 2013).



**Figura 4:** Via de metabolização por microorganismos do glifosato (BAI e OGBOURNE, 2016; BORGGAARD e GIMSING, 2008).

O AMPA é fortemente adsorvido aos sólidos do solo (HAGNER *et al.*, 2019), é quimicamente semelhante ao glifosato e também mostra propriedades semelhantes em termos de comportamento e toxicidade (JÖNSSON; CAMM e HALL, 2013). O tempo de meia-vida do glifosato e seu principal metabólito AMPA pode variar entre 0,8-151 e 10-98 dias respectivamente, essa variação se dá principalmente pelas propriedades bioquímicas do ambiente onde se encontram, solo, água, por exemplo (BAI e OGBOURNE, 2016).

### 2.3 TOXICIDADE

Ao avaliar o risco de um agrotóxico para a saúde humana é necessário definir uma classificação de perigo e valores toxicológicos de referência. E embora exista um potencial perigoso relacionado a determinada substância, o que levaria a crer que todas as avaliações seriam equivalentes, o risco também deve considerar o uso dessa substância, ou seja, a probabilidade e a proporção dos eventos e efeitos adversos provocados pelos padrões e condições desse uso (TARAZONA *et al.*, 2017).

Formulações à base de glifosato são consideradas em alguns estudos como um produto não tóxico ou de baixa toxicidade para seres vivos (DUKE e POWLES, 2008; WILLIAMS, KROES e MUNRO, 2000). Estas considerações justificam-se pelo fato de que a via de biossíntese de aminoácidos aromáticos, a qual é afetada pelo glifosato, não é compartilhada por membros do reino animal, o que tornaria o glifosato um inibidor eficiente somente em plantas (WILLIAMS; KROES e MUNRO, 2000).

Apesar disso, outros estudos demonstram que a toxicidade do glifosato é observada tanto em organismos unicelulares, quanto em organismos multicelulares encontrados no solo e na água (GILL *et al.*, 2017). Essas espécies não alvo são afetadas principalmente pelo uso indiscriminado de glifosato (SINGH *et al.*, 2020).

O efeito tóxico em peixes pode produzir alterações de expressão gênica, alterações fisiológicas, neurológicas, reprodutivas, bioquímicas e histológicas (FOLMAR; SANDERS e JULIN, 1979; GIANNINI, 2013; LANGIANO e MARTINEZ, 2008; MORAES *et al.*, 2020).

Abelhas expostas a níveis de glifosato comumente encontrados em ambientes agrícolas tem sua capacidade cognitiva prejudicada, a qual é responsável por recuperar e integrar informações espaciais, impedindo assim, sua volta bem sucedida à colmeia (BALBUENA *et al.*, 2015). Além disso, essa exposição pode perturbar também sua microbiota intestinal benéfica, o que prejudica sua saúde e sua capacidade polinizadora (MOTTA; RAYMANN e MORAN, 2018).

Para humanos o glifosato representa um provável risco cancerígeno (IARC, 2017). Existe uma relação entre a exposição de produtos à base de glifosato e o aumento do risco de linfoma não-Hodgkin, essa evidência tem por base uma meta-análise de estudos epidemiológicos humanos e estudos experimentais com animais, além de estudos mecanísticos (ZHANG *et al.*, 2019). Existem ainda os riscos associados à herbicidas à base de glifosato, os quais provocam danos ao DNA e efeitos carcinogênicos, mutagênicos e reprotóxicos em células humanas e *in vivo* (GASNIER *et al.* 2009). A título de exemplo, enquanto o glifosato provoca apoptose celular sem danos às membranas, o Roundup® (formulação à base de glifosato) é o que mais induz a morte celular, mais do que glifosato e seu metabólito AMPA, ele perturba as membranas celulares e mitocondriais, levando à necrose, o que confirma que os adjuvantes utilizados nas formulações do Roundup® não são inertes (BENACHOUR e SÉRALINI 2009).

Herbicidas à base de glifosato são considerados também como tóxicos e agem como disruptor endócrino em células humanas (GASNIER *et al.*, 2009), induzem a morte celular através de mecanismos apoptóticos e autofágicos (GASNIER *et al.*, 2009; GUI *et al.*, 2012), e impactam as propriedades mecânicas das células cutâneas devido ao estresse oxidativo (HEU *et al.*, 2012).

Quando se trata do uso de glifosato e herbicidas à base de glifosato, muitas hipóteses são levantadas, por isso são necessários estudos mais aprofundados para investigar os efeitos adversos decorrentes do seu uso. Pesquisas interdisciplinares que correlacionam níveis de exposição com as consequências para os ecossistemas terrestres e aquáticos, e com o surgimento de doenças em animais, humanos e plantas, são necessárias, assim como a revisão dos limites toleráveis para resíduos de glifosato na água, alimentos e ração animal, elucidando todos possíveis riscos para a saúde ambiental (VAN BRUGGEN *et al.*, 2018).

## **2.4 LEGISLAÇÃO**

Ao redor do mundo existem diferentes sistemas regulatórios relacionados ao uso de agrotóxicos, planejados para proteger, em graus variados, os seres humanos e o meio ambiente (DONLEY, 2019). A legislação de pesticidas na União Europeia é geralmente considerada a mais abrangente e rigorosa do mundo (KUDSK e MATHIASSEN, 2020). O limite máximo de resíduos de glifosato em água potável na União Europeia é de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (WANG, Shizong *et al.*, 2016). Nos Estados Unidos o limite é de  $700 \mu\text{g.L}^{-1}$ , conforme a determinação da Agência de Proteção Ambiental (EPA) (WANG, Shizong *et al.*, 2016). No Brasil os parâmetros de potabilidade de água têm seus limites definidos conforme a portaria de consolidação do Ministério da Saúde, n.º 05/2017, onde o valor máximo permitido é de  $500 \mu\text{g.L}^{-1}$  para glifosato e AMPA (BRASIL, 2011). Para corpos de água segundo a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/2005, em águas doces de classe I o valor máximo de glifosato é de  $65 \mu\text{g.L}^{-1}$ , e para águas doces de classe III o valor máximo de glifosato de  $280 \mu\text{g.L}^{-1}$  (BRASIL, 2005).

## 2.5 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO EM AMOSTRAS DE AMBIENTAIS

As inseguranças com a qualidade da água potável e também a contaminação de certos alimentos têm levado pesquisadores a desenvolver métodos eficientes para detectar substâncias em nível traço (STALIKAS e KONIDARI, 2001), assim como glifosato e AMPA. Alguns dos métodos analíticos para a análise de glifosato e AMPA são a cromatografia em camada fina ou Thin-Layer Chromatography (TLC), a cromatografia de interação hidrofílica ou Hydrophilic-Interaction Chromatography (HILIC), a eletroforese capilar ou Capillary Electrophoresis (CE), a cromatografia a gás ou Gas Chromatography (GC) e a cromatografia líquida ou Liquid Chromatography (LC) (GUO *et al.*, 2016). A cromatografia líquida é preposta à cromatografia gasosa quando se trata da análise de glifosato e AMPA, por conta das características apresentadas por sua molécula (DRUART *et al.*, 2011; NEDELKOSKA e LOW, 2004). Além disso, herbicidas do tipo fosfônico e aminoácido, em baixas concentrações, são mais bem detectados através da cromatografia líquida, que é vista, atualmente, como a técnica mais apropriada neste caso (OKADA *et al.*, 2019).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a mais utilizada para determinação de glifosato e AMPA (GUO *et al.*, 2016; PIRES *et al.*, 2020; QIAN *et al.*, 2009; TIAGO *et al.*, 2020; UMSZA-GUEZ *et al.*, 2019). Entre os detectores mais populares estão o detector por fluorescência (FL) e ultravioleta (UV) (DE LLASERA *et al.*, 2005; KACZYŃSKI e ŁOZOWICKA, 2015; KHROLENKO e WIECZOREK, 2005; QIAN *et al.*, 2009; WANG, Shu *et al.*, 2016). Menos popular para determinação de glifosato e AMPA, o detector de arranjo de diodos (DAD) possui um custo de instrumentação relativamente baixo se comparado ao detector de espectrometria sequencial de duplo estágio (MS/MS), e ainda assim é suficientemente seletivo e sensível para análise de agrotóxicos (ABBASPOUR *et al.*, 2019; TUZIMSKI e REJCZAK, 2016). Contudo, o detector MS/MS, é hoje em dia a técnica favorita para análise de resíduos de pesticidas polares, em razão da sua excelente sensibilidade e seletividade (HE *et al.*, 2019; MANZANO-SÁNCHEZ *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020).

A determinação de resíduos de glifosato e AMPA a nível traço é bastante complexa, já que essas substâncias possuem um baixo peso molecular, baixa

volatilidade, instabilidade térmica e alta solubilidade, causando problemas na extração, purificação e determinação do analito (KACZYŃSKI e ŁOZOWICKA, 2015). Para isso são aconselhados métodos de purificação e/ou pré-concentração, tais como a extração líquido-líquido ou Liquid-Liquid Extraction (LLE), extração em fase sólida ou Solid-Phase Extraction (SPE) e microextração em fase sólida ou Solid Phase Micro Extraction (SPME) (CHEN *et al.*, 2019; MEYER *et al.*, 2009). A extração LLE e a SPE, no que se refere às técnicas de preparação de amostras, são procedimentos bem conhecidos e amplamente aceitos para a extração de uma grande variedade de analitos em diferentes tipos de amostras (SAJID, 2018).

Além disso, a falta de grupos cromóforos e fluoróforos do glifosato e AMPA dificulta a detecção por sistemas convencionais, como UV-Visível ou FL (NEDELKOSKA e LOW, 2004), o que torna essencial a derivatização pré ou pós-coluna, do glifosato e AMPA, pois melhora sua volatilidade, possibilita a separação e retenção cromatográfica e o aumento da sensibilidade do método (GUO *et al.*, 2016).

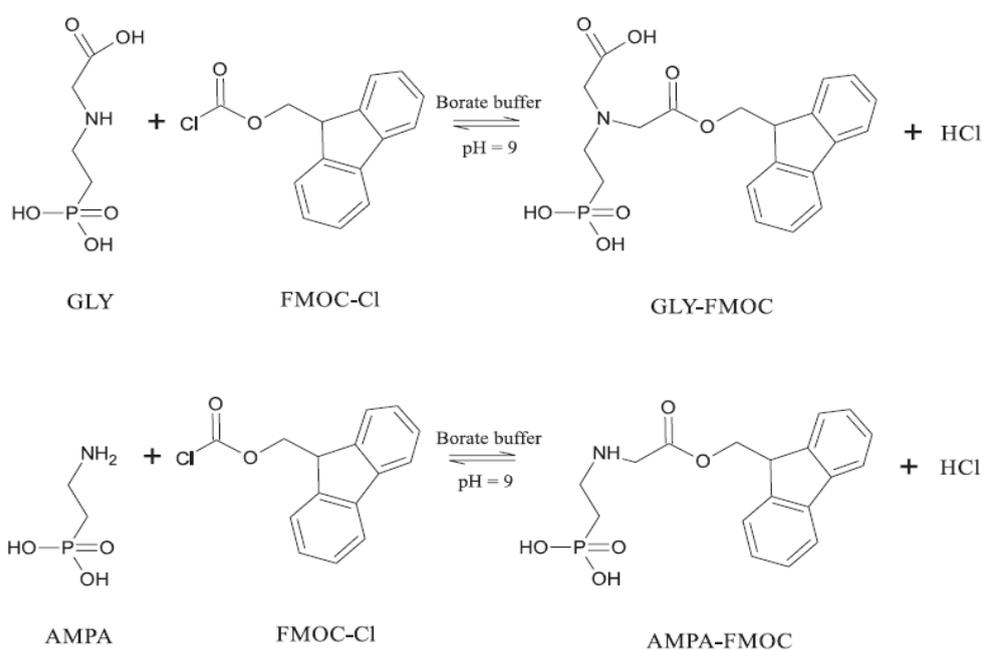
## 2.6 DERIVATIZAÇÃO

Considerado por muitos um procedimento tedioso, a derivatização pode ser demorada e geralmente demanda otimização de muitos parâmetros, como temperatura, concentração do reagente e tempo de reação (GOSCINNY *et al.*, 2012). Como já mencionado anteriormente, ao utilizar HPLC a falta de grupos cromóforos e fluoróforos, implica na derivatização dos analitos glifosato e AMPA, assim como para GC, por conta da baixa volatilidade e caráter iônico dos compostos em questão. Portanto, independente da técnica cromatográfica utilizada, em 99% das contribuições científicas representativas, foi utilizada a derivatização de ambos analitos (ARKAN e MOLNÁR-PERL, 2015).

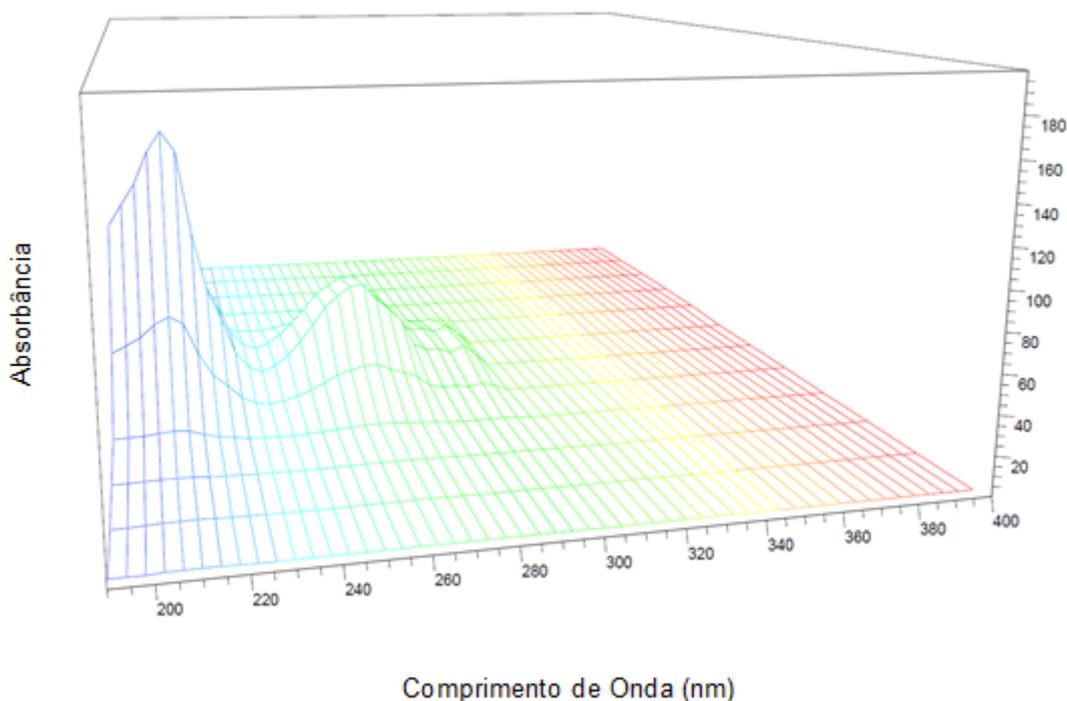
Na cromatografia líquida, a derivatização pode se dar em pré-coluna ou pós-coluna, formando derivados altamente fluorescentes. Entre os reagentes de derivatização em pré-coluna estão o 9-cloroformato de fluorenilmetil (FMOC-Cl) (HANKE; SINGER e HOLLENDER, 2008; NEDELKOSKA e LOW, 2004), o 4-cloro-3,5-dinitrobenzotri-fluoreto (CNBF) (QIAN *et al.*, 2009) e o cloreto de 4-toluenossulfonila (KAWAI; UNO e TOMITA, 1991). No procedimento de derivatização pós-coluna pode ser utilizado o orto-ftaldeído-mercaptoetanol (OPA-MERC) (MALLAT e BARCELÓ, 1998; KACZYŃSKI e ŁOZOWICKA, 2015). Os

reagentes de derivatização na cromatografia gasosa podem ser o N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamida (BSTFA) e o trimetilclorosilano (TMCS) (CATRINCK et al., 2013).

Mas assim como a técnica analítica HPLC é a mais recomendada para análise de glifosato e AMPA, o FMOC-Cl é o reagente pré-coluna mais utilizado na derivatização desses analitos (BOTERO-COY *et al.*, 2013; DRUART *et al.*, 2011). Ao utilizar o FMOC-Cl na derivatização do glifosato e AMPA, esses compostos adquirem uma configuração menos polar através da incorporação de grupos cromóforos (Figuras 5), e ao serem detectados apresentam um espectro de absorção dos comprimentos de onda na região do ultravioleta (Figura 6).



**Figura 5:** Derivatização de glifosato e AMPA com FMOC-Cl (CATRINCK *et al.*, 2014).



**Figura 6:** Espectro de absorção no UV para Fmoc-glifosato (AUTORA, 2019).

A derivatização é extremamente necessária porém extremamente complexa, pois se trata de um passo adicional no preparo de amostra que consome tempo extra e também por conta da natureza tóxica dos reagentes de derivatização comumente utilizados, e como se não bastasse, eles ainda podem incorporar contaminações na amostra (SAJID, 2018).

A contaminação da amostra se dá principalmente pela formação de subprodutos como o Fmoc-OH, que é o produto da hidrólise e descarboxilação do Fmoc-Cl, além do próprio resíduo de Fmoc-Cl que não derivatizou. Esses subprodutos podem precipitar e danificar a coluna cromatográfica, e reduzir a eficiência de ionização afetando a robustez e sensibilidade do método aplicado (HANKE; SINGER e HOLLENDER, 2008). Incluir uma etapa de *clean-up* da amostra por extração líquido-líquido ou lavagem com solvente orgânico seria uma boa estratégia, já que se trata de um procedimento que remove as interferências menos polares, tais como o excesso de Fmoc-Cl e o excesso de reagente hidrolisado (Fmoc-OH), a fim de obter uma melhor recuperação dos analitos durante a análise, através da redução das substâncias interferentes (CATRINCK *et al.*, 2014).

## 2.7 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Dados analíticos confiáveis são uma condição importante para interpretação de resultados durante a avaliação de estudos científicos e seu desenvolvimento, resultados não confiáveis podem levar a falsas interpretações e a conclusões injustificadas, que podem permanecer durante todo um estudo científico ou investigação de caso, se não forem detectados (PETERS; DRUMMER e MUSSHOFF, 2007).

Os métodos cromatográficos, por exemplo, são utilizados em análises quantitativas e qualitativas de amostras ambientais e farmacêuticas, e tem por objetivo estabelecer informações confiáveis, precisas e interpretáveis sobre a amostra que está sendo analisada (JENKE, 1996).

A validação de um método analítico consiste em avaliar sistematicamente seu desenvolvimento, adequação ou execução, através de ensaios experimentais, determinando a eficiência desse método e produzindo evidências objetivas da sua aplicabilidade (BRITO *et al.*, 2003; BRASIL, 2017). Um processo de validação eficiente é aquele em que o analista sabe qual é esse parâmetro, quando deve ser usado, como deve ser realizada a sua avaliação e quais as normas usar para preencher os requisitos dessa validação (JENKE, 1996).

De forma bem objetiva, a validação é uma forma de atestar que qualquer abordagem, estratégia, procedimento experimental, processo, equipe de laboratório, instrumentação, reagentes e condições do laboratório funcionarão de forma adequada sob um conjunto fixo de exigências para o desenvolvimento do método (PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO e CARDA-BROCH, 2015).

De acordo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA em resolução da diretoria colegiada (RDC 166/17), os parâmetros que devem ser considerados na validação de um método devem depender do tipo de ensaio a ser realizado (Tabela 2).

**Tabela 2:** Parâmetros a serem considerados na validação analítica.

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento
		Quantitativo	Ensaio de Limite	-dissolução (quantificação) -uniformidade de conteúdo -potência
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Intermediária	Não	Sim <sup>(1)</sup>	Não	Sim <sup>(1)</sup>
Seletividade <sup>(2)</sup>	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de Detecção	Não	Não <sup>(3)</sup>	Sim	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	Não <sup>(3)</sup>
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

(1) Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária; (2) Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação; (3) Pode ser necessário em alguns casos. Fonte: (BRASIL, 2017).

Conforme a RDC 166/17 os parâmetros de seletividade, linearidade, efeito da matriz, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez devem ser avaliados, conforme a necessidade de cada método a ser validado.

### 2.7.1 SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE

Em termos comuns a especificidade e seletividade são frequentemente trocados um pelo outro. De forma mais adequada, um método é classificado como "específico" quando produz resposta para apenas um único analito, à medida que um método "seletivo" produz respostas para uma série de substâncias químicas que podem ser diferenciadas uma da outra (YUWONO e INDRAYANTO, 2005). Embora o analito possa estar em meio a presença de impurezas, diluentes e componentes da matriz presentes na amostra, sua identificação deve ser inequívoca (BRASIL, 2017).

Em análises cromatográficas, para comprovar a seletividade do método, pode-se estabelecer uma comparação do resultado obtido com outras variáveis, tais como, o uso de técnicas comprobatórias para contestar os resultados da técnica pré estabelecida, e a comparação por adição de padrão analítico ou externo (BRITO *et al.*, 2003).

