

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

Cintia Franco Rodrigues Mendonça

**Determinação de glifosato e AMPA nas águas superficiais da
Bacia do Paraná 3.**

Araraquara

2018

Cintia Franco Rodrigues Mendonça

**Determinação de glifosato e AMPA nas águas superficiais da
Bacia do Paraná 3.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do título de Mestre em Química - Programa de Pós-Graduação em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Theodoro Toci.

Co-orientadora: Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza.

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

M539d Mendonça, Cintia Franco Rodrigues
Determinação de glifosato e AMPA nas águas superficiais da
Bacia do Paraná 3 / Cintia Franco Rodrigues Mendonça. –
Araraquara : [s.n.], 2018
129 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Aline Theodoro Toci

Coorientador: Helena Redigolo Pezza

1. Bacia do Paraná. 2. Glifosato. 3. Qualidade ambiental.
4. Preparo de amostras (Química). 5. Análise cromatográfica.
I. Título.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO:

AUTORA: CINTIA FRANCO RODRIGUES MENDONÇA

ORIENTADORA: ALINE THEODORO TOCI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ALINE THEODORO TOCI
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza / Universidade Federal da Integração Latino
America - UNILA - Foz do Iguaçu

Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MARIO HENRIQUE GONZALEZ
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP -
São José do Rio Preto

Araraquara, 20 de fevereiro de 2018.

Agradecimentos

A minha querida mãe Miriam, que desde o início me incentivou a ser forte nas dores e a me manter firme nos períodos de instabilidade.

Aos meus irmãos Guilherme e Luíz, que mesmo distantes, guiaram e orientaram meus passos.

Ao meu pai Luíz, que não sabe que aqui estou, mas que ainda tenho esperanças que um dia virá a ler o meu trabalho.

Aos professores do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, pelo conhecimento transmitido e pela condução do trabalho.

A professora Aline Theodoro Toci, pela paciência, compreensão, orientação e incentivo.

Aos amigos do grupo de pesquisa Fritz Feigl, pelo apoio e momentos de descontração.

Aos amigos do LEIMA, pelo companheirismo, suporte e por tornar os trabalhos mais brandos.

As minhas amigas Bruna, Viviene e Paula, que mesmo distantes mantiveram-se presentes na minha vida.

Ao Parque Tecnológico de Itaipu (FPTI) e aos colaboradores da Itaipu, Simone e Jussara, pelo apoio financeiro e técnico durante o projeto.

“...Não esqueça filho, que uma rosa não é uma rosa. Uma rosa é uma manhã...uma mulher...um canto de flor. Uma rosa é invenção sua. Você lhe dá sentido. Você o faz bonito. Você o cobre de cores. Um brinquedo... o que é um brinquedo? Uma ou três partes de plástico...de lata? Uma matéria fria, sem alegria, sem história? Mas não é isso, não é filho?...porque você lhe dá vida. Você faz ele voar...viajar. Vamos filho, sabe que lugar é este? Um lugar de sonhos. Uma casa de brinquedos. Vamos entrar?”

Toquinho e Fernando Faro

(Abertura do disco “Casa de Brinquedos” Toquinho, 1983)

Resumo

MENDONCA, C. F. R. **Determinação de Glifosato e AMPA nas Águas Superficiais da Bacia do Paraná 3**. 2018. 126p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2018.

Atualmente, o glifosato é o herbicida de maior uso para o controle de ervas daninhas, sendo muito utilizado em culturas resistentes, como as culturas de soja e milho. O glifosato é aplicado diretamente sobre a folhagem das plantas, porém uma parte acaba indo para o solo. Do solo, tanto o glifosato quanto seu metabólito, ácido aminometilfosfônico (AMPA) podem ser lixiviados para águas superficiais ou subterrâneas. Por conta disto, têm se gerado preocupações quanto ao seu potencial tóxico. A presente dissertação teve como objetivo avaliar a contaminação com glifosato e AMPA das águas superficiais de microbacias situadas na Bacia do Paraná 3 (Paraná-BR). Selecionou-se microbacias situadas próximas a regiões com plantios de soja e milho, assim como o período de coleta das amostras foi escolhido dentro do época de plantio destas culturas. Estudou-se dois métodos de preparo das amostras de água: reação de derivatização com cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) seguida de extração e pré-concentração dos analitos com extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos C₁₈; pré-concentração dos analitos por liofilização seguida de reação de derivatização com FMOC-Cl. Para a determinação de glifosato e AMPA empregou-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de fluorescência. Os resultados demonstraram que a liofilização apresenta maior eficiência no preparo das amostras. Após a escolha do método de preparo realizou-se sua avaliação de desempenho pelos parâmetros de repetitividade, seletividade, linearidade, limite de detecção de quantificação, sensibilidade e estabilidade. Os resultados demonstraram concentrações na faixa de 0,31 a 8,13, $\mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato, estando abaixo da concentração máxima permitida pelas resoluções brasileiras: 65 $\mu\text{g L}^{-1}$ para águas doces classe II (CONAMA 357/05) e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para águas de consumo (MS 2914/11); com exceção de uma amostra coletada em período chuvoso, apresentando glifosato na concentração de 65 $\mu\text{g L}^{-1}$. O metabólito AMPA foi encontrado na faixa de 0,32 –

14,78 $\mu\text{g L}^{-1}$, estando abaixo da concentração máxima permitida pela resolução MS 2914/11: 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Paravas-chave: *glifosato, AMPA, Bacia do Paraná 3.*

Abstract

MENDONCA, C. F. R. **Determinação de glifosato e AMPA nas águas superficiais da Bacia do Paraná 3**. 2018. 126p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2018.

Today, glyphosate is the herbicide of greatest consumption for the control of weeds, widely used in resistant crops such as soybean and corn. Glyphosate is applied directly to the foliage of plants, but part of it ends up going to the soil. From the soil, both glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid (AMPA) can be carried to surface water or underground water. Because of this, concerns have been raised about its toxic potential. In this dissertation, the objective is to evaluate the contamination of surface waters of watersheds located in the Paraná Basin 3 (Paraná-BR) with glyphosate and AMPA. Microbasin located near regions with soybean and corn plantations were chosen, as well as the period of sampling was chosen within the time of planting of these crops. Two methods of preparation of the water samples were studied: 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) derivatization reaction and extraction and pre-concentration of analytes with solid phase extraction (SPE) using C₁₈ cartridges; pre-concentration of the analytes with lyophilization followed by derivatization reaction with FMOC-Cl. High performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector was used for glyphosate and AMPA analysis. The results showed that lyophilization has a better performance in the preparation of the samples. After the choice of the preparation method, its performance evaluation was performed based on evaluation of repeatability, selectivity, linearity, sensitivity and stability were evaluated. The results showed concentrations in the range of 0.31 to 8.13, $\mu\text{g L}^{-1}$ of glyphosate, being below the maximum concentration allowed by the Brazilian resolutions: 65 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Class II (CONAMA 357/05) and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ for drinking water (MS 2914/11); with the exception of a sample collected in the rainy season, presenting glyphosate at the concentration of 65 $\mu\text{g L}^{-1}$. The AMPA metabolite was found in the range of 0.32 - 14.78 $\mu\text{g L}^{-1}$, being below the maximum concentration allowed by resolution MS 2914/11: 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Keyword: *glyphosate, AMPA, Paraná Basin 3.*

Lista de figuras

Figura 1. Biodegradação de glifosato em AMPA no solo	- 21 -
Figura 2. Molécula do herbicida glifosato.....	- 25 -
Figura 3. Rota do chiquimato das plantas, a qual é inibida pelo glifosato, acarretando deficiência na biossíntese de compostos essenciais.	- 25 -
Figura 4. Quantidade de agrotóxico utilizada segundo a classe de uso em 2011 por Bacias Hidrográficas no Paraná.....	- 28 -
Figura 5. Metabólitos provenientes da biodegradação do glifosato.....	- 31 -
Figura 6. Dissociação do glifosato em água com diferentes pkas.	- 33 -
Figura 7. Reação de derivatização de glifosato e AMPA usando FMOC-Cl como agente derivatizante.	40
Figura 8. Etapas do preparo de amostra aquosa de glifosato e AMPA utilizando cartuchos SPE C18 após derivatizados com FMOC-Cl.	46
Figura 9. Diagrama de fase da água (fora de escala).....	47
Figura 10. Esquema do equipamento liofilizador.	48
Figura 11. Configuração típica de um sistema de HPLC.....	50
Figura 12. Mapa de uso e ocupação do solo e destaques para as microbacias selecionadas. ...	54
Figura 13. Cromatograma de padrões glifosato (25,3 min) e AMPA (26,9 min) nas concentrações de 250,0 µg L ⁻¹ preparados em água, derivatizados, extraídos por cartuchos SPE C18 e analisadas por HPLC com detector de fluorescência (λ_{exc} = 260 nm, λ_{em} = 317 nm).....	61
Figura 14. Cromatograma dos padrões glifosato (27,5 min) e AMPA (29,2 min) nas concentrações de 200,0 µg L ⁻¹ preparados em água, liofilizadas, derivatizadas e analisadas por HPLC com detector de fluorescência (λ_{exc} = 260 nm, λ_{em} = 317 nm).	62
Figura 15. Curva analítica do glifosato preparada em água ultrapura através do método de preparo de amostra com liofilização e análise por HPLC com detector de fluorescência.	64
Figura 16. Nova curva analítica após remoção de uma amostra de glifosato na concentração de 30 µg L ⁻¹ e outra na concentração de 65 µg L ⁻¹ da curva analítica da figura 13.....	65
Figura 17. Curva analítica do metabólito AMPA preparada em água ultrapura através do método de preparo de amostra com liofilização e análise por HPLC com detector de fluorescência.	65
Figura 18. Nova curva analítica após retirada de todas amostras na concentração de 10 µg L ⁻¹ e de duas amostras na concentração de 65 µg L ⁻¹ e de AMPA na curva analítica da figura 17.....	66

- Figura 19.** Curva analítica do glifosato preparada em água ultrapura através do método de preparo de amostra com SPE C18 e análise por HPLC com detector de fluorescência. $R^2 = 0,9993$ e $y = 16308x + 28808$ 67
- Figura 20.** Curva analítica do metabólito AMPA preparada em água ultrapura através do método de preparo de amostra com SPE C18 e análise por HPLC com detector de fluorescência. $R^2 = 0,9996$ e $y = 23481x + 120886$ 67
- Figura 21.** Determinação de glifosato (esquerda) e AMPA (direita) nas águas superficiais de 21 microbacias coletadas semanalmente entre 15 Jan a 26 Fev de 2017..... 72
- Figura 22.** Microbacia do rio Azul, localizado no município de Ouro Verde do Oeste /PR 77
- Figura 23.** Modo gradiente I utilizado na análise de glifosato e AMPA por HPLC com detector de fluorescência..... 91
- Figura 24.** Cromatograma obtido com o modo gradiente da Figura 23..... 92
- Figura 25.** Modo gradiente II utilizado na análise de glifosato e AMPA por HPLC com detector de fluorescência..... 92
- Figura 26.** Cromatograma obtido com o modo gradiente da Figura 25..... 93
- Figura 27.** Modo gradiente III utilizado na análise de glifosato e AMPA por HPLC com detector de fluorescência..... 93
- Figura 28.** Cromatograma obtido com o modo gradiente da Figura 27..... 94
- Figura 29.** Modo gradiente IV utilizado na análise de glifosato e AMPA por HPLC com detector de fluorescência..... 94
- Figura 30.** Cromatograma obtido com o modo gradiente da Figura 29..... 95
- Figura 31.** Fase móvel gradiente utilizada antes da otimização metodológica, com diferentes proporções de ACN: de 0 a 7min, 10%; 27 min, 45%; 32 min, 95%; 37min, 10%; reequilibrando as condições iniciais até completar 42 min de corrida (esquerda); Nova fase móvel gradiente, com diferentes proporções de ACN: 0 min, 5 % de B; 23 min, 45%; 28 min, 95%; 33 min, 5 %; reequilibrando as condições iniciais até completar 36 min de corrida (direita). 96
- Figura 32.** Cromatograma dos padrões glifosato (27,5 min) e AMPA (29,2 min) nas concentrações de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ com o método **não otimizado** (esquerda). Cromatograma dos padrões glifosato (21,0 min) e AMPA (22,5 min) nas concentrações de 65 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparados com o método **otimizado** (direita). 96
- Figura 33.** Curva analítica do glifosato em água ultrapura ($183101,4x - 116999$; $R^2 = 0,998$) e na água da matriz advinda da microbacia córrego Água Fria ($y = 142919x + 147217,5$; $R^2 = 0,998$). 97

Figura 34. Curva analítica do metabólito AMPA: em água ultrapura ($260947,8 x + 11039,1$; $R^2 = 0,997$) e na água da matriz advinda da microbacia córrego Água Fria ($225355 x + 150187,5$; $R^2 = 0,996$).....	98
Figura 35. Curva analítica do glifosato na água da matriz.	103
Figura 36. Curva analítica do AMPA na água da matriz.	104

Lista de Tabelas

Tabela 1. Quantidade de agrotóxico consumido por município da BP3 nos anos de 2012 e 2013.	- 28 -
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do herbicida glifosato.	- 32 -
Tabela 3. Publicações entre os anos de 2000 a 2018 que utilizaram cromatografia em fase líquida ou gasosa para análise de glifosato ou AMPA.	- 34 -
Tabela 3. Continuação.....	- 35 -
Tabela 4. Revisão de literatura dos métodos de preparo de amostra e análise de glifosato e AMPA em diferentes matrizes ambientais.	36
Tabela 4. Continuação.....	37
Tabela 4. Continuação.....	38
Tabela 5. Revisão bibliográfica das metodologias de SPE para glifosato e AMPA derivatizados com FMOC-Cl em amostras aquosas e análise por HPLC com diferentes detectores.	41
Tabela 6. Propriedades dos detectores comuns em cromatografia líquida.	50
Tabela 7. Classificação dos municípios da BP3 em termos de produção agrícola, consumo de agrotóxicos e qualidade das águas superficiais das suas microbacias.	53
Tabela 8. Período do uso de glifosato nas culturas de soja e milho na região da BP3.	55
Tabela 9. Desvio padrão relativo (%) da curva analítica de glifosato e AMPA preparadas por liofilização seguida de reação de derivatização e análise por HPLC com detector de fluorescência.	63
Tabela 10. Teste Tn para detecção de outliers nas concentrações de 0,1 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ da curva analítica do glifosato.	63
Tabela 11. Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) para padrões de glifosato (GLY) e AMPA preparadas em água, por diferentes métodos de preparo e diferentes eluições na análise por HPLC com detector de fluorescência.	68
Tabela 12. Teste t de Student para as inclinações das curvas analíticas construídas com dois diferentes preparos de amostras, Liofilização e SPE C ₁₈ , e analisadas por HPLC com detector de fluorescência.	69
Tabela 13. Teores de glifosato (GLY) e AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas microbacias coletadas durante 6 semanas consecutivas no primeiro semestre de 2017.	70
Tabela 13. Continuação.....	71
Tabela 14. Concentrações de glifosato (GLY) e AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas microbacias selecionadas, durante a amostragem extraordinária em períodos de chuva (primeiro semestre de 2017).	74
Tabela 14. Continuação.....	75

Tabela 15. Critérios de aceitação do desvio padrão relativo (%) para repetibilidade.....	81
Tabela 16. Teste <i>t</i> de Student para as inclinações das curvas analíticas, tanto na água ultrapura quanto na matriz.	98
Tabela 17. Valores do desvio padrão relativo (%) para a curva analítica de glifosato (GLY) e AMPA nas águas da matriz.	99
Tabela 18. Aplicação do teste <i>Q</i> e T_n para detecção de valores anômalos na curva de calibração de glifosato e AMPA na matriz.	101
Tabela 19. Novos valores de RSD para as curvas analíticas de glifosato e AMPA na matriz após a retirada dos <i>outliers</i>	102
Tabela 20. Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) para glifosato e AMPA na água da matriz.....	105
Tabela 21. Áreas dos sinais analíticos e seus respectivos desvios-padrão, para glifosato e AMPA, após análises semanais das amostras congeladas à – 20 °C.	106
Tabela 22. Teste <i>t</i> de Student para verificação da estabilidade de glifosato e AMPA durante 8 semanas.	107
Tabela 23. Menores concentrações obtidas nas análises das amostras nos dois diferentes períodos de coleta de 2017: 15 de Jan – 26 Fev (primeiro semestre) e 4 Set – 10 Out (segundo semestre).	109
Tabela 24. Determinação de glifosato (GLY) e AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas águas superficiais das 21 microbacias da BP3, coletadas no segundo semestre de 2017.....	111
Tabela 24. Continuação.....	112
Tabela 25. Teores de glifosato (GLY) e AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas microbacias selecionadas em períodos de chuva (segundo semestre de 2017).....	114
Tabela 25. Continuação.....	115

Lista de abreviaturas e siglas

ACN = Acetonitrila

AMPA= Aminomethylphosphonic acid (ácido aminometilfosfônico)

AOAC = Association of Official Analytical Chemistry (Associação Oficial de Química Analítica)

BP3 = Bacia do Paraná 3

CNRH = Conselho Nacional de Recursos Hídricos

CONAMA = Conselho Nacional do Meio Ambiente

FMOCCl = 9-Fluorenylmethyl chloroformate (cloroformiato de 9-fluorenilmetila)

GLY = Glyphosate (Glifosato)

ha = hectare

HPLC = High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

INMETRO = Instituto Nacional de Metrologia

LD = Limite de Detecção

LD₅₀ = Median Lethal Dose (dose letal média)

LQ = Limite de Quantificação

NOEL = No Observed Adverse Effect Level (nível de dose sem observação de efeito)

PTFE = Politetrafluoretileno

SPE = Solid Phase Extraction (extração em fase sólida)

Sumário

1.	Introdução	- 21 -
2.	Revisão bibliográfica	- 23 -
2.1.	O herbicida glifosato.....	- 23 -
2.2.	Glifosato nas culturas de soja	- 26 -
2.3.	Bacia do Paraná 3.....	- 26 -
2.4.	Mobilidade do glifosato no solo e na água.....	- 30 -
2.5.	Propriedades físico-química do glifosato e AMPA	- 32 -
2.6.	Métodos de análise de glifosato e AMPA	- 33 -
2.6.1.	Determinação de glifosato e AMPA por cromatografia líquida com detector de fluorescência	39
3.	Objetivo Geral	41
4.	Estruturação da dissertação	42
5.	Capítulo 1.....	43
5.1.	Introdução	43
5.2.	Revisão bibliográfica	44
5.2.1.	Amostragem e armazenamento das águas das microbacias	44
5.2.2.	Preparo de amostra	45
5.2.2.1.	Extração em fase sólida.....	45
5.2.2.2.	Liofilização.....	47
5.2.3.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	49
5.3.	Materiais e métodos	51
5.3.1.	Reagentes e materiais.....	51
5.3.2.	Instrumentação.....	51
5.3.3.	Seleção da área de estudo	52
5.3.4.	Método de amostragem.....	55
5.3.5.	Preparo de amostras	57
5.3.5.1.	Reação de derivatização	57
5.3.5.2.	Extração em fase sólida com cartuchos C ₁₈	57

5.3.5.3.	Liofilização.....	58
5.3.6.	Avaliação dos métodos de preparo de amostra.....	58
5.3.7.	Análise cromatográfica.....	59
5.3.7.1.	Eluição das amostras preparadas por SPE.....	59
5.3.7.2.	Eluição das amostras preparadas por liofilização.....	60
5.4.	Resultados e Discussões.....	60
5.4.1.	Separação cromatográfica e detecção.....	60
5.4.2.	Preparo de amostra utilizando liofilização.....	62
5.4.2.1.	Detecção de <i>outliers</i>	63
5.4.2.2.	Construção da curva analítica.....	64
5.4.3.	Preparo de amostra utilizando SPE C18.....	66
5.4.4.	Método de preparo de amostras: SPE vs liofilização.....	68
5.4.5.	Estudo de caso: ocorrência de glifosato e AMPA na Bacia do Paraná.....	69
5.5.	Conclusões.....	78
6.	Capítulo 2.....	79
6.1	Introdução.....	79
6.2.	Objetivos específicos.....	79
6.3.	Revisão Bibliográfica.....	80
6.3.1.	Repetibilidade/reprodutibilidade.....	80
6.3.1.1.	Detecção de <i>outliers</i>	81
6.3.2.	Linearidade.....	83
6.3.3.	Seletividade.....	83
6.3.3.1.	Efeito Matriz.....	84
6.3.4.	Sensibilidade.....	85
6.3.4.1.	Inclinação da curva analítica.....	85
6.3.5.	Limite de detecção.....	86
6.3.6.	Limite de quantificação.....	86
6.3.7.	Estabilidade.....	87
6.4.	Materiais e métodos.....	88

6.4.1.	Reagentes e materiais.....	88
6.4.2.	Instrumentação.....	88
6.4.3.	Otimização do preparo de amostra por liofilização.....	89
6.4.4.	Otimização do modo gradiente na análise cromatográfica.....	89
6.5.	Resultados e Discussões	90
6.5.1.	Otimização do método.....	90
6.5.1.1.	Preparo de amostra	90
6.5.1.2.	Otimização da análise cromatográfica	91
6.5.2.	Validação do método	97
6.5.2.1.	Efeito Matriz.....	97
6.5.2.2.	Repetibilidade.....	99
6.5.2.3.	Linearidade.....	102
6.5.2.4.	Limite de detecção e quantificação	104
6.5.2.5.	Estabilidade	105
6.5.3.	Estudo de caso: ocorrência de glifosato e AMPA na Bacia do Paraná 3.....	109
6.6.	Conclusão	116
	Referências.....	117
	Anexos	128
	Anexo A – Gráfico de resíduos demonstrando anormalidades na curva analítica apresentada na Figura 15. Dados fornecidos pelo software Origin®.	128
	Anexo B – Gráfico de resíduos demonstrando anormalidades na curva analítica apresentada na Figura 17. Dados fornecidos pelo software Origin®.	128
	Anexo C – Gráfico de resíduos da curva analítica do glifosato preparada na matriz apresentados na Figura 35. Dados fornecidos pelo software Origin®.	128
	Anexo D – Gráfico de resíduos da curva analítica do AMPA preparada na matriz apresentados na Figura 36. Dados fornecidos pelo software Origin®.	129

1. Introdução

Plantas daninhas dificultam a colheita e reduzem a produtividade de diversas culturas agrícolas. O aumento expressivo do controle químico de plantas daninhas tem gerado preocupações devido aos possíveis impactos ao meio ambiente e a saúde. Os produtos químicos utilizados para sua eliminação são denominados herbicidas, e entre os mais variados tipos disponíveis no mercado os mais empregados são à base de glifosato (AMARANTE, 2002).

O glifosato é um herbicida pós emergente, podendo ser aplicado após o surgimento das ervas daninhas no solo. Em culturas resistentes, como soja e milho, pode ser utilizado para a dessecação das plantas daninhas também após o plantio. Sua característica pós emergente reduz a mão de obra e permite um aumento na produtividade de diversas colheitas (GAZZIERO, ADEGAS, & VOLL, 2007). Sua atuação sistêmica não-seletiva permite um largo espectro de atividades, eliminando diversos tipos de ervas daninhas, mas também ocasionando a destruição de ambientes naturais e de fontes de alimentos para pássaros e mamíferos, levando então à redução dessas populações e, conseqüentemente, gerando impactos ambientais (AMARANTE, 2002).

Atualmente, o herbicida glifosato é mundialmente conhecido pelo nome comercial Roundup®, fabricado pela Monsanto. A empresa divulga que o glifosato não é considerado uma ameaça contaminante para água, pois em contato com o solo ou sedimento a molécula fica adsorvida, sendo então facilmente biodegradada (Company, 1992). O principal metabólito do glifosato é o ácido aminometilfosfônico (AMPA), degradado por bactérias do solo (Figura 1).

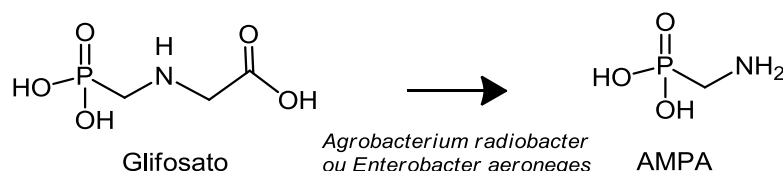


Figura1. Biodegradação de glifosato em AMPA no solo

Fonte: AMARANTE, O. P. et al. 2002

A meia-vida do glifosato no solo é apresentada com diferentes tempos por diversos autores, sendo estimada de 1 mês a 240 dias (TONI, SANTANA, & ZAIA, 2006) (WAUCHOPE, 1992) (GIESY, DOBSON, & SOLOMON, 2000) (VEIGA, 2001). Esta discrepância, provavelmente, é decorrente das diferentes

características dos solos. No solo os mecanismos de adsorção mais comuns são a troca de ligantes com os óxidos de ferro e alumínio e as ligações de hidrogênio formadas entre o glifosato e as substâncias húmicas (FENG & THOMPSON, 1990). Grande parte do glifosato é adsorvido por ligar-se a silicatos, óxidos, materiais não cristalinos ou matéria orgânica⁷. Em solos contendo teores elevados de matéria orgânica e argila, sua adsorção ocorre muito mais rapidamente que a degradação microbiológica, sendo que a perda da atividade herbicida é devida, principalmente, à formação de complexos metálicos (COUTINHO & MAZO, 2005).

O glifosato e o AMPA apresentam baixa mobilidade no solo, porém podem ser transportados por solutos ou cotransportados (ligados) aos colóides do solo. Tanto as formas dissolvidas como as particuladas podem ser movidas pela lixiviação através do solo e pelo escoamento terrestre (escoamento superficial) (BORGGAARD & GIMSING, 2008). O tempo de meia-vida do glifosato em água é mais curto que sua persistência em solo, com valores médios de 7 a 21 dias (GIESY, DOBSON, & SOLOMON, 2000) (PATERSON, 2004).

Diversos estudos sobre o efeito do glifosato à saúde foram realizados por agências governamentais, por acadêmicos independentes ou por cientistas em nome de grandes empresas comercializadoras de glifosato. Obviamente, estes estudos apresentam resultados conflitantes. Em 2015, a Agência Internacional do Câncer (IARC) publicou um relatório evidenciando efeitos carcinogênicos em animais e provável efeito carcinogênico em humanos pelo glifosato (IARC, 2015). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos realizou uma grande revisão bibliográfica na tentativa de avaliar o potencial carcinogênico do glifosato. Foram avaliados 23 estudos epidemiológicos, 15 estudos de carcinogenicidade animal e quase 90 estudos de genotoxicidade para o glifosato. A revisão indicou que os dados disponíveis até o momento não permitem classificar glifosato como potencial carcinogênico em animais e em humanos (EPA, 2016).

Geralmente os herbicidas a base de glifosato possuem de 36 a 48% de glifosato em sua formulação. Altos volumes de coadjuvantes (também chamados de surfactantes) são usados concomitantemente, e assim grandes quantidades destes (ou seus produtos de degradação) podem ser encontrados no meio ambiente. As formulações comerciais podem causar danos prejudiciais maiores do

que o uso do glifosato sozinho. Diversos estudos negligenciam a toxicidade da formulação comercial do glifosato (MESNAGE, 2015).