## **2.7.2 LINEARIDADE**

A linearidade deve ser avaliada em toda a faixa de trabalho do método analítico e pode se dar através dos resultados obtidos a partir de soluções padrão ou amostras em branco enriquecidas, esta demonstra-se preferível, pois o efeito da matriz poderia ser incorporado pela inclinação calculada e a interceptação do eixo y da curva (PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO e CARDA-BROCH, 2015). Na linearidade, a concentração do analito em uma amostra deve ser diretamente proporcional à resposta analítica (BRASIL, 2017).

Com um mínimo de cinco pontos de calibração em concentrações crescentes, igualmente espaçados, plota-se em um gráfico os valores médios da área do pico versus a quantidade de analito. Os dados obtidos são tratados por regressão linear de mínimos quadrados para calcular as constantes da curva de calibração e avaliar a qualidade da relação linear (PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO e CARDA-BROCH, 2015).

## **2.7.3 EFEITO DA MATRIZ**

Ao comparar os coeficientes angulares das curvas de calibração criadas com a substância química de referência do analito em solvente e com a amostra fortificada com a substâncias químicas de referência do analito obtém-se o efeito da matriz (BRASIL, 2017). Embora conste como parâmetro de validação, o efeito da matriz não é considerado para grande parte das validação de método, isso porque ele não influencia a reprodutibilidade ou a linearidade do ensaio (ROGATSKY e STEIN, 2005).

## **2.7.4 FAIXA DE TRABALHO**

A faixa de trabalho é o intervalo entre a quantidade mínima e a quantidade máxima do analito em amostras, em que o procedimento analítico fornece resultados quantitativos com um nível adequado de linearidade, exatidão e precisão (PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO e CARDA-BROCH, 2015).

As faixas de trabalho devem ser consideradas de 80% a 120% para se determinar o teor; de 70% a 130% para determinar a uniformidade de conteúdo; em testes de dissolução deve ser de menos de 20% da menor concentração esperada a mais de 20% da maior concentração esperada a partir do perfil de dissolução; para

determinação de impurezas deve se partir do limite de quantificação até 120% da concentração no limite da especificação de cada impureza individual ; e para determinação simultânea da proporção e impurezas pelo procedimento de normalização de área deve ser considerada a faixa de trabalho a partir do limite de quantificação até 120% da concentração esperada da substância ativa (BRASIL, 2017).

### **2.7.5 PRECISÃO**

A precisão deve considerar a proximidade entre os resultados obtidos através dos ensaios com amostras preparadas conforme descrição do método analítico a ser validado, ela pode ser expressa de três formas, a repetibilidade, a precisão intermediária ou a reprodutibilidade (BRASIL, 2017).

A repetibilidade ou precisão intra-ensaio expressa a precisão diante das mesmas condições operacionais durante um curto intervalo de tempo, a precisão intermediária expressa variações dentro dos laboratórios, como exemplo, dias diferentes, diferentes analistas, equipamentos diferentes e a reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios diferentes para o mesmo método (ICH, 1994).

### **2.7.6 EXATIDÃO**

O grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro determinam a exatidão de um método analítico (BRASIL, 2017). O material de referência certificado, é um dos materiais de controles preferidos para o estudo da exatidão, pois eles estão diretamente relacionados com padrões internacionais, no entanto seu alto custo e difícil acesso à esses produtos acabam muitas vezes inviabilizando a proposta (BRITO *et al.* , 2003).

A comparação de valores obtidos pelo método proposto com os valores obtidos para as mesmas amostras com outro método também é uma forma de estabelecer a exatidão, porém não é sempre que um método de referência está disponível o que impossibilita a utilização desse tipo de proposta (BRITO *et al.*, 2003).

### **2.7.7 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO**

O limite de detecção é definido como a menor concentração de um analito que pode ser detectado nas condições analíticas a serem utilizadas, ou seja, a presença de analitos pode ser detectada, entretanto, suas concentrações não podem ser medidas quantitativamente (YUWONO e INDRAYANTO, 2005). O limite de quantificação é a concentração mais baixa que pode ser determinada com precisão e precisão sob as condições analíticas, normalmente o limite de quantificação pode ser estimado como três vezes mais do que o limite de detecção (YUWONO e INDRAYANTO, 2005).

São utilizadas várias abordagens para determinar o limite de detecção depende se procedimento é não instrumental ou instrumental, ele pode ser calculado com base no meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado, da mesma forma poderá ser calculado o limite de quantificação (BRASIL, 2017).

### **2.7.8 ROBUSTEZ**

A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento e depende do tipo de procedimento em estudo, ela deve mostrar a confiabilidade de uma análise com respeito para deliberar variações nos parâmetros do método (ICH, 1994).

A robustez de um método é o grau de reprodutibilidade dos resultados de testes obtidos pela análise das mesmas amostras a partir da variação de condições, tais como laboratórios diferentes, analistas diferentes, instrumentos diferentes, lote diferente de reagentes, dias diferentes, entre outros (YUWONO e INDRAYANTO, 2005).

### 3. REFERÊNCIAS

ABBASPOUR, M.; FARAJZADEH, M. A.; SOROURADDIN, S. M.; MOHEBBI, A. Monitoring of nine pesticides in different cereal flour samples with high performance liquid chromatography-diode array detection. **Analytical Methods**, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c9ay00935c>>.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A.; CASTELLANO, V. J.; MARTÍNEZ, M.; MARTIN, M. T.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 190, n. 1, p. 91–95, 2009.

ARKAN T.; MOLNÁR-PERL I. The role of derivatization techniques in the analysis of glyphosate and aminomethyl-phosphonic acid by chromatography **Microchemical Journal** 121 (2015) 99–106.

BAER, K. N.; MARCEL, B. J. K.N. Glyphosate, Philip Wexler (Eds.), **Encyclopedia of Toxicology** (Third Edition), Academic Press, 2014, p.767-769.

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental science and pollution research international**, [S. l.], v. 23, n. 19, p. 18988–19001, 2016.

BALBUENA, M. S.; TISON, L.; HAHN, M-L.; GREGGERS, U.; MENZEL, R.; FARINA, W. M. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **The Journal of experimental biology**, [S. l.], v. 218, n. Pt 17, p. 2799–2805, 2015.

BECKIE, H. J.; FLOWER, K. C.; ASHWORTH, M. B. Farming without Glyphosate? **Plants**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/plants9010096>>.

BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G-E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chemical research in toxicology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 97–105, 2009.

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental sciences Europe**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 3, 2016.

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**, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ps.1512>>.

BOTERO-COY, A. M.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 1292, p. 132–141, 2013.

BRASIL. Resolução nº 357/2005, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF: Conselho Nacional Do Meio Ambiente-CONAMA. DOU nº 053, de 18 de março de 2005, páginas 58-63.

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF: Ministério da Saúde. DOU nº 239, de 14 de dezembro de 2011, Seção 1, páginas 39/46

BRASIL. Resolução (RDC) nº. 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF: Ministério da Saúde. DOU: nº 141, de 25 de julho de 2017,| Seção: 1, Página: 87.

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

CALDEIRA, T. L. Modelagem do impacto das mudanças climáticas sobre a hidrologia de sub bacias da bacia hidrográfica transfronteiriça Mirim-São Gonçalo. **Tese**. Universidade Federal de Pelotas, 2019.

CARLES, L.; GARDON, H.; JOSEPH, L.; SANCHÍS, J.; FARRÉ, M.; ARTIGAS, J. Meta-analysis of glyphosate contamination in surface waters and dissipation by biofilms. **Environment International**, [S. l.], v. 124, p. 284–293, 2019

CARRETTA, L.; CARDINALI, A.; MAROTTA, E.r; ZANIN, G.; MASIN, R.. A new rapid procedure for simultaneous determination of glyphosate and AMPA in water at sub µg/L level. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 1600, p. 65–72, 2019.

CATRINCK, T. C. P. G.; AGUIAR, M. C. S.; DIAS, A.; SILVÉRIO, F. O.; FIDÊNCIO, P. H.; PINHO, G. P.. Study of the Reaction Derivatization Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) with N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. **American Journal of Analytical Chemistry**, 2013, 4, 647-652

CATRINCK, T. C. P. G.; TEREZA C. P.; 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**, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140096>>.

CATTELAN, A.J.; DALL'AGNOL, A. The rapid soybean growth in Brazil **OCL** 2018, 25(1), D102. <<https://doi.org/10.1051/ocl/2017058>>

CHANG, S. Y.; LIAO, C-H. Analysis of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with indirect fluorescence detection. **Journal of Chromatography. A**, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)00453-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(02)00453-3)>.

CHEN, D.; MIAO, H.; ZHAO, Y.; WU, Y. A simple liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in human urine using cold-induced phase separation and hydrophilic pipette tip solid-phase extraction. **Journal of Chromatography. A**, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.030>>.

CHEN, M-X.; CAO, Z-Y.; JIANG, Y.; ZHU, Z-W. Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 1272, p. 90–99, 2013.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acomp. safra bras. grãos**, v. 7 - Safra 2019/20 - Sétimo levantamento, Brasília, p. 1-25 abril 2020. ISSN 2318-6852.

CORAZZA, G.; MERIB, J.; DO CARMO, S.; MENDES, L.; CARASEK, E. Assessment of a Fully Optimized DPX-Based Procedure for the Multiclass Determination of Pesticides in Drinking Water Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190016>>.

DE LLASERA, M. P. G.; GÓMEZ-ALMARAZ, L.; VERA-AVILA, L. E.; PEÑA-ALVAREZ, A. Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 1093, n. 1-2, p. 139–146, 2005.

DILL, G. M. et al. **Glyphosate: Discovery, Development, Applications, and Properties****Glyphosate Resistance in Crops and Weeds**, 2010. Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management, chapter 1. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/9780470634394.ch1>>.

DONLEY, N. The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. **Environmental health: a global access science source**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 44, 2019.

DRUART, C.; DELHOMME, O.; DE VAUFLEURY, A.; NTCHO, E.; MILLET, M. Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. **Analytical and bioanalytical chemistry**, [S. l.], v. 399, n. 4, p. 1725–1732, 2011.

DUKE, S. O. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, [S. l.], v. 59, n. 11, p. 5835–5841, 2011.

DUKE, S. O. The history and current status of glyphosate. **Pest management science**, [S. l.], v. 74, n. 5, p. 1027–1034, 2018.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, 2008. DOI: 10.1002/ps.1518. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ps.1518>>.

EHLING, S.; REDDY, T. M. Analysis of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Nutritional Ingredients and Milk by Derivatization with Fluorenylmethyloxycarbonyl Chloride and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 48, p. 10562–10568, 2015.

FOLMAR, L. C.; SANDERS, H. O.; JULIN, A. M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 1979. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/bf01056243>>.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. **Glyphosate: A Unique Global Herbicide**. [s.l.] : Amer Chemical Society, 1997.

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

GHANEM, A.; BADOS, P.; KERHOAS, L.; DUBROCA, J.; EINHORN, J. Glyphosate and AMPA analysis in sewage sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOC derivatization on strong anion-exchange resin as solid support. **Analytical chemistry**, [S. l.], v. 79, n. 10, p. 3794–3801, 2007.

GIANNINI, F. Fish Toxicity of Commercial Herbicides Formulated With Glyphosate. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.1000199>>.

GILL, J. P. K.; SETHI, N.; MOHAN, A.; DATTA, S.; GIRDHAR, M.. Glyphosate toxicity for animals. **Environmental Chemistry Letters**, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>>.

GOSCINNY, S.; UNTERLUGGAUER, H.; ALDRIAN, J.; HANOT, V.; MASSELER, S.. Determination of Glyphosate and Its Metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in Cereals After Derivatization by Isotope Dilution and UPLC-MS/MS". **Food Analytical Methods**, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12161-011-9361-7>>.

GUI, Y-X.; FAN, X-N.; WANG, H-M.; WANG, G.; CHEN, S-D. Glyphosate induced cell death through apoptotic and autophagic mechanisms. **Neurotoxicology and teratology**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 344–349, 2012.

GUO, H.; RITER, L. S.; WUJCIK, C. E.; ARMSTRONG, D. W. Direct and sensitive determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples by high performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 1443, p. 93–100, 2016.

GUYTON, K. Z.; LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; EL GHISSASSI, F.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; SCOCCIANI, C.; MATTOCK, H.; STRAIF, K. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet Oncology**, 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(15\)70134-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(15)70134-8)>.

HAGNER, M.; MIKOLA, J.; SALONIEMI, I.; SAIKKONEN, K.; HELANDER, M. Effects of a glyphosate-based herbicide on soil animal trophic groups and associated ecosystem functioning in a northern agricultural field. **Scientific Reports**, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-44988-5>>.

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**, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-2134-5>>.

HE, S.; CAO, X.; WU, H.; LI, T.; ZHANG, M.; LIANG, Y.; CHEN, B. [Rapid determination of glyphosate, aminomethyl phosphonic acid, glufosinate, and ethephon residues in environmental water by direct injection-ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry]. **Se pu** = Chinese journal of chromatography / Zhongguo hua xue hui, [S. l.], v. 37, n. 11, p. 1179–1184, 2019.

HEU, C.; BERQUAND, A.; ELIE-CAILLE, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a Peak Force Tapping study on living cells. **Journal of structural biology**, [S. l.], v. 178, n. 1, p. 1–7, 2012.

IARC. **Some Organophosphate Insecticides and Herbicides**. [s.l.] : IARC Monographs on the Evaluation, 2017.

ICH. Validation of analytical methods: definitions and terminology. **International Conference on Harmonization**, ICH Q2 A, 1994.

IRGA. Instituto Rio Grandense do Arroz. **Produtividade desta safra será recorde**. Publicado em: 15/05/2020. Disponível em: <<https://irga.rs.gov.br/produtividade-desta-safra-sera-recorde>> Acesso em: 24/07/2020.

JENKE, D. R.. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. II. Guidelines for Primary Validation Parameters. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 1996. 19(5), 737–757. <doi:10.1080/10826079608005534>

JÖNSSON, J.; CAMM, R.; HALL, T. Removal and degradation of glyphosate in water treatment: a review. **Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2166/aqua.2013.080>>.

KACZYŃSKI, P.; ŁOZOWICKA, B. Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection. **Open Chemistry**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 932, 2015.

KANISSERY, R.; GAIRHE, B.; KADYAMPAKANI, D.; BATUMAN, O.; ALFEREZ, F. Glyphosate: Its Environmental Persistence and Impact on Crop Health and Nutrition. **Plants**, [S. l.], v. 8, n. 11, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/plants8110499>>.

KAWAI S.; UNO B.; TOMITA M.. Determination of glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid by high-performance liquid chromatography after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. **Journal of Chromatography**, 540 (1991) 411-415

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 of chromatography. A**, [S. l.], v. 1093, n. 1-2, p. 111–117, 2005.

- KOSKINEN, W. C.; MAREK, Leetta J.; HALL, Kathleen E. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, plant materials and soil. **Pest management science**, [S. l.], v. 72, n. 3, p. 423–432, 2016.
- KUDSK, P.; MATHIASSEN, S. K. Pesticide regulation in the European Union and the glyphosate controversy. **Weed Science**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 214–222, 2020.
- LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comparative biochemistry and physiology. **Toxicology & pharmacology: CBP**, [S. l.], v. 147, n. 2, p. 222–231, 2008.
- 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 of Chromatography. A**, v. 823, n. 1-2, p. 129–136, 1998.
- MANZANO-SÁNCHEZ, L.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, J. A.; DOMÍNGUEZ, I.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L.; FRENICH, A. G.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.. Development and Application of a Novel Pluri-Residue Method to Determine Polar Pesticides in Fruits and Vegetables through Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry. **Foods (Basel, Switzerland)**, [S. l.], v. 9, n. 5, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/foods9050553>>.
- MEYER, M. T.; LOFTIN, K. A.; LEE, E. A.; HINSHAW, G. H.; DIETZE, J. E.; SCRIBNER, E. A. Determination of glyphosate, its degradation product aminomethylphosphonic acid, and glufosinate, in water by isotope dilution and online solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Techniques and Methods**, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3133/tm5a10>>.
- MORAES, J. S.; DA SILVA NORBERG, B. F.; CASTRO, M.R.; VAZ, B. S.; MIZUSCHIMA, C. W.; MARINS, L. F. F.; MARTINS, C. M. G. Zebrafish (*Danio rerio*) ability to activate ABC transporters after exposure to glyphosate and its formulation Roundup Transorb®. **Chemosphere**, [S. l.], v. 248, p. 125959, 2020.
- MOTTA, E. V. S.; RAYMANN, K.; MORAN, N. A. **Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [S. l.], v. 115, n. 41, p. 10305–10310, 2018.
- 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**, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.027>
- OKADA, E.; COGGAN, T.; ANUMOL, T.; CLARKE, B.; ALLINSON, G. A simple and rapid direct injection method for the determination of glyphosate and AMPA in environmental water samples. **Analytical and bioanalytical chemistry**, [S. l.], v. 411, n. 3, p. 715–724, 2019.

PERIS-VICENTE, J.; ESTEVE-ROMERO, J; CARDA-BROCH, S. Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview. **Analytical Separation Science**, 2015.1757–1808.  
<doi:10.1002/9783527678129.assep064>

PETERS, F. T., DRUMMER, O. H., & MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, 2007.165(2-3), 216–224.  
<doi:10.1016/j.forsciint.2006.05.021>.

PIRES, N. L.; PASSOS, C. J. S.; MORGADO, M. G. A.; MELLO, D. C.; INFANTE, C. M. C.; CALDAS, E. D. Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate by high performance liquid chromatography with fluorescence detection in waters of the Santarém Plateau, Brazilian Amazon. **Journal of environmental science and health**. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes, [S. l.], v. 55, n. 9, p. 794–802, 2020.

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**, [S. l.], v. 635, n. 2, p. 222–226, 2009.

ROGATSKY, E.; STEIN, D. Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 2005. 16(11), 1757–1759.  
doi:10.1016/j.jasms.2005.07.012

SAJID, M. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with derivatization: A review of different modes, applications, and green aspects. **TrAC**, Trends in Analytical Chemistry,(2018). 106, 169–182. Disponível em:  
<doi:10.1016/j.trac.2018.07.009>.

SINGH S.; KUMAR, V.; DATTA, S.; WANI, A. B.; DHANJAL, D. S.; ROMERO, R.; SINGH, J.. Glyphosate uptake, translocation, resistance emergence in crops, analytical monitoring, toxicity and degradation: a review. **Environmental Chemistry Letters**, © Springer Nature Switzerland AG 2020.

SHILO, T.; ZYGIER, L.; RUBIN, B.; WOLF, S.; EIZENBERG, H. Mechanism of glyphosate control of *Phelipanche aegyptiaca*. **Planta**, [S. l.], v. 244, n. 5, p. 1095–1107, 2016.

STALIKAS, C. D.; KONIDARI, C. N. Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 907, n. 1-2, p. 1–19, 2001.

SZÉKÁCS, A.; DARVAS, B. Forty Years with Glyphosate, Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds, Mohammed Naguib Abd El-Ghany Hasaneen, **IntechOpen**, 2012.<DOI: 10.5772/32491>.

TARAZONA, J. V.; COURT-MARQUES, D.; TIRAMANI, M.; REICH, H.; PFEIL, R.; ISTACE, F.; CRIVELLENTI, F. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. **Archives of toxicology**, [S. l.], v. 91, n. 8, p. 2723–2743, 2017.

THONGPRAKASANG, S.; THIANTANAWAT, A.; RANGKADILOK, N.; SURIYO, T.; SATAYAVIVAD, J. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, [S. l.], v. 59, p. 129–136, 2013.

TIAGO, J. P. F.; SICUPIRA, L. C.; BARROS, R. E.; DE PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O. Simultaneous and direct determination of glyphosate and AMPA in water samples from the hydroponic cultivation of eucalyptus seedlings using HPLC-ICP-MS/MS. **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, [S. l.], v. 55, n. 6, p. 558–565, 2020.

TRAVLOS, I.; CHEIMONA, N.; BILALIS, D. Glyphosate Efficacy of Different Salt Formulations and Adjuvant Additives on Various Weeds. **Agronomy**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/agronomy7030060>>.

TUZIMSKI, T. Application of SPE-HPLC-DAD and SPE-HPTLC-DAD to the analysis of pesticides in lake water. **Journal of Planar Chromatography – Modern TLC**, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1556/jpc.22.2009.4.1>>.

TUZIMSKI, T.; REJCZAK, T.. Application of HPLC-DAD after SPE/QuEChERS with ZrO<sub>2</sub>-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. **Food chemistry**, [S. l.], v. 190, p. 71–79, 2016.

UMSZA-GUEZ, M. A.; SILVA-BELTRÁN, N. P.; MACHADO, B. A. S.; BALDERRAMA-CARMONA, A. P. Herbicide determination in Brazilian propolis using high pressure liquid chromatography. **International journal of environmental health research**, [S. l.], p. 1–11, 2019.

VAN BRUGGEN, A. H. C.; HE, M. M.; SHIN, K.; MAI, V.; JEONG, K. C.; FINCKH, M. R.; MORRIS, J. G., Jr. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **The Science of the total environment**, [S. l.], v. 616-617, p. 255–268, 2018.