No Brasil, duas normativas estabelecem concentrações máximas permitidas para glifosato e AMPA em amostras de água: para águas doces superficiais de classes I e II, a Resolução CONAMA 357 de 17/03/2005 estabelece quantidade permitida de glifosato de até 65,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CONAMA, 2005), enquanto a Portaria do Ministério da Saúde Nº 2914 de 12/12/2011 determina que o valor máximo de glifosato e AMPA em águas usadas para abastecimento não deve ultrapassar 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (PORTARIA, 2011).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, em seu regulamento para a qualidade da água potável, determina que glifosato não pode ser encontrado em concentrações acima de 700,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em águas para consumo (NPDWR, 2017). No Canadá, o valor permitido não deve ultrapassar 280 $\mu\text{g L}^{-1}$ para água potável (CCME, 2012), enquanto que para águas utilizadas para a proteção da vida aquática o valor máximo permitido é de 65 $\mu\text{g L}^{-1}$ (EBP, 2015). Valores ainda menores são encontrados nas diretrizes da União Europeia, com limites de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o glifosato em água potável (98/83/CE).

Atualmente, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (Pesticide, 2011) e o segundo maior produtor de soja, cultura na qual predomina o uso do glifosato. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento, o estado do Paraná é o segundo maior produtor de soja do país, perdendo apenas para o estado do Mato Grosso (CONAB, 2017). A região da Bacia do Paraná 3 tem um alto volume no consumo de agrotóxicos, acima da média anual do Paraná. A bacia apresenta, em usos rurais, potencial de contaminação por *run-off* agrícola, ou seja, contaminação por escoamento superficial (SEMA, 2010). Desta forma, torna-se de grande relevância o estudo da contaminação das águas da Bacia com o herbicida glifosato.

2. Revisão bibliográfica

2.1. O herbicida glifosato

Desde o início da agricultura e da pecuária, as plantas daninhas infestam espontaneamente as áreas de ocupação humana e agrícola, sendo consideradas

plantas pioneiras, tendo a função de criar habitats adequados ao início de uma sucessão de populações, com o restabelecimento da vegetação original (GALLI & MONTEZUMA, 2005).

Na primeira metade do século XX, a mecanização agrícola foi a grande alternativa para o controle das plantas daninhas, os quais eram eficientes nas mais diversas situações da agricultura mundial. Contudo, após a segunda metade do século, houve o aumento expressivo do controle químico com o desenvolvimento da indústria de herbicidas. Nesse período, grande número de produtos de diferentes classes químicas e modos de ação foram liberados no mercado (GALLI & MONTEZUMA, 2005).

A primeira síntese da molécula de glifosato foi feita por Henri Martin, farmacêutico de uma pequena empresa na suíça, mas não foi testada ou pelo menos patenteada para seu uso como herbicida. John E. Franz, da empresa Monsanto, foi o primeiro a testar o glifosato como herbicida em 1970, patenteando a molécula como herbicida alguns anos depois (E., K., & A, 1997). O uso do glifosato se ampliou em várias culturas, desde a sua instalação (pré-plantio) até a fase produtiva, se mostrando vantajoso em relação a vários métodos de controle de plantas daninhas. Aspectos relacionados à toxicologia, ecotoxicologia, facilidade de manuseio, eficácia de controle, ganhos de produtividade etc, tornaram o produto líder mundial no controle de plantas daninhas (GALLI & MONTEZUMA, 2005). Atualmente, é o herbicida de maior participação no mercado mundial, com mais de 150 marcas comerciais e comercializado em mais de 119 países, com registro para mais de uma centena de culturas (AMARANTE, 2002).

Sua absorção ocorre lentamente pela folhagem das plantas daninhas, sendo necessário um período de 6h sem chuvas após a aplicação para uma atuação adequada. As plantas tratadas com glifosato morrem lentamente, em poucos dias ou semanas e, devido ao transporte por todo o sistema, nenhuma parte da planta sobrevive, aparecendo os sintomas de injúria a partir do terceiro dia após o tratamento, incluindo: nanismo, amarelecimento da folhagem e morte lenta da planta (AMARANTE, 2002).

A molécula de glifosato, N-(fosfonometil)-glicina (Figura 2), pertence ao grupo químico dos inibidores da síntese de aminoácidos.

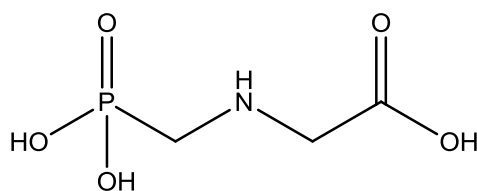


Figura 2. Molécula do herbicida glifosato.

Fonte: Autoria do próprio autor.

Após sua absorção pelas plantas, o glifosato é translocado, seguindo a mesma rota dos produtos da fotossíntese (açúcares) (YAMADA & CASTRO, 2007), dos pontos de aplicação situados nas folhas até drenos distantes, atuando na inibição da atividade da enzima plastídica 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs), responsável pela transferência do fosfato piruvato (PEP) ao chiquimato-3-fosfato (S3P) para a formação dos produtos 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico (Pi), impossibilitando a transferência do PEP para o S3P (Figura 3) (SCHÖNBRUNN, 2001), evitando, assim, a síntese de três aminoácidos essenciais das plantas – triptofano, fenilalanina e tirosina. Outros processos também são influenciados, como a inibição da síntese de clorofila, estimulação da produção de etileno, redução da síntese de proteínas e elevação da concentração do ácido indolacético (hormônio responsável pelo crescimento das plantas) (YAMADA & CASTRO, 2007).

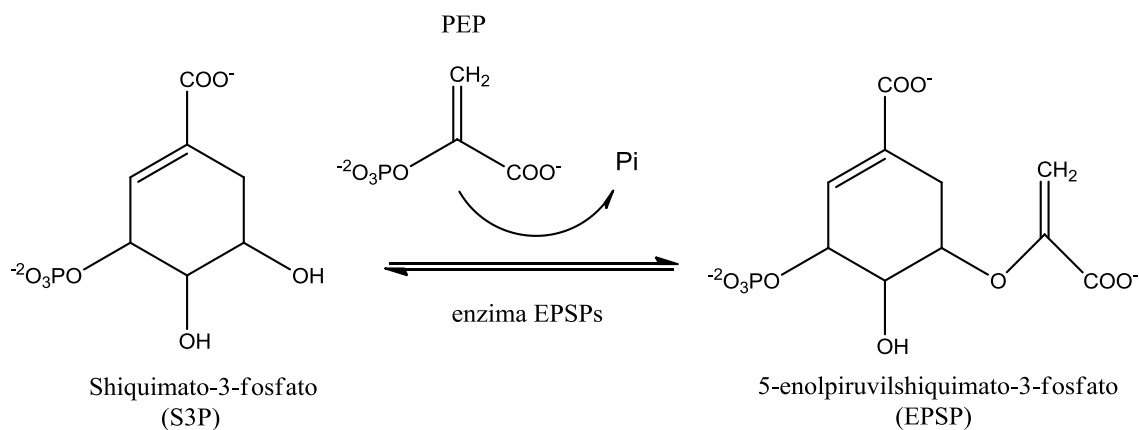


Figura 3. Rota do chiquimato das plantas, a qual é inibida pelo glifosato, acarretando deficiência na biossíntese de compostos essenciais.

Fonte: SCHÖNBRUNN, E. et al. 2001.

A rota do chiquimato é ausente em animais, mas é fundamental no metabolismo de plantas, fungos e bactérias para biossíntese dos aminoácidos aromáticos essenciais (HINCHEE, 1993).

2.2. Glifosato nas culturas de soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das mais importantes culturas na economia mundial. Seus grãos são muito usados pela agroindústria (produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal), indústria química e de alimentos. Recentemente, vem crescendo também o uso como fonte alternativa de biocombustível (COSTA NETO, 2000).

A introdução da soja geneticamente modificada resistente ao glifosato (GM_{RR}) no Brasil facilitou o uso do plantio direto. Cerca de 50% da área plantada com culturas anuais utilizam este sistema (ZADINELLO, 2012), substituindo o manejo do solo com maquinarias, os quais, não sendo seletivos, levavam as plantas daninhas a desenvolver inúmeros e complexos mecanismos de dormência de suas estruturas reprodutivas, resistência aos decompositores e predadores do solo, grande descontinuidade na germinação e capacidade de germinar e emergir de camadas mais profundas do solo (GALLI & MONTEZUMA, 2005). Assim, a aplicação de glifosato após a emergência das plantas daninhas, e antes que estas interfiram no desenvolvimento da cultura, representa a possibilidade de uso de um herbicida de amplo espectro de ação. A eficiência de controle, a facilidade e flexibilidade de seu uso, são o grande diferencial.

2.3. Bacia do Paraná 3

A bacia do Paraná 3 (BP3) está localizada na mesorregião Oeste do Paraná, entre as latitudes 24° 01' S e 25° 35' S e as longitudes 53° 26' O e 54° 37' O e se estende em áreas dos municípios de Cascavel, Céu Azul, Diamante do Oeste, Entre Rios do Oeste, Foz do Iguaçu, Guaíra, Itaipulândia, Marechal Cândido Rondon, Maripá, Matelândia, Medianeira, Mercedes, Missal, Nova Santa Rosa, Ouro Verde do Oeste, Pato Bragado, Quatro Pontes, Ramilândia, Santa Helena, Santa Teresa do Oeste, Santa Teresinha de Itaipu, São José das Palmeiras, São

Miguel do Iguçu, São Pedro do Iguçu, Terra Roxa, Toledo, Tupãssi e Vera Cruz do Oeste, totalizando 28 municípios (Itaipu Binacional, 2011).

A BP3 é uma região intensamente explorada por agricultura intensiva mecanizada, mas com diferentes níveis de ocupação em função de condições de relevo e características locais. Possui uma agroindústria dinâmica e em expansão, mas centralizada em alguns municípios polos. Desta forma, seu crescimento tem sido heterogêneo, com municípios em fase de expansão populacional e municípios com crescimento populacional mínimo ou mesmo crescimento negativo (Itaipu Binacional, 2011).

De acordo com Alves e Paiva (2008) (ALVES & PAIVA, 2008), a partir das informações do valor bruto da produção agropecuária, o cultivo da soja e a criação de suínos eram as principais atividades da agropecuária do Oeste do Paraná em 1970. Atividades essas que foram consolidadas durante o período de 1970 a 2010. No caso da atividade de suínos, foi uma atividade tradicional que esteve presente, como atividade de subsistência, durante todo o período de colonização regional. De uma atividade de subsistência, a criação de suínos se transformou em um complexo agroindustrial dos mais importantes nessa região onde juntamente com a criação e abate de aves formam as principais atividades da pecuária regional. Essas atividades ainda são as mais expressivas na BP3. A maioria dos municípios que formam a BP3 possuem na produção vegetal o maior percentual do valor da produção agropecuária total. Na produção vegetal as lavouras temporárias (soja e milho) se destacam na grande maioria dos municípios como sendo a atividade de maior produção nessa categoria (SEAB/ADAPAR/SIAGRO, 2012).

Dentre as bacias hidrográficas, o consumo de agrotóxicos na BP3 foi de 12% do consumo total de herbicidas no estado do Paraná no ano de 2012, ficando em quarto lugar dentre a região hidrográfica com maior consumo de agrotóxico do estado neste mesmo período (BENASSI, 2016)³³. A quantidade total de agrotóxico ($\text{kg há}^{-1} \text{ano}^{-1}$) utilizado no ano de 2011 no estado do Paraná por bacia hidrográfica e as principais classes de uso agrícola de agrotóxico, podem ser vistas na Figura 4.

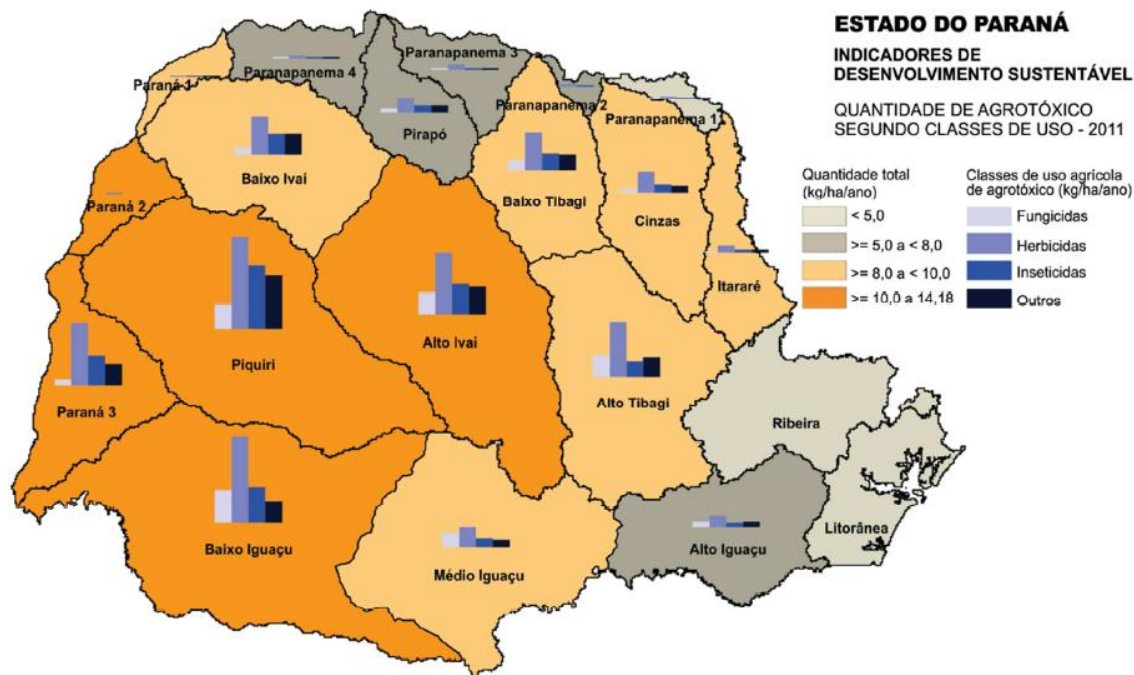


Figura 4. Quantidade de agrotóxico utilizada segundo a classe de uso em 2011 por Bacias Hidrográficas no Paraná.

Fonte: BENASSI. S. F. et al. 2016.

Nos anos consecutivos houve um aumento no consumo de agrotóxicos na BP3, chegando a $11,5 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ em 2012 e $13,7 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ em 2013, continuando acima da média do Paraná anual, com predomínio de agricultura mecanizada e intensiva (64 %). A Tabela 1 apresenta a quantidade de agrotóxico total consumido pelos municípios da BP3 nos anos de 2012 e 2013. Como pode ser verificado, os municípios de Cascavel, Toledo e Marechal Cândido Rondon, de acordo com o relatório apresentado pelo Sistema de Controle do Comércio e Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná – SIAGRO, foram aqueles que apresentaram os valores mais elevados na comercialização de agrotóxicos no ano de 2013. Dentre estes agrotóxicos, o glifosato representou 8,88 % e atrazina 1,99 % dos comercializados. Segundo o mesmo relatório, soja e milho foram os alimentos mais produzidos no estado, representando 47,34 % e 16,66 % respectivamente³³, sendo o glifosato utilizado na cultura da soja e a atrazina no milho.

Tabela 1. Quantidade de agrotóxico consumido por município da BP3 nos anos de 2012 e

2013.

Município	Quantidade 2012 (Kg)	Quantidade 2013 (kg)	Total (Kg)
Cascavel	3.277.254	3.692.072	6.969.326
Toledo	1.162.124	1.300.726	2.462.850
Marechal Cândido Rondon	799.511	1.218.263	2.017.774
São Miguel do Iguaçu	633.229	728.178	1.361.407
Vera Cruz do Oeste	604.699	680.850	1.285.549
Céu Azul	632.412	569.340	1.201.752
Terra Roxa	458.343	668.098	1.126.441
Guaíra	526.172	544.340	1.070.512
Santa Tereza do Oeste	364.442	436.558	801.000
Santa Helena	319.681	394.368	714.050
Mercedes	223.175	348.178	571.353
Tupãssi	274.965	281.669	556.634
Quatro Pontes	237.124	244.632	481.756
Ouro Verde do Oeste	226.547	253.477	480.023
Santa Terezinha de Itaipu	252.817	221.630	474.447
Maripá	187.139	235.289	422.427
São Pedro do Iguaçu	190.733	228.035	418.768
Medianeira	181.958	195.900	377.858
Nova Santa Rosa	159.930	194.889	354.819
Altônia	185.463	156.100	341.563
Itaipulândia	156.639	172.222	328.861
Matelândia	143.541	181.175	324.716
Missal	137.163	145.265	282.428
Pato Bragado	118.724	163.694	282.418
Entre Rios do Oeste	121.342	153.422	274.764
Foz do Iguaçu	70.316	120.162	190.478
São José das Palmeiras	46.817	59.046	105.862
Ramilândia	45.510	60.167	105.677
Diamante d'Oeste	27.643	32.282	59.925
TOTAL	11.765.413	13.680.027	25.445.438

Fonte: BENASSI, S. F et al. 2016.

A disponibilidade hídrica da Bacia do Paraná 3 é de aproximadamente 3 mil L s⁻¹, dos quais 63 % provém de mananciais superficiais e 37 % de mananciais subterrâneos. Com relação aos setores usuários, 49 % são para o abastecimento público, 24 % para uso industrial, 11 % para o setor agrícola, 16 % para o setor pecuário e o setor mineral com menos de 1 %. A disponibilidade hídrica superficial da Bacia do Paraná 3 é de 58 mil L s⁻¹, o que representa cerca de 5 % do total do estado. O valor demandado é de 2 mil L s⁻¹, representando apenas 3 % do total disponível na bacia. A bacia apresenta, em usos rurais, potencial de contaminação por *run-off* (escoamento superficial) agrícola, e ainda apresenta-se como um núcleo com alto volume de agrotóxicos comercializados. Já em usos urbanos, há baixa infraestrutura de esgotos e drenagem (BENASSI, 2016).

2.4. Mobilidade do glifosato no solo e na água

Os grupamentos fosfonato, amino e carboxilato do glifosato dão a característica de ligante tridentado, permitindo uma posição privilegiada entre os herbicidas. Após a aplicação do glifosato, parte do herbicida não atinge o alvo, sendo sorvido em sedimentos ou partículas suspensas no solo e água, formando complexos em água com íons metálicos de Ca²⁺, Mg²⁺, (MORAES & ROSSI, 2010) e complexos no solo com os ácidos húmicos, íons Fe²⁺, Fe³⁺, Al³⁺, além da complexação com diversos outros metais (COUTINHO & MAZO, 2005).

Outro fator importante que determina a presença deste produto no solo é a atividade microbiana. As taxas de metabolismo do glifosato podem variar consideravelmente entre diferentes solos, que podem ser relacionados com o nível de atividade microbiológica (E., K., & A, 1997). Duas rotas de degradação são conhecidas para o glifosato: a primeira consiste na transformação do glifosato em sarcosina por ação da bactéria *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase). Esta rota é, no entanto, pouco citada na literatura. A segunda rota consiste na transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico, AMPA, pela bactéria *Agrobacterium radiobacter*, (Figura 5) (AMARANTE, 2002), que por sua vez é degradado em dióxido de carbono e amônia (RUEPPEL, 1977).

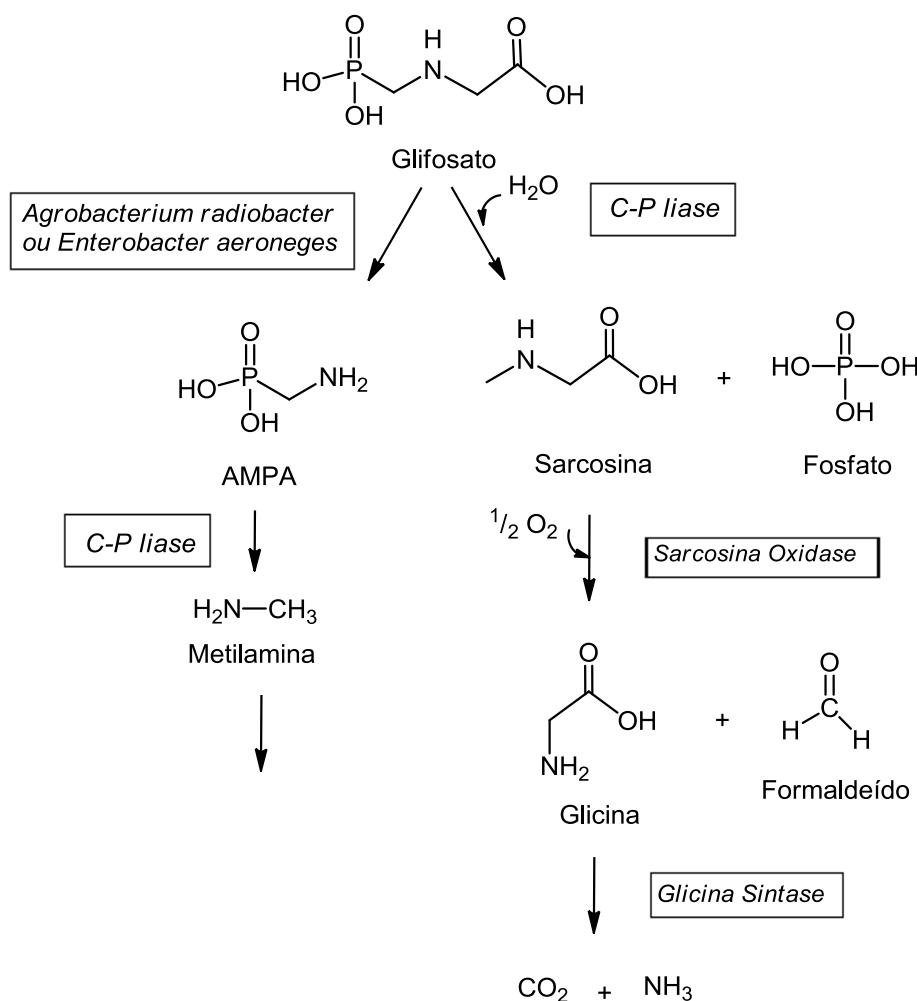


Figura 5. Metabolitos provenientes da biodegradação do glifosato.

Fonte: AMARANTE, O. P. et al. 2002; GRANDCOIN, A.; PIEL, S.; BAURES, E. 2017.

A meia-vida do glifosato no solo varia conforme os teores de argila e matéria orgânica e do nível de atividade microbiana (TONI, SANTANA, & ZAIA, 2006). Wauchope et al. (1992) relatam que a meia-vida pode chegar a 174 dias (WAUCHOPE R. D., 1992), enquanto que Giesy et al. (2000) predizem de dois a 197 dias para glifosato e 76 a 240 dias para AMPA (GIESY, DOBSON, & SOLOMON, 2000). Tempos de meia vida mais curtos também são encontrados na literatura, Veiga et al. (2001) demonstrando uma dissipação rápida pelo período de um mês após a aplicação (VEIGA, 2001).

Glifosato se liga mais fortemente aos constituintes do solo do que AMPA (DUKE & POWLES, 2008), sendo na maioria dos solos imóvel, mas a mobilidade pode variar conforme o pH do solo. O AMPA se decompõe rapidamente, e resulta na lixiviação de quantidades mínimas no solo (WAUCHOPE R. D., 1992).

O transporte de glifosato e AMPA do ambiente terrestre para o ambiente aquático pode ocorrer na forma de solutos ou cotransportados ligados a coloides do solo. Ambas as formas, dissolvidas e particuladas, podem ser movidas por: lixiviação através do solo para águas subterrâneas e pelo fluxo terrestre para águas superficiais (BORGGAARD & GIMSING, 2008).

O glifosato se dissipa em águas superficiais rapidamente por ser adsorvido pelos sedimentos e degradado por microorganismos. Seu tempo de meia-vida em água é mais curto que sua persistência em solo. Para Paterson et al. (2007) o glifosato no ambiente aquático pode se encontrar com valores de meia-vida de 7 a 21 dias (PATERSON, 2004). Giesy et al. (2000) relatam que, a meia vida do glifosato e AMPA em ambientes aquáticos varia de 7 a 14 dias (GIESY, DOBSON, & SOLOMON, 2000). Na água o sedimento desempenha um papel fundamental na degradação microbiana do glifosato pela via sarcosina e AMPA (WANG, 2016). No entanto, a absorção de metais ou agentes quelantes demonstraram diminuição da biodegradação do glifosato na água, aumentando seu tempo de meia-vida (JAYASUMANA, GUNATILAKE, & SENANAYAKE, 2014).

2.5. Propriedades físico-química do glifosato e AMPA

Algumas das propriedades do glifosato são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do herbicida glifosato.

Fórmula molecular	$C_3H_8NO_5P$ (m.m. = 169,1 g mol ⁻¹)
Fórmula comercial (sal de isopropilamônio)	$(CH_3)_2CHNH_3^+$ (m.m. = 228,2 g mol ⁻¹)
Solubilidade em água	10,5 g L ⁻¹ em pH 2 e 20 °C (995 g Kg ⁻¹)
Solubilidade em solvente orgânico	Baixa solubilidade
Coeficiente de partição (log P _{ow})	-3,2, em pH 3-5 e 25 °C (999 g Kg ⁻¹)
Ponto de fusão	189,5 °C (com decomposição)
Pressão de vapor	1,31.10 ⁻⁵ Pa (25°C, meio ácido)
Densidade	1,705 g mL ⁻¹ (995 g Kg ⁻¹)
Fotodegradação	Estável na presença de luz
Dissociação em água	pK ₁ 0,8; pK ₂ 2,2, pK ₃ 5,5 e pK ₄ 10,1

Fonte: European Commission, 2002.

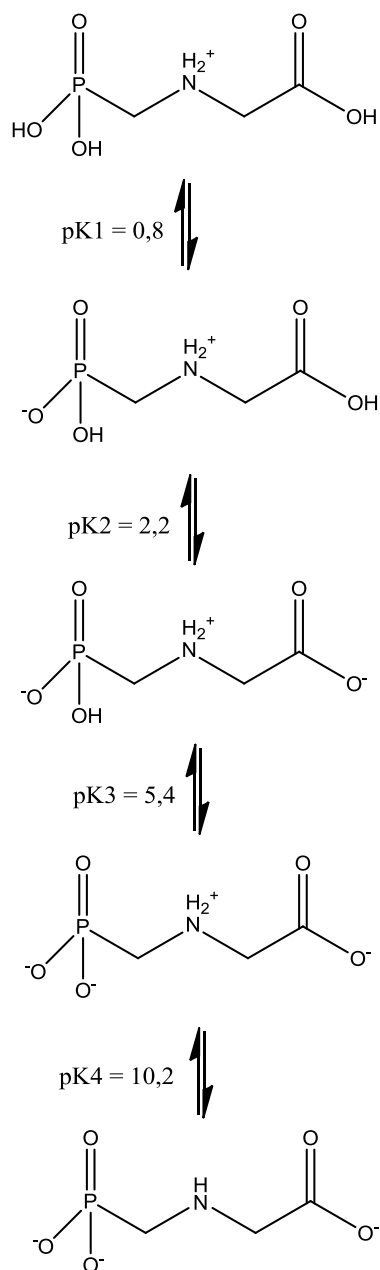


Figura 6. Dissociação do glifosato em água com diferentes pKas.

Fonte: AMARANTE, O. P. 2002.

Os quatro graus de dissociação do glifosato em água são apresentados na Figura 6 (AMARANTE, 2002). Suas propriedades toxicológicas agudas incluem: via oral $\text{LD}_{50, \text{rato}}$ de 5600 mg Kg^{-1} , via dermal $\text{LD}_{50, \text{coelho}} > 5000 \text{ mg Kg}^{-1}$. Apresenta as seguintes propriedades toxicológicas crônicas: para ratos com uma dieta de 24 meses o NOEL oncogênico é de $4500 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e NOEL carcinogênico de $400 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (MESNAGE, 2015).

As propriedades físico-químicas e toxicológicas do AMPA ainda não estão bem estabelecidas na literatura. Sua fórmula molecular é $\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$ (m.m. = $111,0 \text{ g mol}^{-1}$) e na água três graus de dissociação (pK) da sua molécula são encontrados: pK_1 0,9; pK_2 5,6 e pK_3 10,2 (NEDELKOSKA & LOW, 2004).

2.6. Métodos de análise de glifosato e AMPA

A alta polaridade da molécula do glifosato e do seu metabólito tem levado ao desenvolvimento de muitos métodos de análise baseados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Devido à ausência de grupamentos cromóforos nas moléculas de glifosato e AMPA, a dificuldade destas análises se refere à sua forma de detecção, fazendo-se necessário o uso de reação de derivatização destas moléculas para a análise por convencionais detectores de UV-Vis e fluorescência.

A técnica de Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*, GC) é a segunda mais amplamente utilizada para análise de glifosato (AMARANTE, 2002). Devido à baixa volatilidade do glifosato e AMPA, também faz-se necessário uma prévia reação de derivatização para obtenção de um composto mais estável (Borjesson, 2000).

Uma pesquisa avançada no banco de dados do ScienceDirect, a base de dados de texto completo e revisado por pares da Elsevier com aproximadamente 26.000 livros e mais de 2.200 periódicos, foi realizada. A busca foi focada em dois diferentes métodos de análise cromatográfica, HPLC e GC, para ambos os analitos (Tabela 3) (ScienceDirect, 2017). Foram encontrados um total de 321 referências.

Tabela 3. Publicações entre os anos de 2000 a 2018 que utilizaram cromatografia em fase líquida ou gasosa para análise de glifosato ou AMPA.

Termos pesquisados	Fonte	Número de Publicações
Glyphosate AND NOT Aminomethylphosphonic acid (title, abstract or keywords) and Líquid Chromatography (title, abstract or keywords)	Journals	28
Aminomethylphosphonic acid AND NOT Glyphosate (title, abstract or keywords) and Líquid Chromatography (title, abstract or keywords)	Journals	4
Glyphosate AND Aminomethylphosphonic acid (title, abstract or keywords) and Líquid Chromatography (title, abstract or keywords)	Journals	22
Glyphosate AND NOT Aminomethylphosphonic acid (all fields) and Líquid Chromatography (all fields)	Book	139
Aminomethylphosphonic acid AND NOT Glyphosate (all fields) and Líquid Chromatography (all fields)	Book	8
Glyphosate AND Aminomethylphosphonic acid (all fields) and Líquid Chromatography (all fields)	Book	23
Glyphosate AND NOT Aminomethylphosphonic acid (title, abstract or keywords) and Gas Chromatography (title, abstract or keywords)	Journals	7
Aminomethylphosphonic acid AND NOT Glyphosate (title, abstract or keywords) and Gas Chromatography (title, abstract or keywords)	Journals	4
Glyphosate AND Aminomethylphosphonic acid (title, abstract or keywords) and Gas Chromatography (title, abstract or keywords)	Journals	4

Tabela 4. Continuação.

Glyphosate <u>AND NOT</u> Aminomethylphosphonic acid (all fields) and Gas Chromatography (all fields)	Book	123
Aminomethylphosphonic acid <u>AND NOT</u> Glyphosate (all fields) and Gas Chromatography (all fields)	Book	8
Glyphosate <u>AND</u> Aminomethylphosphonic acid (all fields) and Gas Chromatography (all fields)	Book	23

Fonte: Autoria do próprio autor.

Métodos baseados em outras técnicas, além das cromatográficas, vêm sendo desenvolvidos para a determinação de glifosato e seu metabólito, embora ainda sejam pouco utilizados. Estas técnicas incluem ressonância magnética nuclear de fósforo 31 (RMN ³¹P), espectrofotometria, polarografia e eletroforese (AMARANTE, 2002).

Dependendo do sistema de detecção e da quantidade mínima detectável desejados de glifosato e AMPA na água, uma etapa adicional de pré-concentração pode ser necessária, embora muitos métodos de detecção sensíveis dispensem esta etapa (como por exemplo, imunensaio, calorimetria, cromatografia acoplada à espectrometria de massa). Nos últimos anos, uma grande parte dos estudos publicados utilizaram vários métodos de pré-concentração da água. O método de pré-concentração mais utilizado são cartuchos de Extração em Fase Sólida (*Solid Fase Extraction*, SPE). Outros métodos menos utilizados incluem pré-concentração à vácuo, por evaporação, liofilização entre outras técnicas (MERÁS, DÍAZ, & FRANCO, 2005).

Uma revisão bibliográfica de diferentes métodos de preparo de amostra utilizando reação de derivatização, análise cromatográfica com diferentes detectores, e a quantificação de glifosato e AMPA com seus limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) são apresentados na Tabela 4.

Tabela 5. Revisão de literatura dos métodos de preparo de amostra e análise de glifosato e AMPA em diferentes matrizes ambientais.

Matriz	Derivatização			Extração	Detector	Glifosato		AMPA		Unidade LQ e LD	Ref
	Reagente	(°C)	Tempo (min)			LD	LQ	LD	LQ		
S ^a	NBD-Cl	90	5		FD-PLS1	2		5,4		µg L ⁻¹	(MERÁS, DÍAZ, & FRANCO, 2005)
W ^a		50	3,5 h		LC-FD		1		0,1	µg L ⁻¹	(COLIN, 2000)
W ^a	Ninidrim	100	5		HPLC-FD	96	320			µg L ⁻¹	(SUNDARAM & CURRY, 1997)
E ^a		100	5		UV	40	110			µg L ⁻¹	(BHASKARA & NAGARAJA, 2006)
S ^b	DNP	T.A (escuro)	60		HPLC-UV	0,05		0,1		µg g ⁻¹	(LUNDGREN, 1986)
F ^c		T.A	30	MSPD	HPLC-FD	0,5		0,03		µg g ⁻¹	(GARCIA DE LLASERA, 2005)
G ^a		T.A	60	SPE	HPLC-FD	0,24	0,07			µg L ⁻¹	(OLIVO, 2015)
C ^a , P ^c		T.A	30	SPE	HPLC-FD	0,16				µg L ⁻¹	(NEDELKOSKA & LOW, 2004)
(G, S) ^a S ^b		T.A	1 noite	SPE	LC-ESI-MS/MS	0,005	0,05	0,005	0,05	µg L ⁻¹	(IBÁÑEZ, 2005)
G ^c		T.A	15	SPE	LC-FD	0,5				µg g ⁻¹	(HOGENDOORN, 1999)
(P, S, G) ^a		T.A	30		LC-LC-FD		0,1		0,1	µg L ⁻¹	(HIDALGO, 2004)
(P, G) ^a	Fmoc-Cl	T.A	30	IER	LC-LC-FD		0,02			µg L ⁻¹	(HIDALGO, 2004)
S ^a		40 escuro	24 h		HPLC-UV	40		100		µg L ⁻¹	(PERUZZO, PORTA, & RONCO, 2008)
(S, SS) ^b		37	1 noite		LC-ESI-MS/MS	100		250		µg Kg ⁻¹	(VREEKEN, 1998)
(P, S, R) ^a		37	1 noite	SPE	LC-ESI-MS/MS	0,03	0,05	0,03	0,05	µg L ⁻¹	(VREEKEN, 1998)
(S, G) ^a		T.A	2h	SPE	LC-ESI-MS/MS	0,0002	0,0007	0,0002	0,0008	µg L ⁻¹	(HANKE, SINGER, & HOLLENDER, 2008)
(P, S) ^a		T.A	60	LL	HPLC - FD	0,025	0,04	0,05	0,08	µg L ⁻¹	(LE BOT, 2002)
B		T.A	60		HPLC - FD	4	13	3	10	µg L ⁻¹	(DELHOMME, 2011)

Tabela 6. Continuação.

E ^a		T.A	1 noite	SPE	UHPLC-MS/MS	0,2	0,6	0,2	0,6	µg L ⁻¹	(SASAL, 2015)
(S, G, R) ^a , P ^c		T.A	4h		LC-MS	0,8		1,6		µg L ⁻¹	(GREY, NGUYEN, & YANG, 2001)
S ^b		T.A	20		HPLC-FD	100		-		µg L ⁻¹	(MILES & MOYE, 1988)
G ^a	Fmoc-Cl	T.A	2h	IA-SPE	LC-MS/MS	0,0032		0,0096		µg L ⁻¹	(SANCHÍS, 2012)
S ^a		Coluna		mSPE-CE	CE-UV	0,4		0,4		µg L ⁻¹	(DONG, 2015)
S ^a		T.A	120		LC-FD-MS/MS	0,058	0,174	0,108	0,324	µg L ⁻¹	(RAMIREZ, BELLMUND, & GARDINALI, 2014)
S ^b		T.A	60	LL	HPLC-FD	103	172	16	28	µg Kg ⁻¹	(DRUART, 2011)
(S, G) ^a		Coluna		SPE	IC-FD	2		4		µg L ⁻¹	(MALLAT & BARCELÓ, 1998)
S ^a		Coluna		SPE	IC-FD	0,02		0,1		µg L ⁻¹	(PATSIAS, PAPADOPOULOU, & PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, 2001)
S ^a	OPA-MERC	Coluna		SPE	HPLC-FD	2		2		µg L ⁻¹	(ABDULLAH, 1995)
P ^c		Coluna		SPE	LC-FLD	20	50	30	50	µg Kg ⁻¹	(KACZYŃSKI & ŁOZOWICKA, 2015)
P ^c		Coluna		SPE	LC-MS/MS	5	10	5	10	µg Kg ⁻¹	(KACZYŃSKI & ŁOZOWICKA, 2015)
F ^c		50	10	SLM	HPLC-UV	10		25		µg L ⁻¹	(KHROLENKO & WIECZOREK, 2005)
W ^a	TsCl	50	30		HPLC-UV	10		8		µg L ⁻¹	(KAWAI, UNO, & TOMITA, 1991)
(T, S) ^a	CNBF	60	30		HPLC-UV	9				µg L ⁻¹	(QIAN, 2009)
(P, S) ^a		Coluna			HPLC-FD	170	530			µg L ⁻¹	(DA SILVA, 2011)
(S, M) ^a	p-DAC	45	8	SPE	ISP-REF	723	21900			µg L ⁻¹	(DA SILVA A. S., 2011)
(S, SS) ^b	OPA-2ME	Coluna			LC-FD	18	61	6,7	22	µg L ⁻¹	(COLOMBO & MASINI, 2011)
T ^a	DMOSC	35	10		HPLC-UV	67				µg L ⁻¹	(FANG, WEI, & LIU, 2014)
S ^a , P ^c	PITC	T.A	35		UV	5		20		µg L ⁻¹	(AMELIN, BOL'SHAKOV, & TRETIAKOV, 2012)
R ^a	MOBS-F	45	10		LC-UV	0,1		0,1		µg L ⁻¹	(SUN, 2010)

Tabela 7. Continuação.

G ^a , S ^b	TFAA-TFE	100	60		GC-MS	0,05	0,1	0,05	0,1	µg L ⁻¹	(BÖRJESSON & TORSTENSSON, 2000)
S ^a	NDA	T.A. (escuro)	3h	SPE	LIF	0,008				µg L ⁻¹	(JIANG & LUCY, 2007)

FONTE: Autoria do próprio autor

^a Matriz aquosa: S = água superficial, G = água subterrânea, P = Potável, E = água de escoamento, R = água residuária, W = água pura, C = água de chuva, T = água da torneira, M = água mineral

^b Matriz sólida: S = sólido, SS = sedimento

^c Matriz vegetal: F = Extrato de fruta, P = Extrato de planta, G = Extrato de farinha

B = Matriz biológica

T.A = Temperatura ambiente

Com os dados da Tabela 4 observamos que o reagente derivatizante comumente utilizado é o cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl), em especial para análises com cromatografia líquida e detector de fluorescência. O preparo de amostra com FMOC-Cl seguida da análise dos analitos com cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (LC-ESI-MS/MS) é uma técnica de alta capacidade e detecção, fornecendo os menores limites de detecção e quantificação. Amostras de matrizes de solo, no geral, apresentaram altos limites de detecção e quantificação, enquanto que em amostras aquosas, com limites menores que as obtidas para solos, os maiores limites foram encontrados para água superficial.

2.6.1. Determinação de glifosato e AMPA por cromatografia líquida com detector de fluorescência

A determinação por fluorescência é o método de detecção mais aplicado na análise cromatográfica de glifosato devido à maior sensibilidade e seletividade deste tipo de detecção, se comparada com a detecção por absorção no UV-VIS.

O agente derivatizante comumente utilizado em pré-coluna com detecção de fluorescência é o cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) (CATRINCK, 2014), permitindo detecção fluorimétrica dos grupamentos aminos e ligações duplas conjugadas da molécula derivatizadas (λ_{Ex} . 265 nm e λ_{Em} . 315 nm) (Coppex, 2000). A reação pode ser observada na Figura 7. Neste processo, ocorre a substituição de um átomo de hidrogênio no grupo amino em ambas as moléculas, glifosato e AMPA, por substituição nucleofílica em meio alcalino.

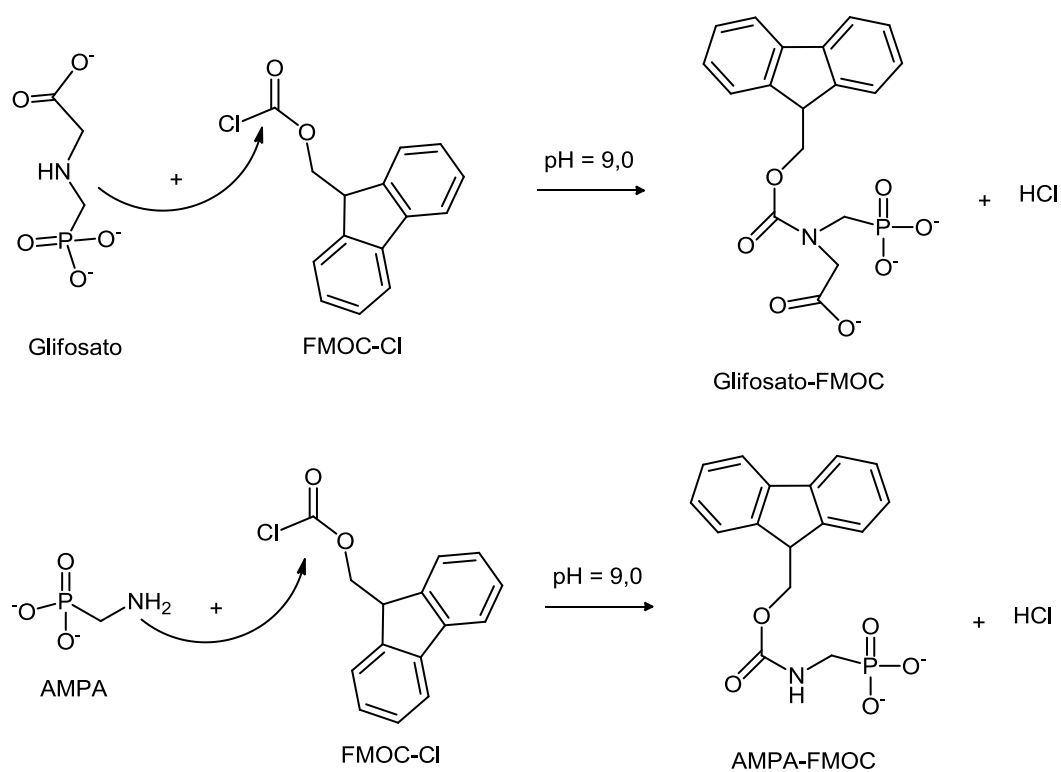


Figura 7. Reação de derivatização de glifosato e AMPA usando FMOC-Cl como agente derivatizante.

Fonte: CATRINCK, T. C. P. G. et al. 2014.

Após reações de derivatização do glifosato e AMPA com FMOC-Cl procede-se com a etapa de remoção de excesso de reagente derivatizante e sub produtos da reação, que podem interferir nas análises cromatográficas. Levantamentos bibliográficos foram realizados visando escolher a melhor técnica de extração em fase sólida (*Solid-phase Extraction*, SPE) para glifosato e AMPA em matrizes aquosas para análise por HPLC. Os resultados da pesquisa são apresentados na Tabela 5.

Tabela 8. Revisão bibliográfica das metodologias de SPE para glifosato e AMPA derivatizados com FMOC-Cl em amostras aquosas e análise por HPLC com diferentes detectores.

Sorvente SPE	Tipo de amostra de água ^a	Det. ^b	Glifosato		AMPA		Ref.
			LD (µgL ⁻¹)	LQ (µgL ⁻¹)	LD (µgL ⁻¹)	LQ (µgL ⁻¹)	
Oasis HLB	S, G	MS	0,005	0,05	0,005	0,05	(IBÁÑEZ, 2005)
	E	MS	0,2	0,6	0,2	0,6	(SASAL, 2015)
	S, G	MS	0,025	0,04	0,05	0,08	(LE BOT, 2002)
	S	MS	0,1				(BYER, 2008)
Amberlite-IRA	S, G, P	FD		0,02			(HIDALGO, 2004)
	S	FD	0,1		0,3		(CORBERA, HIDALGO, & SALVADÓ, 2006)
C ₁₈	G	MS	0,003	0,009			(SANCHÍS, 2012)
	G	FD	0,07		0,24		(OLIVO, 2015)
Strata-X	S	MS	0,002	0,007	0,002	0,008	(HANKE, SINGER, & HOLLENDER, 2008)
	S,E	MS	0,005	0,01	0,005	0,01	(DAOUK, DE ALENCASTRO, & PFEIFER, 2013)
PLRP-S	S, P, R	MS	0,03	0,05	0,03	0,05	(BRITO, 2003)

Fonte: Autoria do próprio autor

^a S = superficial, G = subterrânea, P = Potável, E = água de escoamento, R = água residual

^b Detectores acoplados ao equipamento de HPLC: MS = massas, FD = fluorescência

De acordo com a revisão (Tabela 5) observamos que os menores limites de detecção e limite de quantificação foram obtidos utilizando preparo de amostras com sorventes de SPE octadecil sílica-gel modificada (C₁₈), o qual foi selecionado para o presente trabalho.

3. Objetivo Geral

Com os estudos dos diferentes métodos de preparo de amostra e análise cromatográfica para a determinação de glifosato e seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), desenvolveu-se otimização de técnicas já existentes na literatura para a avaliação da contaminação ambiental nas águas superficiais de 21 microbacias distribuídas na Bacia do Paraná 3.

4. Estruturação da dissertação

A presente dissertação está dividida em 2 capítulos. No primeiro capítulo dois diferentes métodos de preparo de amostra foram estudados para o preparo das amostras de glifosato e AMPA em água: derivatização dos analitos com FMOC-Cl seguido de pré concentração e *clean up* utilizando SPE com cartuchos C₁₈ e; pré-concentração dos analitos com liofilização seguida de reação de derivatização com FMOC-Cl. Para a quantificação dos analitos utilizou HPLC com detector de fluorescência. Selecionou-se o método com melhor desempenho no preparo das amostras e determinou-se as concentrações de glifosato e AMPA nas águas superficiais da Bacia do Paraná 3 coletadas no período de 15 de Janeiro a 26 de Fevereiro de 2017.

No segundo capítulo foi desenvolvido a otimização e validação de figuras de mérito do método empregado no capítulo 1, bem como a determinação de glifosato e AMPA das águas superficiais da Bacia do Paraná 3 coletadas no período de 4 de Setembro à 10 de Novembro de 2017 com o método otimizado e validado.

5. Capítulo 1

5.1. Introdução

Um procedimento analítico inclui algumas etapas fundamentais para se obter resultados confiáveis e informativos. Os principais processos envolvidos incluem amostragem, armazenamento e transporte, preparo de amostra, separação, quantificação, validação analítica, avaliação estatística e tomada de decisões. (BORGES, FIGUEIREDO, & QUEIROZ, 2015)

Na etapa de análise, após o preparo de amostra, os analitos presentes são separados a partir de diferentes tipos de mecanismos, dependendo da técnica aplicada. Na quantificação, verifica-se a intensidade de resposta do analito ao princípio operacional do detector (por exemplo, corrente elétrica, radiação absorvida, razão massa/carga etc.), levando a resultados analíticos (COLLINS & BRAGA, 1988).

Atualmente, o desenvolvimento de metodologias rápidas, precisas, exatas e sensíveis tem recebido crescente interesse. Apesar dos avanços no desenvolvimento de instrumentação analítica altamente eficiente para a determinação da concentração muito baixas de analitos em amostras ambientais, geralmente o preparo de amostra é fundamental, visando a extração, o isolamento e a concentração dos analitos presentes em matrizes complexas. Além disso, o preparo de amostra pode influenciar nas técnicas de separação e identificação, aumentando a seletividade e melhorando a detectabilidade, além de manter o bom uso dos instrumentos, que por sua vez diminui o custo das análises (BORGES, FIGUEIREDO, & QUEIROZ, 2015).

Objetivos específicos

1. Avaliação do uso de dois diferentes métodos de preparo das amostras em água: derivatização seguida de extração e *clean-up* com cartuchos SPE C₁₈;
2. Seleção do método de preparo para ser aplicado nas amostras das águas superficiais da BP3;
3. Validar os parâmetros de desempenho como sensibilidade, linearidade, limite de detecção limite de quantificação do método selecionado;

4. Avaliar a contaminação por glifosato e AMPA das águas superficiais da BP3 no período de 15 de Janeiro e 26 de Fevereiro de 2017, adotando o método validado.

5.2. Revisão bibliográfica

5.2.1. Amostragem e armazenamento das águas das microbacias

O método de amostragem depende da natureza física da amostra, que pode ser determinada pela matriz, pelo analito ou por ambos, dependendo da concentração do analito na matriz. Já a quantidade de amostra requerida para análise depende não só da concentração do analito e da natureza da matriz, mas também da técnica analítica que será empregada (CETESB, 2011).

O planejamento adequado envolve a obtenção de informações preliminares sobre a área de influência do corpo d'água a ser amostrado. Levantamentos já realizados no local são importantes fontes de informação sobre as principais atividades poluidoras na bacia que pode influir na qualidade das águas, tais como as atividades: indústria, mineração, zonas urbanas, etc, a fim de estabelecer locais de amostragem. Em muitas situações, é necessária uma visita à área de estudo para georreferenciamento dos locais de coleta por meio do GPS (*Global Position System*), levantamento fotográfico com características dos locais e contato com as pessoas do local com a finalidade de se obter dados adicionais. Outra etapa do planejamento inclui verificar as vias de acessos, bem como a situação das mesmas, tempo necessário para a realização dos trabalhos, disponibilidade de apoio local para armazenamento e transporte (BRANDÃO, 2011).

Independente da natureza da amostra, a estabilidade completa para cada constituinte nunca pode ser obtida. As técnicas de preservação, a seleção adequada dos frascos e a forma de armazenamento, têm por objetivo retardar a ação biológica e a alteração dos compostos químicos; reduzir a volatilidade ou precipitação dos constituintes e os efeitos de adsorção; e/ou preservar organismos, evitando ou minimizando alterações morfológicas, fisiológicas e de densidades populacionais, em todas as etapas da amostragem (coleta, acondicionamento, transporte, armazenamento, até o momento do ensaio) (BRANDÃO, 2011).

5.2.2. Preparo de amostra

A escolha da técnica de preparo de amostras é baseada nas propriedades físico-químicas dos constituintes da amostra (analitos, interferentes e matriz), tais como polaridade, solubilidade, estabilidade química e térmica, coeficiente de partição, entre outros. É necessário conhecer ou estimar a concentração dos analitos a serem determinados, os interferentes presentes e as características do instrumento analítico a ser empregado. Métodos limpos também são desejados, com menor consumo de solvente, reagentes, frequência analítica, custos, utilização de sistemas miniaturizados entre outros.

5.2.2.1. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) é uma das técnicas mais utilizadas no preparo de amostra em análises ambientais, nas quais os analitos se encontram em níveis traços, $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} . Quando as determinações fazem uso das técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performace Liquid Chromatography*, HPLC) ou cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*, GC), o preparo de amostra, além de evitar que os interferentes da matriz coeluem com os compostos de interesse, é importante para a remoção de interferentes, garantindo a longevidade das colunas analíticas e evitando limpezas constantes no sistema de injeção, proporcionando também boas separações e melhor detectabilidade (COLLINS & BRAGA, 1988).

A SPE utiliza fases sólidas denominadas sorventes, as quais ficam contidas dentro de cartuchos, nas formas de barril ou seringa, sendo parecidas com as fases estacionárias utilizadas em cromatografia líquida em coluna. Os principais mecanismos de separação consistem em: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão. As forças químicas e físicas que atuam entre as moléculas do analito e do sorvente em fase reversa são principalmente interações de van der Waals, entre as ligações carbono-hidrogênio do analito com os grupos funcionais da superfície da sílica. Em fase normal, as principais interações são entre os grupos polares do analito e da fase sólida, por meio de ligações de hidrogênio, interações π - π , dipolo-dipolo, dipolo-induzido e dipolo induzido-

induzido. No modo de troca iônica, as interações iônicas são responsáveis pelas extrações seletivas dos analitos (COLLINS & BRAGA, 1988).

A SPE pode ser usada para quatro importantes propósitos: extração e/ou concentração do analito, isolamento do analito, isolamento da matriz ou limpeza (*clean-up*) e estocagem da amostra. Quando glifosato e AMPA são derivatizados com FMOC-Cl, cartuchos C₁₈ permitem um *clean up* da amostra removendo interferentes apolares ou de baixa polaridade advindas da reação, permitindo a eluição direta dos analitos glifosato-FMOC e AMPA-FMOC pelo cartucho (Figura 8).

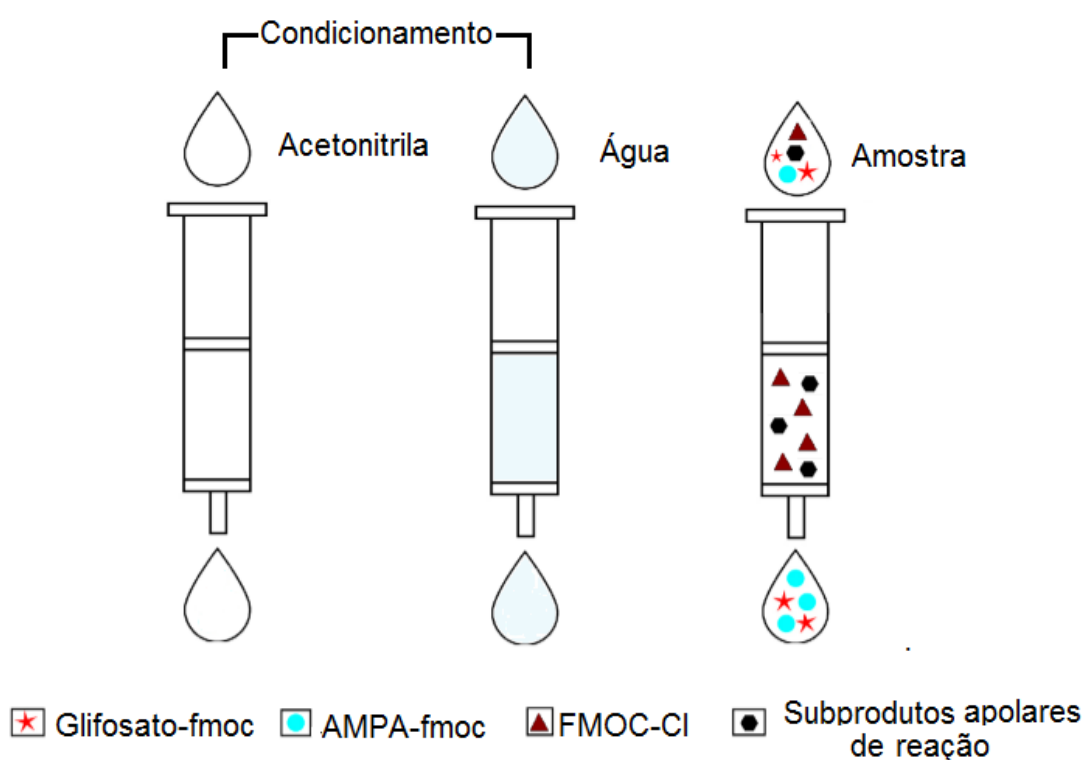


Figura 8. Etapas do preparo de amostra aquosa de glifosato e AMPA utilizando cartuchos SPE C18 após derivatizados com FMOC-Cl.