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

WANG, S.; SEIWERT, B.; KASTNER, M.; MILTNER, A.; SCHAFFER, A.; REEMTSMA, T.; YANG, Q.; NOWAK, K. M. (Bio)degradation of glyphosate in water-sediment microcosms – A stable isotope co-labeling approach. **Water research**, [S. l.], v. 99, p. 91–100, 2016.

WANG, S.; LIU, B.; YUAN, D.; MA, J. A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Talanta**, [S. l.], v. 161, p. 700–706, 2016.

WANG, X.; MENG, X.; WU, Q.; WANG, C.; WANG, Z. Solid phase extraction of carbamate pesticides with porous organic polymer as adsorbent followed by high performance liquid chromatography-diode array detection. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 1600, p. 9–16, 2019.

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: RTP**, [S. l.], v. 31, n. 2 Pt 1, p. 117–165, 2000.

XI, X.; YANG, M.; SHEN, G.; WU, X.; LU, R.; ZHOU, W.; YUWONO, M.; INDRAYANTO, G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, 2005. Volume 32, 243–259. <doi:10.1016/s0099-5428(05)32009-0>.

ZHANG, S.; GAO, H. Pipette vial dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of benzoylurea insecticide in fruit juice. **Journal of separation science**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 391–398, 2016.

ZHAN, H.; FENG, Y.; FAN, X.; CHEN, S. Recent advances in glyphosate biodegradation. **Applied microbiology and biotechnology**, [S. l.], v. 102, n. 12, p. 5033–5043, 2018.

ZHANG, Y.; DANG, Y.; LIN, X.; AN, K.; LI, J.; ZHANG, M. Determination of glyphosate and glufosinate in corn using multi-walled carbon nanotubes followed by ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 1619, p. 460939, 2020.

## 4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E/OU TECNOLÓGICA

### 4.1 ARTIGO Nº 1

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125959>

Chemosphere 248 (2020) 125959



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)



## Zebrafish (*Danio rerio*) ability to activate ABCC transporters after exposure to glyphosate and its formulation Roundup Transorb®



Jenifer Silveira Moraes<sup>a</sup>, Bruna Félix da Silva Nornberg<sup>b</sup>, Micheli Rosa de Castro<sup>a</sup>, Bernardo dos Santos Vaz<sup>c</sup>, Catiúscia Weinert Mizuschima<sup>c</sup>, Luis Fernando Fernandes Marins<sup>a,b</sup>, Camila de Martinez Gaspar Martins<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

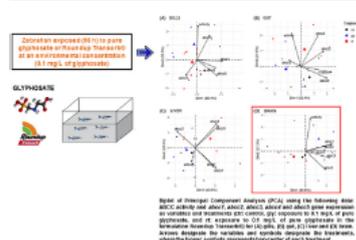
<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biologia Molecular, Av. Itália km 8, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

<sup>c</sup> Instituto Federal Sul – Rio – Grandense, Campus Pelotas, Praça Vinte de Setembro, Centro, 96015-360, Pelotas, RS, Brazil

### HIGHLIGHTS

- Effects of glyphosate and Roundup on ABCC transporters from tissues of *Danio rerio*.
- Gills are the first organs to respond to the herbicides exposure.
- Glyphosate increased ABCC activity in gills, liver, gut and brain.
- Roundup increased ABCC activity and gene expression in gills, liver and gut.
- Roundup did not activate ABCC activity or gene expression in the brain.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 4 November 2019  
Received in revised form 17 January 2020  
Accepted 17 January 2020  
Available online 22 January 2020

Handling Editor: David Volz

**Keywords:**  
Herbicides  
ABC proteins  
Gene expression  
ABCC activity  
Detoxification

### ABSTRACT

The emergent demand for food production has increased the widespread use of pesticides, especially glyphosate-based herbicides as they can protect different types of crops, especially transgenic ones. Molecules of glyphosate have been found in water bodies around the world, and its presence can cause negative effects on non-target organisms, such as fish. Glyphosate toxicity appears to be systemic in fish but does not affect their organs equally. Also, its formulations can be more toxic than pure glyphosate. In this sense, we investigated if these variations in toxicity could be related to ATP binding cassette subfamily C (ABCC) transporters and the cellular detoxification capacity, following exposure to herbicides. Thus, adults of *Danio rerio* were exposed (24 and 96 h) to glyphosate and Roundup Transorb® (RT) at an environmental concentration of 0.1 mg/L, and the activity of ABCC proteins and gene expression of five isoforms of ABCC were analyzed. Glyphosate and RT exposure increased ABCC protein activity and gene expression up to 3-fold when compared to controls, indicating the activation of detoxification mechanisms. Only in the brain of *D. rerio*, the exposure to RT did not stimulate the activity of ABCC proteins, neither the expression of genes *abcc1* and *abcc4* that responded to the exposure to pure glyphosate.

## 4.2 ARTIGO Nº 2

Engenharia Sanitária e Ambiental

**engenharia sanitária e ambiental**

### **Desafios metodológicos na análise de Glifosato e AMPA em amostras ambientais.**

Journal:	<i>Engenharia Sanitária e Ambiental</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Literature Review
Keyword:	pesticidas, metodologia analítica, qualidade de água

SCHOLARONE™  
Manuscripts



[Home](#)

[Author](#)

# Submission Confirmation

---

Print

Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Engenharia Sanitária e Ambiental

**Manuscript ID**

ESA-2021-0055

**Title**

Desafios metodológicos na análise de Glifosato e AMPA em amostras ambientais.

**Authors**

Weinert Mizuschima, Catiúscia

Vaz, Bernardo

**Date Submitted**

26-Feb-2021

---

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1                   **Desafios metodológicos na análise de Glifosato e AMPA em**  
2                   **amostras ambientais.**

3                   **Methodological challenges in Glyphosate and AMPA analysis for environmental**  
4                   **samples.**

5                   **RESUMO**

6                   O herbicida glifosato é um dos mais utilizados ao redor do mundo. As áreas agrícolas têm  
7                   sido a principal via de obtenção de dados de monitoramento e vigilância relacionados à  
8                   ocorrência de glifosato e seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) em águas  
9                   superficiais e subterrâneas. Recentemente esses compostos foram declarados como  
10                  "preocupantemente tóxicos" devido a sua capacidade de persistência e acumulação na cadeia  
11                  alimentar. Diante desse fato, o monitoramento desses compostos se torna essencial para  
12                  garantir a saúde humana e ambiental. A determinação de glifosato pode ser um tanto  
13                  complexa, devido à sua característica iônica e de baixa volatilidade, além de não possuir  
14                  grupos cromóforos e fluoróforos. Apesar disso, diversos métodos analíticos vêm sendo  
15                  desenvolvidos ao longo dos anos. Entre eles o mais utilizado é a determinação de glifosato e  
16                  AMPA por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detectores de fluorescência  
17                  (FL) e ultravioleta (UV) e derivatização da amostra com 9-cloroformato de fluorenilmetil  
18                  (FMOC-Cl). Ao desenvolver uma metodologia analítica é necessário que conheçamos o  
19                  analito em questão, suas particularidades e comportamento ambiental, buscando traçar  
20                  estratégias para tornar a esse método mais rápido, no que diz respeito ao preparo de amostras  
21                  e mais econômicos, quanto à quantidade de insumos (como solventes e reagentes) e  
22                  instrumentos utilizados, buscando, manter ou inovar a seletividade e sensibilidade analítica.

23                  **PALAVRAS-CHAVE:** Pesticidas, qualidade da água, metodologia analítica.

24                  **ABSTRACT**

25                  The glyphosate herbicide is widely used worldwide. Agricultural areas have been the main  
26                  route of monitoring and surveillance related to the occurrence of glyphosate and its metabolite  
27                  aminomethylphosphonic acid (AMPA) in surface waters and groundwater. These compounds  
28                  have recently been declared "worryingly toxic" due to its ability to persist and accumulate in  
29                  food chain. Thus, the monitoring of these compounds is essential to ensure human and  
30                  environmental health. The determination of glyphosate can be somewhat complex, due to its  
31                  ionic characteristics and low volatility, in addition to the absence of chromophores and

1

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

32 fluorophores. Despite this, several analytical methods have been developed over the years.  
33 The most used is the determination of glyphosate and AMPA by high performance liquid  
34 chromatography (HPLC) with fluorescence (FL) and ultraviolet (UV) detectors and sample  
35 derivatization with fluorenylmethyl 9-chloroformate (FMOC-Cl). When developing an  
36 analytical methodology, it is necessary knowledge about the analyte, its particularities and  
37 environmental behavior, seeking to outline strategies to make this method faster, in terms of  
38 sample preparation and more economical, in terms of the amount of inputs (such as solvents  
39 and reagents) and instruments used, seeking, maintaining or innovating selectivity and  
40 analytical sensitivity.

41 **KEY WORDS:** Pesticides, water quality, analytical methodology.

## 42 INTRODUÇÃO

43 Os ecossistemas terrestres têm sofrido alterações constantes e muitas delas provocam  
44 degradação significativa da qualidade do solo e da água. A agricultura intensiva como, por  
45 exemplo, as monoculturas e o plantio direto, associadas ao uso extensivo de agrotóxicos com  
46 intuito de aumentar a produção de alimentos, são responsáveis por grande parte dessa  
47 degradação ambiental em todo o mundo (HÉBERT, FUGÈRE e GONZALEZ, 2019). O uso  
48 de agrotóxicos é uma prática agrícola amplamente adotada e é conhecida por causar impactos  
49 prejudiciais aos seres humanos e ao meio ambiente (DONLEY, 2019).

50 Um desses agrotóxicos é o herbicida glifosato, um dos mais utilizados ao redor do  
51 mundo (VAN STEMPVOORT *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016). Desde 1974, cerca de 8,6  
52 bilhões de kg vêm sendo aplicados globalmente (BENBROOK, 2016). Estados Unidos, União  
53 Européia, China e Brasil, os quatro maiores produtores agrícolas do mundo, responsáveis por  
54 pelo menos mais da metade de toda a produção agrícola global, também são considerados  
55 alguns dos maiores consumidores de agrotóxicos (DONLEY, 2019).

56 Embora a aplicação deste herbicida se dê essencialmente sobre as plantas, parte dele  
57 acaba no solo onde é fortemente adsorvido e pode lixiviar até o lençol freático ou alcançar  
58 cursos de água através do escoamento superficial (LUPI *et al.*, 2019). Por este motivo, as  
59 áreas agrícolas têm sido a principal via de obtenção de dados de monitoramento e vigilância  
60 relacionados à ocorrência de glifosato e seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA)  
61 em águas superficiais e subterrâneas (VAN STEMPVOORT *et al.*, 2014).

62 Inicialmente classificados como "não tóxicos e não irritantes", de acordo com  
63 protocolos de toxicidade aguda, o glifosato e o AMPA foram, a partir de 2005, declarados

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

64 pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) como  
65 "preocupantemente tóxicos" devido a capacidade de persistência e acumulação na cadeia  
66 alimentar (OKADA *et al.*, 2019). Estas características sugerem que a ação dessas substâncias  
67 sobre a fisiologia humana em situações crônicas é mais complexa do que em situações agudas  
68 (BENACHOUR e SÉRALINI, 2009).

69 Diante do fato, de que o glifosato seja tão amplamente utilizado atualmente, o  
70 monitoramento desse agrotóxico se torna essencial para garantir a saúde humana e ambiental.  
71 Nesse contexto, esta breve revisão tem por objetivo apresentar as principais características e  
72 propriedades do herbicida glifosato, bem como, tendências acerca do seu uso, e uma pequena  
73 amostra das principais técnicas utilizadas para o desenvolvimento de métodos analíticos  
74 capazes de determinar tanto o glifosato como seu principal metabólito o AMPA.

## 75 O HERBICIDA GLIFOSATO

76 O glifosato é um herbicida organofosforado de amplo espectro, não seletivo, de pós-  
77 emergência. Sua molécula [N- (fosfonometil) glicina], mais tarde denominada glifosato, foi  
78 sintetizada pela primeira vez em 1950 por Henri Martin, um pesquisador da pequena empresa  
79 farmacêutica suíça, Cilag (FRANZ, MAO e SIKORSKI, 1997). No entanto, neste período,  
80 não foram encontradas aplicações farmacêuticas, e a molécula passou a ser vendida para uma  
81 série de outras empresas, e amostras foram testadas para diversos tipos de usos possíveis  
82 (BENBROOK, 2016).

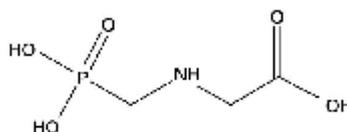
83 Foi então que, em 1970 a molécula foi re-sintetizada e testada pela Monsanto, e seu  
84 efeito herbicida foi descrito por Baird e colaboradores em 1971, seguido por vários outros, e  
85 sua patente foi reivindicada e obtida pela Companhia Monsanto em 1974, como invenção de  
86 John E. Franz e, a partir daí, foi introduzida como produto herbicida Roundup® (formulação  
87 do sal de isopropilamina de glifosato com um surfactante) (SZEKACS e DARVAS, 2012).

88 A comercialização do Roundup® começou em 1974 e em 2000, ao expirar sua  
89 patente, o uso do ingrediente ativo do herbicida (glifosato) passou a ser ainda maior, com  
90 produtos genéricos de diferentes formulações, agora fabricados por diversas empresas  
91 (BECKIE, FLOWER e ASHWORTH, 2020). A partir daí, as diversas formulações comerciais  
92 disponíveis de glifosato, passaram a apresentar-se também nas formas de sais de diamônio,  
93 monoamônio, potássio, trimetil sulfônio e sesquisódio, além da já conhecida apresentação  
94 em sal de isopropilamina (TRAVLOS, CHEIMONA e BILALIS, 2017).

1  
2  
3  
4  
5 95 Atualmente o glifosato é um dos herbicidas mais utilizados em sistemas de cultivo  
6 96 agrícolas e não agrícolas em países desenvolvidos (HAGNER *et al.*, 2019), se não o mais  
7  
8 97 utilizado no mundo (BECKIE, FLOWER e ASHWORTH, 2020; DUKE e POWLES, 2008;  
9  
10 98 ZHAN *et al.*, 2018). Esse composto é frequentemente utilizado para controlar o crescimento  
11  
12 99 de ervas daninhas na agricultura e costuma ser muito utilizado em culturas geneticamente  
13  
14 100 modificadas (transgênicas), além da silvicultura, rodovias, ferrovias e áreas urbanas  
15  
16 101 (TRAVLOS, CHEIMONA e BILALIS, 2017; VAN STEMPVOORT *et al.*, 2014).

## 102 PROPRIEDADES E MODO DE AÇÃO

103 O glifosato [N - (fosfonometil) glicina],  $C_3H_8NO_5P$ , é um derivado de fosfonometil do  
104 aminoácido glicina, é um sólido cristalino branco e inodoro, composto por uma função amino  
105 básica e três locais ácidos ionizáveis (Figura 1) (DILL *et al.*, 2010).



106

107 **Figura 1:** Estrutura química do glifosato (BORGGAARD e GIMSING, 2008).

108 É uma substância química anfotérica que contém a função amino secundária básica no  
109 meio da molécula e sítios ácidos monobásicos (carboxílico) e dibásico (fosfônico) em ambas  
110 as extremidades (SZEKACS e DARVAS, 2012). O glifosato é altamente polar, não volátil e  
111 não possui grupos cromóforos ou fluoróforos (CHEN *et al.*, 2013). Algumas das propriedades  
112 físico-químicas relevantes do glifosato constam a seguir na Tabela 1.

113 **Tabela 1:** Propriedades físico-químicas do glifosato.

114 <b>Densidade</b>	1,705 g.mL <sup>-1</sup> a 20 °C
115 <b>Solubilidade em Água</b>	10,5 g.L <sup>-1</sup> a 20 °C e pH 1,9, 12 g.L <sup>-1</sup> a 25 °C
116 <b>Constante de Dissociação</b>	pKa <sub>1</sub> = 2,3 (20 °C – ácido fosfônico), pKa <sub>2</sub> = 5,7 (20 °C – amina secundária), e pKa <sub>3</sub> = 10,2 (25 °C – ácido carboxílico)
117 <b>Ponto de fusão</b>	184,5 °C
118 <b>Ponto de Ebulição</b>	~ 100 °C
119 <b>Ponto de Decomposição</b>	187 °C
120 <b>Insolúvel em</b>	acetona, etanol e xileno
121 <b>Constante da Lei de Henry</b>	2,1 x 10 <sup>-12</sup> atm·m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> a 25 °C

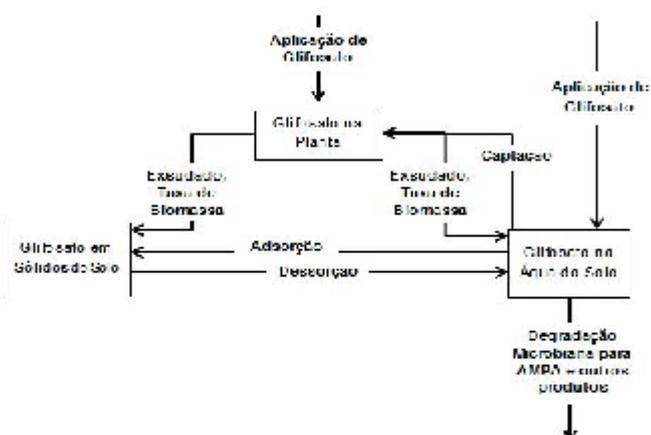
114

Fonte: (BAER e MARCEL, 2014).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

115 Fisiologicamente ele atua inibindo a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase  
116 (EPSPS), uma enzima chave na biossíntese de aminoácidos aromáticos, hormônios e outros  
117 metabólitos essenciais das plantas (DILL *et al.*, 2010; SHILO *et al.*, 2016). A fotossíntese e a  
118 respiração também são afetadas neste processo, e as plantas morrerão entre uma e três  
119 semanas (CHANG e LIAO, 2002). A eficácia do glifosato como fitotoxina se deve, em parte,  
120 ao seu baixo peso molecular e alta solubilidade em água, que ajuda sua rápida absorção e  
121 translocação pelos tecidos vegetais (ANADÓN *et al.*, 2009).

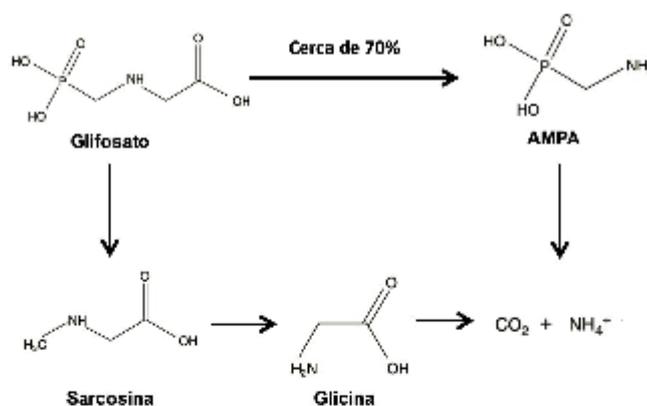
122 Porém, após ser aplicado como spray foliar para controlar ervas daninhas, o glifosato  
123 pode acabar em diferentes partes do solo, em locais que não são seu alvo principal (Figura 2).



124  
125

Figura 2: Possíveis vias do glifosato após aplicação (KANISSERY *et al.*, 2019).

126 A metabolização do glifosato se dá a partir da ação de microorganismos do solo  
127 (DUKE, 2011), da qual resulta o AMPA (Figura 3), considerado o único metabólito  
128 significativo do glifosato (JÖNSSON, CAMM e HALL, 2013).



129

130 **Figura 3:** Via de metabolização do glifosato, adaptado de (BAI e OGBOURNE, 2016; BORGGAARD e  
 131 GIMSING, 2008).

132 O AMPA é fortemente adsorvido aos sólidos do solo (HAGNER *et al.*, 2019), é  
 133 quimicamente semelhante ao glifosato e também mostra propriedades semelhantes em termos  
 134 de comportamento e toxicidade (JÖNSSON, CAMM e HALL, 2013). O tempo de meia-vida  
 135 do glifosato e seu principal metabólito AMPA pode variar entre 0,8-151 e 10-98 dias  
 136 respectivamente, essa variação se dá principalmente pelas propriedades bioquímicas do  
 137 ambiente onde se encontram, solo, água, por exemplo (BAI e OGBOURNE, 2016).

### 138 TOXICIDADE

139 Ao se avaliar o risco de um agrotóxico para a saúde humana é necessário definir uma  
 140 classificação de perigo e valores toxicológicos de referência, e mesmo que exista um  
 141 potencial perigoso relacionado a determinada substância, o que levaria a crer que todas as  
 142 avaliações seriam equivalentes, o risco também deve considerar o uso dessa substância, ou  
 143 seja, a probabilidade e a proporção dos eventos e efeitos adversos provocados pelos padrões e  
 144 condições desse uso (TARAZONA *et al.*, 2017).