Fonte: A autoria do próprio autor.

A principal desvantagem do uso do SPE no preparo de amostra é a possibilidade de perdas do analito de interesse pela sua sorção nos cartuchos, contaminações cruzadas, não reaproveitamento de cartuchos e difícil reprodutibilidade quando não se utiliza automatização da técnica.

5.2.2.2. Liofilização

A liofilização faz proveito das propriedades físico-químicas da água (Figura 9). Qualquer ponto na região marcada "gelo", corresponde às condições nas quais a fase sólida da água é mais estável. Fato semelhante acontece nas regiões marcadas "líquida" e "vapor". As linhas que separam as regiões do diagrama na Figura 9 são os limites de fases. Em qualquer ponto da linha que limita duas regiões, as fases vizinhas coexistem em equilíbrio dinâmico (ATKINS & JONES, 2009). Desta forma, sob pressão e temperatura controladas é possível obter a sublimação de amostras contendo água congelada.

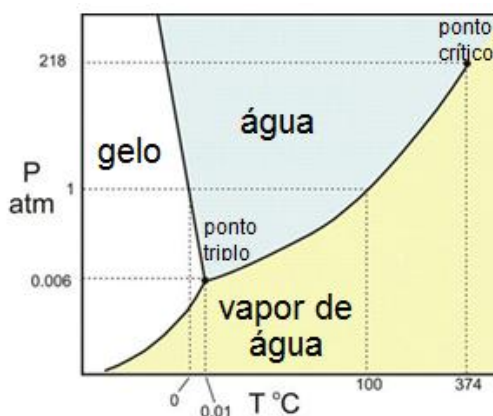


Figura 9. Diagrama de fase da água (fora de escala).

Fonte: ATKINS, P. W.; JONES, L. 2009.

Na Figura 10 temos um esquema de liofilizador com três componentes principais: a câmara de secagem no qual os frascos são aquecidos ou refrigerados; a bomba de vácuo, que fornece baixa pressão na câmara; e um condensador, que aprisiona o vapor da água advinda dos frascos.

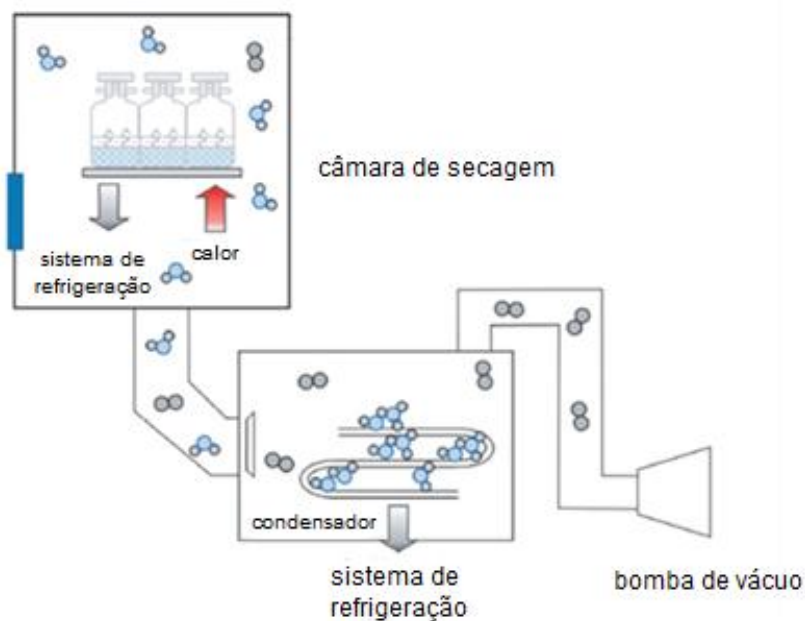


Figura 10. Esquema do equipamento liofilizador.

Fonte: SUNDARAM, J. et al. 2010

Inicialmente o produto a ser liofilizado é congelado em ultra freezer e, em seguida, colocado dentro da câmara de produtos do liofilizador. O sistema de vácuo do liofilizador aplica pressão negativa no sistema e a câmara de secagem controla a temperatura, permitindo a sublimação da água da amostra. O propósito do condensador é atrair os vapores sendo sublimados do produto. Como o condensador é mantido em um nível de energia menor em relação ao gelo do produto, os vapores se condensam e voltam à forma sólida (gelo) no condensador. O gelo sublimado se acumula no condensador e é removido manualmente no final do ciclo de secagem por congelamento (passo de descongelamento). A temperatura do condensador requerida é ditada pelo ponto de congelamento e temperatura de colapso do produto. O sistema de refrigeração mantém a temperatura do condensador substancialmente abaixo da temperatura do produto (BARLEY, s.d.).

O congelamento controlado mantém a temperatura do produto suficientemente baixa durante o processo para evitar mudanças na aparência e características do produto seco. É um excelente método para preservar uma grande variedade de materiais sensíveis ao calor, como proteínas, microorganismos, produtos farmacêuticos, tecidos e plasma (BARLEY, s.d.).

Na literatura são encontrados dois estudos de pré-concentração de pesticidas em água com a técnica de liofilização (SINHA, 2011) (RAMIREZ,

BELLMUND, & GARDINALI, 2014), porém, apenas Ramirez et al (2014) utiliza a liofilização para determinação de glifosato e AMPA.

A principal desvantagem da liofilização para análise de pesticidas é o longo tempo (variando conforme o volume) de secagem das amostras e pré-concentração de compostos não voláteis da matriz, porém oferece como vantagem a secagem de um largo número de amostras simultaneamente, operação automática e o não uso de solventes orgânicos.

5.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Em HPLC, a mistura de interesse é transferida para uma coluna com um solvente ou com uma mistura de solventes (fase móvel), por um injetor e uma por uma bomba (Figura 11). A coluna é um tubo, na maioria dos casos de aço inoxidável preenchida com a fase estacionária. A fase estacionária geralmente consiste em sílica gel porosa ou partículas de polímeros com ligantes químicos ligados em sua superfície. Esses ligantes são responsáveis pelas interações seletivas entre os analitos e a fase estacionária, que são necessárias para a separação cromatográfica efetiva. As substâncias são retidas de maneira diferentes dentro da coluna, possuindo diferentes tempos de retenção e saída na coluna. Os analitos dentro da amostra são registrados individualmente por um detector. Os dados do detector são processados por um computador resultando em um cromatograma. O número de picos corresponde ao número de componentes separados na amostra e sua área é relativa a concentração de cada analito (K., D., & HERBIG, s.d.).

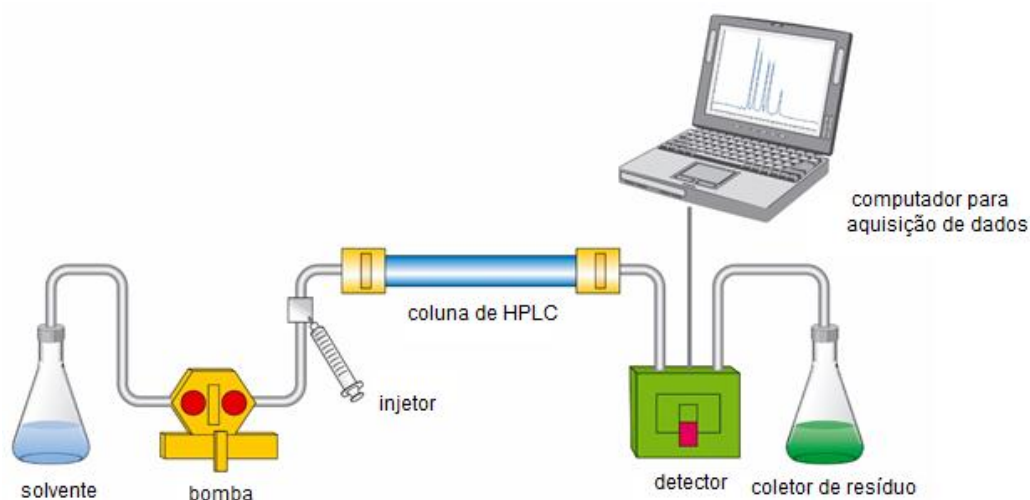


Figura 11. Configuração típica de um sistema de HPLC.

Fonte: TÖPPNER. K.; HANSEN. D.; HERBIG, E. 2017.

Existem vários detectores disponíveis para HPLC. Eles incluem tanto dispositivos gerais quanto específicos que medem os índices de refração, absorvância, fluorescência, condutividade e propriedades eletroquímicas de analitos de eluição. A espectrometria de massa também é aplicável tanto à detecção geral quanto à seletiva em cromatografia líquida (HAGE & CARR, 2012).

Detectores de fluorescência, empregado no presente trabalho, são os mais sensíveis quando comparado aos detectores comuns em cromatografia líquida (Tabela 6) (POOLE & POOLE, 2012).

Tabela 9. Propriedades dos detectores comuns em cromatografia líquida.

Nome do detector	Compostos detectados	Limites de detecção
Índice de refração	Universal (todos os compostos)	0,1 – 1 µg
Absorbância UV-Vis	Compostos com cromóforos	0,1 – 1 ng
Evaporativo com dispersão de luz	Compostos não voláteis	10 µg
Fluorescência	Compostos fluorescentes	1 – 10 pg
Condutividade	Compostos iônicos	0,5 – 1 ng
Eletroquímico	Eletroquimicamente ativos	0,01 – 1 ng
Espectrometria de massas	Universal (modo <i>full-scan</i>) Seletivo (modo SIM)	0,1 – 1 ng

Fonte: POOLE, C. F.; POOLE, S. K. 2012.

Detectores de fluorescência medem a capacidade que as substâncias químicas têm de absorver e emitir luz em um conjunto específico de comprimentos

de onda, característico de uma determinada substância. A fluorescência se aplica à detecção seletiva de qualquer analito que absorva e emita luz em determinada excitação e comprimentos de onda de emissão. Apesar de existirem poucas substâncias fluorescentes, aquelas que apresentam fluorescência são de grande importância. Os exemplos incluem diversos tipos de drogas (lícitas e ilícitas) e seus metabólitos, aditivos alimentares e poluentes ambientais. A fluorescência também pode ser usada para detectar analitos que são primeiro convertidos em um derivado fluorescente, através de reação de derivatização (HAGE & CARR, 2012).

5.3. Materiais e métodos

5.3.1. Reagentes e materiais

Padrões analíticos de Glifosato ($\geq 99,7\%$, CAS: 1071-83-6), AMPA ($\geq 98,0\%$, CAS: 1066-51-9) e FMOC-Cl ($\geq 99,0\%$, CAS: 28920-43-6) foram comprados de Fluka® Analytical (USA).

Padrões derivatizados Glifosato-FMOC ($98,0\%$, CAS: n/a) e AMPA-FMOC ($98,0\%$, CAS:195306-88-8) foram comprados de Dr Ehrenstorfer® GmbH (Germany).

Acetonitrila (for HPLC, gradiente grade, $\geq 99,9\%$, CAS: 75-05-8) e Ácido Fosfórico (≥ 85 wt. % H₂O, $\geq 99,9\%$ trace metals basis, CAS: 7664-38-2) foram comprados de Sigma-Aldrich® (EUA).

Borato de sódio (Borax, P.A, CAS: 1303-96-4) obtido a partir de Synth® e Ácido Bórico (P.A, CAS: 10043-35-3) obtido de Neon®, ambos indústria brasileira.

Cartuchos SPE C₁₈ (CHROMABOND®, 500 mg) foram comprados de Macherey-Nagel® (Germany).

5.3.2. Instrumentação

Para o preparo de amostras utilizou-se liofilizador de bancada Christ (Alpha 1-2 LD Plus). Para separação e quantificação dos analitos utilizou-se Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*,

UHPLC), no modo HPLC, com sistema consistindo de uma bomba de dois pistões, um degaseificador e auto-injetor, acoplada com detector de fluorescência (Modelo Dionex UltiMate 3000, Thermo Scientific, Alemanha). Utilizou-se coluna cromatográfica de fase reversa Ace 5 (C18, 5.0 μm , 250x4.6 mm i.d.) mantida a 25 °C, injeções com volume de 20 μL e a detecção dos analitos derivatizados realizada por fluorescência em comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{em}) de 260 nm e 317nm, respectivamente.

5.3.3. Seleção da área de estudo

A Bacia Hidrográfica do Rio Paraná 3 (BP3) é uma região localizada no oeste do Paraná e sul do Mato Grosso do Sul, perfazendo 28 municípios. É uma região intensamente explorada por agricultura intensiva mecanizada, mas com diferentes níveis de ocupação em função de condições de relevo e características locais. Possui uma agroindústria dinâmica e em expansão, mas centralizada em alguns municípios polos. Desta forma, seu crescimento tem sido heterogêneo, com municípios em fase de expansão populacional e municípios com crescimento populacional mínimo ou mesmo crescimento negativo.

Segundo Bombardi, quanto maior a propriedade agrícola maior a probabilidade de se utilizar agrotóxicos. Desta forma, buscou-se no processo de seleção microbacias onde havia predominância de propriedades maiores ou próximas de 100 ha. Outro critério de seleção das microbacias foram regiões com cultura predominante de soja e milho, por apresentarem maior volume de consumo de agrotóxico (BOMBARDI, 2011).

Com informações dos Indicadores de Sustentabilidade de Bacias Hidrográficas do IPARDES (IPARDES, 2013), em conjunto com colaboradores da Usina Hidrelétrica de Itaipu (PR-Brasil), foi elaborada uma tabela com a colocação dos principais municípios da BP3 em termos de produção agrícola, área colhida de soja e milho, tamanho dos estabelecimentos agropecuários, quantidade de agrotóxico por área plantada e como estava a qualidade da água dos principais rios do referido município durante o processo de seleção das microbacias (Tabela 7). Após a classificação, foram ranqueados os principais municípios que por ventura pudessem contribuir em termos de utilização de agrotóxico.

Tabela 10. Classificação dos municípios da BP3 em termos de produção agrícola, consumo de agrotóxicos e qualidade das águas superficiais das suas microbacias.

Colocação	Produção agrícola de soja (> ha)	Produção agrícola de Milho (t)	Área (ha) >=50 a < 100	Área colhida de soja (ha)	Área colhida de milho (ha)	Quantidade de agrotóxico (kg/ha/ano)	Qualidade de água
1º	Cascavel	Cascavel	Ouro Verde	Cascavel	Toledo	Mercedes	Toledo
2º	Terra Roxa	Toledo	Santa Tereza do Oeste	Toledo	Terra Roxa	Matelândia	Quatro Pontes
3º	Toledo	Terra Roxa	Terra Roxa	Terra Roxa	São Miguel		Medianeira
4º	Marechal Rondon	São Miguel		São Miguel	Guaíra		Marechal
5º	Santa Helena	Guaira		Guaira	Marechal Rondon		Matelândia
6º	São Miguel	Santa Helena		Marechal Rondon	Santa Helena		Santa Helena
7º		Maripa		Santa Helena	Cascavel		Diamante
8º		Santa Tereza		Céu Azul	Nova Santa Rosa		Ramilândia
9º				Nova Santa Rosa	Maripa		Vera Cruz
10º				Ouro Verde	Missal		Ouro Verde
11º				São Pedro	Santa Terezinha		Cascavel
12º				Santa Tereza	Santa Tereza		Missal

FONTE: BENASSI. S. F et al 2016.

Buscou-se selecionar microbacias com mais de 70% de uso agrícola e, ao mesmo tempo, evitando aquelas com grande percentual de área urbana, florestas, pastagens ou banhados.

Foi utilizada ainda a base hidrográfica e altimétrica da Copel para delimitações das microbacias e classificação delas quanto à ordem do curso d'água. Quanto à dimensão espacial, buscaram-se bacias de até 1.000 ha, de relevo plano, ondulado e suave ondulado. Quanto à ordem, buscaram-se rios de até 2ª ordem (junção de duas nascentes), excepcionalmente 3ª ordem (junção de dois rios de 2ª ordem). Justificam-se estes critérios por buscarmos pontos amostrais em cursos d'água com menor vazão.

Utilizou-se ainda a plataforma *Google Earth* para analisar individualmente o local ideal no curso d'água para realizar o ponto de coleta, sendo de fácil acesso, próximo à residências ou em pequenas pontes rodoviárias.

Ao todo foram selecionadas 21 microbacias (Figura 12) distribuídas em 12 municípios: Sangas Memória I e II, Água de Palmito, Alto Rio Toledo, Córrego Guarani e Córrego Peaberu situadas no município de Toledo; Sanga Buriti situada nos municípios de Itaipulândia e Missal; Lajeado Santa Rosa e Sanga Ajuricaba no município Marechal Cândido Rondon; Sanga Tapena em Maripá; Sanga Pinhal no município de Matelândia; Córrego Belmonte em Mercedes; Rio Azul e Córrego Lajeado no município Ouro Verde do Oeste; Rio Pacuri e Moreninha em Santa Helena; Sanga Shangri-lá e Rio Bonito no município de Santa Terezinha de Itaipu; Córrego Água Fria em São Miguel do Iguaçu; Córrego Tamanduá e Alto Taturi no município de Terra Roxa.

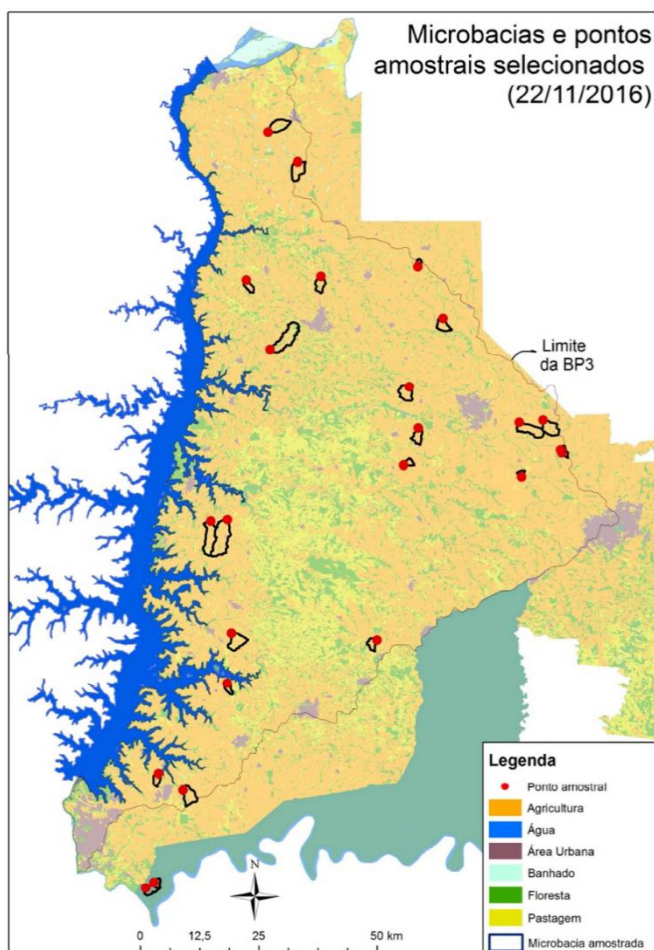


Figura 12. Mapa de uso e ocupação do solo e destaques para as microbacias selecionadas.

Fonte: ITAIPU BINACIONAL Divisão de Geoprocessamento – Classificação supervisionada de imagem Landsat OLI 8 (2014).

A seleção das microbacias a ser amostradas resultou em locais bem distribuídos em toda a Bacia do Paraná 3.

5.3.4. Método de amostragem

A aplicação do glifosato é realizada, geralmente, em localidades onde a umidade relativa do ar esteja acima de 60%, temperaturas inferiores a 30 °C e ventos abaixo de 8 Km h⁻¹, sendo evitado a aplicação em períodos chuvosos, pois após a aplicação o glifosato requer um período de seis horas sem chuva para uma completa absorção foliar. Para um bom controle, os agricultores tem o costume de aplicar o herbicida na dose de 4 L ha⁻¹, com antecedência mínima de 20 a 25 dias da semeadura de soja (GIESY, DOBSON, & SOLOMON, 2000).

O período de amostragem das águas superficiais das 21 microbacias situadas na BP3 foi selecionado conforme o calendário agrícola das plantações de soja na região da BP3 (Tabela 8). De acordo com a Portaria nº 202 (19/07/2017) pela Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR): o vazio sanitário vegetal para soja no território paranaense, no qual é proibido cultivar, manter ou permitir a existência de plantas vivas de soja, ficou compreendido entre 10 de Junho a 10 de Setembro de 2017/2018. Por esse motivo, selecionou-se a coleta das amostras no período do cultivo das culturas: durante 6 semanas no primeiro semestre, de 15 de Janeiro a 26 de Fevereiro e; durante 6 semanas no segundo semestre, de 4 de Setembro à 10 de Novembro, no ano de 2017, coletando-se semanalmente duplicatas de cada ponto. O branco amostral foi coletado fora do período de cultivo da cultura de soja e milho.

Tabela 11. Período do uso de glifosato nas culturas de soja e milho na região da BP3.

Mês	Semana	Atividades		
		Dessecação do solo	Safra de milho	Safra de soja
Janeiro	1	Dessecação com glifosato para a colheita de soja	1. Semeadura do milho "safrinha". 2. Pulverização de glifosato nas culturas de milho transgênico.	Colheita de soja
	2			
	3			
	4			
Fevereiro	1	Dessecação com glifosato para a colheita de soja	1. Semeadura do milho "safrinha". 2. Pulverização de glifosato nas culturas de milho transgênico.	Colheita de soja
	2			
	3			
	4			
Agosto	1			

	2				
	3				
	4				
	1				
Setembro	2	Dessecação com glifosato para a pré-semeadura	1.	Principal período para semeadura do milho "verão".	
	3		2.	Pulverização de glifosato nas culturas de milho transgênico.	
	4				
	1			Principal período para semeadura da soja	
Outubro	2			1.	Principal período para semeadura da soja.
	3			2.	Pulverização de glifosato na cultura de soja
	4				

Fonte: Autoria do próprio autor

Realizou-se apenas uma amostragem das águas superficiais de cada microbacia semanalmente dentro do período de coleta, em dias aleatórios. Além das amostragens semanais, coletou-se também amostras extras (em datas aleatórias) para as microbacias que apresentaram precipitação local acima de 10 mm de água de chuva. Estas coletas extras foram realizadas dentro do período amostral selecionado para as coletas semanais, acarretando, em alguns casos, mais que uma data de amostragem por microbacia em cada semana. É importante ressaltar que não foram feitas coletas em todas as datas de chuvas no período amostral selecionado, seja devido à dificuldade de acesso ao local ou a ausência de amostradores durante as datas de chuva.

A amostragem das águas superficiais nas microbacias da BP3 seguiu a metodologia estabelecida para pesticidas organofosforados pela Agência Nacional das Águas – ANA no *Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras de Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos* (1 ed. Brasília-DF, 2011): Coletou-se as amostras em frascos de 1 L de vidro cor âmbar com tampa de rosca, passado por lavagem especial. Após a coleta e transporte, feitos em caixas térmicas com gelo, as amostras foram filtradas em membrana de celulose 0,45µm. Fez-se necessário o congelamento das amostras coletadas no período do primeiro semestre de 2017, a – 20 °C, não sendo armazenadas como recomendando pelo guia de coleta da Agência Nacional das Águas (armazenamento sob refrigeração a 4 °C (+/- 2°C) em até 7 dias) (CETESB, 2011), portanto, fez-se necessário um estudo de estabilidade dos analitos durante o período de 8 semanas de

armazenamento das amostras. O estudo foi realizado tanto na água ultrapura quanto na matriz e serão apresentados no próximo capítulo (vide item 6.5.2.5.). As amostras coletadas no segundo semestre não foram congeladas e foram analisadas dentro do período de 7 dias recomendando pelo guia de coleta da Agência Nacional das Águas.

5.3.5. Preparo de amostras

Dois métodos de preparo de amostras foram testados: Reação de derivatização seguida da extração em fase sólida utilizando cartucho C₁₈ e liofilização seguida de reação de derivatização.

5.3.5.1. Reação de derivatização

Para as reações de derivatização utilizou-se o método descrito por Báez et al, com adaptações (BÁEZ, 2014). Uma alíquota de 5 mL de amostra foi introduzida em vials de vidro de 20 mL, seguida da adição de 600 µL de 0,040 mol L⁻¹ tampão de borato (pH 9), 2 mL de acetonitrila e 300 µL de solução de 1,60 mg mL⁻¹ de FMOC-Cl (preparada em acetonitrila). O frasco foi agitado suavemente durante 30s em vortex e a reação finalizada após 30 min.

5.3.5.2. Extração em fase sólida com cartuchos C₁₈

Para a extração com SPE C₁₈ utilizou-se o método empregado por Báez et al (2014)¹⁰¹, com modificações. Inicialmente as amostras foram filtradas em filtros de acetato de celulose 0,45 µm e derivatizadas. Condicionou-se o cartucho SPE C₁₈ com 3 mL de acetonitrila e 5 mL de água. Em seguida, 5 mL de amostra derivatizada foi diluída pela adição de 10 mL de água e em seguida introduzida no cartucho sob vazão de 2 mL min⁻¹, sendo coletada diretamente em balão de 25 mL contendo 2 mL de tampão borato 0,040 M (pH 8). Seu volume foi completado com água e a amostra resultante filtrada em filtro PTFE 0,22 µm, afim de se reter menores impurezas e prolongar a vida útil da coluna cromatográfica.

Posteriormente as amostras foram enviadas para análise cromatográfica.

5.3.5.3. Liofilização

Para a pré-concentração dos analitos com liofilização utilizou-se o método empregado por Ramirez et al, com modificações (RAMIREZ, BELLMUND, & GARDINALI, 2014). Inicialmente as amostras foram filtradas em filtros de acetato de celulose 0,45 µm. Em seguida, adicionou-se uma alíquota 20 mL de amostra, não derivatizada, em tubo Falcon de 50 mL, seguida de refrigeração a – 80°C. O tubo contendo a amostra congelada foi recoberto com papel laminado contendo pequenos furos em sua superfície, permitindo a evaporação da água da amostra e evitando perdas durante a liofilização. Em seguida, a amostra foi liofilizada por aproximadamente 72h ou até secagem completa, sob alto vácuo e temperatura de -10 °C. Após liofilizada, o volume da amostra foi reconstituído com 5 mL de água e em seguida derivatizada como descrito anteriormente (vide item 5.3.5.1). Após a derivatização transferiu-se uma alíquota de 5 mL da solução derivatizada para balão volumétrico de 25 mL contendo 2 mL de tampão de borato 40 mM (pH 8), completando seu volume com água. A amostras foi filtrada em filtro PTFE 0,22 µm afim de se reter menores impurezas e prolongar a vida útil da coluna cromatográfica. Posteriormente as amostras foram enviadas para análise cromatográfica.

5.3.6. Avaliação dos métodos de preparo de amostra

Para a seleção do método mais adequado para o preparo de amostras das águas superficiais, comparou-se os métodos: SPE utilizando cartuchos C₁₈ e liofilização. A avaliação foi realizada construindo-se diferentes curvas analíticas para ambos os métodos.

Para o método de preparo de amostra com SPE foram preparados 6 pontos de curva analítica, para glifosato e AMPA, nas concentrações de 10, 50, 275, 500, 775 e 1000 µg L⁻¹, todos em unicata devido a limitação da quantidade de cartuchos disponíveis. Para o método de preparo de amostra utilizando liofilização foram

realizados 9 pontos para a curva analítica com glifosato e AMPA nas concentrações de 0,1; 1, 5, 10, 30, 65, 100, 200 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$. Uma faixa com menores concentrações foi selecionada para a construção da curva analítica preparada pela liofilização devido a pré-concentração dos analitos, que em concentrações maiores acarreta a saturação do cromatograma obtido com o detector de fluorescência.

Ferramentas estatísticas para análise de alguns parâmetros de validação do método, como repetibilidade (vide item 6.5.2.2.), linearidade (vide item 6.5.2.3.), limite de detecção e quantificação (vide item 6.3.5 e 6.3.6.) foram empregados. A partir dos dados das curvas selecionou-se a técnica mais adequada para o preparo e análise das amostras superficiais da BP3 pela sensibilidade (vide item 6.3.4) de cada método utilizando ferramentas estatísticas para estimar a existência de diferenças entre os coeficientes angulares de cada curva analítica.

5.3.7. Análise cromatográfica

Para separação e quantificação dos analitos utilizando HPLC com coluna de fase reversa C_{18} e detector de fluorescência fez-se necessário o uso de fase móvel gradiente: H_3PO_4 0,05% (pH 2,5, solvente A) e acetonitrila (solvente B) com vazão de 1 mL min^{-1} . As amostras preparadas por SPE possuem a vantagem da etapa de *clean up*, removendo subprodutos e excesso de reagente derivatizante da reação, diferentemente do que ocorre no preparo de amostras utilizando liofilização, que permite apenas a pré-concentração dos analitos. Portanto, foi necessário o desenvolvimento de dois diferentes métodos cromatográficos a fim de eliminar todas as impurezas advindas de cada preparo de amostra e completa eluição dos interferentes.

5.3.7.1. Eluição das amostras preparadas por SPE

Para o programa de gradiente utilizou-se diferentes proporções do solvente B: de 0 a 7 min manteve-se 10% de B; 7 a 27 min B aumentou para 45%; de 27 a 32 min manteve-se B na proporção de 45%; em 37 min B foi reduzido para 10%; em seguida reequilibrou as condições iniciais mantendo 10% de B até completar

42 min de corrida.

5.3.7.2. Eluição das amostras preparadas por liofilização

Para o programa de gradiente utilizou-se diferentes proporções do solvente B: 0 a 7 min manteve-se 10% de B; 7 a 27 min B aumentou para 45%; de 27 a 32 min B aumentou para 45%; de 32 a 37 min B diminui para 10%, em seguida reequilibrou as condições iniciais mantendo 10% de B até completar 42 min de corrida.

5.4. Resultados e Discussões

5.4.1. Separação cromatográfica e detecção

Para a análise de glifosato e AMPA foram testadas diferentes gradientes e solventes. Experimentou-se o uso de tampão borato (pH 8) e acetonitrila (ACN) como descrito por Báez et al (BÁEZ, 2014), bem como o uso de tampão de amônio (pH 9,5) e ACN como descrito por Ramirez et al (RAMIREZ, BELLMUND, & GARDINALI, 2014), porém, a eluição que melhor se adequou ao presente trabalho foi realizada com gradiente utilizando metodologia Druart et al (DRUART, 2011) com algumas modificações. Os solventes utilizados como fase móvel foram: H₃PO₄ 0,05% (pH 2,5, solvente A) e ACN (solvente B) com vazão de 1 mL min⁻¹.

Diferentes tempos de retenção foram obtidos na eluição das amostras preparadas por SPE: 27,5 min para glifosato e 29,5 min para AMPA (Figura 13).

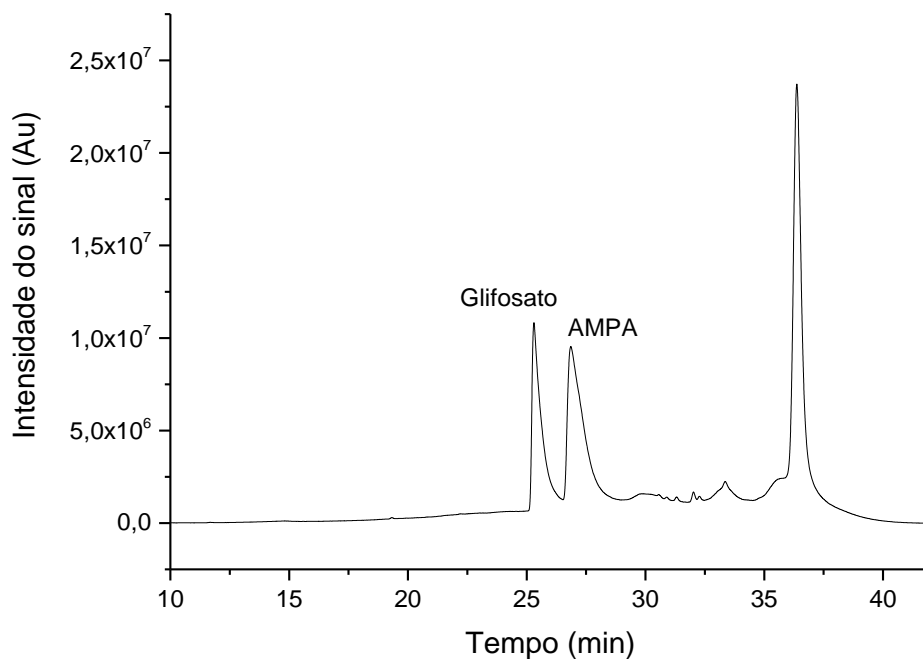


Figura 13. Cromatograma de padrões glifosato (25,3 min) e AMPA (26,9 min) nas concentrações de 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparados em água, derivatizados, extraídos por cartuchos SPE C18 e analisadas por HPLC com detector de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$).

Fonte: Autoria do próprio autor.

A eluição das amostras preparadas pela liofilização o método de análise forneceu tempos de 25 min para glifosato e 27 min para AMPA (Figura 14).

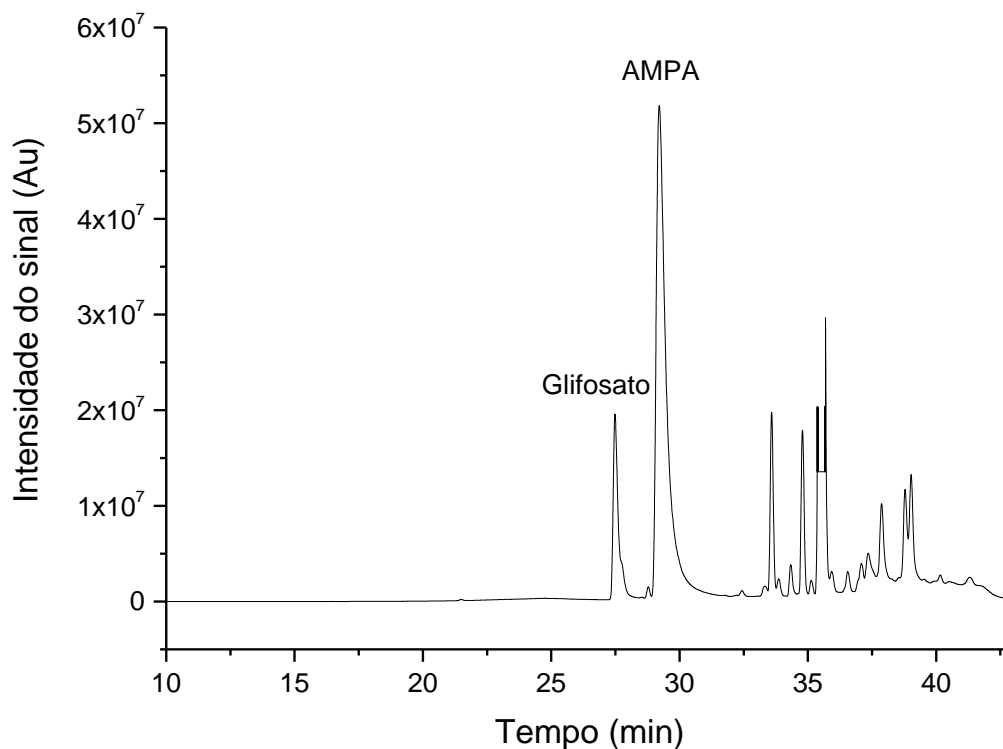


Figura 14. Cromatograma dos padrões glifosato (27,5 min) e AMPA (29,2 min) nas concentrações de $200,0 \mu\text{g L}^{-1}$ preparados em água, liofilizadas, derivatizadas e analisadas por HPLC com detector de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$).

Fonte: A autoria do próprio autor.

A confirmação dos tempos de retenção foram feitas pela análise dos padrões derivatizados glifosato-FMOC e AMPA-FMOC nos diferentes métodos de eluição.

5.4.2. Preparo de amostra utilizando liofilização

Cálculos do desvio padrão relativo (*Relative Standard Deviation*, RSD%) demonstraram boas variações entre as replicatas dos pontos das curvas analíticas dos analitos em água, que foram preparados e analisados duplicata. Apenas as concentrações de $0,1$ e $30 \mu\text{g L}^{-1}$ da curva analítica de glifosato demonstraram grandes variações de erros, acima do recomendado pela associação oficial de química analítica (Association of Official Analytical Chemistry, AOAC), que em concentrações menores ou igual a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ o RSD não deve ultrapassar o valor de 30% e, em concentrações entre $10 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$ não deve ultrapassar o valor de

21%. (Tabela 9).

Tabela 12. Desvio padrão relativo (%) da curva analítica de glifosato e AMPA preparadas por liofilização seguida de reação de derivatização e análise por HPLC com detector de fluorescência.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	
	Glifosato	AMPA
0,1	60,3	10,5
1,0	4,9	8,0
5,0	19,1	13,1
10,0	5,4	2,0
30,0	29	3,3
65,0	4,2	0,5
100,0	3,1	0,5

Fonte: Autoria do próprio autor.

5.4.2.1. Detecção de outliers

Foi aplicado testes para a detecção de valores anômalos (*outliers*, vide item 6.3.1.1.) nas concentrações com altas porcentagens de RSD da curva analítica do glifosato. Teste T_n em um intervalo de confiança de 95% ($T_{n\text{crítico}} = 1,16$) não demonstraram anormalidades nas variações para a rejeição de valores na curva analítica do glifosato (Tabela 10).

Tabela 13. Teste T_n para detecção de outliers nas concentrações de 0,1 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ da curva analítica do glifosato.

Teste T_n					
Analito	($\mu\text{g L}^{-1}$)	Replicata	$T_{n\text{calculado}}$	Comparação	Significância
Glifosato	0,1	1	0,8	$ T_{n\text{calculado}} < T_{n\text{crítico}}$	Insignificante
		2	0,91	$ T_{n\text{calculado}} < T_{n\text{crítico}}$	Insignificante
	30	1	0,88	$ T_{n\text{calculado}} < T_{n\text{crítico}}$	Insignificante
		2	0,85	$ T_{n\text{calculado}} < T_{n\text{crítico}}$	Insignificante

Fonte: Autoria do próprio autor.

Portanto, apesar de algumas amostras da curva analítica de glifosato apresentarem porcentagens de RSD acima do critério de aceitação pela AOAC o teste para a detecção de *outliers* demonstrou que nenhum ponto deve ser rejeitado.

5.4.2.2. Construção da curva analítica

As curvas analíticas foram processadas pelo software Origin®. A curva analítica de glifosato com método de preparo utilizando liofilização nas concentrações de: 0,1; 1; 5; 10; 30; 65 e 100 µg L⁻¹ são apresentadas na Figura 15. O ajuste linear com adição de linha de tendência forneceu uma equação de reta: $y = 21376,5 x - 56200,8$; e coeficiente de regressão $R^2 = 0,858$.

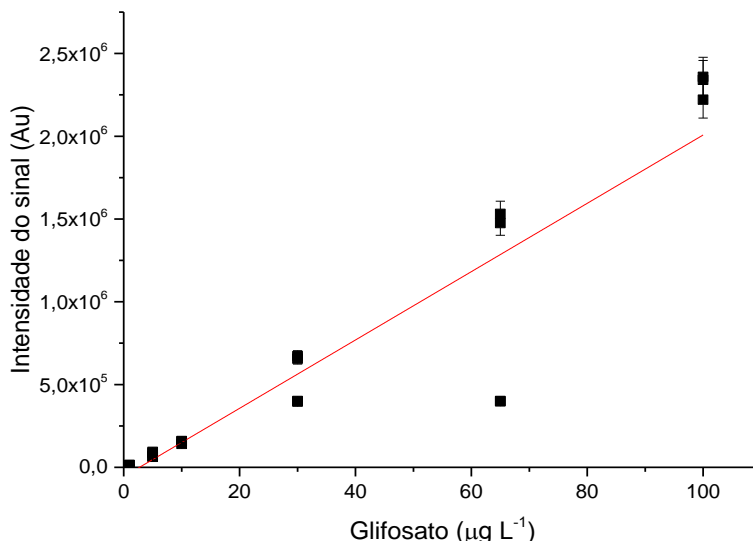


Figura 15. Curva analítica do glifosato preparada em água ultrapura através do método de preparo de amostra com liofilização e análise por HPLC com detector de fluorescência.

Fonte: Autoria do próprio autor.

Apenas o valor do coeficiente de regressão (R^2) não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração. Modelos de calibração com alto resíduo no sinal analítico ou ponto mal distribuído ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependentes e independentes. Para evitar problemas de falta de ajuste durante a modelagem, fez-se necessária a análise cuidadosa do gráfico de resíduos do sinal analítico e a aplicação de testes para determinar a faixa na qual a curva de calibração apresenta um bom comportamento linear.

No Anexo A temos os resíduos da curva analítica da curva analítica do glifosato. A análise dos resíduos demonstrou presença de amostras atípicas e erros com distribuição não uniforme, sendo necessário um ajuste para garantir a adequação da linearidade. A fim de se obter uma melhor distribuição dos resíduos foi necessário retirar uma amostra do padrão e glifosato na concentração de 30 µg

L⁻¹ e uma amostra do padrão na concentração de 65 µg L⁻¹, obtendo uma nova curva analítica (Figura 16), com equação da reta $Y = 23354,5 x - 30344,290$ e regressão linear $R^2 = 0,997$, com uma distribuição dos resíduos mais uniforme.

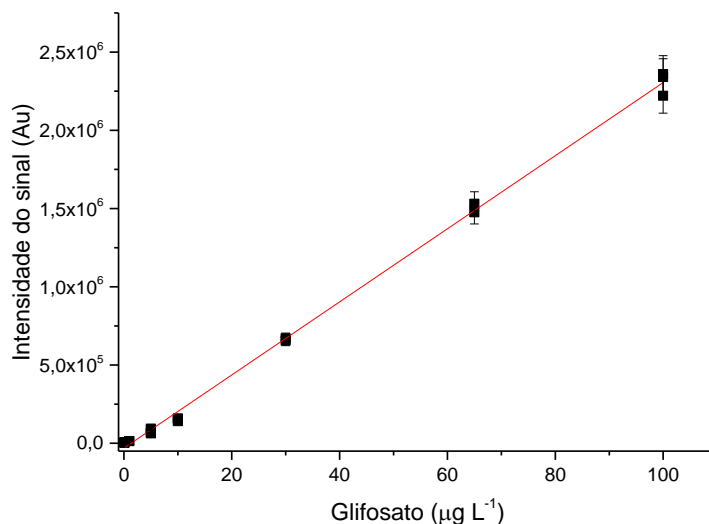


Figura 16. Nova curva analítica após remoção de uma amostra de glifosato na concentração de 30 µg L⁻¹ e outra na concentração de 65 µg L⁻¹ da curva analítica da figura 13.

Fonte: Autoria do próprio autor.

A curva analítica do AMPA preparado pela liofilização nas concentrações de: 0,1; 1, 5, 10, 30, 65 e 100 µg L⁻¹ são representadas na Figura 17. O ajuste linear com adição de linha de tendência forneceu a equação da reta $y = 115078,1 x - 285299,4$ e coeficiente de regressão $R^2 = 0,929$.

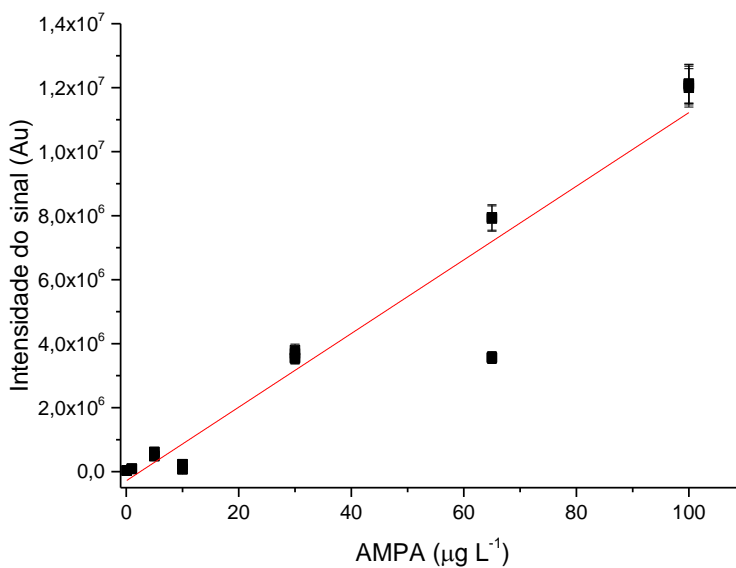


Figura 17. Curva analítica do metabólito AMPA preparada em água ultrapura através do método de preparo de amostra com liofilização e análise por HPLC com detector de fluorescência.

Fonte: Autoria do próprio autor.

No Anexo B temos os resíduos da curva analítica do AMPA. A análise dos resíduos demonstrou presença de amostras atípicas e erros com distribuição não uniforme, sendo necessário um ajuste para garantir a adequação da linearidade. Quando retiramos todas as amostras padrões na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e uma das amostra padrão na concentração de $65 \mu\text{g L}^{-1}$ na curva analítica de AMPA obtemos uma nova curva analítica (Figura 18), com equação da reta $Y = 121131,6 x - 11510,5$ e regressão linear $R^2 = 0,999$.

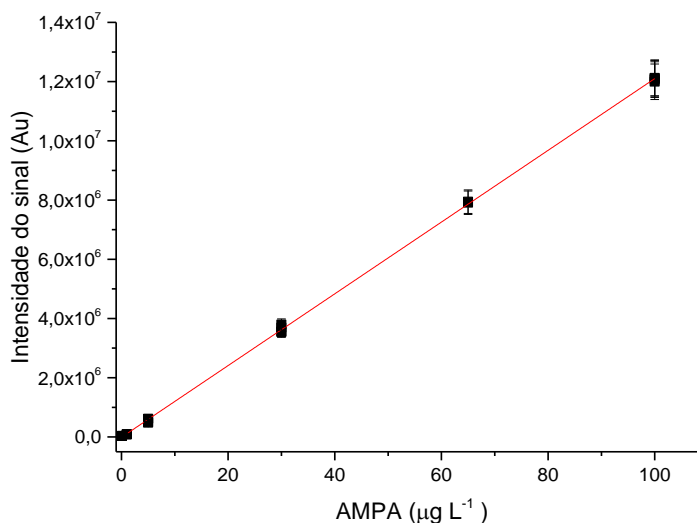


Figura 18. Nova curva analítica após retirada de todas amostras na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e de duas amostras na concentração de $65 \mu\text{g L}^{-1}$ e de AMPA na curva analítica da figura 17.

Fonte: Autoria do próprio autor.

5.4.3. Preparo de amostra utilizando SPE C18

Devido a limitação das replicatas empregadas na construção da curva analítica, feitas em unicata e analisadas em triplicata, não foi possível empregar análises estatísticas para otimização da curva.

As curvas analíticas construídas a partir da análise de glifosato e AMPA nas concentrações de: 10, 50, 275, 500, 775 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$; utilizando preparo de amostras com cartucho SPE C₁₈ são apresentadas nas Figuras 19 e 20.

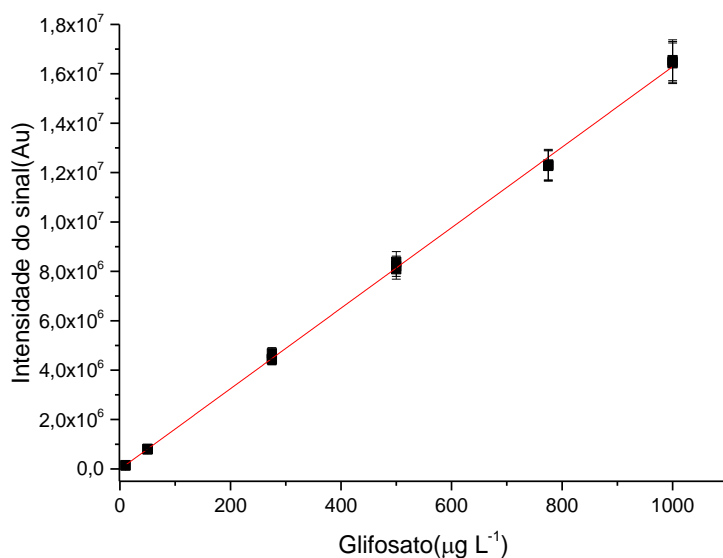


Figura 19. Curva analítica do glifosato preparada em água ultrapura através do método de preparo de amostra com SPE C18 e análise por HPLC com detector de fluorescência. $R^2 = 0,9993$ e $y = 16308 x + 28808$.

Fonte: Autoria do próprio autor.

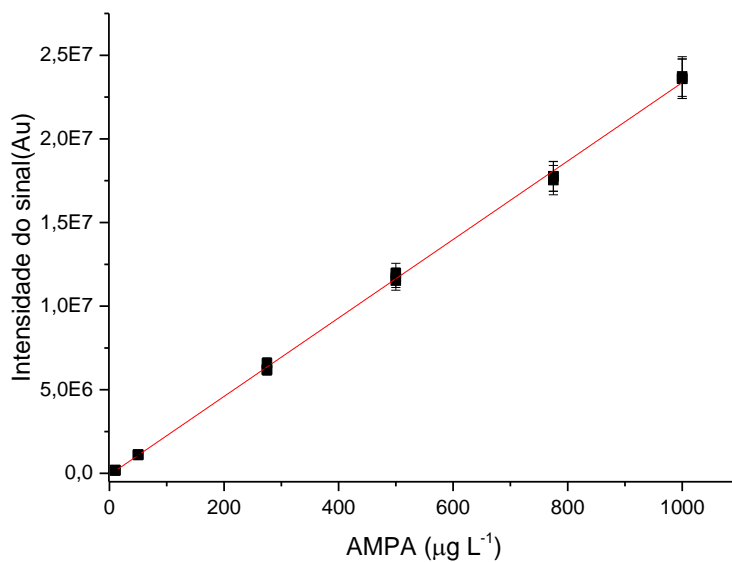


Figura 20. Curva analítica do metabólito AMPA preparada em água ultrapura através do método de preparo de amostra com SPE C18 e análise por HPLC com detector de fluorescência. $R^2 = 0,9996$ e $y = 23481 x + 120886$.

Fonte: Autoria do próprio autor.

5.4.4. Método de preparo de amostras: SPE vs liofilização

A partir dos dados da equação da reta e equações quimiométricas foi possível calcular LD e LQ para glifosato (GLY) e AMPA preparados por SPE e liofilização, individualmente, ambos em água ultrapura. Os resultados são demonstrados na Tabela 11.

Tabela 14. Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) para padrões de glifosato (GLY) e AMPA preparadas em água, por diferentes métodos de preparo e diferentes eluições na análise por HPLC com detector de fluorescência.

Limite de Detecção (LD)		
Preparo de amostra	GLY ($\mu\text{g L}^{-1}$)	AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Liofilização	0,1	0,11
SPE	1,2	2,1
Limite de Quantificação (LQ)		
Preparo de amostra	GLY ($\mu\text{g L}^{-1}$)	AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Liofilização	0,3	0,3
SPE	3,5	6,3

Fonte: Autoria do próprio autor.

Pode-se observar que para a liofilização obtivemos menores limites de detecção e quantificação, porém, apenas com estes dados não é possível fazer afirmações sobre a sensibilidade dos dois diferentes métodos. A comparação da inclinação da reta das curvas analíticas (coeficiente angular), utilizando teste t de Student pareado (vide item 6.3.3.), com $T_{\text{crítico}} = 2,20$ ($f = 11$, 95%) para glifosato e $T_{\text{crítico}} = 2,23$ ($f = 10$, 95%) para AMPA, demonstraram que a inclinação da curva analítica construída preparando-se as amostras com liofilização é diferente da inclinação da curva analítica construída preparando-se as amostras com SPE C₁₈, para ambos os analitos (Tabela 12). A maior inclinação da curva analítica torna a liofilização o método mais sensível para preparo e análise das amostras de glifosato e AMPA quando comparada ao SPE C₁₈, ou seja, pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta de análise.

Tabela 15. Teste *t* de Student para as inclinações das curvas analíticas construídas com dois diferentes preparos de amostras, Liofilização e SPE C₁₈, e analisadas por HPLC com detector de fluorescência.

Curva analítica do glifosato		
	Liofilização	SPE C₁₈
Coefficiente angular da curva (x)	23354,5	16308,0
Desvio padrão global da curva (s)	230,2	105,4
T calculado		123,54
Resultado	$T_{calculado} \gg t_{crítico}$	Efeito Significativo
Curva analítica do AMPA		
	Liofilização	SPE C₁₈
Coefficiente angular da curva (x)	121131,6	23481,0
Desvio padrão global da curva (s)	395,4	210,3
T calculado		925,05
Resultado	$T_{calculado} > t_{crítico}$	Efeito Significativo

Fonte: Autoria do próprio autor.

Portanto, o método de preparo de utilizando liofilização foi selecionado para a determinação de glifosato e AMPA nas águas superficiais.

5.4.5. Estudo de caso: ocorrência de glifosato e AMPA na Bacia do Paraná

A determinação de glifosato e AMPA nas amostras de água superficial coletas nas 21 microbacias no primeiro semestres de 2017 são apresentadas na Tabela 13. Nela são apresentados 22 pontos de monitoramento, porém o ponto 10 foi retirado do planejamento em decorrência da falta de amostrador local, resultando em 21 pontos de monitoramento em microbacias.

Tabela 16. Teores de glifosato (GLY) e AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas microbacias coletadas durante 6 semanas consecutivas no primeiro semestre de 2017.