145 Formulações à base de glifosato são consideradas em alguns estudos como um produto  
 146 não tóxico ou de baixa toxicidade para seres vivos (DUKE e POWLES, 2008; WILLIAMS,  
 147 KROES e MUNRO, 2000). Estas considerações justificam-se pelo fato de que a via de  
 148 biossíntese de aminoácidos aromáticos, a qual é afetada pelo glifosato, não é compartilhada  
 149 por membros do reino animal, o que tornaria o glifosato um inibidor eficiente somente em  
 150 plantas (WILLIAMS, KROES e MUNRO, 2000).

6

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

151 Apesar disso, outros estudos demonstram que a toxicidade do glifosato é observada  
152 tanto em organismos unicelulares, quanto em muitos organismos multicelulares encontrados  
153 no solo e na água (GILL *et al.*, 2017). Por conta do uso indiscriminado de glifosato, o cultivo  
154 não alvo é afetado negativamente, e ocorre do mesmo modo com as espécies não alvo de  
155 animais de ecossistemas aquáticos e terrestres (SINGH *et al.*, 2020).

156 O efeito tóxico em peixes pode produzir alterações de expressão gênica, alterações  
157 fisiológicas, neurológicas, reprodutivas, bioquímicas e histológicas (FOLMAR, SANDERS e  
158 JULIN, 1979; GIANNINI, 2013; LANGIANO e MARTINEZ, 2008; MORAES *et al.*, 2020).

159 Abelhas expostas a níveis de glifosato comumente encontrados em ambientes  
160 agrícolas tem sua capacidade cognitiva prejudicada, a qual é responsável por recuperar e  
161 integrar informações espaciais, impedindo assim, sua volta bem sucedida à colmeia  
162 (BALBUENA *et al.*, 2015). Além disso, essa exposição pode perturbar também sua  
163 microbiota intestinal benéfica, o que prejudica sua saúde e sua capacidade polinizadora  
164 (MOTTA, RAYMANN e MORAN, 2018).

165 Para humanos o glifosato representa um provável risco cancerígeno (IARC, 2017).  
166 Existe uma relação entre a exposição de produtos à base de glifosato e o aumento do risco de  
167 linfoma não-Hodgkin, essa evidência tem por base uma meta-análise de estudos  
168 epidemiológicos humanos e estudos experimentais com animais, além de estudos  
169 mecanísticos (ZHANG *et al.*, 2019). Existem ainda os riscos associados à herbicidas à base de  
170 glifosato, os quais provocam danos ao DNA e efeitos carcinogênicos, mutagênicos e  
171 reprotóxicos em células humanas e *in vivo* (GASNIER *et al.* 2009). A título de exemplo,  
172 enquanto o glifosato provoca apoptose celular sem danos às membranas, o Roundup®  
173 (formulação à base de glifosato) é o que mais induz a morte celular, mais do que glifosato e  
174 seu metabólito AMPA, ele perturba as membranas celulares e mitocondriais, levando à  
175 necrose, o que confirma que os adjuvantes utilizados nas formulações do Roundup® não são  
176 inertes (BENACHOUR e SÉRALINI 2009).

177 Herbicidas à base de glifosato são considerados também como tóxicos e agem como  
178 disruptor endócrino em células humanas (GASNIER *et al.*, 2009), induzem a morte celular  
179 através de mecanismos apoptóticos e autofágicos (GASNIER *et al.*, 2009; GUI *et al.*, 2012), e  
180 impactam as propriedades mecânicas das células cutâneas devido ao estresse oxidativo (HEU  
181 *et al.*, 2012).

182 Quando se trata do uso de glifosato e herbicidas à base de glifosato, muitas hipóteses  
183 são levantadas, por isso são necessários estudos mais aprofundados para investigar os efeitos

1  
2  
3  
4 184 adversos decorrentes do seu uso. Pesquisas interdisciplinares que correlacionam níveis de  
5  
6 185 exposição com as consequências para os ecossistemas terrestres e aquáticos, e com o  
7  
8 186 surgimento de doenças em animais, humanos e plantas, são necessárias, assim como a revisão  
9  
10 187 dos limites toleráveis para resíduos de glifosato na água, alimentos e ração animal, elucidando  
11  
12 188 todos possíveis riscos para a saúde ambiental (VAN BRUGGEN *et al.*, 2018).

### 13 14 189 LEGISLAÇÃO

15  
16 190 Ao redor do mundo existem diferentes sistemas regulatórios relacionados ao uso de  
17  
18 191 agrotóxicos, planejados para proteger, em graus variados, os seres humanos e o meio  
19  
20 192 ambiente (DONLEY, 2019). A legislação de pesticidas na União Europeia é geralmente  
21  
22 193 considerada a mais abrangente e rigorosa do mundo (KUDSK e MATHIASSEN, 2020). O  
23  
24 194 limite máximo de resíduos de glifosato em água potável na União Europeia é de 0,1  $\mu\text{g.L}^{-1}$   
25  
26 195 (WANG *et al.*, 2016). Nos Estados Unidos o limite é de 700  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , conforme a determinação  
27  
28 196 da Agência de Proteção Ambiental (EPA) (WANG *et al.*, 2016). No Brasil os parâmetros de  
29  
30 197 potabilidade de água têm seus limites definidos conforme a portaria do Ministério da Saúde,  
31  
32 198 n.º 2914/2011 onde o valor máximo permitido é de 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para glifosato e AMPA  
33  
34 199 (BRASIL, 2011). Para corpos de água segundo a resolução do Conselho Nacional do Meio  
35  
36 200 Ambiente (CONAMA) n.º 357/2005, em águas doces de classe I o valor máximo de glifosato  
37  
38 201 é de 65  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , e para águas doces de classe III o valor máximo de glifosato de 280  $\mu\text{g.L}^{-1}$   
39  
40 202 (BRASIL, 2005).

### 41 203 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO EM 42 204 AMOSTRAS DE AMBIENTAIS

43  
44 205 As inseguranças com a qualidade da água potável e também a contaminação de certos  
45  
46 206 alimentos têm levado pesquisadores a desenvolver métodos eficientes para detectar  
47  
48 207 substâncias em nível traço (STALIKAS e KONIDARI, 2001), assim como glifosato e AMPA.  
49  
50 208 Alguns dos métodos analíticos para a análise de glifosato e AMPA são a cromatografia em  
51  
52 209 camada fina (TLC), cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), eletroforese capilar (CE),  
53  
54 210 cromatografia a gás (GC) e cromatografia líquida (LC) (GUO *et al.*, 2016). A cromatografia  
55  
56 211 líquida é preposta à cromatografia gasosa quando se trata da análise de glifosato e AMPA, por  
57  
58 212 conta das características apresentadas por sua molécula (DRUART *et al.*, 2011;  
59  
60 213 NEDELKOSKA E LOW, 2004). Além disso, herbicidas do tipo fosfônico e aminoácido, em  
214  
215 214 baixas concentrações, são mais bem detectados através da cromatografia líquida, que é vista,  
215  
215 215 atualmente, como a técnica mais apropriada neste caso (OKADA *et al.*, 2019).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

216 A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a mais utilizada para  
217 determinação de glifosato e AMPA (GUO *et al.*, 2016; PIRES *et al.*, 2020; QIAN *et al.*, 2009;  
218 TIAGO *et al.*, 2020; UMSZA-GUEZ *et al.*, 2019). Entre os detectores mais populares estão o  
219 detector por fluorescência (FL) e ultravioleta (UV) (DE LLASERA *et al.*, 2005;  
220 KACZYŃSKI E ŁOZOWICKA, 2015; KHROLENKO e WIECZOREK, 2005; QIAN *et al.*,  
221 2009; WANG, *et al.*, 2016). Menos popular para determinação de glifosato e AMPA, o  
222 detector de arranjo de diodos (DAD) possui um custo de instrumentação relativamente baixo  
223 se comparado ao detector de espectrometria de massa (MS/MS), e ainda assim é  
224 suficientemente seletivo e sensível para análise de agrotóxicos (ABBASPOUR *et al.*, 2019;  
225 TUZIMSKI e REJCZAK, 2016). Contudo, o detector MS/MS, é hoje em dia a técnica favorita  
226 para análise de resíduos de pesticidas polares, em razão da sua excelente sensibilidade e  
227 seletividade (HE *et al.*, 2019; MANZANO-SÁNCHEZ *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020).

228 A determinação de resíduos de glifosato e AMPA a nível traço é bastante complexa, já  
229 que essas substâncias possuem um baixo peso molecular, baixa volatilidade, instabilidade  
230 térmica e alta solubilidade, causando problemas na extração, purificação e determinação do  
231 analito (KACZYŃSKI e ŁOZOWICKA, 2015). Para isso são aconselhados métodos de  
232 purificação e/ou pré-concentração, tais como a extração líquida (LLE), extração em fase  
233 sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME) (CHEN *et al.*, 2019; MEYER *et al.*,  
234 2009). A extração LLE e a SPE, no que se refere às técnicas de preparação de amostras, são  
235 procedimentos bem conhecidos e amplamente aceitos para a extração de uma grande  
236 variedade de analitos em diferentes tipos de amostras (SAJID, 2018).

237 Além disso, a falta de grupos cromóforos e fluoróforos do glifosato e AMPA dificulta  
238 a detecção por sistemas convencionais, como UV-Vis ou FL (LOW, 2004), o que torna  
239 essencial a derivatização pré ou pós-coluna, do glifosato e AMPA, pois melhora sua  
240 volatilidade, possibilita a separação e retenção cromatográfica e o aumento da sensibilidade  
241 do método (GUO *et al.*, 2016).

## 242 DERIVATIZAÇÃO

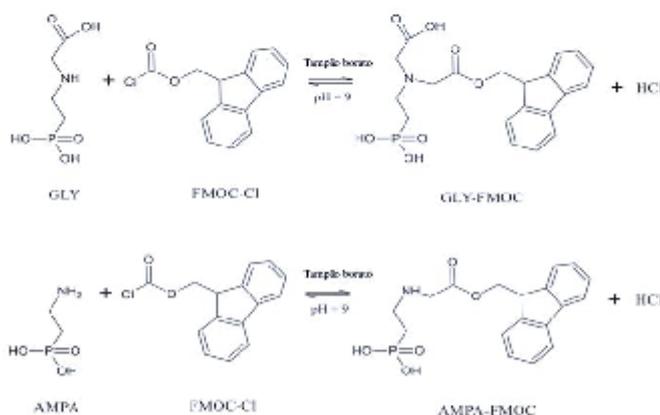
243 Considerado por muitos um procedimento tedioso, a derivatização pode ser demorada  
244 e geralmente demanda otimização de muitos parâmetros, como temperatura, concentração do  
245 reagente e tempo de reação (GOSCINNY *et al.*, 2012). Como já mencionado anteriormente,  
246 ao utilizar HPLC a falta de grupos cromóforos e fluoróforos, implica na derivatização dos  
247 analitos glifosato e AMPA, assim como para GC, por conta da baixa volatilidade e caráter  
248 iônico dos compostos em questão. Portanto, independente da técnica cromatográfica utilizada,

9

249 em 99% das contribuições científicas representativas, foi utilizada a derivatização de ambos  
 250 analitos (ARKAN e MOLNÁR-PERL, 2015).

251 Na cromatografia líquida, a derivatização pode se dar em pré-coluna ou pós-coluna,  
 252 formando derivados altamente fluorescentes. Entre os reagentes de derivatização em pré-  
 253 coluna estão o 9-cloroformato de fluorenilmetil (FMOC-Cl) (HANKE, SINGER e  
 254 HOLLENDER, 2008; NEDELKOSKA e LOW, 2004), o 4-cloro-3,5-  
 255 dinitrobenzotrifluoreto (CNBF) (QIAN *et al.*, 2009) e o cloreto de 4-toluenossulfonila  
 256 (KAWAI, UNO e TOMITA, 1991). No procedimento de derivatização pós-coluna pode ser  
 257 utilizado o ortoftaldeído-mercaptopetanol (OPA-MERC) (MALLAT e BARCELÓ, 1998;  
 258 KACZYŃSKI e LOZOWICKA, 2015). Os reagentes de derivatização na cromatografia  
 259 gasosa podem ser o N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamida (BSTFA) e o  
 260 trimetilclorosilano (TMCS) (CATRINCK *et al.*, 2013).

261 Mas assim como a técnica analítica HPLC é a mais recomendada para análise de  
 262 glifosato e AMPA, o FMOC-Cl é o reagente pré-coluna mais utilizado na derivatização desses  
 263 analitos (BOTERO-COY *et al.*, 2013; DRUART *et al.*, 2011). Ao utilizar o FMOC-Cl na  
 264 derivatização do glifosato e AMPA, esses compostos adquirem uma configuração menos  
 265 polar (Figuras 4), e detectável através de comprimentos de onda do ultravioleta (UV)  
 266 (Figuras 5).

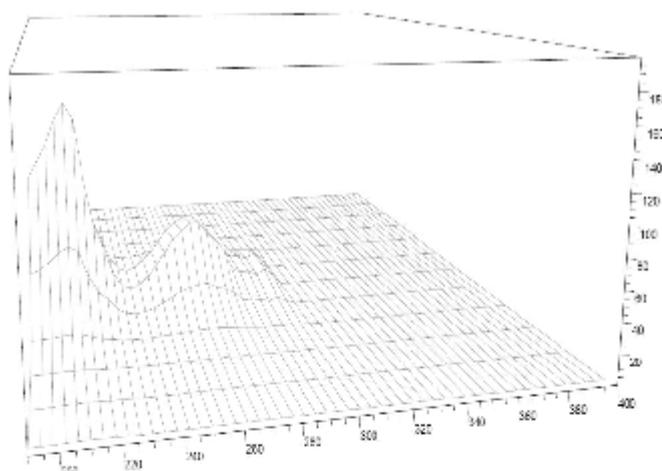


267

268 **Figura 4:** Derivatização de glifosato e AMPA com FMOC-Cl (CATRINCK *et al.*, 2014).

60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



269

270

**Figura 5:** Comprimento de onda de absorção no UV para Fmoc-glifosato (AUTORA, 2019).

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

Embora a derivatização seja extremamente necessária, muitos analistas deixariam passar essa etapa, já que se trata de um passo adicional no preparo de amostra que consome tempo extra e também por conta da natureza tóxica dos reagentes de derivatização comumente utilizados, e como se não bastasse, eles ainda podem incorporar contaminações na amostra (SAJID, 2018).

A contaminação da amostra se dá principalmente pela formação de subprodutos como o Fmoc-OH, que é o produto da hidrólise e descarboxilação do Fmoc-Cl, além do próprio resíduo de Fmoc-Cl que não derivatizou. Esses subprodutos podem precipitar e danificar a coluna cromatográfica, e reduzir a eficiência de ionização afetando a robustez e sensibilidade do método aplicado (HANKE; SINGER; HOLLENDER, 2008). Incluir uma etapa de clean-up da amostra com solvente orgânico seria uma boa estratégia, já que se trata de um procedimento que remove as interferências menos polares, tais como o excesso de Fmoc-Cl e o excesso de reagente hidrolisado (Fmoc-OH), a fim de obter uma melhor recuperação dos analitos durante a análise (CATRINCK et al., 2014).

#### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta revisão apresentou as principais considerações acerca dos desafios para desenvolvimento de métodos analíticos para determinar glifosato e AMPA em amostras ambientais. É importante ressaltar que para desenvolver uma metodologia analítica é necessário conhecer o analito em questão, suas particularidades e comportamento ambiental.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

290 Compostos como o glifosato, o herbicida mais utilizado no mundo e do qual ainda se tem  
291 tantas dúvidas sobre os efeitos adversos para a saúde humana e ambiental, devem fazer parte  
292 de um monitoramento contínuo.

293 Podemos verificar na literatura disponível e atual que os métodos envolvendo a  
294 determinação de glifosato e AMPA estão sempre em busca de estratégias para se tornarem  
295 mais rápidos, no que diz respeito ao preparo de amostras e mais econômicos, quanto à  
296 quantidade de insumos (como solventes e reagentes) e instrumentos utilizados, buscando,  
297 manter ou inovar a seletividade e sensibilidade analítica. Embora o glifosato possua  
298 características que tornem sua determinação complexa, a combinação de técnicas analíticas  
299 pode garantir a eficiência a cada desenvolvimento de método.

## 300 REFERÊNCIAS

- 301 ABBASPOUR, M.; FARAJZADEH, M. A.; SOROURADDIN, S. M.; MOHEBBI, A.  
302 Monitoring of nine pesticides in different cereal flour samples with high performance liquid  
303 chromatography-diode array detection. *Analytical Methods*, 2019, 11, 4022-4033.
- 304 ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A.; CASTELLANO,  
305 V. J.; MARTÍNEZ, M.; MARTIN, M. T.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L. Toxicokinetics of  
306 glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicology letters*, [s. l],  
307 v. 190, n. 1, p. 91–95, 2009.
- 308 ARKAN T.; MOLNÁR-PERL I. The role of derivatization techniques in the analysis of  
309 glyphosate and aminomethyl-phosphonic acid by chromatography *Microchemical Journal*,  
310 121 (2015) 99–106.
- 311 BAER, K. N.; MARCEL, B. J. K.N. Glyphosate, Philip Wexler (Eds.), *Encyclopedia of*  
312 *Toxicology* (Third Edition), Academic Press, 2014, p.767-769.
- 313 BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and  
314 potential risks to human health via food contamination. *Environmental science and pollution*  
315 *research international*, [s. l.], v. 23, n. 19, p. 18988–19001, 2016.
- 316 BALBUENA, M. S.; TISON, L.; HAHN, M-L; GREGGERS, U.; MENZEL, R.; FARINA,  
317 W. M. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *The Journal of*  
318 *experimental biology*, v. 218, n. Pt 17, p. 2799–2805, set. 2015.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 319 BECKIE, H. J.; FLOWER, K. C.; ASHWORTH, M. B. Farming without Glyphosate? *Plants*,  
320 [s. l.], v. 9, n. 1, 96, 2020.
- 321 BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G-E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis  
322 in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical research in toxicology*, [s. l.], v.  
323 22, n. 1, p. 97-105, 2009.
- 324 BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally.  
325 *Environmental sciences Europe*, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 3, 2016.
- 326 BORGGAARD, O. K.; GIMSING, A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of  
327 leaching to ground and surface waters: a review. *Pest. Manag. Sci.*, [S. l.: s. n.], 2008  
328 Apr;64(4):441-56.
- 329 BRASIL. Conselho Nacional Do Meio Ambiente-CONAMA. *Resolução nº 357/2005*.  
330 Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. Brasília, DF: Assunto: Dispõe sobre a  
331 classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como  
332 estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.
- 333 BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria nº 2.914/2011*. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 12  
334 de dezembro de 2011. Assunto: controle e de vigilância da qualidade da água para consumo  
335 humano e seu padrão de potabilidade.
- 336 CATRINCK, T. C. P. G.; AGUIAR, M. C. S.; DIAS, A.; SILVÉRIO, F. O.; FIDÊNCIO, P.  
337 H.; PINHO, G. P.. Study of the Reaction Derivatization Glyphosate and  
338 Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) with N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide.  
339 *American Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 4, 647-652.
- 340 CATRINCK, T. C. P. G.; DIAS, A.; AGUIAR, M. C. S.; SILVÉRIO, F. O.; FIDÊNCIO, P.  
341 H.; PINHO, G. P. A Simple and Efficient Method for Derivatization of Glyphosate and  
342 AMPA Using 9-Fluorenylmethyl Chloroformate and Spectrophotometric Analysis. *Journal of*  
343 *the Brazilian Chemical*, [S. l.: s. n.], 2014.
- 344 CHANG, S. Y.; LIAO, C-H. Analysis of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic  
345 acid by capillary electrophoresis with indirect fluorescence detection. *Journal of*  
346 *Chromatography A*. [S. l.: s. n.], 2002.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 347 CHEN, D.; MIAO, H.; ZHAO, Y.; WU, Y. A simple liquid chromatography-high resolution  
348 mass spectrometry method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic  
349 acid in human urine using cold-induced phase separation and hydrophilic pipette tip solid-  
350 phase extraction. *Journal of Chromatography A*, [S. L.: s. n.], 2019.
- 351 CHEN, M-X; CAO, Z-Y; JIANG, Y.; ZHU, Z-W. Direct determination of glyphosate and its  
352 major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode  
353 hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with  
354 electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, [s. l.], v. 1272, p. 90-  
355 99, 2013.
- 356 DE LLASERA, M. P. G.; GÓMEZ-ALMARAZ, L.; VERA-ÁVILA, L. E.; PEÑA-  
357 ALVAREZ, A. Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-  
358 performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and  
359 aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. *Journal of chromatography. A*, [s. l.], v. 1093,  
360 n. 1-2, p. 139-146, 2005.
- 361 DILL, G. M.; SAMMONS, R. D.; FENG, P. C. C.; KOHN, F.; KRETZMER, K.;  
362 MEHRSHEIKH, A.; BLEEKE, M.; HONEGGER, Y. L.; FARMER, D.; WRIGHT, D.;  
363 HAUPFEAR, E. A. Glyphosate: Discovery, Development, Applications, and Properties. In:  
364 VK Nandula (ed), *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and*  
365 *Management*, [S. L.: s. n.]. Hoboken: Wiley, 2010, pp.1-33.
- 366 DONLEY, N. The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides.  
367 *Environmental health: a global access science source*, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 44, 2019.
- 368 DRUART, C.; DELHOMME, O.; VAUFLEURY, A.; NTCHO, E. Optimization of extraction  
369 procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and  
370 aminomethylphosphonic acid in soil. *Analytical and bioanalytical chemistry*, [s. l.], v. 399, n.  
371 4, p. 1725-1732, 2011.
- 372 DUKE, S. O. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and  
373 weeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, [s. l.], v. 59, n. 11, p. 5835-5841, 2011.
- 374 DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. [S. L.: s. n.], 2008.  
375 *Pest Management Science*, 64(4), 319-325.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 376 FOLMAR, L. C.; SANDERS, H. O.; JULIN, A. M. Toxicity of the herbicide glyphosate and  
377 several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environm. Contain.*  
378 *Toxicol.* 8, 269-278. 1979.
- 379 FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. [S.  
380 I.]: Amer Chemical Society, 1997.
- 381 GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M-C;  
382 SÉRALINI, G-E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human  
383 cell lines. *Toxicology*, v. 262, n. 3, p. 184–191, 21 ago. 2009.
- 384 GILL, J. P. K.; SETHI, N.; MOHAN, A.; DATTA, S.; GIRDHAR, M.. Glyphosate toxicity  
385 for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 2017. 16(2), 401–426.
- 386 GOSCINNY, S.; UNTERLUGGAUER, H.; ALDRIAN, J.; HANOT, V.; MASSELER, S.  
387 Determination of Glyphosate and Its Metabolite AMPA (Aminomethylphosphonic Acid) in  
388 Cereals After Derivatization by Isotope Dilution and UPLC-MS/MS. *Food Analytical*  
389 *Methods*, v. 5, n. 5, p. 1177–1185, 2012.
- 390 GUI, Y-X; FAN, X-N; WANG, H-M; WANG, G.; CHEN, S-D. Glyphosate induced cell  
391 death through apoptotic and autophagic mechanisms. *Neurotoxicology and teratology*, v. 34,  
392 n. 3, p. 344–349, maio 2012.
- 393 GUO, H.; RITER, L. S.; WUJCIK, C. E.; ARMSTRONG, D. W. Direct and sensitive  
394 determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water  
395 samples by high performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass  
396 spectrometry. *Journal of chromatography. A*, [S. I.], v. 1443, p. 93–100, 2016.
- 397 HAGNER, M.; MIKOLA, J., SALONIEMI, I., SAIKKONEN, K., & HELANDER, M. .  
398 Effects of a glyphosate-based herbicide on soil animal trophic groups and associated  
399 ecosystem functioning in a northern agricultural field. *Scientific Reports*, 9(1), 2019.
- 400 HANKE, I.; SINGER, H.; HOLLENDER, J. Ultratrace-level determination of glyphosate,  
401 aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction  
402 followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of  
403 derivatization, enrichment and detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, n. 6,  
404 p. 2265–2276, 2008..