Ponto	Microbacia	Data da coleta das amostras em 2017											
		15 – 22 Jan		23 – 29 Jan		30 Jan – 05 Feb		06 – 12 Feb		13 – 19 Feb		20 – 26 Feb	
		GLY	AMPA	GLY	AMPA	GLY	AMPA	GLY	AMPA	GLY	AMPA	GLY	AMPA
1	Esquina Memória I	-	-	1,92	0,79	0,49	D	-	-	-	-	-	-
2	Esquina Memória II	-	-	D	-	0,63	0,36	-	-	-	D	-	-
3	Sanga Shangrilá	-	-	D	-	0,56	-	-	-	-	-	-	-
4	Córrego Água Fria	-	-	-	-	0,79	14,78	D	1,49	-	-	-	-
5	Sanga Buriti	2,66	0,72	-	-	1,38	D	0,69	-	-	-	-	0,32
6	Sanga Pinhal	D	-	0,50	-	D	D	-	-	-	0,91	-	-
7	Rio Bonito	-	-	D	-	0,53	-	-	-	D	-	1,51	-
8	Rio Pacuri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
9	Rio Moreninha	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	2,94	1,03
11	Afluente Rio Azul	-	-	-	-	0,78	-	-	-	-	-	-	-
12	Córrego Lajeado	-	0,59	-	-	0,61	-	-	-	-	-	-	-
13	Córrego Guarani	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Alto Rio Toledo	-	D	-	-	0,95	0,65	-	-	-	-	-	-
15	Água Palmito	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,02
16	Sanga Ajuricaba	-	1,36	-	-	1,61	D	-	-	-	-	-	-
17	Córrego Peaberu	-	D	-	0,37	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Córrego Belmonte	-	D	D	-	-	-	-	-	-	-	D	-
19	Lajeado St Rosa	0,53	-	-	-	-	1,11	-	-	2,22	-	1,47	D
20	Sanga Tapena	-	-	-	-	2,01	-	-	-	-	-	-	-
21	Alto Taturi	D	-	0,35	-	-	-	-	-	2,10	-	-	-

Tabela 17. Continuação.

22	Córrego Tamanduá	1,79	-	D	-	-	-	-	-	-	-	1,36	-
----	------------------	------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	------	---

Fonte: A autoria do próprio autor.

D = Amostras com concentrações abaixo do limite de quantificação e acima do limite de detecção (LQ = 0,30 µg L⁻¹ e LD = 0,10 µg L⁻¹ para GLY; LQ = 0,32 µg L⁻¹ e LD = 0,11 µg L⁻¹ para AMPA)

" - " = Amostras com concentrações abaixo do limite de detecção

A Figura 21 representa as microbacias nas quais foi possível quantificar os analitos (laranja), detectar os analitos (amarela) e nas quais não foi detectado (ND) os analitos (verde) durante todo o período de coletas do primeiro semestre de 2017.

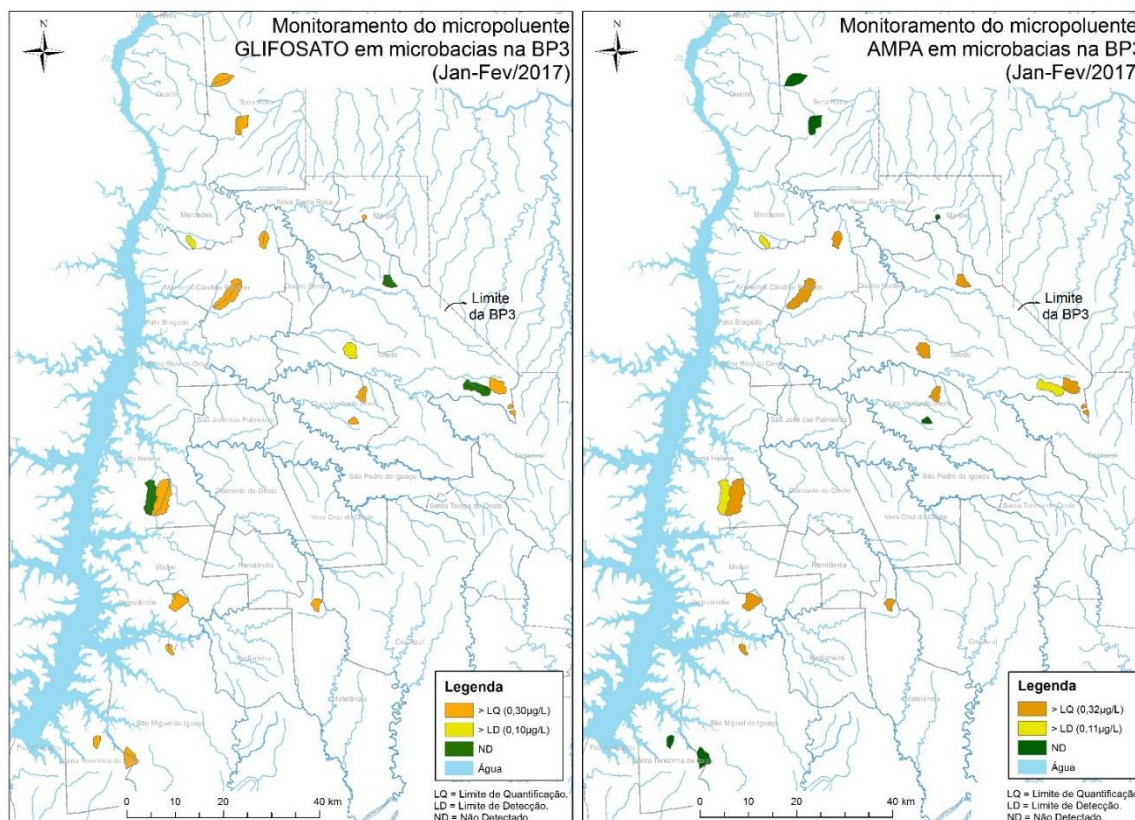


Figura 21. Determinação de glifosato (esquerda) e AMPA (direita) nas águas superficiais de 21 microbacias coletadas semanalmente entre 15 Jan a 26 Feb de 2017.

Fonte: Divisão de Reservatório - Programa de Monitoramento e Avaliação Ambiental da Itaipu. 2017

Ao todo foram analisadas 123 amostras de águas superficiais no primeiro semestre de 2017, referente a amostragem realizada semanalmente, sendo que apenas a amostra do Afluente Rio Azul coletada entre os dias 06 -12 Feb não foi analisada. Das amostras analisadas, 30,1% contiveram a presença de glifosato em ao menos 01 amostra durante o período, sendo: 10,6% das amostras foram apenas detectadas a presença do glifosato e 19,5% quantificadas (0,35 – 2,94 $\mu\text{g L}^{-1}$, mínima e máxima concentração observada, respectivamente).

O analito AMPA foi encontrado em 20,3 % das amostras: 8,9% detectadas e 11,4% quantificadas (0,32 – 14,78 $\mu\text{g L}^{-1}$ mínima e máxima concentração observada, respectivamente). Glifosato e AMPA foram encontrados em conjunto, na mesma data de amostragem, em 10% de todas as amostras analisadas.

Apesar da quantificação de glifosato e AMPA em algumas microbacias, as concentrações observadas estão abaixo do limite máximo pela resolução 357/05 da CONAMA, para rios de classe 02.

As amostragens extraordinárias, ocorridas em dias com precipitação acima de 10 mm de chuva, durante o período amostral, são representadas na Tabela 14.

Tabela 19. Continuação.

P12	GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AMPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P13	GLY	-	-	D	-	0,44	-	-	-	5,40
	AMPA	-	-	-	-	-	-	-	-	1,56
P14	GLY	-	-	-	-	-	-	0,39	-	5,99
	AMPA	-	-	-	-	-	-	-	-	1,40
P15	GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AMPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P16	GLY	-	-	-	5,26	-	-	-	-	-
	AMPA	-	-	-	0,92	-	-	-	-	-
P17	GLY	-	-	4,69	-	-	-	-	-	-
	AMPA	-	-	1,05	-	-	-	-	-	-
P18	GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AMPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P19	GLY	-	-	-	-	-	-	0,74	-	-
	AMPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P20	GLY	-	-	-	1,80	-	-	-	-	-
	AMPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P21	GLY	-	-	-	D	-	-	-	-	-
	AMPA	-	-	-	D	-	D	-	-	-
P22	GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AMPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Autoria do próprio autor.

D = Amostras com concentrações abaixo do limite de quantificação (0,3 µg L⁻¹ para GLY e AMPA) " - " = Amostras com concentrações abaixo do limite de detecção (0,1 µg L⁻¹ para GLY e AMPA)

Foram analisadas 86 amostras de chuva no período de coleta do primeiro semestre de 2017. Glifosato foi encontrado em 29,1% das amostras, sendo: 4,7% detectadas e 24,4% quantificadas (0,4 – 91,91 $\mu\text{g L}^{-1}$, mínima e máxima observada, respectivamente). AMPA foi encontrado em 24,4% das amostras: 4,7% detectadas e 19,7% quantificadas (0,48 – 2,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, mínima e máxima, respectivamente). Os analitos glifosato e AMPA foram observados em conjunto, na mesma data de amostragem, em 11,6% de todas as amostras extraordinárias analisadas no primeiro semestre. A água superficial do rio Azul (ponto 11), coletada na data 25 Jan, apresentou 91,91 $\mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato, acima do valor máximo de 65 $\mu\text{g L}^{-1}$ permitido para águas superficiais de classe II pela CONAMA 357 de 17/03/2005, classe na qual se enquadra o rio em estudo. Apesar da alta concentração encontrada, observa-se que ela está abaixo da toxicidade crônica para microalgas verdes (NOEC = 200 $\mu\text{g L}^{-1}$), o organismo aquático mais sensível ao glifosato (BOMBARDI L. M., 2011).

A microbacia rio Azul tem uma área estimada em 223 ha e o seu rio principal possui um comprimento médio de 1808 m, o qual é classificado como rio de segunda ordem, conforme estabelece a codificação Otto resolução n° 30/2002 do CNRH. A cultura predominante do município de Ouro Verde do Oeste, cidade no qual está inserida a microbacia, é de soja e milho. Quanto ao uso e ocupação do solo 88,4% são utilizados para a agricultura, 0,1% para açudes, 0,6% para edificações, 1,3% ocupados por estradas, 3,01% para pastagens, 0,1% por banhado, 2,5% por capoeira e 3,9% por floresta (Figura 22) (BENASSI, 2016).

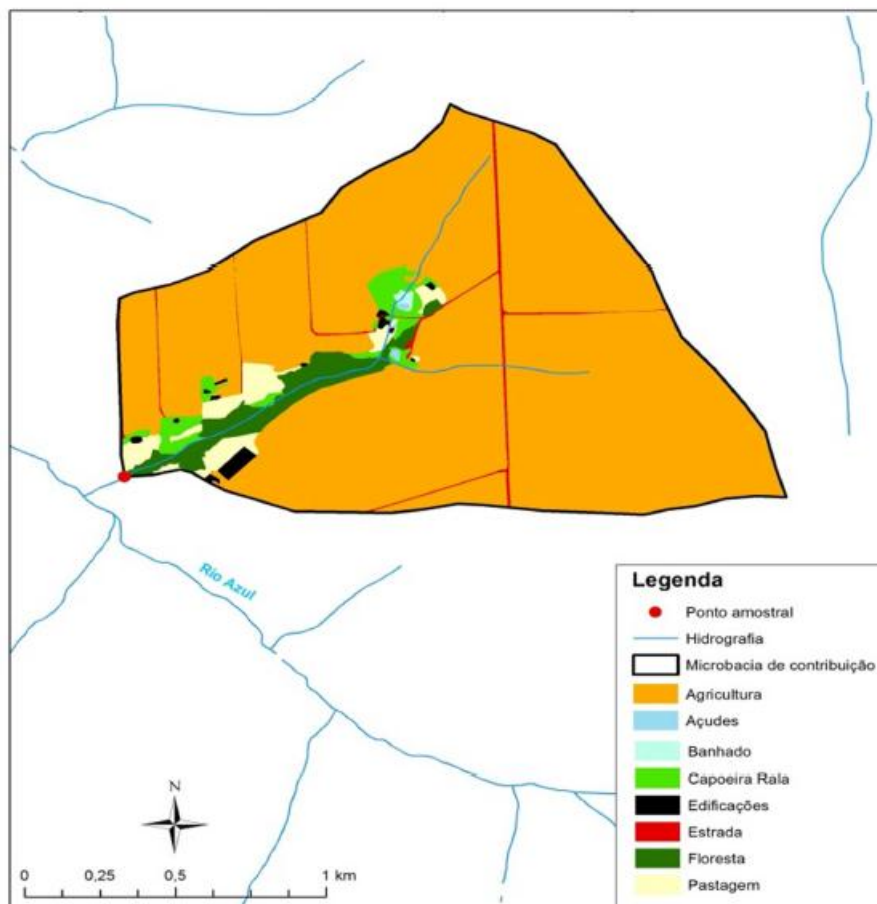


Figura 22. Microbacia do rio Azul, localizado no município de Ouro Verde do Oeste /PR
Fonte: BENASSI. S. F et al. 2016.

A precipitação durante o horário de coleta em conjunto com o período de aplicação de glifosato na cultura de soja da região, pode ter sido o fator determinante para a presença de altas concentrações de glifosato no afluente Rio Azul, pois o glifosato é fortemente ligado ao solo e é carregado para as águas superficiais através de escoamento superficial (BORGGAARD & GIMSING, 2008).

Ao compararmos nossos resultados com os da literatura observamos que nossas amostras se enquadram com alguns estudos, com valores baixos dos analitos ($0,35 - 91,91 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato e $0,32 - 14,78 \mu\text{g L}^{-1}$ de AMPA). Ao analisar as águas superficiais dos canais que abastecem o Parque Nacional do Biscaney (Flórida, EUA), Ramirez et al encontrou concentrações de $0,44 - 59,9 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato e $1,15 - 9,09 \mu\text{g L}^{-1}$ de AMPA em Fevereiro de 2008 (RAMIREZ, BELLMUND, & GARDINALI, 2014). Todavia, Hanke et al, ao analisar amostras de água superficial, encontrou concentrações de glifosato de $30 - 390 \text{ ng L}^{-1}$ no lago Greifensee, e 290 ng L^{-1} no afluente do lago Murtensee, ambos localizado no estado

de Illinois (EUA) (HANKE, SINGER, & HOLLENDER, 2008). Ronco et al analisou amostras superficiais do rio Paraná no Paraguai e na Argentina, em apenas 15% das 23 amostras de água foi possível detectar glifosato na faixa de concentração média de $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto AMPA não teve níveis detectado. No mesmo trabalho, foi também avaliado sedimentos dos rios, encontrando altas concentrações dos analitos, variando de $35 - 3004 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de glifosato e $4 - 5374 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de AMPA (RONCO, 2016).

5.5. Conclusões

Os resultados de linearidade, sensibilidade, LD e LQ demonstraram que a técnica de liofilização apresenta maior desempenho na análise glifosato e AMPA por HPLC com detecção de fluorescência quando compara a técnica de SPE com cartuchos C₁₈. Apesar da técnica de liofilização pré-concentrar interferentes e não fazer um *clean up* da amostra seu uso foi eficiente para as amostras reais de águas superficiais em estudo.

Os resultados obtidos demonstram que em todas as amostras analisadas os valores de glifosato e AMPA nas microbacias estudadas, entre $0,35 - 34,3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,32 - 14,78 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, estão abaixo do limite máximo permitido para águas superficiais de classe II preconizado pelo CONAMA 357/2005, classe na qual se enquadra os rios da BP3. Em apenas uma amostra do período de chuva foi encontrada concentração acima do permitido pela legislação, no valor de $91,91 \mu\text{g L}^{-1}$.

6. Capítulo 2

6.1 Introdução

A otimização do preparo de amostra é de fundamental importância para se obter resultados precisos e exatos. Idealmente, a técnica de preparo de amostra deve ser rápida, de baixo custo, de fácil execução e ser compatível com o instrumento analítico (BORGES, FIGUEIREDO, & QUEIROZ, 2015).

O desenvolvimento de novos métodos de análise ou mesmo a modificação de métodos existentes é importante sempre que se perceba o uso desnecessário de materiais e solventes, desgaste de equipamentos e geração excessiva de resíduos. Mas é fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. A necessidade de se mostrar a qualidade das análises químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, pois dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões contraditórias e a prejuízos financeiros irrecuperáveis. Para tanto, é necessário que se faça a validação dos métodos analíticos, pois o bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medias obtidas e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento (BRITO, 2003).

Dentro da validação de métodos são necessárias avaliações estatísticas, uma ferramenta muito mais do que a simples construção de gráficos e cálculos de médias. As informações são obtidas com a finalidade de acumular informação para a tomada de decisão. Dessa forma, a estatística pode ser vista como um conjunto de técnicas para planejar experimentos, obter dados, organiza-los, resumi-los, analisá-los, interpretá-los e deles extrair conclusões.

6.2. Objetivos específicos

1. Otimização do método de preparo de amostra utilizando liofilização para análise de glifosato e AMPA em água;
2. Validar os parâmetros de desempenho do método de preparo de amostra análise de glifosato e AMPA em água: seletividade (efeito matriz), repetibilidade, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação e estabilidade;

3. Avaliar a contaminação por glifosato e AMPA das águas superficiais da BP3 no período de 4 de Setembro à 10 de Novembro de 2017, adotando o método validado.

6.3. Revisão Bibliográfica

Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos, apesar de não haver uma norma estabelecida de âmbito nacional ou internacional. No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias e normas para o procedimento de validação de métodos analíticos. É importante esclarecer que resoluções são documentos com poder de lei, que devem ser obedecidos e guias são documentos que sugerem uma linha a ser seguida e são, portanto, abertos para interpretação (RIBANI, 2004).

Diferentes parâmetros são dados pelos guias nacionais e internacionais. A seguir são apresentados os parâmetros adotados de interesse para o presente trabalho.

6.3.1. Repetibilidade/reprodutibilidade

A repetibilidade representa a dispersão dos resultados e define a faixa dentro da qual espera-se que o erro aleatório esteja contido.

Cálculos de desvio padrão relativo (*Relative Standard Deviation*, RSD%) são importantes na descrição de propagação de erros durante as análises. Normalmente os critérios de aceitação para reprodutibilidade variam conforme a concentração do analito. Na Tabela 15 podemos ver os critérios sugeridos pela associação oficial de química analítica (Association of Official Analytical Chemistry, AOAC) para a repetibilidade de diferentes concentrações do analito (SYNDER & GLAJCH, 1997).

Tabela 20. Critérios de aceitação do desvio padrão relativo (%) para repetibilidade.

Unidade	Razão do analito	RSD, %
100 %	1	1,3
10 %	10 ⁻¹	1,9
1%	10 ⁻²	2,7
0,1%	10 ⁻³	3,7
100 µg L ⁻¹	10 ⁻⁴	5,3
10 µg L ⁻¹	10 ⁻⁵	7,3
1 µg L ⁻¹	10 ⁻⁶	11
100 µg L ⁻¹	10 ⁻⁷	15
10 µg L ⁻¹	10 ⁻⁸	21
1 µg L ⁻¹	10 ⁻⁹	30

Fonte: AOAC, 2012.

O número mínimo de repetições para cada nível de concentração varia de acordo com diferentes documentos de validação, mas tipicamente são entre 6 e 15 por material usado de estudo (Instituto Nacional de Metrologia, 2016).

Para se obter resultados de RSD(%) aplicamos a equação:

$$RSD (\%) = \frac{s}{x} \times 100$$

Onde:

s = desvio padrão do conjunto de amostras

x = média do conjunto de amostras.

6.3.1.1. Detecção de *outliers*

Variações durante a execução de um experimento com repetitivos ensaios são esperadas, porém alguns pontos de dados podem parecer não se enquadrar na tendência observada pelos outros resultados, seja devido a erros ou mudanças imprevistas durante um ensaio. A estes pontos denominamos *valor anômalo* ou *outliers* e eles podem ser detectados por meio do uso de dois métodos estatísticos: **teste Q** e/ou **Teste T_n**. (HAGE & CARR, 2012).

Teste Q

O teste de Dixon (Teste Q) determina se o maior valor de um conjunto de dados é um *outlier*. Inicialmente coloca-se os dados em ordem crescente de números. Em seguida calcula-se a *faixa* de valores trabalhado no conjunto de dados (*faixa* = maior valor – menor valor). O valor suspeito (x_0) é comparado com outro valor mais próximo dele dentro do conjunto de dados (x_n) pelas suas diferenças. Dessa forma, são comparadas as diferenças ($x_0 - x_n$) com a *faixa*.

$$Q = \frac{|x_0 - x_n|}{faixa}$$

Após esse procedimento, o valor calculado para Q é comparado com um valor de teste crítico (Q_c) em um intervalo de confiança que se pretende utilizar. Se constatado que $Q > Q_c$, o ponto de dados suspeito poderá ser considerado um valor anômalo e rejeitado (AOAC, 2012).

O teste Q utiliza-se de cálculos simples, mas apresenta várias desvantagens: não faz uso de todas as informações disponíveis, já que emprega apenas três valores (x_0 , x_n e *faixa*) do conjunto de dados e; não é correto usar os valores para eliminar mais de um ponto do mesmo grupo de resultados (HAGE & CARR, 2012).

Teste T_n

Com ele, se calcula a diferença entre a média geral do conjunto de dados (média, \bar{x}) e o valor anômalo suspeito (x_0). Em seguida, dividi-se o valor absoluto dessa diferença pelo desvio-padrão dos dados de todo o conjunto (s), o que dá uma razão chamada T_n , indicando que T_n é igual ao número de desvios-padrão que separam x_0 e \bar{x} (HAGE & CARR, 2012).

$$T_n = \frac{|x_0 - \bar{x}|}{s}$$

O ponto de corte em que x_0 pode ser considerado um valor anômalo é dado por um valor crítico T^* .

6.3.2. Linearidade

Linearidade de um procedimento analítico é a sua habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (NETO, SCARMINIO, & BRUNS, 2010). Ela expressa a faixa na qual o sinal analítico, denominado variável dependente y_i , é linearmente proporcional à sua concentração, denominada variável independente x_i , e a equação matemática que descreve esta dependência é conhecida como *curva analítica*.

A linearidade de um método não pode ser observada apenas por meio do gráfico dos resultados de resposta em função da concentração do analito, pois apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração. Modelos de calibração com alto resíduo no sinal analítico ou ponto mal distribuído ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependentes e independentes (RIBEIRO, 2008). Para evitar problemas de falta de ajuste durante a modelagem, fez-se necessária a análise cuidadosa do gráfico de resíduos do sinal analítico e a aplicação de testes para determinar a faixa na qual a curva de calibração apresenta um bom comportamento linear. Antes de fazer a regressão linear, deve ser verificada a ausência de valores discrepantes (em inglês, *outliers*) para cada nível de concentração e a homocedasticidade (igualdade das variâncias) dos dados (AOAC, 2012).

6.3.3. Seletividade

Seletividade é o grau em que o método pode quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material interferente. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (AOAC, 2012).

6.3.3.1. Efeito Matriz

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, comprometendo o resultado. Logo, no estudo de seletividade é necessário verificar também a existência de efeito de matriz.

Nesta situação tem-se a necessidade do uso de um modelo estatístico para o estudo do efeito matriz. Segundo INMETRO o estudo do efeito matriz pode ser conduzido com o preparo de duas curvas analíticas, que contenham a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Uma curva é preparada com adição de analito na matriz das amostras (que já contêm um nível do analito) e a outra curva analítica não inclui a matriz da amostra. Devem ser preparados, no mínimo, 5 níveis de concentração com 3 replicatas por nível (RIBEIRO, 2008).

Para este experimento foi testada a hipótese de que a matriz não interfere na inclinação da curva de adição padrão. Para testar o modelo estatístico utilizamos *t* de Student com modificações, com um desvio-padrão comum (s_{pool}) que reflete a variação em ambos os resultados (HAGE & CARR, 2012).

$$s_{pool} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times (s_1)^2 + (n_2 - 1) \times (s_2)^2}{(n_1 + n_2 - 2)}}$$

Nessa equação, s_1 e s_2 são os desvios-padrão estimados para os dois conjuntos de dados, e n_1 e n_2 representam o número de pontos em cada um desses conjuntos (curva analítica). Assim como pode-se usar s_1 ou s_2 para determinar os desvios-padrão das médias x_1 e x_2 , e usar s_{pool} para obter um desvio-padrão para a média combinada (s_{xpool}), que é encontrada por meio da equação abaixo (HAGE & CARR, 2012).

$$s_{xpool} = \frac{s_{pool}}{\sqrt{\frac{(n_1 \times n_2)}{(n_1 + n_2)}}}$$

Um modo de obter s_{xpool} é considerá-lo uma média da incerteza na diferença entre x_1 e x_2 . Se x_1 e x_2 representam o mesmo valor, sua diferença ($x_1 - x_2$) deverá ficar dentro de um número razoavelmente pequeno de desvios-padrão para essa diferença. Isso significa que se pode comparar ($x_1 - x_2$) diretamente com s_{xpool} e usar sua razão para fornecer um valor *t* de Student nessa comparação (HAGE & CARR, 2012).

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{S_{xpool}}$$

Um valor pequeno para essa relação pode indicar que os dois resultados são aproximados e, provavelmente, representam o mesmo número. Uma vez que calculado esse valor t de Student, deve-se comparar com um valor crítico (t_c), conforme obtido para o nível de confiança selecionado e usando $f = (n_1 + n_2 - 2)$ como graus de liberdade. Se t for menor ou igual a t_c , pode-se dizer que x_1 e x_2 representam o mesmo valor em nível de confiança selecionado (HAGE & CARR, 2012).

6.3.4. Sensibilidade

A sensibilidade trata-se de uma medida de como a resposta muda à medida que a quantidade de analito ou a propriedade da amostra varia.

6.3.4.1. Inclinação da curva analítica

A forma mais comum de descrever a sensibilidade de um método é usar a inclinação da curva analítica. Um método que segue uma resposta linear ($y = mx + b$) terá uma sensibilidade igual à inclinação (m) da regressão linear. Um método com inclinação acentuada em sua curva analítica terá alta sensibilidade, possibilitando observar pequenas diferenças na concentração de um analito (AOAC, 2012), tornando mais fácil a discriminação entre duas amostras que contenham quantidades semelhantes de analito.

Quando se deseja comparar a sensibilidade de duas ou mais curvas analíticas, faz-se necessário o uso de ferramentas estatísticas. Pode-se utilizar o teste t de Student, descrito no item 6.3.3.1. deste capítulo, para confirmar a existência de diferença significativa entre a inclinação das curvas analíticas comparando-se seus coeficientes angulares. Caso essa diferença seja significativa, pode-se afirmar que a curva analítica de maior inclinação é a de maior sensibilidade, pois pequenas variações na concentração do analito resultaram em maiores respostas em sua análise.

6.3.5. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental (Instituto Nacional de Metrologia, 2016).

Diferentes métodos para estimar o limite de detecção podem ser empregados.

Métodos da avaliação/percepção visual baseiam-se na percepção da resposta da concentração do analito ou propriedade observada. Neste método sucessivas diluições com concentrações baixas conhecidas de analito são feitas até se encontrar a menor concentração possível de ser detectado. Uma relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1 é geralmente aceitável para estimativa do limite de detecção. É importante ressaltar que a região do ruído do branco deve ser a mesma do sinal medido (Instituto Nacional de Metrologia, 2016).

Outro método muito utilizado para estimar LD é através da curva analítica, utilizando a equação:

$$LD = \frac{3,3s}{b}$$

Onde:

s = desvio padrão da resposta do branco, e, quando o branco não gera sinal, pode-se adotar o valor do desvio padrão do menor nível da curva analítica.

b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

6.3.6. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a mais baixa concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método durante as operações de rotina do laboratório (Instituto Nacional de Metrologia, 2016).

Assim como o LD, LQ pode ser determinado de diferentes formas. Pela avaliação/percepção visual o método segue o mesmo utilizado para estimar LD, porém a relação típica para determinar o limite de quantificação é de sinal/ruído é de 10:1. Também pode ser adotadas relações sinal/ruído 6:1 e 5:1, em função do método (Instituto Nacional de Metrologia, 2016).

A determinação através da curva analítica pode ser estimada pela equação:

$$LQ = \frac{10s}{b}$$

Onde:

s = desvio padrão da resposta do branco, e, quando o branco não gera sinal, pode-se adotar o valor do desvio padrão do menor nível da curva analítica.

b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

6.3.7. Estabilidade

Para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e reagentes devem ser estáveis por um período razoável (por ex. um dia, uma semana, um mês, dependendo da necessidade). A estabilidade das amostras e padrões é importante em termos de temperatura e tempo. Se uma solução não for estável em temperatura ambiente, a diminuição da temperatura pode aumentar sua estabilidade (SYNDER, J., & GLAJCH, 1997).

Em certos tipos de amostras, faz-se necessário avaliar a estabilidade da substância para determinar o tempo de estocagem. Conhecendo a estabilidade, as análises podem ser completadas antes de ocorrer a degradação (RIBANI, 2004).

Segundo a diretiva da União Europeia sobre o desempenho de métodos analíticos e a interpretação de resultados, o tempo de armazenamento pode ser selecionado como 1, 2, 3 e 4 semanas ou maior, caso seja necessário, até ser possível observar o primeiro fenômeno de degradação dos analitos (96/23/CE, 2002). Para isto, devemos confirmar a hipótese de que houve perda significativa com o decorrer do tempo, sendo necessário a aplicação do **teste t de Student para um valor de referência**.

$$t = \frac{|x_i - u|}{S_x}$$

Onde:

x = resultado da média experimental

u = valor de referência

S_x = desvio padrão da média experimental

Caso seja obtido um $t_{\text{calculado}} \leq t_{\text{crítico}}$, pode-se dizer que x e u não são significativamente diferentes no nível de confiança selecionado.

Sempre que possível deve-se utilizar amostras reais. Quando isso não for possível, deve-se usar a matriz fortificada com a substância a analisar (HAGE & CARR, 2012).

6.4. Materiais e métodos

6.4.1. Reagentes e materiais

Padrões analíticos de Glifosato ($\geq 99,7\%$, CAS: 1071-83-6), AMPA ($\geq 98,0\%$, CAS: 1066-51-9) e FMOC-Cl ($\geq 99,0\%$, CAS: 28920-43-6) foram comprados de Fluka® Analytical (USA).

Padrões derivatizados Glifosato-FMOC (98,0%, CAS: n/a) e AMPA-FMOC (98,0%, CAS:195306-88-8) foram comprados de Dr Ehrenstorfer® GmbH (Germany).

Acetonitrila (for HPLC, gradiente grade, $\geq 99,9\%$, CAS: 75-05-8) e Ácido Fosfórico (≥ 85 wt. % H₂O, $\geq 99,9\%$ trace metals basis, CAS: 7664-38-2) adquiridos de Sigma-Aldrich® (EUA).

Borato de sódio (Borax, P.A, CAS: 1303-96-4) obtido a partir de Synth® e Ácido Bórico (P.A, CAS: 10043-35-3) obtido de Neon®, ambos de indústria brasileira.

6.4.2. Instrumentação

Para o preparo de amostras utilizou-se liofilizador de bancada Christ (Alpha 1-2 LD Plus). Para separação e quantificação dos analitos utilizou-se Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC), no modo HPLC, com sistema consistindo de uma bomba de dois pistões, um degaseificador e auto-injetor, acoplada com detector de fluorescência (Modelo Dionex UltiMate 3000, Thermo Scientific, Alemanha). Utilizou-se coluna cromatográfica de fase reversa Ace 5 (C18, 5.0 μ m, 250x4.6 mm i.d.) mantida a 25 °C, injeções com volume de 20 μ L e a detecção dos analitos derivatizados realizada por fluorescência em comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{em}) de 260 nm e 317nm, respectivamente.

6.4.3. Otimização do preparo de amostra por liofilização

Resultados do estudo feitos no capítulo 1 demonstraram que o preparo de amostra utilizando liofilização e análise por HPLC, com detector de fluorescência, são sensíveis para determinação de glifosato e AMPA em águas superficiais. No presente capítulo realizou-se estudos de otimização para tornar estas técnicas mais sensíveis, rápidas e econômicas, resultando em uma nova parte experimental.

Inicialmente as amostras de água superficial foram filtradas em filtros de acetato de celulose 0,45 μm . Em seguida, uma alíquota de 10 mL de amostra foi introduzida em tubo Falcon de 50 mL e levada a refrigeração a -80°C . O tubo contendo a amostra congelada foi recoberta com papel laminado contendo pequenos furos em sua superfície a fim de evitar contaminação e perdas durante a liofilização. Em seguida, a amostra foi liofilizada por aproximadamente 72 h, até secagem completa, sob alto vácuo e temperatura de -10°C . Após, seu volume foi reconstituído com 2 mL de água e a amostra foi derivatizada com 240 μL de 40 mmol L^{-1} tampão de borato (pH 9), 800 μL de acetonitrila e 120 μL de solução de 1,6 mg mL^{-1} FMOC-Cl preparada em acetonitrila. O tubo Falcon foi agitado suavemente durante 30 s em vortex e a reação finalizada após 30 min. Após a reação uma alíquota de 2 mL de amostra derivatizada foi colocada em balão de 5 mL e seu volume completado com água. Em seguida a amostra foi filtrada em filtro PTFE e armazenada a 4°C para posterior análise cromatográfica.

6.4.4. Otimização do modo gradiente na análise cromatográfica

No presente capítulo realizou-se testes para diminuir o tempo de corrida e aumentar a o tempo de separação de glifosato e AMPA durante a análise cromatográfica descrita no capítulo 1, para as amostras preparadas com a liofilização. Para a separação e quantificação dos analitos utilizou-se HPLC com coluna de fase reversa C_{18} e detector de fluorescência em modo gradiente.

Testou-se o modo de eluição, modificado de Druart et al (DRUART, 2011), com diferentes proporções de acetonitrila (ACN, solvente B) e H_3PO_4 0,05% (pH 2,5, solvente A) com vazão de 1 mL min^{-1} . O modo de gradiente selecionado foi

aquele de maior tempo de separação entre glifosato e AMPA em um menor tempo de corrida cromatográfica.

6.4.5. Validação do método

Com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido utilizou-se as orientações sobre validação de métodos analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) DOQ-CGCRE-008 Revisão 05 – Agosto 2016.

Seis parâmetros foram selecionados para a validação o método de análise de glifosato e AMPA nas águas superficiais da BP3: Seletividade (efeito matriz), repetibilidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e estabilidade.

6.5. Resultados e Discussões

6.5.1. Otimização do método

6.5.1.1. Preparo de amostra

Alguns estudos feitos com o objetivo de otimizar a técnica de preparo de amostras pela liofilização foram realizados.

Testes com 10, 20 e 30 mL de amostras fortificadas com glifosato e AMPA levadas à liofilização demonstraram que quanto maior o volume de amostra liofilizada maior será a área do analito no cromatograma obtido por HPLC com detector de fluorescência.

Testes com diferentes volumes de água, acetonitrila, tampão de borato 40 mM (pH 9) e 1,6 mg mL⁻¹ de FMOC-Cl, mantendo todos na proporção de 100: 40: 12: 6 (v:v:v), respectivamente, demonstraram que um maior rendimento de reação é obtido quando se utiliza maiores volumes de solventes e reagentes.

Teste com diferentes volumes de água na diluição final do processo de preparo de amostra demonstraram que quanto menor a diluição maior será a área do analito no cromatograma obtido por HPLC com detector de fluorescência.

No presente estudo, foi testado o método com e sem tampão borato 40 m mol⁻¹ (pH 8) durante a diluição final do preparo de amostra e os resultados revelaram que não existe a necessidade do tampão.

Testou-se adição de ácido aspártico como padrão interno na análise, porém não foi possível detectar sua presença durante a corrida cromatográfica.

Como resultado dos estudos foi possível ter a redução no volume de solvente e reagentes utilizados na reação de derivatização assim como um aumento na sensibilidade da análise dos analitos.

6.5.1.2. Otimização da análise cromatográfica

Diferentes modos de eluição utilizando acetonitrila (ACN, solvente B) e H_3PO_4 0,05% (pH 2,5, solvente A) com fluxo de 1 mL min^{-1} foram testados:

- I. Modo gradiente com diferentes proporções do solvente B: 0 min, 5%; 3 min, 5%; 23 min, 45%; 28 min, 95%; 33 min, 5% e 38 min 5% (Figura 23).

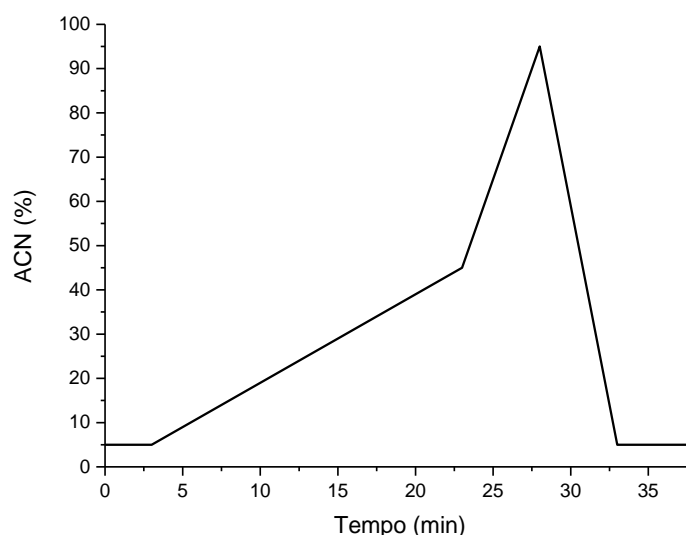


Figura 23. Modo gradiente I utilizado na análise de glifosato e AMPA por HPLC com detector de fluorescência.

Fonte: Autoria do próprio autor

A eluição e separação dos analitos são apresentadas na Figura 24.

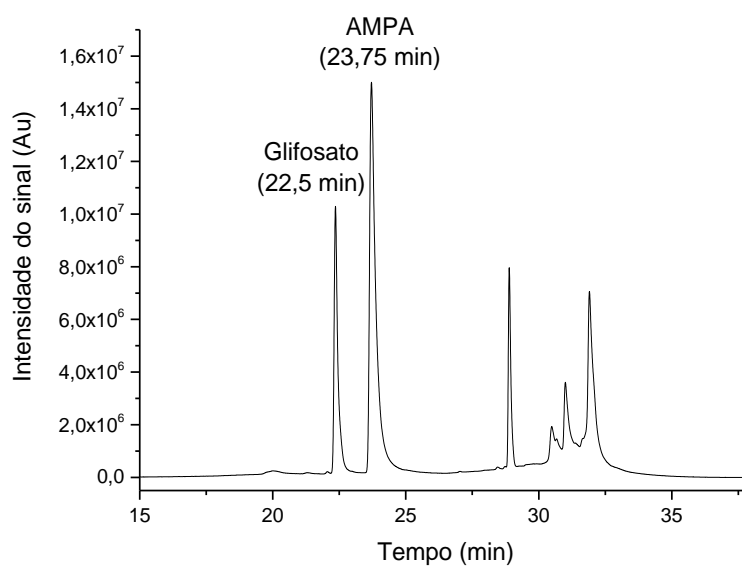


Figura 24. Cromatograma obtido com o modo gradiente da Figura 23.

Fonte: Autoria do próprio autor

II. Modo gradiente com diferentes proporções do solvente B: 0 min, 5%; 23 min, 45%; 28 min, 95%; 33 min, 5% e 36 min 5% (Figura 25)

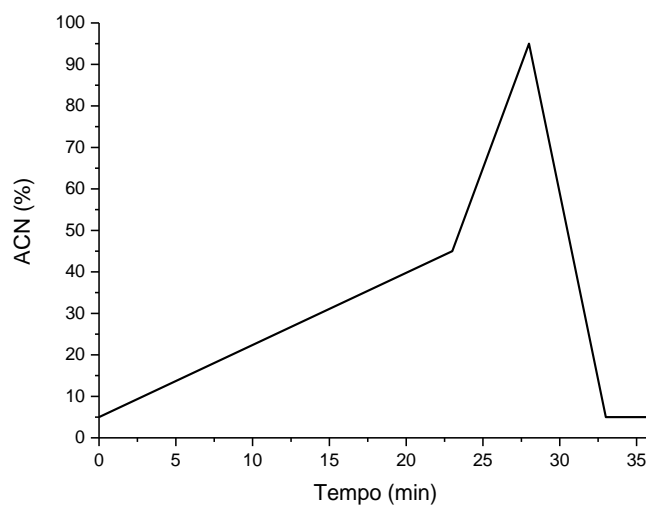


Figura 25. Modo gradiente II utilizado na análise de glifosato e AMPA por HPLC com detector de fluorescência.

Fonte: Autoria do próprio autor

A eluição e separação dos analitos são apresentadas na Figura 26.

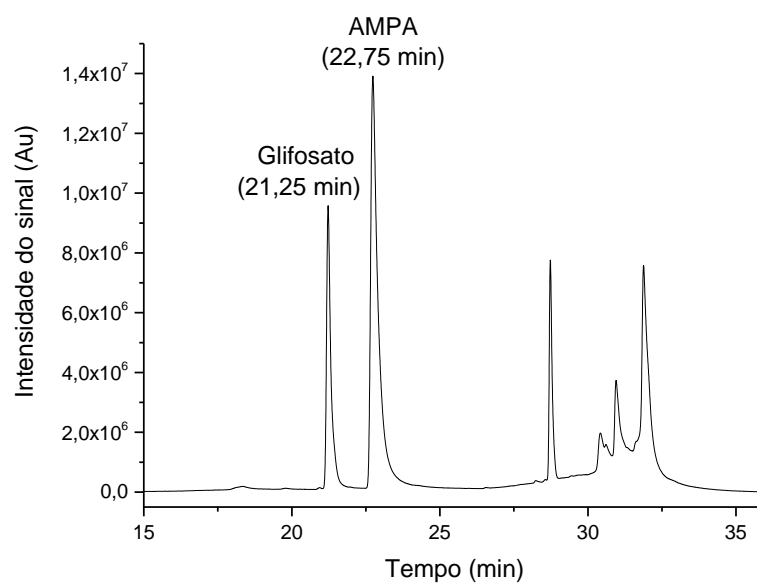


Figura 26. Cromatograma obtido com o modo gradiente da Figura 25.

Fonte: Autoria do próprio autor

III. Modo gradiente com diferentes proporções do solvente B: 0 min, 15%; 10 min, 15%; 20 min, 45%; 25 min, 95%; 30 min, 15% e 36 min 15% (Figura 27).

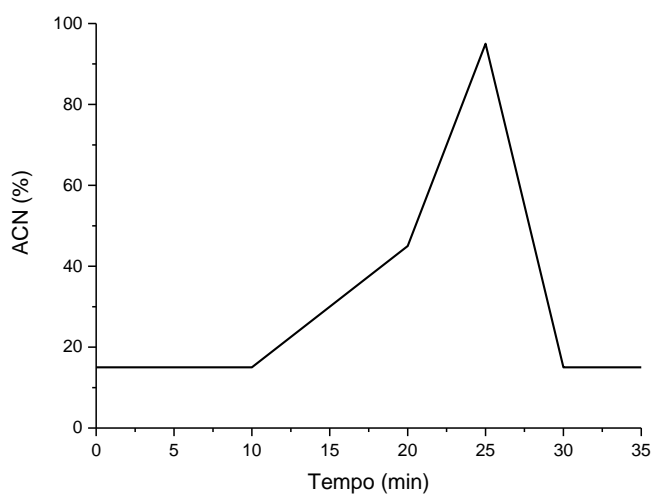


Figura 27. Modo gradiente III utilizado na análise de glifosato e AMPA por HPLC com detector de fluorescência.

Fonte: Autoria do próprio autor

A eluição e separação dos analitos são apresentadas na Figura 28.

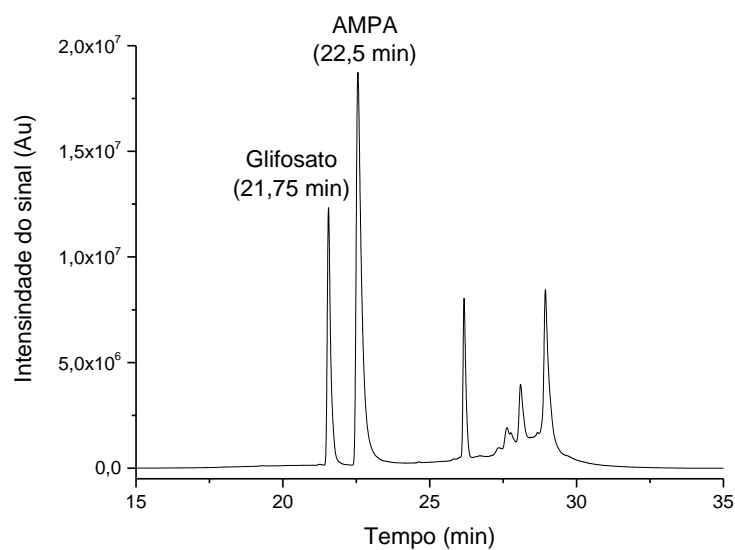


Figura 28. Cromatograma obtido com o modo gradiente da Figura 27.

Fonte: Autoria do próprio autor

IV. Modo gradiente com diferentes proporções do solvente B: 0 min, 10%; 7 min, 10%; 17 min, 40%; 23 min, 40%; 27 min, 90%; 30 min, 90%; 35 min, 10% e 38 min 10% (Figura 29).

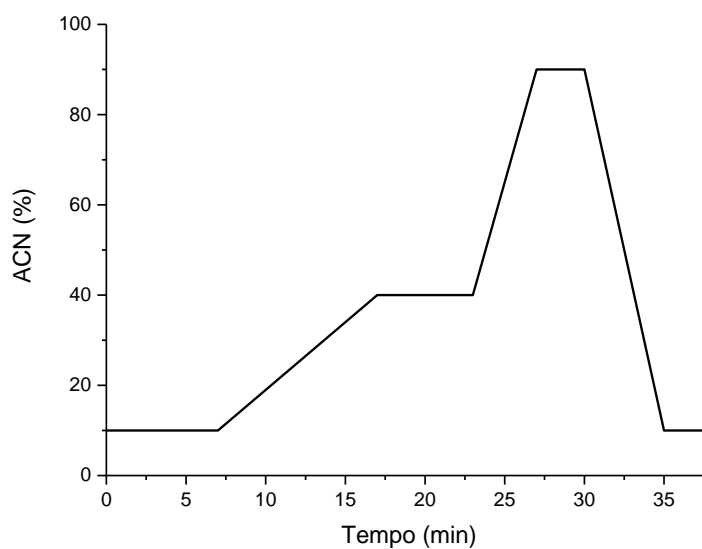


Figura 29. Modo gradiente IV utilizado na análise de glifosato e AMPA por HPLC com detector de fluorescência.

Fonte: Autoria do próprio autor

A eluição e separação dos analitos são apresentadas na Figura 30.

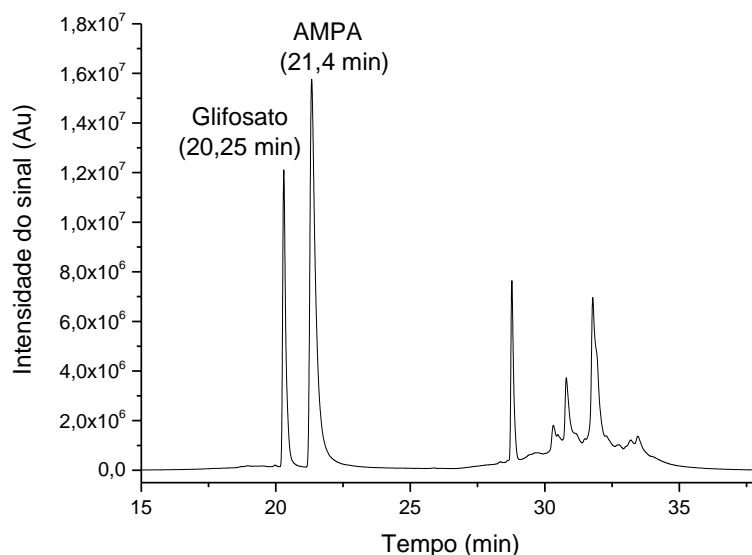


Figura 30. Cromatograma obtido com o modo gradiente da Figura 29

Fonte: Autoria do próprio autor

Selecionou-se o modo gradiente contendo o maior tempo de separação entre os analitos no cromatograma bem como o menor tempo total de corrida de análise: modo gradiente II, com tempos de 21,25 min para Glifosato e 22,75 min para AMPA e tempo total de corrida de 36 min. A confirmação dos tempos de retenção foram feitas pela análise dos padrões derivatizados glifosato-FMOC e AMPA-FMOC nos diferentes métodos de eluição.

Os ensaios de melhoria na eluição dos analitos na análise cromatográfica resultaram em um menor tempo de corrida cromatográfica como pode ser visto na Figura 31.

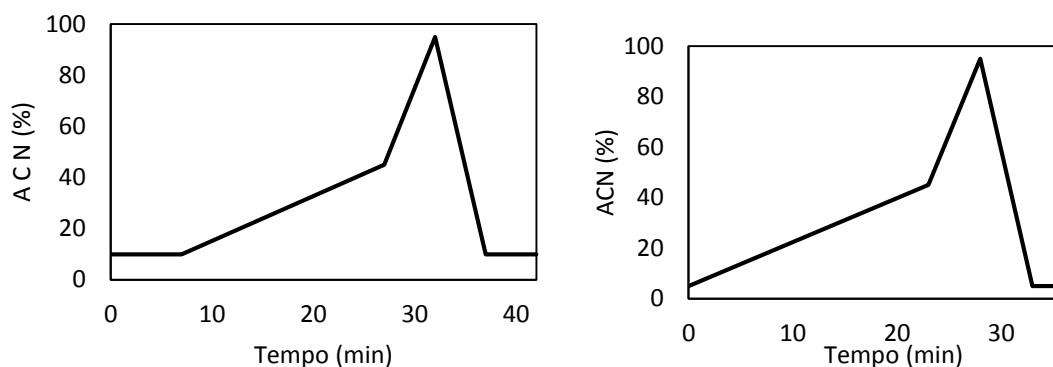


Figura 31. Fase móvel gradiente utilizada antes da otimização metodológica, com diferentes proporções de ACN: de 0 a 7min, 10%; 27 min, 45%; 32 min, 95%; 37min, 10%; reequilibrando as condições iniciais até completar 42 min de corrida (esquerda); Nova fase móvel gradiente, com diferentes proporções de ACN: 0 min, 5 % de B; 23 min, 45%; 28 min, 95%; 33 min, 5 %; reequilibrando as condições iniciais até completar 36 min de corrida (direita).

Fonte: Autoria do próprio autor

Outra contribuição com o método otimizado foi um aumento na sensibilidade na análise cromatográfica, no qual concentrações *menores* de glifosato e AMPA eluidas com o método otimizado possuem áreas similares aqueles obtidos com concentrações *maiores* eluidas com o método não otimizado (Figura 32).

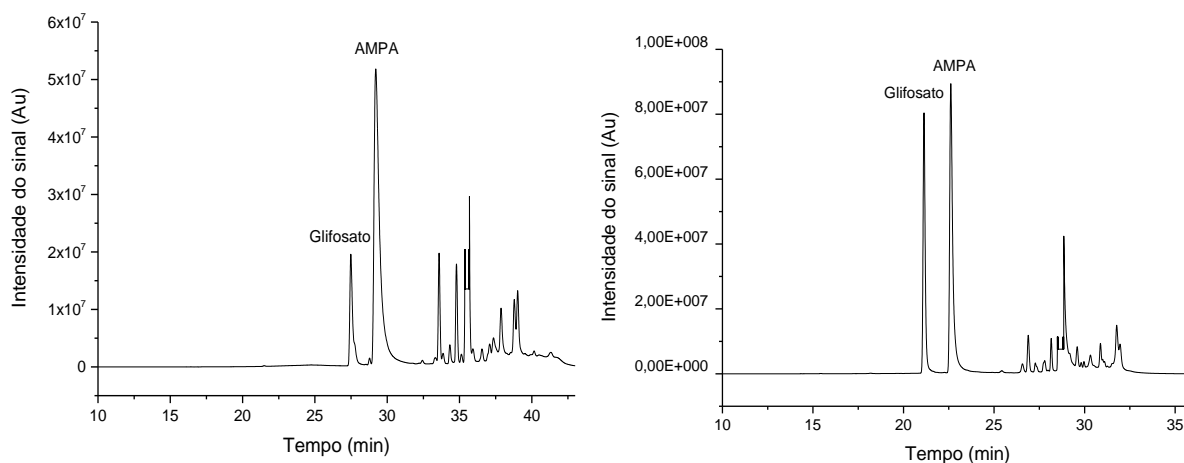


Figura 32. Cromatograma dos padrões glifosato (27,5 min) e AMPA (29,2 min) nas concentrações de 200 µg L-1 com o método **não otimizado** (esquerda). Cromatograma dos padrões glifosato (21,0 min) e AMPA (22,5 min) nas concentrações de 65 µg L-1 preparados com o método **otimizado** (direita).

Fonte: Autoria do próprio autor

6.5.2. Validação do método

6.5.2.1. Efeito Matriz

Para o estudo de efeito matriz construiu-se duas curvas analíticas, a primeira em água ultrapura e a segunda na água superficial da microbacia Córrego Água Fria. Esta microbacia foi selecionada devido ao fácil acesso de amostragem e também por não conter a presença de glifosato e AMPA nas semanas coletadas de 15 de Set – 8 Out, período utilizado para os estudos de efeito matriz. Ambas as curvas foram construídas, para glifosato e AMPA, nas concentrações de 1; 2,5; 5; 15; 30; 45 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para cada concentração foram preparadas triplicatas independentes de amostra. Cada réplica de preparo de amostra foi analisada em duplicata de injeção cromatográfica, resultando em 6 replicatas de dados cromatográficos para cada ponto na curva analítica. Os dados são apresentados na Figura 33 e 34.

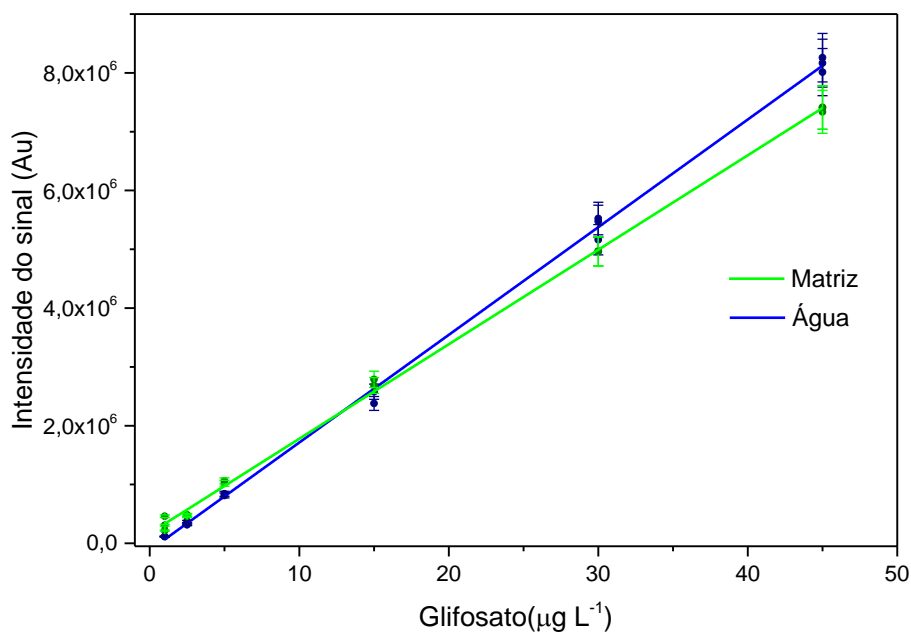


Figura 33. Curva analítica do glifosato em água ultrapura ($183101,4 x - 116999$; $R^2 = 0,998$) e na água da matriz advinda da microbacia córrego Água Fria ($y = 142919 x + 147217,5$; $R^2 = 0,998$).