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 405 HE, S.; CAO, X.; WU, H.; LI, T.; ZHANG, M.; LIANG, Y.; CHEN, B. Rapid determination  
406 of glyphosate, aminomethyl phosphonic acid, glufosinate, and ethephon residues in  
407 environmental water by direct injection-ultra performance liquid chromatography-triple  
408 quadrupole mass spectrometry. *Se Pu*. 2019 Nov 8;37(11):1179-1184.
- 409 HÉBERT, M.P.; FUGÈRE, V.; GONZALEZ, A. The overlooked impact of rising glyphosate  
410 use on phosphorus loading in agricultural watersheds. *Front Ecol Environ*, 2019; 17(1): 48–  
411 56.
- 412 HEU, C.; BERQUAND, A.; ELIE-CAILLE, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced stiffening of  
413 HaCaT keratinocytes, a Peak Force Tapping study on living cells. *Journal of structural*  
414 *biology*, v. 178, n. 1, p. 1–7, abr. 2012. .
- 415 IARC. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. [S. l.]: *IARC Monographs on the*  
416 *Evaluat*, 2017.
- 417 JÖNSSON, J.; CAMM, R.; HALL, T. Removal and degradation of Glyphosate in water  
418 treatment: A review. *Aqua*, 2013. 62. 395.
- 419 KACZYŃSKI, P.; ŁOZOWICKA, B.. Liquid chromatographic determination of glyphosate  
420 and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or  
421 derivatization/fluorescence detection. *Open Chemistry*, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 932, 2015.
- 422 KANISSERY, R.; GAIRHE, B.; KADYAMPAKENI, D.; BATUMAN, O.; ALFEREZ, F.  
423 Glyphosate: Its Environmental Persistence and Impact on Crop Health and Nutrition. *Plants*,  
424 [s. l.], v. 8, n. 11, 2019.
- 425 KAWAI S.; UNO B.; TOMITA M.. Determination of glyphosate and its major metabolite  
426 aminomethylphosphonic acid by high-performance liquid chromatography after derivatization  
427 with p-toluenesulphonyl chloride. *Journal of Chromatography*, 540 (1991) 411-415.
- 428 KHROLENKO, M. V.; WIECZOREK, P. P. Determination of glyphosate and its metabolite  
429 aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane  
430 preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection  
431 after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. *Journal of chromatography. A*, [s. l.], v.  
432 1093, n. 1-2, p. 111–117, 2005.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 433 KUDSK, P.; MATHIASSEN, S. K. Pesticide regulation in the European Union and the  
434 glyphosate controversy. *Weed Science*, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 214–222, 2020.
- 435 LANGIANO, V.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide  
436 on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative biochemistry and physiology.*  
437 *Toxicology & pharmacology: CBP*, v. 147, n. 2, p. 222–231, mar. 2008. .
- 438 LUPI, L.; BEDMAR, F.; PURICELLI, M.; MARINO, D. Glyphosate runoff and its  
439 occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in  
440 Argentina. *Chemosphere*, 225, 2019, 906e914.
- 441 MALLAT, E.; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of  
442 aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange  
443 solid-phase extraction columns followed by ion chromatography–post-column derivatization  
444 with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 823, n. 1-2, p. 129–136, 1998.
- 445 MANZANO-SÁNCHEZ, L.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ J. A.; DOMÍNGUEZ, I.;  
446 MARTÍNEZ, V. J. L.; FRENICH, A. G.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. Development and  
447 Application of a Novel Pluri-Residue Method to Determine Polar Pesticides in Fruits and  
448 Vegetables through Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry. *Foods*.  
449 2020 May 1;9(5):553.
- 450 MEYER, M. T.; LOFTIN, K.; LEE, E.; HINSHAW, G.; DIETZE, J.; SCRIBNER, E. (2009).  
451 Determination of Glyphosate, its Degradation Product Aminomethylphosphonic Acid, and  
452 Glufosinate, in Water by Isotope Dilution and Online Solid-Phase Extraction and Liquid  
453 Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *U.S. Geological Survey Techniques and*  
454 *Methods*, book 5, chap. A10, 32p.
- 455 MORAES, J. S.; NORBERG, B. F. S.; CASTRO, M. R.; VAZ, B. S.; MIZUSCHIMA, C.  
456 W.; MARINS, L. F. F.; MARTINS, C. M. G. Zebrafish (*Danio rerio*) ability to activate  
457 ABCC transporters after exposure to glyphosate and its formulation Roundup Transorb®.  
458 *Chemosphere*, v. 248, p. 125959, jun. 2020.
- 459 MOTTA, E. V. S.; RAYMANN, K.; MORAN, N. A. Glyphosate perturbs the gut microbiota  
460 of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*  
461 *America*, v. 115, n. 41, p. 10305–10310, 9 out. 2018. .

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 462 NEDELKOSKA, T. V.; LOW, G. K-C. High-performance liquid chromatographic  
463 determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with  
464 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 511(1), 145–153.
- 465 OKADA, E.; COGGAN, T.; ANUMOL, T.; CLARKE, B.; ALLINSON, G. A simple and  
466 rapid direct injection method for the determination of glyphosate and AMPA in  
467 environmental water samples. *Anal Bioanal Chem*. 2019 Jan;411(3):715-724.
- 468 PIRES, N.; PASSOS, C. J. S.; MORGADO, M. G. A.; MELLO, D. C.; INFANTE, C. M. C.;  
469 CALDAS, E. D. Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate by high performance  
470 liquid chromatography with fluorescence detection in waters of the Santarém Plateau,  
471 Brazilian Amazon. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food*  
472 *contaminants, and agricultural wastes, [s. l.]*, v. 55, n. 9, p. 794–802, 2020.
- 473 QIAN, K.; TANG, T.; SHI, T.; WANG, F.; LI, J.; CAO, Y. Residue determination of  
474 glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography  
475 and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. *Anal Chim*  
476 *Acta*. 2009 Mar 9;635(2):222-6.
- 477 SAJID, M. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with derivatization: A review of  
478 different modes, applications, and green aspects. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 2018,  
479 106, 169–182.
- 480 SINGH, S.; KUMAR, V.; DATTA, S.; WANI, A. B.; DHANJAL, D. S.; ROMERO, R.;  
481 SINGH, J. . Glyphosate uptake, translocation, resistance emergence in crops, analytical  
482 monitoring, toxicity and degradation: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 2020.
- 483 SHILO, T.; ZYGIER, L.; RUBIN, B.; WOLF, S.; EIZENBERG, H. Mechanism of glyphosate  
484 control of *Phelipanche aegyptiaca*. *Planta*. 2016, 244.
- 485 STALIKAS, C. D.; KONIDARI, C. N. Analytical methods to determine phosphonic and  
486 amino acid group-containing pesticides. *Journal of chromatography. A, [s. l.]*, v. 907, n. 1-2,  
487 p. 1–19, 2001.
- 488 SZEKACS, A.; DARVAS, B. Forty years with glyphosate. In: *Herbicides – Properties,*  
489 *Synthesis and Control of Weeds* (Hasaneen, M. N. A. E.-G., Ed.), InTech, Rijeka, Croatia,  
490 chapter 14, pp. 247-284, 2012.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 491 TARAZONA, J.; COURT-MARQUES, D.; TRAMANI, M.; REICH, H.; PFEIL, R.;  
492 ISTACE, F.; CRIVELLENTI, F. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the  
493 scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Arch*  
494 *Toxicol.* 2017 Aug;91(8):2723-2743.
- 495 TIAGO, J. P. F.; SICUPIRA, L. C.; BARROS, R. E.; DE PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.  
496 Simultaneous and direct determination of glyphosate and AMPA in water samples from the  
497 hydroponic cultivation of eucalyptus seedlings using HPLC-ICP-MS/MS. *Journal of*  
498 *environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural*  
499 *wastes, [s. l], v. 55, n. 6, p. 558–565, 2020.*
- 500 TRAVLOS, I.; CHEIMONA, N.; BILALIS, D. Glyphosate Efficacy of Different Salt  
501 Formulations and Adjuvant Additives on Various Weeds. *Agronomy* 2017, 7, 60.
- 502 TUZIMSKI, T.; REJCZAK, T. Application of HPLC-DAD after SPE/QuEChERS with ZrO<sub>2</sub>-  
503 based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. *Food chemistry, [s.*  
504 *l], v. 190, p. 71–79, 2016.*
- 505 UMSZA-GUEZ, M. A.; SILVA-BELTRÁN, N. P.; MACHADO, B. A. S.; BALDERRAMA,  
506 C. A. P. Herbicide determination in Brazilian propolis using high pressure liquid  
507 chromatography. *International journal of environmental health research, [s. l], p. 1–11,*  
508 *2019.*
- 509 VAN BRUGGEN, A. H. C.; HE, M. M.; SHIN, K.; MAI, V.; JEONG, K. C.; FINCKH, M.  
510 R.; MORRIS, J. G. Jr. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *The*  
511 *Science of the total environment, v. 616-617, p. 255–268, mar. 2018.*
- 512 VAN STEMPVOORT, D. R.; ROY, J. W.; BROWN, S. J.; BICKERTON, G. Residues of the  
513 herbicide glyphosate in riparian groundwater in urban catchments. *Chemosphere, [s. l], v. 95,*  
514 *p. 455–463, 2014.*
- 515 WANG, S.; SEIWERT, B.; KÄSTNER, M.; MILTNER, A.; SCHÄFFER, A.; REEMTSMA,  
516 T.; NOWAK, K. M. (Bio)degradation of glyphosate in water-sediment microcosms – A stable  
517 isotope co-labeling approach. *Water research, [s. l], v. 99, p. 91–100, 2016.*
- 518 WANG, S.; LIU, B.; YUAN, D; MA, J. A simple method for the determination of glyphosate  
519 and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid  
520 chromatography and fluorescence detection. *Talanta, [s. l], v. 161, p. 700–706, 2016.*

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 521 WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety Evaluation and Risk Assessment of  
522 the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory*  
523 *Toxicology and Pharmacology*, 2000. 31(2), 117–165.
- 524 ZHAN, H.; FENG, Y.; FAN, X.; CHEN, S. Recent advances in glyphosate biodegradation.  
525 *Applied microbiology and biotechnology*, [s. l.], v. 102, n. 12, p. 5033–5043, 2018.
- 526 ZHANG, L.; RANA, I.; TAIOLI, E.; SHAFFER, R. M.; SHEPPARD, L. Exposure to  
527 Glyphosate-Based Herbicides and Risk for Non-Hodgkin Lymphoma: A Meta-Analysis and  
528 Supporting Evidence. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. 781 (2019) 186–  
529 206.
- 530 ZHANG, Y.; DANG, Y.; LIN, X.; AN, K.; LI, J.; ZHANG, M. Determination of glyphosate  
531 and glufosinate in corn using multi-walled carbon nanotubes followed by ultra high  
532 performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of*  
533 *chromatography. A*, [s. l.], v. 1619, p. 460939, 2020.

### 4.3 ARTIGO Nº 3

#### ÍTEGRA DO ARTIGO A SER SUBMETIDO

##### **OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA, DERIVATIZADAS COM FMOC-CI, UTILIZANDO HPLC-DAD**

**RESUMO:** O glifosato e herbicidas à base de glifosato podem contaminar organismos, seres humanos, ecossistemas, alimentos e rações. Por isso, um método confiável e eficiente para a determinação do glifosato em amostras ambientais é essencial. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das técnicas mais utilizadas para determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em matrizes ambientais. Os detectores mais utilizados para quantificação do glifosato são o de fluorescência e ultravioleta, no entanto o detector de arranjo de diodos (DAD) é amplamente empregado em análises de HPLC para determinar resíduos de outros agrotóxicos. A técnica HPLC-DAD, tem um custo de instrumentação relativamente baixo e ainda assim é seletiva e sensível para análise de resíduos de agrotóxicos. O emprego desta técnica para análise de glifosato e AMPA em amostras ambientais, exige que as amostras sejam derivatizadas, pois não possuem grupos cromóforos e fluoróforos. O reagente de derivatização mais utilizado é o 9-cloroformato de fluorenilmetil (FMOC-CI). O método desenvolvido para determinação de glifosato e AMPA em amostras ambientais de água nestas condições, alcançou o LD para glifosato e AMPA, de 0,007 e 0,006 mg.L<sup>-1</sup> e LQ para glifosato e AMPA de 0,035 e 0,019 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. É considerado um método de alta repetibilidade devido à sua precisão. A partir dele foi possível determinar a presença de glifosato nas amostras de um dos ambientes investigados, contendo a concentração de 0,078 mg.L<sup>-1</sup>, valor acima do limite permitido pela resolução CONAMA 357/2005 de 0,065 mg.L<sup>-1</sup>.

**Palavras-Chave:** Qualidade da Água, CONAMA, Pesticidas, Cromatografia Líquida, CLAE.

**ABSTRACT:** Glyphosate and glyphosate-based herbicides can contaminate organisms, humans, ecosystems, food and feed. Therefore, a reliable and efficient method for glyphosate determination in environmental samples is essential. High performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most used techniques for glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) determination in environmental matrices. The most used detectors for glyphosate quantification are fluorescence and ultraviolet, however the diode array detector (DAD) is widely used in HPLC analysis to determine residues of other pesticides. The HPLC-DAD technique has a relatively low instrumentation cost and is nonetheless selective and sensitive for the analysis of pesticide residues. The use of this technique for glyphosate and AMPA analysis in environmental samples, requires that the samples be derivatized, as they do not have chromophores and fluorophores groups. The

most widely used derivatization reagent is fluorenylmethyl 9-chloroformate (FMOC-Cl). The method developed to glyphosate and AMPA determine in environmental water samples under these conditions, reached the LD for glyphosate and AMPA, of 0,007 and 0,006 mg.L<sup>-1</sup>, and LQ for glyphosate and AMPA 0,035 e 0,019 mg.L<sup>-1</sup>, respectively. It is considered a high repeatability method due its precision. It was possible to determine glyphosate presence in samples of one of the investigated environments, containing a concentration of 0.078 mg.L<sup>-1</sup>, a value above the limit allowed by CONAMA resolution 357/2005 (0.065 mg.L<sup>-1</sup>).

**Keywords:** Water quality, CONAMA, Pesticides, Liquid Chromatography, CLAE.

## 1. INTRODUÇÃO

O glifosato [N-(fosfonometil) glicina] é um herbicida organofosforado de amplo espectro, não seletivo e de pós-emergência. Amplamente utilizado no combate às ervas daninhas, ele atua na inibição da 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), uma enzima chave na biossíntese de aminoácidos aromáticos (SHILO *et al.*, 2016), que são essenciais para a sobrevivência das plantas. É o herbicida com maior volume de produção, usado em mais de 750 produtos diferentes, e mundialmente utilizado na agricultura, silvicultura, áreas urbanas e em aplicações domésticas (GUYTON *et al.*, 2015; IARC, 2017).

O glifosato tem sido foco de intensa pesquisa científica e inovação de produtos, o número de publicações científicas e patentes relacionadas a ele aumentou para quase 20.000 em 40 anos, sendo a maioria nos últimos 15 anos (DUKE, 2018). Além disso, a discussão sobre os efeitos na saúde humana, contaminação do solo e ecossistemas aquáticos causados por glifosato, têm sido uma questão central na mídia e cenário político mundial, onde se debate a respeito da continuidade do uso desta substância no meio ambiente (CARLES *et al.*, 2019).

Glifosato e herbicidas à base de glifosato podem contaminar organismos, incluindo seres humanos, ecossistemas e também alimentos e rações (GASNIER *et al.*, 2009). Já foi possível, inclusive, detectar glifosato em amostras de sangue e urina coletadas de trabalhadores agrícolas, indicando assim, a absorção desta substância pelo corpo (GUYTON *et al.*, 2015; IARC, 2017). Alguns estudos associam a exposição humana ao glifosato à incidência de doenças como câncer (IARC, 2017; THONGPRAKAISANG *et al.*, 2013), a danos no DNA e efeitos mutagênicos e reprotóxicos nas células humanas e de organismos vivos (GASNIER *et al.*, 2009).

Por isso, visando a proteção da saúde humana, foram estipulados níveis máximos permitidos de glifosato em água potável, que são determinados por diferentes agências e países. Na União Europeia o limite é de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; nos Estados Unidos o limite é de  $700 \mu\text{g.L}^{-1}$ , conforme a determinação da Agência de Proteção Ambiental (EPA) (WANG, Shizong *et al.*, 2016). No Brasil, conforme a portaria de consolidação do Ministério da Saúde, n.º 05/2017, o valor residual máximo permitido de glifosato e seu metabólito o ácido aminometilfosfônico (AMPA) para água potável é de  $500 \mu\text{g.L}^{-1}$  (BRASIL, 2011). E conforme a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) n.º 357/2005, são estabelecidos para águas doces de classe um e classe três os valores residuais máximos de glifosato de  $65 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $280 \mu\text{g.L}^{-1}$  respectivamente (BRASIL, 2005).

Diante desse panorama, torna-se indispensável um método confiável e eficiente para a determinação do glifosato em amostras ambientais (QIAN *et al.*, 2009), que assegure um monitoramento ambiental adequado, tendo em vista a saúde humana e ambiental. Dadas as condições de monitoramento ambiental para glifosato, é importante ressaltar que frequentemente ao investigar a sua ocorrência, inclui-se também seu principal produto de degradação, o AMPA (EHLING e REDDY, 2015).

Entre as técnicas mais utilizadas para determinação de glifosato e AMPA em matrizes ambientais, estão a cromatografia líquida e a gasosa. Contudo, se comparada à cromatografia gasosa a líquida é mais vantajosa, devido à característica iônica e de baixa volatilidade do glifosato e AMPA, que favorece a técnica (DRUART *et al.*, 2011). A cromatografia líquida é, inclusive, a técnica mais adequada para a detecção de herbicidas fosfônicos e do tipo aminoácido em baixas concentrações (OKADA *et al.*, 2019).

Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), do inglês high performance liquid chromatography (HPLC), os detectores mais utilizados para quantificação do glifosato são o de fluorescência (FL) e ultravioleta (UV) (KACZYŃSKI e ŁOZOWICKA, 2015). Além desses, há também o detector de arranjo de diodos (DAD) que é pouco utilizado na determinação de glifosato e AMPA, mas amplamente empregado em análises de HPLC para determinar resíduos de outros agrotóxicos (ABBASPOUR *et al.*, 2019; CORAZZA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019; XI *et al.*, 2016). O DAD é especialmente útil na análise de amostras com matrizes complexas por obtenção de espectros de UV e avaliação da pureza dos picos nos

cromatogramas (TUZIMSKI, 2009). A técnica analítica que emprega HPLC-DAD tem um custo de instrumentação relativamente baixo e ainda assim é suficientemente seletiva e sensível para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras que foram purificadas e concentradas antes análise cromatográfica (ABBASPOUR *et al.*, 2019; TUZIMSKI e REJCZAK, 2016).

Relativo à detecção de glifosato e AMPA, a falta de grupos cromóforos ou fluoróforos dificulta o uso de métodos convencionais (OKADA *et al.*, 2019), como por exemplo o DAD. Em razão disso, a maioria dos métodos analíticos para determinação desses compostos envolvem uma etapa de derivatização, pré-coluna ou pós-coluna, com a finalidade de aumentar a seletividade e sensibilidade do método, através da redução do caráter polar das moléculas de glifosato e AMPA, aumentando a retenção e melhorando a separação cromatográfica (GHANEM *et al.*, 2007). Para a derivatização o reagente pré-coluna mais utilizado é o 9-cloroformato de fluorenilmetil (FMOC-Cl) (CARRETTA *et al.*, 2019; DRUART *et al.*, 2011; KOSKINEN; MAREK e HALL, 2016).

O FMOC-Cl tem baixa solubilidade e estabilidade quando em água, sendo necessário seu preparo com solvente orgânico miscível com água, a acetonitrila é um exemplo de solvente orgânico utilizado nesse caso (OKADA *et al.*, 2019). Embora o FMOC-Cl seja um reagente amplamente utilizado para derivatização, ele provoca efeitos indesejados durante sua reação em matriz aquosa, que é a formação de subprodutos de derivatização, tais como o 9-fluorenylmethanol (FMOC-OH), produto da hidrólise e descarboxilação do FMOC-Cl, que podem danificar a coluna cromatográfica em caso de precipitação, o que poderá reduzir a eficiência de ionização da molécula podendo afetar a robustez e sensibilidade do método em geral (HANKE; SINGER e HOLLENDER, 2008).

Além disso, o excesso do FMOC-Cl utilizado no preparo da amostra pode provocar danos na coluna cromatográfica, e uma das estratégias utilizadas para remoção do excesso desse reagente além de outras impurezas orgânicas após a derivatização, é a inclusão de uma etapa de *clean-up* da amostra com solvente orgânico (CATRINCK *et al.*, 2014). Somado a isso, uma técnica de preparação de amostras com pré-concentração dos analitos, também tem potencial de reduzir ou eliminar possíveis compostos interferentes, o que poderá permitir a transferência dos analitos para uma fase de extração compatível com o instrumento de análise (CORAZZA *et al.*, 2019; XI *et al.*, 2016).

Com base nessas informações, este trabalho teve por objetivo otimizar uma metodologia para determinação de glifosato e seu metabólito AMPA em amostras ambientais de água, derivatizadas com FMOC-Cl, empregando a técnica cromatográfica HPLC-DAD.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 INSTRUMENTOS

Para a realização do presente estudo, foi utilizado um cromatógrafo líquido Agilent 1260 Infinity, constituído de uma bomba quaternária [modelo G1311C]; injetor automático [modelo G1329B]; compartimento de coluna [modelo G1316A] com controle de temperatura e detector de arranjo de diodos (DAD) [modelo G1315D]. As colunas analíticas utilizadas neste estudo são apresentadas a seguir (Tabela 1).

**Tabela 1:** Descrição das colunas analíticas utilizadas para análise de glifosato e AMPA

Coluna Analítica	Descrição
Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Analytical	L × I.D. 250 mm × 4,6 mm × 5 µm de tamanho de partícula
Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution	L × I.D. 100 mm × 4,6 mm × 3,5 µm de tamanho de partícula
Phenomenex Kinetex Core-Shell C18 100A	L × I.D. 250 mm × 4,6 mm × 5 µm de tamanho de partícula

As pipetas utilizadas foram da marca Eppendorf<sup>®</sup>. No preparo da amostra durante a derivatização foi utilizada uma incubadora com agitação orbital da marca Quimis<sup>®</sup> para a homogeneização. No preparo das amostras no *clean-up* foi utilizado um agitador automático ZX3 da marca Velp Scientifica<sup>®</sup> para homogeneização, e uma centrífuga 80-2B da marca Daiki para auxiliar a separação de fase.

### 2.2 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Como padrões analíticos foram utilizados o glifosato Pestanal<sup>®</sup> (98,6%) (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>P) [CAS n.º 1071-83-6] e o AMPA 99% (CH<sub>6</sub>NO<sub>3</sub>P) [CAS n.º 10-66-51-9], ambos adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Como reagente de

derivatização foi utilizado o FMOC-Cl (97%) ( $C_{15}H_{11}ClO_2$ ) [CAS n.º 28-920-43-6] (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). A água ultrapura utilizada foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Millipore Direct - Q<sup>®</sup> 3 UV 18,2 M $\Omega$ ·cm a 25°C.

A solução tampão comercial de borato (pH 9) utilizada foi da marca Dinâmica<sup>®</sup> [CAS n.º 1303-96-4]. Os reagentes utilizados foram fosfato de potássio monobásico anidro P.A. ( $KH_2PO_4$ ), IMPEX [CAS n.º 7778-77-0]; hidróxido de potássio escamas P.A. (KOH), VETEC [CAS n.º 1310-58-3]; acetonitrila grau HPLC ( $CH_3CN$ ), MERCK [CAS n.º 75-05-8]; éter etílico 99% P.A. [ $(C_2H_5)_2O$ ], VETEC [CAS n.º 60-29-7]; diclorometano P.A. ( $CH_2Cl_2$ ), NEON [CAS n.º 75-09-2]; hexano P.A. ( $C_6H_{14}$ ), Alphatec [CAS n.º 110-54-3].

### **2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES E CURVA DE CALIBRAÇÃO**

As soluções estoque de glifosato e AMPA foram preparadas com concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup> utilizando o padrão analítico e água ultrapura. A partir destas foram preparadas as soluções de trabalho, que posteriormente foram preparadas em triplicata, derivatizadas e analisadas.

A solução de derivatização FMOC-Cl foi preparada a 0,02 mol.L<sup>-1</sup> em acetonitrila grau HPLC.

O reagente  $KH_2PO_4$  foi utilizado no preparo da solução da fase móvel de 0,005 mol.L<sup>-1</sup> em água ultrapura. Para o ajuste de pH desta solução para 5,5 foi utilizado solução de KOH (2 mol.L<sup>-1</sup>). Depois de pronta, essa solução foi filtrada em membrana de nylon de 0,22  $\mu$ m e foram ultrassonificadas durante 45 min para remover bolhas de ar presentes na solução.

### **2.4 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS**

As amostras foram coletadas em dois mananciais superficiais no estado do Rio Grande do Sul - Brasil, cujas localizações se fazem constar na Tabela 2.

**Tabela 2:** Pontos de coleta das amostras ambientais de água.

Amostra de Água	Localização	
	Latitude	Longitude
<b>Amostra Ambiental 1</b> (Figura 1)	-32.009010°	-52.687640°
<b>Amostra Ambiental 2</b> (Figura 2)	-31.590991°	-52.347510°



**Figura 1:** Ponto de coleta da amostra ambiental de água nº 1: área rural com predominância de atividade agrícola intensiva (Google Earth, 2021).



**Figura 2:** Ponto de coleta da amostra ambiental de água nº 2: área rural com habitações, atividades de pecuária e pequenos cultivos (Google Earth, 2021).

As amostras do ambiente 1 foram coletadas na primeira semana de março de 2020 e as amostras do ambiente 2 foram coletadas na última semana de janeiro de 2020. Essas amostras foram coletadas em frasco de polietileno estéril e acondicionadas em um recipiente de isopor com gelo e transportadas até o laboratório para preparo. Já no preparo essas amostras foram filtradas em membrana de nylon de 0,22 µm por três vezes e após passaram pelo processo de derivatização, *clean-up* e por fim foram analisadas.

## **2.5 DERIVATIZAÇÃO DO GLIFOSATO E AMPA COM FMOC-CL**

Na derivatização todas as amostras foram preparadas em tubo cônico (15 mL) de polipropileno, a partir da reação de 1 mL dessas amostras (soluções de trabalho ou amostra ambiental fortificada ou não), com 1,25 mL da solução de FMOC-Cl e 0,25 mL do tampão borato (pH 9). Após o preparo, estas amostras foram homogeneizadas em uma incubadora com agitação orbital a 180 rotações por minuto (rpm) durante uma hora em temperatura ambiente. Da derivatização resultaram os produtos FMOC-glifosato e FMOC-AMPA, que a seguir passaram pelo *clean-up*.

## **2.6 CLEAN-UP**

O *clean-up* é um processo de limpeza após a derivatização, que consiste em remover as interferências menos polares da amostra, tais como FMOC-Cl e o excesso de reagente hidrolisado (FMOC-OH), usando um solvente orgânico, a fim de obter uma melhor recuperação dos analitos durante a análise através da remoção de substâncias interferentes.

Para o *clean-up* foram adicionados 2 mL de solvente orgânico (Tabela 3) nas amostras já derivatizadas, em seguida essas amostras passaram por agitação durante 2 min, em agitador automático e posteriormente foram centrifugadas (4000 rpm) por 2 min. Da separação de fases ocorrida após esse processo, a fase aquosa foi extraída utilizando a técnica de extração líquido-líquido, filtrada em membrana de nylon de 0,22 µm e analisada por HPLC-DAD.

### **2.6.1 OTIMIZAÇÃO DO CLEAN-UP DE AMOSTRAS**

Para otimizar esse procedimento, foi realizado um teste em triplicata com 3 solventes diferentes, escolhidos de acordo com o coeficiente de solubilidade (Tabela

3). Estes solventes foram adicionados em amostras preparadas a partir da solução padrão, com concentração de  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de Fmoc-glifosato e preparados conforme a descrição 1.3.6.

**Tabela 3:** Coeficiente de solubilidade dos solventes orgânico testados

<b>Solvente Orgânico</b>	<b>Solubilidade em água a 20 °C</b>
Éter Etilico	$69 \text{ g. L}^{-1}$
Diclorometano	$20 \text{ g. L}^{-1}$
Hexano	$0,0095 \text{ g. L}^{-1}$

Da separação de fases ocorrida após esse processo, uma aquosa e uma orgânica, foram extraídas uma amostra de cada fração, aproximadamente 1 ml, que foram filtradas em membrana de nylon de  $0,22 \mu\text{m}$  e analisadas por HPLC-DAD com as seguintes condições cromatográficas: coluna analítica Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Analytical ( $4,6 \times 250 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ );  $40 \text{ °C}$  de temperatura da coluna; fluxo da fase móvel de  $0,700 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ ; a fase móvel foi composta de acetonitrila e solução  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de  $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ , em modo isocrático (30:70 v/v), respectivamente.

## 2.7 AVALIAÇÃO DA COLUNA ANALÍTICA

A otimização da coluna analítica consistiu em verificar através da análise de amostras de concentração conhecida, qual coluna apresentava maior eficiência, em relação à altura de pratos teóricos, uma em relação a outra. As colunas analíticas utilizadas nessa otimização foram citadas anteriormente na Tabela 1 do item 2.1. As condições para esta análise foram:  $40 \text{ °C}$  de temperatura da coluna; fluxo da fase móvel de  $0,700 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ ; a fase móvel foi composta de acetonitrila e solução  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de  $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ , em modo isocrático (30:70 v/v), respectivamente. Para avaliar a eficiência da coluna analítica foi calculada a altura equivalente ao prato teórico de cada coluna.

## 2.8 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Os parâmetros de validação do método serão calculados conforme Resolução da Diretoria Colegiada Anvisa (RDC) nº. 166/2017 (BRASIL, 2017).

## 2.9 ANÁLISE DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS

As amostras após coletadas e filtradas foram derivatizadas e passaram por *clean-up* de diclorometano, foram analisadas em HPLC-DAD utilizando a coluna analítica Phenomenex Kinetex Core-Shell C18 100A (4,6 × 250 mm x 5 µm). As condições cromatográficas aplicadas foram: fase móvel composta de acetonitrila e de solução KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,005 mol.L<sup>-1</sup>, em modo isocrático (30:70 v/v), respectivamente; temperatura da coluna a 40 °C; fluxo da fase móvel de 0,700 mL.min<sup>-1</sup>; volume de injeção de 20 µL. As análises foram acompanhadas nos comprimentos de onda de 206, 210 e 260 nm.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 OTIMIZAÇÃO DO CLEAN-UP DAS AMOSTRAS

O *clean-up* é aplicado após o processo de derivatização dos analitos, é um procedimento utilizado para remover compostos co-derivatizados que podem prejudicar a determinação cromatográfica ou ainda causar danos para os instrumentos analíticos (TADEO *et al.*, 2000). Da mesma forma, pelo critério de afinidade com o solvente orgânico usado, o *clean-up* remove o excesso de FMOC-Cl e FMOC-OH que podem também danificar os equipamentos.

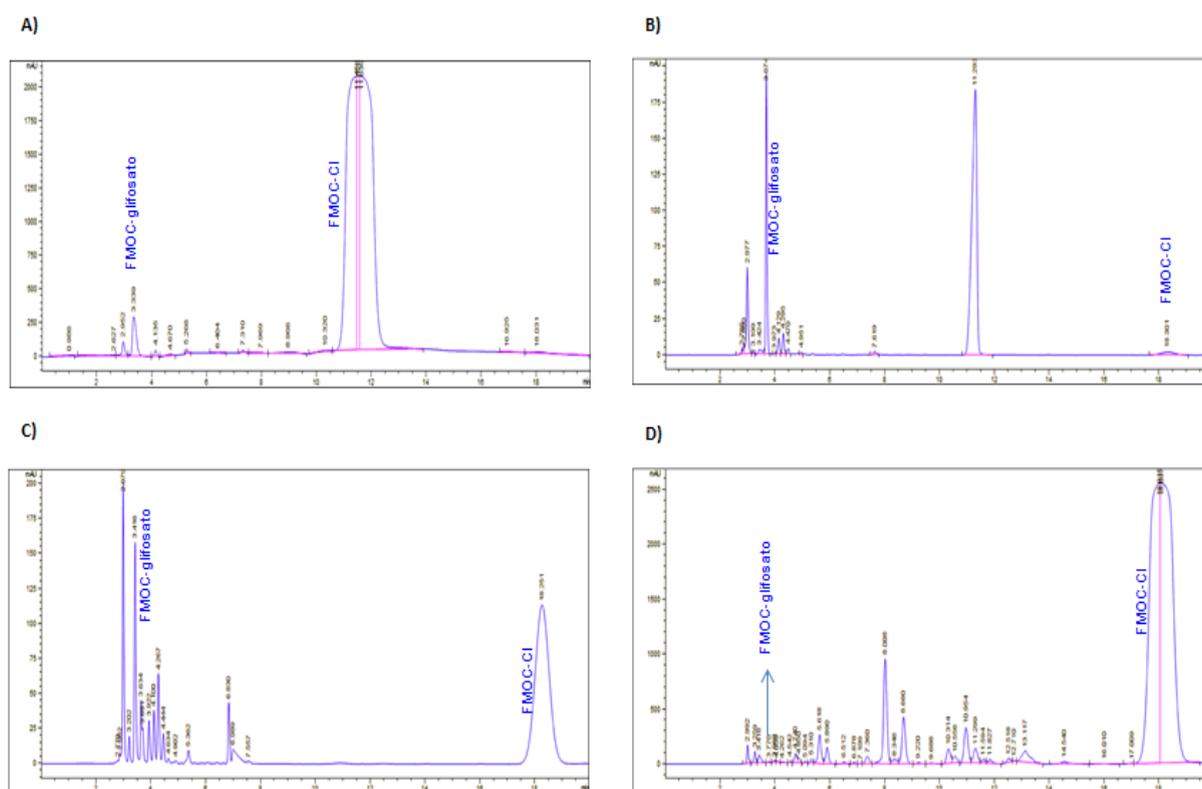
Dos solventes testados, os resultados para o éter e o diclorometano foram satisfatórios, já o solvente mais apolar, hexano, não respondeu positivamente ao objetivo. O éter etílico costuma ser recomendado para o *clean-up* pela literatura (CATRINCK *et al.*, 2014), assim como o diclorometano (LIAO *et al.*, 2018; DAL MAGRO *et al.*, 2015). A Tabela 4 demonstra o resultado do *clean-up* através da recuperação do analito FMOC-glifosato na fase aquosa, tendo em vista que a concentração das amostras padrão analisadas foi de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de glifosato.

**Tabela 4:** Recuperação do FMOC-glifosato após *clean-up*

Solvente do Clean-up	Recuperação	
	Média (%)	RSD (%)
Diclorometano	101,99 <sup>a</sup>	0,47
Éter Etílico	102,51 <sup>a</sup>	0,50
Hexano	75,54 <sup>b</sup>	1,16

As letras representam a diferença estatística a partir do Teste de Tukey (P<0,05%). RSD representa o desvio padrão relativo.

O desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação dos resultados apresentados na Tabela 4 são considerados aceitáveis, visto que, para análises de resíduos de pesticidas o valor aceitável é de até 20% (BRITO *et al.*, 2003). As recuperações obtidas também são consideradas aceitáveis, pois estão dentro da faixa que é aceita para análise de resíduos de pesticidas (70-120%) (ABREU; MATTA e MONTAGNER, 2008). Por não apresentar diferenças estatísticas significativas entre éter e diclorometano, o *clean-up* com esses solventes são os mais indicados. O hexano, além de apresentar recuperação significativamente menor comparado aos demais solventes testados, apresentou perda de analito da fase aquosa para a fase orgânica, de difícil identificação, provavelmente por ter sido co-eluído na análise por HPLC. A Figura 3 demonstra, através dos cromatogramas, a eficiência do *clean-up* quanto a remoção do FMO-CI residual da fase aquosa das amostras.



**Figura 3:** As figuras representam os cromatogramas (mAU x min) das análises de *clean-up* de amostras padrão com concentração de  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de glifosato derivatizadas com FMO-CI: **A)** Amostra sem *clean-up*; **B)** *Clean-up* com diclorometano; **C)** *Clean-up* com éter-etílico; **D)** *Clean-up* com hexano

Na busca do melhor solvente orgânico para *clean-up* de amostra, entre diclorometano, éter etílico e hexano, optou-se por trabalhar com o diclorometano. Os resultados obtidos com hexano não corresponderam às expectativas, não foi

possível através deste *clean-up* remover grande parte das substâncias interferentes na amostra, e a baixa eficiência desta limpeza acabou interferindo inclusive na quantificação do analito. Muito embora, os resultados de recuperação para o *clean-up* com diclorometano e éter etílico sejam muito semelhantes, optou-se pelo diclorometano visto que permitiu uma maior remoção de substâncias interferentes presentes na amostra, incluindo o FMOC-Cl residual.

### 3.2 OTIMIZAÇÃO DA COLUNA ANALÍTICA

Os resultados das análises de eficiência de coluna podem ser verificados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Média e desvio padrão da altura dos pratos teóricos (N) entre cada concentração analisada. As letras representam diferença estatística (P<0,05%), Teste de Tukey.

Coluna	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )						
	0,01	0,02	0,05	0,1	0,5	1	2,5
<b>C18 Zorbax Analytical</b>	0,0152 ±0,0097 <sup>b</sup>	0,0299 ±0,0026 <sup>b</sup>	0,0186 ±0,0008 <sup>b</sup>	0,0133 ±0,0006 <sup>b</sup>	0,0101 ±0,0002 <sup>b</sup>	0,0092 ±0,0004 <sup>b</sup>	0,0098 ±0,0002 <sup>b</sup>
<b>C18 Core Shell</b>	0,0035 ±0,0001 <sup>a</sup>	0,0035 ±0,0001 <sup>a</sup>	0,0049 ±0,0006 <sup>a</sup>	0,0059 ±0,0001 <sup>a</sup>	0,0049 ±0,0002 <sup>a</sup>	0,005 ±0,0007 <sup>a</sup>	0,0033 ±0,0024 <sup>a</sup>
<b>C18 Rapid Resolution</b>				0,0145 ±0,0014 <sup>b</sup>	0,013 ±0,0005 <sup>c</sup>	0,0121 ±0,0004 <sup>c</sup>	0,01 ±0,0001 <sup>b</sup>

As letras representam a diferença estatística a partir do Teste de Tukey (P<0,05%).

De acordo com o analisado na Tabela 5, a coluna C18 Core Shell Phenomenex obteve resultado superior quanto ao número de pratos teóricos, visto que, quanto menor a altura do prato teórico, maior será a eficiência da coluna (MEYER, 2010). Além disso, foi possível diminuir o tempo de corrida de 30 para 20 minutos. Este é um dos mais importantes objetivos alcançados com a tecnologia core-shell, a redução de tempo de análise durante uma corrida cromatográfica, o que consequentemente diminui o consumo de solventes e o volume de resíduos gerados (GONZÁLEZ-RUIZ; OLIVES; MARTÍN, 2015). A coluna C18 Rapid

Resolution não foi capaz de separar o analito nas três faixas de concentração menores, além de ser a coluna menos eficiente nos demais resultados.

### 3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

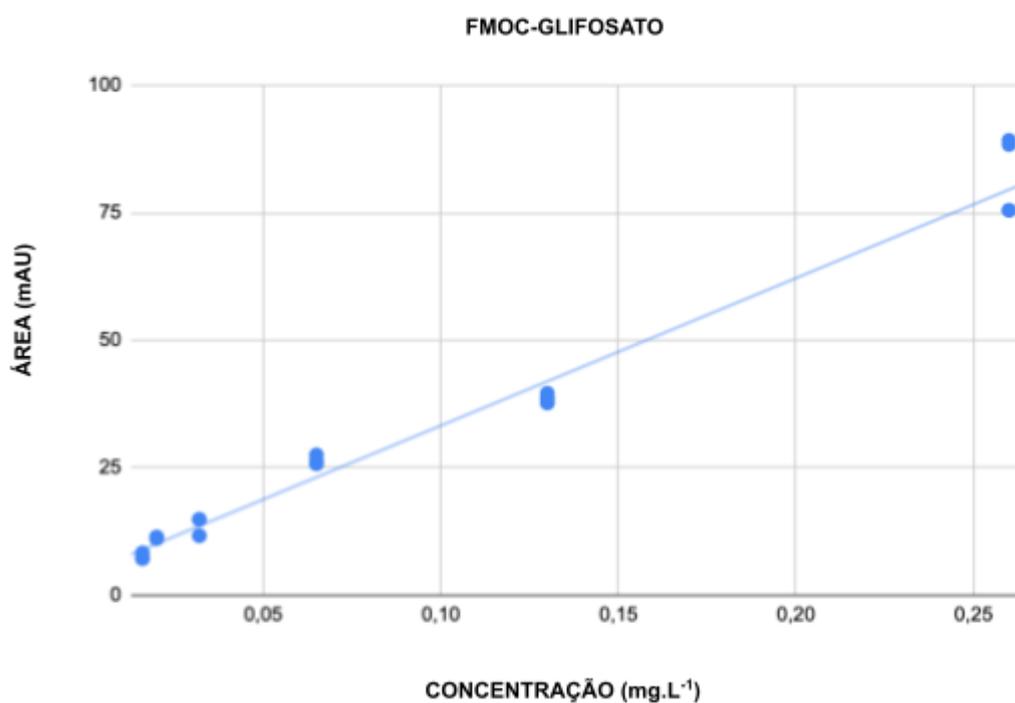
#### 3.3.1 LINEARIDADE

A Tabela 6 mostra as equações de regressão e coeficiente de correlação (R) e de determinação ( $R^2$ ) de cinco amostras padrão, preparadas a partir da solução de estoque de glifosato e AMPA com concentrações de 0,016; 0,032; 0,065; 0,13 e 0,26 mg.L<sup>-1</sup>. O coeficiente de determinação para FMOC-glifosato ( $R^2 = 0,982$ ) foi maior do que para FMOC-AMPA ( $R^2 = 0,993$ ).

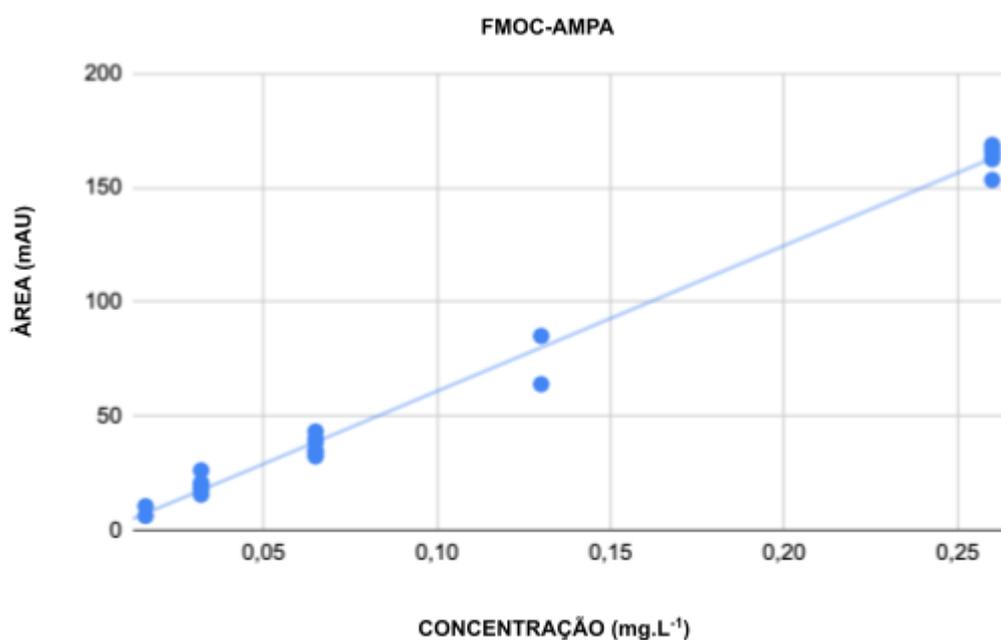
**Tabela 6:** Dados da curva de calibração de FMOC-glifosato e FMOC-AMPA

<b>Analito</b>	<b>Equação de regressão</b>	<b>R</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>FMOC-glifosato</b>	$y = 281,25x + 4.6967$	>0,99	0,982
<b>FMOC-AMPA</b>	$y = 637x - 2,73$	>0,99	0,993

De acordo com a RDC 166/2017 são admitidos os coeficientes de correlação (R) maiores que 0,990 (BRASIL, 2017), por tanto os resultados obtidos neste estudo foram considerados satisfatórios. De acordo com Brito et al. (2003) considera-se satisfatória a linearidade do gráfico quando o R da reta obtida não é estatisticamente diferente da unidade 9. Neste caso, o R obtido através do estudo de linearidade do FMOC-glifosato (Figura 4) e FMOC-AMPA (Figura 5), apresenta correlação é fortíssima ( $0,91 < R < 0,99$ ) (BRITO *et al.*, 2003).



**Figura 4:** Curva de calibração representando a linearidade do Fmoc-glifosato nas concentrações 0,016; 0,032; 0,065; 0,13 e 0,26 mg.L<sup>-1</sup>; coeficiente de determinação  $r^2=0,982$

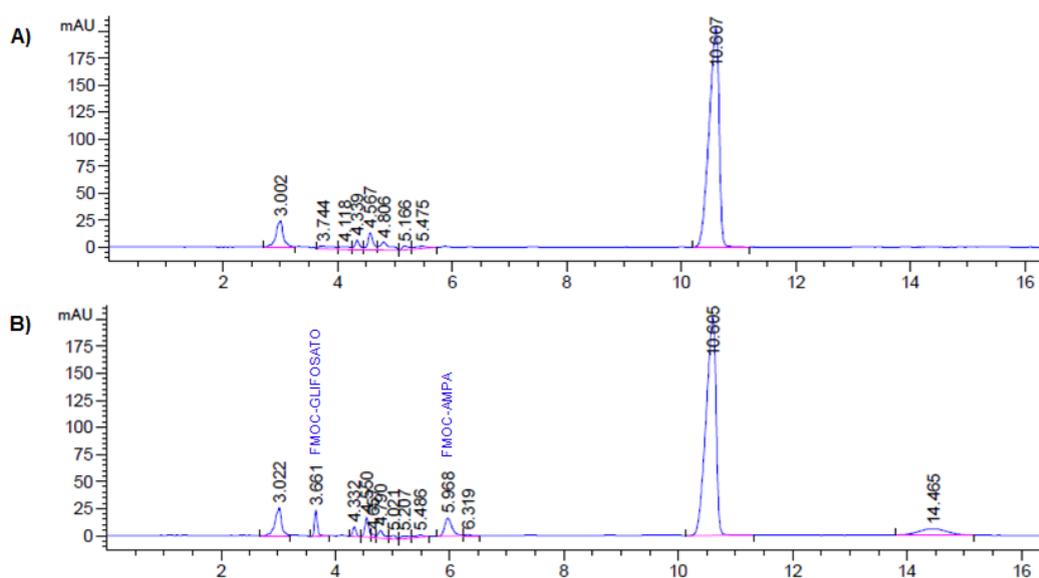


**Figura 5:** Curva de calibração representando a linearidade do Fmoc-AMPA nas concentrações 0,016; 0,032; 0,065; 0,13 e 0,26 mg.L<sup>-1</sup>; coeficiente de determinação  $r^2=0,993$ .

### 3.3.2 SELETIVIDADE

O termo "seletivo" significa que o método fornece respostas para uma série de substâncias químicas que podem ser distinguidas umas das outras (YUWONO e INDRAYANTO, 2005). A seletividade inclui a capacidade de separar o analito de produtos de degradação, metabólitos e medicamentos co-administrados contidos na amostra (BRESSOLLE; BROMET-PETIT e AUDRAN, 1996) .

A seletividade do método é demonstrada a partir da comparação de uma amostra em ausência do analito (branco) e outra amostra fortificada contendo a concentração de 0,26 mg.L<sup>-1</sup> de FMOC-glifosato e FMOC-AMPA. Na Figura 6B é possível observar a ocorrência de dois picos que não ocorrem na Figura 6A, estes picos correspondem aos analitos de interesse. No tempo de 3,661 min ocorre o FMOC-glifosato e no tempo de 5,968 min ocorre o FMOC-AMPA (Figura 6B).



**Figura 6:** **A)** o cromatograma corresponde à amostra padrão com ausência do analito; **B)** o cromatograma corresponde a uma amostra padrão contendo a concentração de 0,26 mg.L<sup>-1</sup> de FMOC-glifosato e FMOC-AMPA.

### 3.3.3 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) do método desenvolvido para determinar FMOC-glifosato e FMOC-AMPA em amostras de água são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** LD e LQ para glifosato e AMPA por HPLC-DAD.

Matriz	Analito	Parâmetros	
		LD (mg.L <sup>-1</sup> )	LQ (mg.L <sup>-1</sup> )
Água	FMOC-glifosato	0,007	0,035
	FMOC-AMPA	0,006	0,019

Conforme demonstrado na Tabela 7, o LD e o LQ do método analítico desenvolvido neste estudo, para determinar FMOC-glifosato e FMOC-AMPA em amostras de ambientais de água, correspondem às expectativas de atender os valores máximos permitidos tanto da portaria de consolidação do Ministério da Saúde, n.º 05/2017, que é de 500 µg.L<sup>-1</sup> (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) para glifosato e AMPA, quanto da resolução CONAMA 357/2005 que é de 65 µg.L<sup>-1</sup> (0,065 mg.L<sup>-1</sup>) e 280 µg.L<sup>-1</sup> (0,28 mg.L<sup>-1</sup>) para glifosato. Garba *et al.* (2018) alcançaram o LD e o LQ para FMOC-glifosato de 0,024 mg.L<sup>-1</sup> e 0,083 mg.L<sup>-1</sup> e para FMOC-AMPA de 0,076 mg.L<sup>-1</sup> e 0,247 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, em amostras de água utilizando HPLC-DAD.

### 3.3.4 PRECISÃO E EXATIDÃO

Os percentuais de recuperação e de desvio padrão relativo (RSD) do método desenvolvido para determinar FMOC-glifosato e FMOC-AMPA em amostras de água são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8:** % de recuperação e % de RSD para glifosato e AMPA em amostras de água.

Matriz	Analito	Parâmetros	
		Recuperação (%)	RSD (%)
Água	FMOC-glifosato	93,55 - 103,94	0,041 - 0,67
	FMOC-AMPA	96,67 - 103,28	0,17 - 0,41

Uma excelente precisão pode ser determinada através do valor de RSD próximo a zero, e a exatidão é a proximidade dos valores da concentração fornecida pelo ensaio analítico, ela é atingida quando os valores de recuperação ficam em torno dos 100% (PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO e CARDA-BROCH, 2015).

Portanto, os valores de recuperação e RSD alcançados a partir deste estudo (Tabela 8) demonstram a precisão e exatidão do método desenvolvido.

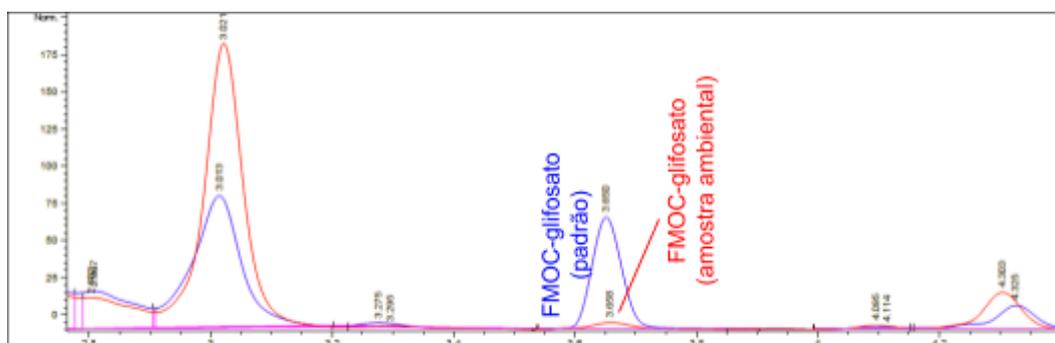
### 3.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS

Os resultados obtidos na análise de amostras ambientais de água, após a aplicação do método desenvolvido neste estudo constam na Tabela 9.

**Tabela 9:** Determinação de glifosato e AMPA em amostras ambientais de água.

Amostra de Água	Analito	
	FMOC-glifosato	FMOC-AMPA
Amostra Ambiental 1	0,078 mg.L <sup>-1</sup>	<L/D
Amostra Ambiental 2	<LD	<L/D

Na amostra ambiental de água 1 foi possível detectar e quantificar a presença de glifosato (Figura 7) em concentração equivalente a 0,078 mg.L<sup>-1</sup> (78 µg.L<sup>-1</sup>). Segundo a resolução CONAMA 357/2005 para águas doces de classe um, o valor máximo permitido para resíduos de glifosato nesses ambientes é de 0,065 mg.L<sup>-1</sup> (65 µg.L<sup>-1</sup>), ou seja, o valor determinado neste ambiente excede o valor permitido.



**Figura 7:** Cromatograma indicando a presença de glifosato na amostra ambiental de água 1. Estão sobrepostos os cromatogramas correspondentes à amostra padrão de glifosato derivatizada com FMOC-Cl (em azul) e à amostra ambiental de água também derivatizada com FMOC-Cl (em vermelho).

A resolução CONAMA 357/2005 para águas doces de Classe I define que essas águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado, à proteção das comunidades aquáticas, à recreação de contato primário (natação, esqui aquático e mergulho), à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que

sejam ingeridas cruas sem remoção de película e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas (BRASIL, 2005). Infelizmente usuários e ecossistemas dependentes da água desse ambiente, podem sofrer consequências pela exposição ao glifosato, principalmente em concentrações acima do permitido pela legislação.

A presença de glifosato neste ambiente pode ser decorrente da atividade agrícola intensiva ali desenvolvida. A maioria das pesquisas de resíduos de glifosato em amostras ambientais de água têm se concentrado em áreas agrícolas (VAN STEMPOORT *et al.*, 2014). Van Stempvoort *et al.* (2016), demonstraram a ocorrência de níveis de glifosato e AMPA em águas subterrâneas rasas e superficiais em uma bacia hidrográfica rural do Canadá, com predominância de atividade agrícola, embora esses níveis estivessem abaixo do permitido pelas diretrizes canadenses, eles puderam demonstrar que o glifosato e seu produto de degradação, AMPA, persistem por tempo suficiente no ambiente para serem transportados através da zona de solo insaturado e acabarem em águas subterrâneas. Outros estudos também constataram a presença de glifosato e AMPA em amostras ambientais de água (REYNOSO *et al.*, 2020; STRUGER; VAN STEMPOORT e BROWN, 2015; APARICIO *et al.*, 2013)

#### 4. REFERÊNCIAS

ABBASPOUR, M.; FARAJZADEH, M. A.; SOROURADDIN, S. M.; MOHEBBI, A. Monitoring of nine pesticides in different cereal flour samples with high performance liquid chromatography-diode array detection. **Analytical Methods**, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c9ay00935c>>.

ABREU, A. B. G., MATTA, M. H. R., MONTAGNER, E. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 1, 5-9, 2008.

APARICIO, V. C.; DE GERÓNIMO, E.; MARINO, D.; PRIMOST, J.; CARRIQUIRIBORDE, P.; COSTA, J. L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, 93(9), 1866–1873. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.06.041

BRASIL. Resolução nº 357/2005, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF: Conselho Nacional Do Meio Ambiente-CONAMA. DOU nº 053, de 18 de março de 2005, páginas 58-63.

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF: Ministério da Saúde. DOU nº 239, de 14 de dezembro de 2011, Seção 1, páginas 39/46

BRASIL. Resolução (RDC) nº. 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF: Ministério da Saúde. DOU: nº 141, de 25 de julho de 2017, | Seção: 1, Página: 87.

BRESSOLLE, F., BROMET-PETIT, M., & AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, 1996. 686(1), 3–10. doi:10.1016/s0378-4347(96)00088-6

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

CATRINCK, T. C. P. G.; TEREZA C. P.; 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**, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140096>>.

CARLES, L.; GARDON, H.; JOSEPH, L.; SANCHÍS, J.; FARRÉ, M.; ARTIGAS, J. Meta-analysis of glyphosate contamination in surface waters and dissipation by biofilms. **Environment International**, [S. l.], v. 124, p. 284–293, 2019

CARRETTA, L.; CARDINALI, A.; MAROTTA, E.; ZANIN, G.; MASIN, R. A new rapid procedure for simultaneous determination of glyphosate and AMPA in water at sub µg/L level. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 1600, p. 65–72, 2019.

CORAZZA, G.; MERIB, J.; DO CARMO, S.; MENDES, L.; CARASEK, E. Assessment of a Fully Optimized DPX-Based Procedure for the Multiclass Determination of Pesticides in Drinking Water Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190016>>.

DAL MAGRO, J., OLIVO, V. E., TANSINI, A., CARASEK, F., CORDENUZZI, D., FERNANDES, S.; FRAGOSO, A. Rapid method for determination of glyphosate in groundwater using high performance liquid chromatography and solid-phase extraction after derivatization. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, 2015. 10(2). <[doi:10.4136/ambi-agua.1548](https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1548)>.

DRUART, C.; DELHOMME, O.; DE VAUFLEURY, A.; NTCHO, E.; MILLET, M. Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. **Analytical and bioanalytical chemistry**, [S. l.], v. 399, n. 4, p. 1725–1732, 2011.

DUKE, S. O. The history and current status of glyphosate. **Pest management science**, [S. l.], v. 74, n. 5, p. 1027–1034, 2018.

EHLING, S.; REDDY, T. M. Analysis of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Nutritional Ingredients and Milk by Derivatization with Fluorenylmethyloxycarbonyl Chloride and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 48, p. 10562–10568, 2015.

GARBA, J. et al. Simplified method for derivatization of extractable glyphosate and aminomethylphosphonic acid and their determination by high performance liquid chromatography. **Environmental Research & Technology**, Vol. 1(2), pp. 19-30, 2018.

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

GONZÁLEZ-RUIZ, V.; OLIVES, A. I.; MARTÍN, M. A. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. **Trends in analytical chemistry: TRAC**, [S. l.], v. 64, p. 17–28, 2015.

GUYTON, K. Z.; LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; EL GHISSASSI, F.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; SCOCCIANI, C.; MATTOCK, H.; STRAIF, K. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet Oncology**, 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(15\)70134-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(15)70134-8)>.

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**, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-2134-5>>.

IARC. **Some Organophosphate Insecticides and Herbicides**. [s.l.] : IARC Monographs on the Evaluation, 2017.

KACZYŃSKI, P.; ŁOZOWICKA, B. Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection. **Open Chemistry**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 932, 2015.

KOSKINEN, W. C.; MAREK, L. J.; HALL, K. E. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, plant materials and soil. **Pest management science**, [S. l.], v. 72, n. 3, p. 423–432, 2016.

LIAO, Y.; BERTHION, J.-M.; COLET, I.; MERLO, M.; NOUGADÈRE, A.; HU, R. Validation and application of analytical method for glyphosate and glufosinate in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 1549, p. 31–38, 2018.

MEYER, V. R. (2010). **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 5<sup>a</sup> ed. [S.l.]: John Wiley & Sons.

OKADA, E.; COGGAN, T.; ANUMOL, T.; CLARKE, B.; ALLINSON, G. A simple and rapid direct injection method for the determination of glyphosate and AMPA in environmental water samples. **Analytical and bioanalytical chemistry**, [S. l.], v. 411, n. 3, p. 715–724, 2019.

PERIS-VICENTE, J.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview. **Analytical Separation Science**, 2015.1757–1808. <doi:10.1002/9783527678129.assep064>

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**, [S. l.], v. 635, n. 2, p. 222–226, 2009.

REYNOSO, E. C.; PEÑA, R. D.; REYES, D.; CHAVARIN-PINEDA, Y.; PALCHETTI, I.; TORRES, E. . Determination of Glyphosate in Water from a Rural Locality in México and Its Implications for the Population Based on Water Consumption and Use Habits. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2020.17(19), 7102. <doi:10.3390/ijerph17197102>.

SHILO, T.; ZYGIER, L.; RUBIN, B.; WOLF, S.; EIZENBERG, H. Mechanism of glyphosate control of *Phelipanche aegyptiaca*. **Planta**, [S. l.], v. 244, n. 5, p. 1095–1107, 2016.

STRUGER, J., VAN STEMPVOORT, D. R., & BROWN, S. J. (2015). Sources of aminomethylphosphonic acid (AMPA) in urban and rural catchments in Ontario, Canada: Glyphosate or phosphonates in wastewater? **Environmental Pollution**, 204, 289–297. <doi:10.1016/j.envpol.2015.03.038>.

- TADEO, J. L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; PÉREZ, R. A.; FERNÁNDEZ, M. D. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 882, n. 1-2, p. 175–191, 2000.
- THONGPRAKAISANG, S.; THANTANAWAT, A.; RANGKADILOK, N.; SURIYO, T.; SATAYAVIVAD, J. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, [S. l.], v. 59, p. 129–136, 2013.
- TUZIMSKI, T. Application of SPE-HPLC-DAD and SPE-HPTLC-DAD to the analysis of pesticides in lake water. **Journal of Planar Chromatography – Modern TLC**, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1556/jpc.22.2009.4.1>>.
- TUZIMSKI, T.; REJCZAK, T.. Application of HPLC-DAD after SPE/QuEChERS with ZrO<sub>2</sub>-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. **Food chemistry**, [S. l.], v. 190, p. 71–79, 2016.
- VAN STEMPVOORT, D. R.; ROY, J. W.; BROWN, S. J.; BICKERTON, G. Residues of the herbicide glyphosate in riparian groundwater in urban catchments. **Chemosphere**, [S. l.], v. 95, p. 455–463, 2014.
- VAN STEMPVOORT, D. R.; SPOELSTRA, J.; SENGER, N. D.; BROWN, S. J., POST, R.; STRUGER, J. . Glyphosate residues in rural groundwater, Nottawasaga River Watershed, Ontario, Canada. **Pest Management Science**, 2016. 72(10), 1862–1872. doi:10.1002/ps.4218
- WANG, S.; SEIWERT, B.; KASTNER, M.; MILTNER, A.; SCHAFFER, A.; REEMTSMA, T.; YANG, Q.; NOWAK., K. M. (Bio)degradation of glyphosate in water-sediment microcosms – A stable isotope co-labeling approach. **Water research**, [S. l.], v. 99, p. 91–100, 2016.
- WANG, X.; MENG, X.; WU, Q.; WANG, C.; WANG, Z. Solid phase extraction of carbamate pesticides with porous organic polymer as adsorbent followed by high performance liquid chromatography-diode array detection. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 1600, p. 9–16, 2019.
- XI, X.; YANG, M.; SHEN, G.; WU, X.; LU, R.; ZHOU, W.; ZHANG, S.; GAO, H. Pipette vial dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of benzoylurea insecticide in fruit juice. **Journal of separation science**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 391–398, 2016.
- YUWONO, M.; INDRAYANTO, G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, 2005. Volume 32, 243–259. <doi:10.1016/s0099-5428(05)32009-0>.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo desenvolvido ao longo deste período permitiu o incremento de novas técnicas analíticas ao repertório tão vasto e precioso da Química do Instituto Federal Sul Rio Grandense - Câmpus Pelotas. Permitiu aos analistas envolvidos a aquisição de conhecimentos inovadores, que irão contribuir para a trajetória pessoal e profissional de cada membro envolvido nesta pesquisa. Esta metodologia permitiu estudos colaborativos com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FURG), dos quais resultou na publicação de um excelente artigo científico. Somado a isso, ainda como fruto deste estudo, submetemos outro artigo científico sobre os "Desafios metodológicos na análise de Glifosato e AMPA em amostras ambientais", e um mais a ser submetido, sobre o "Otimização de metodologia analítica para a determinação de glifosato e ampa em amostras ambientais de água, derivatizadas com FMOC-Cl, utilizando HPLC-DAD".

Além desta produção incluída nesta dissertação, destaco artigo (no prelo) em colaboração com o Biólogo da FEPAM e aluno do PPGECA Leandro Campelo, onde foi possível utilizar a técnica desenvolvida de forma prática, sendo detectado glifosato em amostras ambientais na Reserva Ambiental do Mato Grande. Outra produção técnica foi a criação de um banco de espectros de FMOC-Cl, FMOC-Glifosato e FMOC-AMPA que poderá ser acessado e compartilhado por demais pesquisadores que desejarem replicar o método desenvolvido neste trabalho, auxiliando a identificação de cada composto. Este trabalho contribuiu também para o desenvolvimento de métodos que estão além da análise de glifosato. As técnicas de derivatização, uma vez dominadas pelo grupo de pesquisa, puderam ser extrapoladas para outros analitos. O exemplo é um trabalho desenvolvido em parceria com a Universidade Federal de Pelotas na análise de açúcares redutores em extratos de plantas por HPLC/DAD (em andamento), utilizando técnica similar. As descobertas acerca deste estudo, deixam um legado para o Câmpus Pelotas, que poderá ser desfrutado por toda a comunidade acadêmica.

## 6. ANEXOS

### 6.1 NORMAS DA REVISTA DO ARTIGO SUBMETIDO

Artigo Nº 2, Vide Seção 4.2, Página 33



Órgão oficial de informação técnica da ABES - Rio de Janeiro – Brasil

janeiro 2016

## Regulamento para apresentação de contribuições

### 1. Objetivo

O presente regulamento objetiva uniformizar a apresentação das contribuições a serem encaminhadas para publicação na Revista Engenharia Sanitária e Ambiental.

### 2. Formas de contribuição

2.1. As formas de contribuição são:

- Artigo Técnico
- Nota Técnica
- Revisão da Literatura
- Discussão de Nota Técnica, Artigo Técnico ou Revisão da Literatura

2.2. Artigo Técnico é uma exposição completa e original, totalmente documentada e interpretada, de um trabalho de relevância.

2.3. Nota Técnica é um trabalho sumário podendo corresponder a:

- artigo com resultados ainda parciais
- considerações sobre aspectos pouco abrangentes da área
- desenvolvimento de considerações técnicas relativas a algum aspecto da Engenharia Sanitária e Ambiental
- alguma outra abordagem sumária pertinente, a juízo dos Editores.

2.4. Revisão da Literatura corresponde a um artigo, no qual é levantado o estado da arte de algum tema relevante e inovador, na área de Engenharia Sanitária e Ambiental, cuja abordagem deve ser suficientemente crítica e capaz de identificar avanços, lacunas e desafios científicos, à luz da literatura nacional e internacional. Trabalhos de revisão sistemática e meta-análise podem ser incluídos nessa categoria de artigo.

2.5. Discussão é uma avaliação crítica ou ampliação do conteúdo de uma Nota Técnica, Artigo Técnico ou Revisão da Literatura publicado na Revista. As discussões serão publicadas, sempre que possível, conjuntamente com a resposta do(s) autor(es). A Revista tem como linha editorial o incentivo à publicação de artigos de discussão.

2.6. Não serão aceitos relatórios, traduções e nem artigos já publicados ou submetidos à publicação em outros veículos, ou que impliquem em promoção comercial de determinada marca, produto ou empresa.

### 3. Encaminhamento das contribuições

3.1. A inscrição das contribuições será feita pelo sistema da SCielo, através do link <http://submission.scielo.br/index.php/esa/index>. Não serão aceitas inscrições de artigos por fax, e-mail ou correio.

3.2. O primeiro passo para o acesso ao sistema é o Cadastro, bastando clicar em "Cadastrar-se" no link no canto superior direito. A partir daí, clicar em "Engenharia Sanitária e Ambiental", que fará a vinculação do cadastro junto à Revista.

3.3. Feito isso, o próprio sistema mostrará, passo a passo, como submeter a sua contribuição.

3.4. Realizada a submissão, o autor receberá um e-mail acusando o recebimento da mesma. E a partir do código dado pelo próprio sistema que o autor poderá acompanhar o processo de avaliação do seu trabalho.

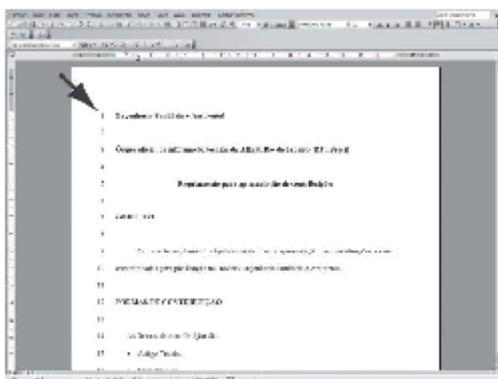
3.5. A Revista Engenharia Sanitária e Ambiental cobra taxa de submissão no valor de: **R\$ 100,00**.

A taxa destina-se a não sócios da ABES. Caso o autor principal seja sócio, enviar e-mail para [esa@abes-dn.org.br](mailto:esa@abes-dn.org.br) informando número de matrícula ABES para isentar-se da taxa. Observação: A taxa de submissão não será restituída caso o manuscrito seja recusado, e o pagamento da taxa não garante o aceite do artigo, que passará normalmente pelo processo de avaliação. Associe-se à ABES: <http://socio.abes-dn.org.br/>

3.6. Qualquer dúvida, favor enviar e-mail para [esa@abes-dn.org.br](mailto:esa@abes-dn.org.br).

## 4. Formato das contribuições

4.1. As contribuições devem ser preparadas pelos autores no formato ".doc" aberto para edição usando o recurso de numeração de linhas do Microsoft Word (Arquivo – Configurar página – Layout – Números de linha – Numerar linhas – Contínua – OK – OK).



4.2. As contribuições devem ser enviadas no formato ".doc" pelo Sistema de Envio de Artigos. Todos os demais formatos de arquivos, inclusive os compactados, serão bloqueados.

4.3. Após o processo avaliativo, as contribuições aprovadas para publicação deverão sofrer correções e ser enviadas em sua versão final para diagramação.

4.3. Os trabalhos submetidos devem estar de acordo com as normas da ABNT/NBR 14724:2011– Trabalhos Acadêmicos

4.4. Poderão ser incluídos figuras, gráficos e ilustrações, desde que o tamanho do arquivo não ultrapasse 10MB.

4.5. O texto integral do artigo não poderá exceder 20 (vinte) páginas para Artigo Técnico e Revisão da Literatura e 8 (oito) páginas para Nota Técnica e Discussão, atendendo ao formato estabelecido nos itens a seguir.

4.6. O Artigo Técnico e a Nota Técnica deverão seguir a seguinte sequência de apresentação:

- Título do artigo em português (até 200 caracteres) e em inglês
  - Resumo em português e em inglês, de 100 a 250 palavras (conforme NBR 14724).
  - Palavras-chave em português e em inglês
  - Título resumido do artigo em português (até 60 caracteres) para o cabeçalho
  - Texto do artigo (sem divisão em colunas)
  - Referências
  - Anexos (se houver)
    - i. Agradecimentos, se houver, deverão ser incluídos somente na versão final do artigo aprovado para publicação.
    - ii. O Nome do(s) autor(es), Currículo resumido(s) do(s) autor(es), endereço para correspondência (profissional) devem constar somente nos metadados do Sistema Scielo, preenchidos no momento de cadastro. **IMPORTANTE:** não colocar estas informações no envio da contribuição original.
- 4.7. O texto deverá ser formatado para um tamanho de página A-4, margens 3 cm para esquerda e superior, e 2 cm inferior e direita (conforme NBR 14724). As páginas deverão ser devidamente numeradas. Deve ser empregada fonte Times New Roman, corpo 12, exceto no título que deverá ter corpo 16. O espaçamento entre as linhas deverá ser 1,5.
- 4.8. O corpo do artigo deve ser organizado segundo um encadeamento lógico, contendo subtítulos "Introdução", "Metodologia", "Resultados", "Discussão", (ou "Resultados e Discussão"), "Conclusões" e "Referências". Na redação não deve ser empregada a primeira pessoa e o estilo a ser adotado deve ser objetivo e sóbrio, compatível com o recomendável para um texto científico.
- 4.10. Deverá ser evitada a subdivisão do texto em um grande número de subtítulos ou itens, admitindo-se um máximo de cabeçalhos de terceira ordem.
- 4.11. O conteúdo do trabalho deve ser submetido a criteriosa revisão ortográfica.
- 4.12. Termos grafados em itálico ou negrito poderão ser utilizados no corpo do artigo.
- 4.13. As discussões deverão ser submetidas no máximo até 6 (seis) meses após a publicação do Artigo, NotaTécnica ou Revisão da Literatura.
- 4.14. Somente serão aceitos trabalhos em português Brasil.

## 5. Figuras e ilustrações

As figuras e ilustrações devem observar os seguintes critérios:

- 5.1. Os arquivos das figuras e ilustrações, sem bordas ao redor, devem ser inseridas no arquivo do texto, de maneira que possam ser editados por meio do MS Word for Windows.
- 5.2. Os textos e legendas não devem ficar muito pequenos ou muito grandes em relação à figura.
- 5.3. As figuras devem ser intercaladas nos locais apropriados e apresentar um título.
- 5.4. A inclusão de fotografias não é aconselhável; porém, se os autores julgarem que são importantes para esclarecer aspectos relevantes do artigo, deverão ser inseridas em resolução mínima de 300 dpi.
- 5.5. Todos os gráficos, desenhos, figuras e fotografias devem ser denominados "Figura", e numerados sequencialmente em algarismos arábicos. Toda figura deve ser mencionada no texto.
- 5.6 O número e título da Figura devem ser colocados centralizados, imediatamente abaixo da figura. O título deve ser claro e autoexplicativo.
- 5.7. As páginas internas da Revista são impressas em uma só cor, não sendo permitida, portanto, a adoção de cores na diferenciação das variáveis nos gráficos e diagramas.

## 6. Quadros e tabelas

Os quadros e tabelas deverão atender os seguintes critérios:

6.1. Os quadros e tabelas devem ser claros e objetivos, sem linhas de grade. As unidades correspondentes a todos os termos usados devem ser claramente identificadas.

6.2. Todos os quadros ou tabelas devem ser denominados "Quadro" ou "Tabela", numerados sequencialmente em algarismos arábicos e mencionados no texto.

6.3. Cada quadro e tabela, além da numeração, deve possuir um título. O número e o título devem ser colocados centralizados, imediatamente acima do quadro ou tabela. O título deve ser claro e autoexplicativo.

6.4. Um quadro e uma tabela não poderão ser maiores do que uma folha A-4.

6.5. Quadros e tabelas devem aparecer, preferencialmente, intercalados nos locais apropriados do texto, a critério do autor.

6.6. As páginas internas da Revista são impressas em uma só cor, não sendo permitida, portanto, a adoção de cores na diferenciação das variáveis nos quadros e tabelas.

## 7. Equações

As equações podem ser editadas pela equipe responsável pela diagramação. Portanto, os seguintes critérios devem ser satisfeitos:

7.1. As equações devem ser claras e legíveis, e escritas com a mesma fonte do corpo do texto, sem a utilização de itálico ou negrito.

7.2. As equações e fórmulas devem ser denominadas "Equação" e numeradas sequencialmente em algarismos arábicos. A numeração à direita da equação deve ser entre parênteses. Todas as equações devem ser mencionadas no texto.

7.3. Todos os símbolos usados devem ser definidos imediatamente após a equação (caso não tenham sido definidos anteriormente), incluindo as suas unidades ou dimensões.

## 8. Unidades

8.1. Todas as unidades mencionadas no texto, tabelas, quadros e figuras devem ser expressas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI).

8.2. Deve-se evitar o uso da barra de fração na expressão das unidades. Exemplo: Ao invés de mg/L ou m<sup>3</sup>/s, deve-se utilizar mg.L<sup>-1</sup> e m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>.

## 9. Referências

As referências citadas no texto e listadas ao final do artigo deverão estar de acordo com a norma NBR 6023/2002. A título de esclarecimento são apresentadas algumas diretrizes:

9.1. As referências citadas no texto devem conter o sobrenome do(s) autor(es), em caixa alta, seguidos pelo ano da publicação, observando-se os seguintes critérios:

9.1.1. Quando houver mais de um trabalho, as citações devem ser em ordem alfabética.

9.1.2. Trabalhos com mais de três autores devem ser referenciados ao primeiro autor, seguido por "et al." (em itálico e com ponto).

9.1.3. Quando houver mais de uma publicação do mesmo autor, no mesmo ano, o ano da publicação deve ser seguido dos componentes "a, b, c...", em ordem alfabética.

Exemplos: ... estudos efetuados por Silva (1994a, 1994b) e por Machado *et al.* (1995a) revelaram...; ... estudos recentes (SOUZA, 1993; SILVA, WILSON e OLIVEIRA, 1994; MACHADO *et al.*, 1995b) revelaram...

9.2. Ao final do trabalho deverá ser apresentada uma lista de todas as referências citadas no texto, de acordo com os seguintes critérios, entre outros:

9.2.1. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, de acordo com o sobrenome do primeiro

autor.

9.2.2. Devem ser referenciados todos os autores (independentemente do número de autores) pelo sobrenome seguido pelas iniciais de cada autor, separados por vírgulas.

Exemplo: SMITH, P.J.; WATSON, L.R.M.; GREEN, C.M...

9.2.3. O título do periódico referenciado deverá ser apresentado em itálico. As indicações de volume, número e página deverão ser identificados pela letra inicial ("v", "n" ou "p"), seguida de ponto. Não devem ser utilizadas aspas antes e depois do título do trabalho.

Exemplo: JEWELL, W.J.; NELSON, Y.M.; WILSON, M.S. Methanotrophic bacteria for nutrient removal from wastewater: attached film systems. *Water Environment Research*, v. 64, n. 6, 1992, p. 756-85.

9.2.4. O título do livro deve ser apresentado em itálico. Devem ser incluídos a edição, o local, a editora, o número de páginas e a data.

Exemplo: FRANÇA, J.L.; VASCONCELOS A.C. *Manual para Normalização de Publicações Técnico-Científicas*. 8 ed. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2007, 255 p.

9.2.5. Em capítulos de livros e trabalhos de congressos, a obra principal (título do livro ou denominação do congresso) é referenciada em itálico e vem precedida da expressão "In".

Exemplos: Anais - CAIXINHAS, R.D. Avaliação do impacto ambiental de empreendimentos hidro-agrícolas. In: *Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 5 Anais... Lisboa: APRH, 1992, p. 203-11.

Capítulo de Livro - KUKOR, J.J.; OLSEN, R.H.; IVES, K. Diversity of toluene degradation following exposure to BTEX in situ. In: KAMELY, D.; CHAKABARTY, A.; OLSEN, R.H. (Eds.) *Biotechnology and Biodegradation*. Portfolio Publishing Company, The Woodlands, E.U.A., 1989, p. 405-421.

## 10. Julgamento

10.1. Após avaliação prévia realizada pelos Editores da Revista, se considerado pertinente, cópias da contribuição, sem identificação dos autores, serão enviadas a pelo menos dois avaliadores, especialistas da área, indicados pelos Editores.

10.2. Em qualquer etapa de julgamento do trabalho, serão levados em consideração a obediência às disposições regulamentares, o relacionamento do tema à Engenharia Sanitária e Ambiental, adequação do título, do resumo e das palavras-chave, existência de encadeamento lógico, ineditismo e qualidade da contribuição.

10.3. Na análise dos editores e dos avaliadores a contribuição será classificada segundo uma das seguintes categorias:

- Aceito
- Revisões requeridas
- Rejeitar

## 11. Comunicação aos autores

O autor principal será comunicado do resultado da avaliação e no caso de artigos recusados, receberão as devidas justificativas.

## 12. Número de autores

O número de autores permitido para cada submissão é de até cinco. Casos excepcionais enviar email para [esa@abes-dn.org.br](mailto:esa@abes-dn.org.br) para consulta.

### **13. Responsabilidades e direitos**

O conteúdo dos artigos é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es), que declaram se responsabilizar por qualquer reclamação de terceiros quanto a conflitos envolvendo direitos autorais, assumindo e isentando a ESA/ABES de qualquer pendência envolvendo suas publicações. Os autores que encaminharem seus artigos cedem à ESA/ABES os respectivos direitos de reprodução e/ou publicação. Os casos omissos serão resolvidos pelos editores do periódico.

## 7. APÊNDICES

**Tabela Auxiliar:** Limites de Detecção e de Quantificação utilizando três métodos diferentes (S/N, dados da curva analítica, análise de regressão)

Analito	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO (mg.L <sup>-1</sup> )	METODOLOGIA		
		S/N	Curva	Regressão
FMOC-Glifosato	LD	0,007	0,055	0,047
	LQ	0,035	0,166	0,013
FMOC-AMPA	LD	0,006	0,014	0,013
	LQ	0,019	0,04	0,040