Fonte: Autoria do próprio autor.

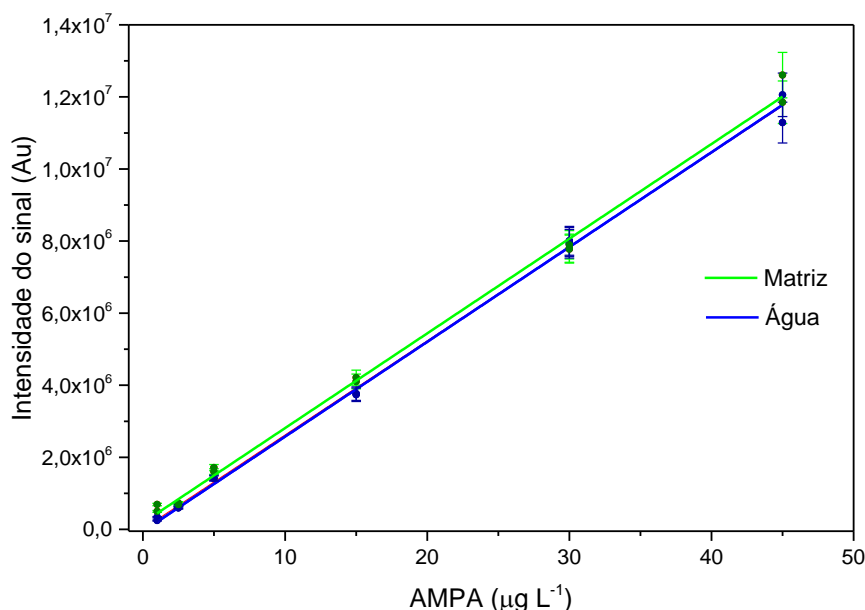


Figura 34. Curva analítica do metabólito AMPA: em água ultrapura ($260947,8 x + 11039,1$; $R^2 = 0,997$) e na água da matriz advinda da microbacia córrego Água Fria ($225355 x + 150187,5$; $R^2 = 0,996$).

Fonte: Autoria do próprio autor.

Para comparação do efeito de matriz realizou-se o teste *t* de Student pareado, com $T_{\text{crítico}} = 2,23$ ($f = 10$, 95% de confiança). Os resultados são apresentados na tabela 16.

Tabela 21. Teste *t* de Student para as inclinações das curvas analíticas, tanto na água ultrapura quanto na matriz.

Curva analítica do glifosato		
	Água	Matriz
Coefficiente angular da curva (<i>x</i>)	1,83E+05	1,4E+05
Desvio padrão da curva (<i>s</i>)	1,7E+03	1,3E+03
$T_{\text{calculado}}$		46,31
Resultado	$T_{\text{calculado}} \gg t_{\text{crítico}}$	Efeito Significativo
Curva analítica do AMPA		
	Água	Matriz
Coefficiente angular da curva (<i>x</i>)	2,6E+05	2,2E+05
Desvio padrão da curva (<i>s</i>)	3,3E+03	3,6E+03
$T_{\text{calculado}}$		17,78
Resultato	$T_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$	Efeito Significativo

Fonte: Autoria do próprio autor.

Tanto glifosato quanto AMPA apresentaram efeito da matriz sobre suas análises, desta forma, o estudo dos outros parâmetros de validação foram realizados na matriz do analito.

6.5.2.2. Repetibilidade

Novas concentrações foram inseridas na curva analítica na matriz. A faixa linear de trabalho para a construção da curva do glifosato compreende-se entre a faixa inferior, na concentração de $0,025 \mu\text{g L}^{-1}$ do limite de detecção estipulada pela relação sinal/ruído 10:1 (vide item 6.5.2.4.), e a faixa superior na concentração de $68 \mu\text{g L}^{-1}$ (acima da concentração máxima permitida pelo CONAMA, de $65 \mu\text{g L}^{-1}$) Cálculos de RSD demonstraram pequenas variações entre as replicatas de cada ponto da curva analítica da matriz. Porém as concentrações $0,025$; $0,25$ e $1 \mu\text{g L}^{-1}$ da curva analítica de glifosato (GLY) e $0,25$ e $1 \mu\text{g L}^{-1}$ na curva de AMPA, demonstraram grandes variações de erros em suas análises (Tabela 17), estando acima dos valores recomendados pela AOAC, que em concentrações menores ou igual a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ o RSD não deve ultrapassar o valor de 30.

Tabela 22. Valores do desvio padrão relativo (%) para a curva analítica de glifosato (GLY)

e AMPA nas águas da matriz.

GLY ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Média	Desv Pad	RSD
0,025	9,2E+03	1,3E+03	14
0,25	5,7E+04	1,1E+05	192,6
1	2,7E+05	9,8E+04	36,5
2,5	4,2E+05	1,0E+04	2,4
5	9,0E+05	5,1E+04	5,6
15	2,4E+06	1,2E+05	5,2
30	4,4E+06	3,1E+04	0,7
45	7,3E+06	7,1E+05	9,7
65	1,1E+07	5,1E+04	0,5
68	1,1E+07	1,8E+05	1,7
AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Média	Desv Pad	RSD
0,025	3,1E+04	4,4E+03	13,9
0,25	1,4E+05	3,0E+05	215,8
1	5,8E+05	9,8E+05	167,3
2,5	5,9E+05	2,0E+04	3,4
5	1,4E+06	9,4E+04	6,8
15	3,5E+06	9,2E+04	2,6
30	6,7E+06	5,3E+04	0,8
45	1,1E+07	3,1E+05	2,9
65	1,6E+07	1,4E+05	0,9
68	1,6E+07	2,3E+05	1,4

Fonte: Autoria do próprio autor.

Aplicou-se teste Q e T_n para a detecção de valores anômalos (*outliers*) nas concentrações das curvas analíticas que apresentaram valores de RSD acima do recomendado (Tabela 17). Utilizou-se intervalos de confiança de 95% para ambos os testes, com $T_{n\text{crítico}} = 1,16$ e $Q_{\text{crítico}} = 0,97$.

Tabela 23. Aplicação do teste Q e T_n para detecção de valores anômalos na curva de calibração de glifosato e AMPA na matriz.

Teste Q					
Analito	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$Q_{\text{menor/maior}}$	Comparação		
			$ Q_{\text{menor/maior}} \text{ e } Q_{\text{crítico}}$		
Glifosato	0,25	-0,05/0,95	$ Q_{\text{menor/maior}} < Q_{\text{crítico}}$	Insignificante	
	1	-0,37/0,63	$ Q_{\text{menor/maior}} < Q_{\text{crítico}}$	Insignificante	
AMPA	0,25	-0,07/0,92	$ Q_{\text{menor/maior}} < Q_{\text{crítico}}$	Insignificante	
	1	-0,08/0,91	$ Q_{\text{menor/maior}} < Q_{\text{crítico}}$	Insignificante	

Teste T_n					
Analito	($\mu\text{g L}^{-1}$)	Replicata	$T_{n\text{calculado}}$	Comparação	Significância
Glifosato	0,25	1	0,11	$ T_{n\text{calculado}} < T_{n\text{crítico}}$	Insignificante
		2	0	$ T_{n\text{calculado}} < T_{n\text{crítico}}$	Insignificante
		3	1,88	$ T_{n\text{calculado}} > T_{n\text{crítico}}$	Significante
	1	1	0,82	$ T_{n\text{calculado}} < T_{n\text{crítico}}$	Insignificante
		2	0	$ T_{n\text{calculado}} < T_{n\text{crítico}}$	Insignificante
		3	1,39	$ T_{n\text{calculado}} > T_{n\text{crítico}}$	Significante
AMPA	0,25	1	0,15	$ T_{n\text{calculado}} < T_{n\text{crítico}}$	Insignificante
		2	0	$ T_{n\text{calculado}} < T_{n\text{crítico}}$	Insignificante
		3	1,86	$ T_{n\text{calculado}} > T_{n\text{crítico}}$	Significante
	1	1	0	$ T_{n\text{calculado}} < T_{n\text{crítico}}$	Insignificante
		2	1,85	$ T_{n\text{calculado}} > T_{n\text{crítico}}$	Significante
		3	0,17	$ T_{n\text{calculado}} < T_{n\text{crítico}}$	Insignificante

Fonte: Autoria do próprio autor.

É de suma importância ressaltar que cada concentração da curva analítica, de ambos os analitos, foram feitos em triplicatas de preparo de amostra e duplicata de injeção cromatográfica, resultando em 6 dados cromatográficos por pontos da curva. Os resultados apresentados na tabela para o teste T_n são as médias de cada unicata de preparo de amostra.

Os resultados do teste Q para glifosato e AMPA não demonstraram *outliers* nas curvas, porém o teste T_n demonstrou a presença de *outliers* em uma das replicatas de cada ponto. Sendo assim, exclui-se os *outliers* da curva analítica e os valores de RSD que estavam fora do recomendado foram recalculados (Tabela 18).

Tabela 24. Novos valores de RSD para as curvas analíticas de glifosato e AMPA na matriz após a retirada dos *outliers*.

GLY ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Média	Desv Pad	RSD (%)
0,25	5,16E+04	6,80E+03	13,18
1	2,27E+05	4,64E+04	20,40
AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Média	Desv Pad	RSD (%)
0,25	1,18E+05	2,61E+04	22,11
1	5,02E+05	9,47E+04	18,86

Fonte: Autoria do próprio autor.

Com o reajuste das curvas analíticas foi possível obter valores RSD dentro do recomendado, garantindo uma maior confiabilidade nos resultados.

6.5.2.3. Linearidade

As curvas analíticas foram processados pelo software Origin®. Construiu-se a curva na água da matriz. Utilizou-se como critério para a seleção da faixa superior a possibilidade de detectar concentrações de glifosato acima do permitido pela legislação CONAMA 357 de 17/03/2005, de $65 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas superficiais de classe II, classe na qual se enquadra as microbacias. Não foi possível aumentar a faixa superior de trabalho devido a sensibilidade do detector para altas concentrações, a qual extrapola a capacidade de saturação do detector.

A curva analítica para glifosato na água da matriz é apresentado na Figura 35, nas concentrações: 0,025; 0,25; 1; 2,5; 5; 15; 30; 45; 65 e $68 \mu\text{g L}^{-1}$. O ajuste linear com adição de linha de tendência forneceu a equação da reta: $y = 165033,3x - 49342,6$ e coeficiente de regressão $R^2 = 0,995$.

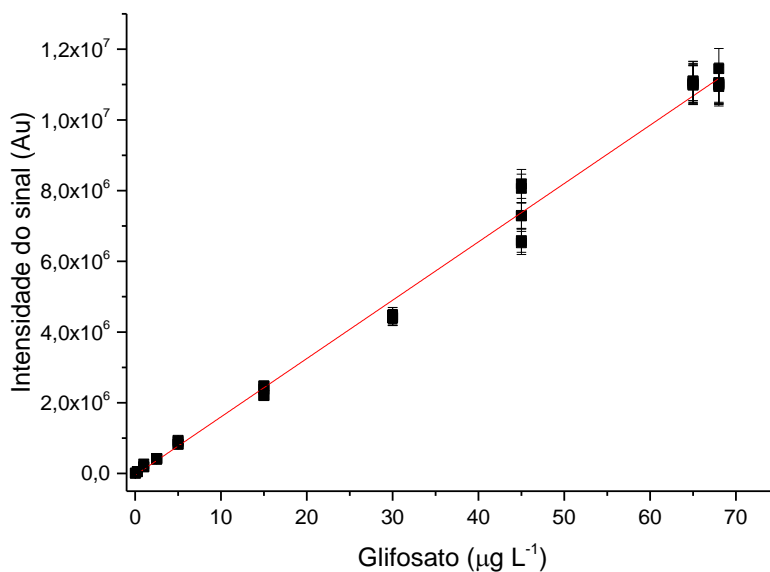


Figura 35. Curva analítica do glifosato na água da matriz.

Fonte: Autoria do próprio autor.

O gráfico de resíduos da curva analítica do glifosato é apresentado no anexo C.

A faixa linear de trabalho para a construção da curva do metabólito AMPA compreende-se entre a faixa inferior, na concentração de 0,25 µg L⁻¹ do limite de detecção estipulada pela relação sinal/ruído 10:1 (vide item 6.5.2.4.), e a faixa superior na concentração de 68 µg L⁻¹, selecionada com os mesmos critérios estabelecidos para a faixa superior de trabalho do glifosato.

A curva analítica para AMPA na água da matriz é apresentada na Figura 36, nas concentrações: 0,25; 1; 2,5; 5; 15; 30; 45; 65 e 68 µg L⁻¹. O ajuste linear com adição de linha de tendência forneceu uma equação da reta $y = 238711,1 x + 1700,9$ e coeficiente de regressão $R^2 = 0,998$.

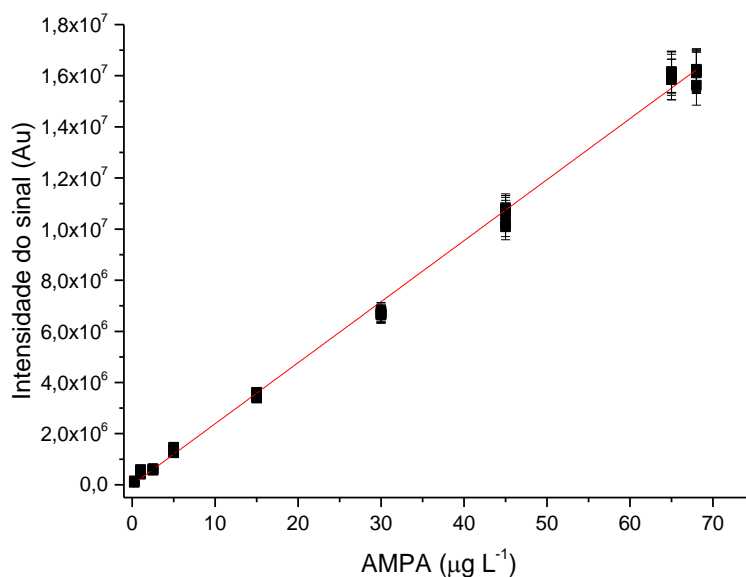


Figura 36. Curva analítica do AMPA na água da matriz.

Fonte: Autoria do próprio autor.

O gráfico de resíduos da curva analítica do AMPA é apresentado no Anexo D.

Para a determinação de glifosato e AMPA nas amostras das águas superficiais da BP3 utilizou-se as curvas analíticas preparadas na matriz apresentadas na Figura 34 e 35.

6.5.2.4. Limite de detecção e quantificação

Dois métodos foram utilizados para determinar o LD de ambos os analitos, glifosato e AMPA. O primeiro consistiu em diluições da menor concentração da curva analítica na matriz até a obtenção de uma relação sinal/ruído 5:1. O segundo método foi através da curva analítica, construída na matriz, como recomendado pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, 2016).

Para a determinação do LQ de ambos os analitos também fez-se uso dos métodos da relação sinal/ruído, na proporção 10:1, e da curva analítica, construída na matriz, como recomendado pelo INMETRO.

Os resultados para LD e LQ por ambos os métodos de determinação são apresentados na Tabela 20.

Tabela 25. Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) para glifosato e AMPA na água da matriz.

Glifosato ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
Método de determinação	LD	LQ
Relação sinal/ruído	0,0125	0,025
Curva analítica	0,026	0,078
AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
Método de determinação	LD	LQ
Relação sinal/ruído	0,025	0,25
Curva analítica	0,36	1,09

Fonte: Autoria do próprio autor.

Os menores limites de detecção e quantificação foram obtidos pela relação sinal/ruído, sendo este o método adotado para o presente trabalho: LD = 0,025 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LQ = 0,0125 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o glifosato e; LD = 0,025 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LQ = 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para AMPA.

6.5.2.5. Estabilidade

O estudo foi realizado tanto na água ultrapura quanto na matriz. Diferentes tubos falcon contendo 10 mL⁻¹ amostras com 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato (GLY) e AMPA foram mantidas congeladas a – 20 °C. Semanalmente 6 tubos falcon, triplicatas com os analitos na água e na matriz, foram analisadas. Inicialmente as amostras foram transferidas do freezer de – 20 °C para o ultra freezer a – 80 °C. Após 1 hora no ultra freezer as amostras foram enviadas para a liofilização e preparadas com o método otimizado no item 6.4.3. Os dados das áreas dos cromatogramas obtidos pela análise de glifosato e AMPA por HPLC com detector de fluorescência são apresentados na Tabela 21.

Tabela 26. Áreas dos sinais analíticos e seus respectivos desvios-padrão, para glifosato e AMPA, após análises semanais das amostras congeladas à – 20 °C.

GLIFOSATO				
Semana	Água pura		Matriz	
	Área	Desvio padrão	Área	Desvio padrão
0	4,3E+06	1,3E+05	2,9E+06	5,9E+03
1	3,3E+06	2,4E+05	3,2E+06	1,1E+05
2	3,2E+06	3,1E+05	3,3E+06	3,0E+05
3	3,7E+06	4,1E+05	3,5E+06	1,7E+05
4	2,9E+06	1,6E+05	3,7E+06	4,3E+04
8	3,7E+06	1,7E+05	3,9E+06	1,5E+05
AMPA				
Semana	Água pura		Matriz	
	Área	Desvio padrão	Área	Desvio padrão
0	6,9E+06	1,2E+05	5,8E+06	8,8E+04
1	6,4E+06	3,0E+05	5,9E+06	1,1E+05
2	6,4E+06	2,7E+05	6,1E+06	4,9E+05
3	6,6E+06	3,3E+05	6,2E+06	2,9E+05
4	6,4E+06	5,4E+04	6,6E+06	3,5E+04
8	6,7E+06	2,6E+05	6,8E+06	9,4E+04

Fonte: Autoria do próprio autor.

Teste T não pareado utilizando valor de referência dos analitos (semana 0) e $T_{\text{crítico}} = 4,30$ ($n = 3$, 95%) são apresentados na Tabela 22. Para os cálculos utilizou-se os seguintes parâmetros: x sendo a média experimental do analito após a semana i , u sendo o valor de referência (média experimental da semana 0) e s_x o desvio padrão da média experimental do analito na semana i . Os dados foram retirados da Tabela 21 para os cálculos.

Tabela 27. Teste *t* de Student para verificação da estabilidade de glifosato e AMPA durante 8 semanas.

Estabilidade na Matriz					
Semana	T_{calculado} GLY	T_{calculado} AMPA	Comparação	Significância	
1	3,2	0,7	$T_{\text{calculado}} \leq T_{\text{crítico}}$	Insignificante	
2	1,4	0,6	$T_{\text{calculado}} \leq T_{\text{crítico}}$	Insignificante	
3	3,9	1,4	$T_{\text{calculado}} \leq T_{\text{crítico}}$	Insignificante	
4	19,5	20,5	$T_{\text{calculado}} \geq T_{\text{crítico}}$	Significante	
8	6,8	9,8	$T_{\text{calculado}} \geq T_{\text{crítico}}$	Significante	

Estabilidade na Água ultrapura					
Semana	T_{calculado} GLY	T_{calculado} AMPA	Comparação	Significância	
1	4,2	1,7	$T_{\text{calculado}} \leq T_{\text{crítico}}$	Insignificante	
2	3,5	1,9	$T_{\text{calculado}} \leq T_{\text{crítico}}$	Insignificante	
3	0,7	1,0	$T_{\text{calculado}} \leq T_{\text{crítico}}$	Insignificante	
4	9,1	9,0	$T_{\text{calculado}} \geq T_{\text{crítico}}$	Significante	
8	3,4	1,0	$T_{\text{calculado}} \leq T_{\text{crítico}}$	Insignificante	

Fonte: Autoria do próprio autor.

Os testes sugerem que não houve perda de sinal analítico de glifosato e AMPA na matriz, pois não ocorreu diminuição do sinal. Todavia, foi observado um aumento de sinal significativo de 12 % a partir da segunda semana, chegando a 36% após oitava semana para o glifosato. Para AMPA o aumento de sinal ocorreu somente após a quarta semana com 12 %, chegando a 15% na oitava semana na matriz (Tabela 22).

Em água pura observou-se perda de sinal analítico significativo de 13% a partir da quarta semana. Para AMPA observou-se perda insignificante, abaixo de 7% em todas as semanas em água pura (Tabela 22). Pelos mesmos motivos mencionados acima, não podemos afirmar que tais variações são reais.

Não é possível concluir de forma categórica que essas variações são reais, pois não utilizou-se padrão interno estável que assegurasse os resultados. Havia sido prevista a utilização de ácido aspártico como padrão interno, como sugerido pela metodologia de Ramirez et al (2014)⁶⁵, contudo, o composto não eluiu de forma adequada, conforme relatado no presente trabalho (vide 6.5.1.1.) e, devido a problemáticas burocráticas, não houve tempo hábil para a compra e utilização de outro padrão para o experimento. Deve-se considerar que o detector de fluorescência pode apresentar variação da intensidade de sinal dependendo do

número de horas de utilização da lâmpada e também do número de horas de uso contínuo. Considerando a possibilidade que a perda de estabilidade seja devido a lâmpada, este resultado não invalida o resultado das análises realizadas na primeira coleta, pois as amostras reais foram quantificadas com padrões preparados no momento da análise. Uma hipótese é a possibilidade de que algum outro composto presente na matriz esteja degradando e seu produto de degradação co-elua com o analitos em questão, portanto, não podendo afirmar que tais variações sejam realmente reais. Caso sejam variações reais os teores de glifosato nas amostras da primeira coleta estariam super estimados em 36% e o de AMPA 15 % (Tabela 20). Com relação a segunda coleta, as amostras foram analisadas imediatamente após a coleta

Segundo Kylin H (2013), o glifosato se liga de forma diferentes aos metais e coloides em diferentes pH, afetando sua disponibilidade para a análise. Segundo seus estudos o tempo de meia-vida do glifosato em águas naturais: em temperatura ambiente (20 °C) e pH natural (próximo de 7), seu tempo de meia-vida é de 10 – 12 dias à luz ambiente, e de 10 – 20 dias no escuro. Quando armazenado na geladeira, (4°C) e em pH natural (próximo de 7) seu tempo de meia-vida aumenta para 21 – 42 dias. Essa perda se deve em parte devido à sua complexação reversível com cátions ou coloides, e que só podem ser revertidos, em partes, por acidificação das amostras antes de sua análise ou antes do seu armazenamento.

Ao compararmos as médias dos resultados obtidos com as amostras coletadas no primeiro semestre (Tabela 13 e 14) com as amostras coletadas no segundo semestre de 2017 (Tabela 24 e 25), vemos que, apesar dos resultados de estabilidade, os resultados estão próximos (Tabela 23). É de importância ressaltar que os dados do primeiro e do segundo semestres apresentam limites de quantificação diferentes: 0,30 µg L⁻¹ para glifosato e 0,32 µg L⁻¹ AMPA para as análises do primeiro semestres; 0,025 µg L⁻¹ para glifosato e 0,25 µg L⁻¹ para AMPA para as análises do segundo semestre. A comparação foi possível pois os valores mais baixos quantificados foram similares para os diferentes semestres foram similares (Tabela 23).

Tabela 28. Menores concentrações obtidas nas análises das amostras nos dois diferentes períodos de coleta de 2017: 15 de Jan – 26 Fev (primeiro semestre) e 4 Set – 10 Out (segundo semestre).

AMOSTRAS FIXAS		
Analito	15 de Jan – 26 Fev	4 Set – 10 Out
Glifosato ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,35	0,36
AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,32	0,65
AMOSTRAS EXTRAS (com chuva $\geq 10\text{mm}$)		
Analito	15 de Jan – 26 Fev	4 Set – 10 Out
Glifosato ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,40	0,31
AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,48	0,50

Fonte: Autoria do próprio autor.

6.5.3. Estudo de caso: ocorrência de glifosato e AMPA na Bacia do Paraná 3.

A amostragem seguiu o procedimento estabelecido para pesticidas organofosforados pela Agência Nacional das Águas – ANA no *Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras de Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos* no qual determina que as amostras devem ser armazenadas sob refrigeração a 4°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) em até 7 dias. Diferentemente das amostras coletadas no primeiro semestre, que foram analisadas após 2 meses de congelamento, as amostras coletadas no período do segundo semestre de 2017 foram analisadas dentro do prazo de 7 dias.

Os frascos foram de vidro âmbar utilizados na coleta foram reutilizados após passarem por lavagem especial: inicialmente deixou-se de molho o frasco de vidro em detergente extran 2 %, seguida do ensaboamento e enxague em água de torneira. Após o enxague o frasco foi preenchido com água de torneira e levado para o ultrassom durante 20 min em 60°C , afim de se remover qualquer vestígio do detergente. Em seguida o frasco foi calcinado a 200°C (acima da temperatura de degradação (180°C) do glifosato e AMPA). Logo após, enxaguou-se o frasco com água destilada e passou-se acetona para sua rápida secagem e remoção de vestígios bacteriológicos que possam degradar a amostra.

A determinação de glifosato e AMPA nas amostras de água superficial coletadas nas 21 microbacias no segundo semestres de 2017 são apresentadas na

Tabela 24. Na tabela são apresentadas 22 pontos de microbacias, porém o ponto 10 foi retirado do planejamento, resultando em 21 pontos de microbacias

Tabela 29. Determinação de glifosato (GLY) e AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas águas superficiais das 21 microbacias da BP3, coletadas no segundo semestre de 2017.

P.	Microbacia	4 – 10 Set		11 – 17 Set		18 – 24 Set		24 Set – 1 Out		2 – 8 Out		8 – 13 Out	
		GLY	AMPA	GLY	AMPA	GLY	AMPA	GLY	AMPA	GLY	AMPA	GLY	AMPA
1	Esquina Memória I	D	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	D
2	Esquina Memória II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
3	Sanga Shangri-lá	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	0,48	-
4	Córrego Água Fria	0,40	D	D	-	-	-	-	-	-	-	D	D
5	Sanga Buriti	-	D	D	0,75	-	-	-	-	-	-	0,36	-
6	Sanga Pinhal	1,65	D	-	D	-	-	-	-	0,37	D	D	-
7	Rio Bonito	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Rio Pacuri	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Rio Moreninha	-	D	-	D	-	-	-	-	-	-	D	-
11	Afluente Rio Azul	0,41	D	0,39	-	-	-	-	-	-	-	0,43	-
12	Córrego Lajeado	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,62	-
13	Córrego Guarani	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	0,87	-
14	Alto Rio Toledo	-	-	D	-	-	-	-	-	D	-	D	-
15	Água Palmito	D	-	D	-	D	-	-	-	0,36	-	D	-
16	Sanga Ajuricaba	-	-	0,36	0,65	-	-	D	D	0,36	-	0,52	-
17	Córrego Peaberu	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	D	D
18	Córrego Belmonte	-	-	0,38	-	-	-	0,40	D	D	-	0,37	D

Tabela 30. Continuação.

19	Lajeado St Rosa	D	-	-	-	-	-	0,43	D	D	-	0,38	-
20	Sanga Tapena	0,36	D	-	-	D	-	0,37	D	0,36	-	D	D
21	Alto Taturi	D	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-
22	Córrego Tamanduá	-	-	-	-	-	D	-	D	-	-	-	-

Fonte: Autoria do próprio autor.

D = Amostras com concentrações abaixo do limite de quantificação (0,025 µg L⁻¹ para GLY e 0,25 µg L⁻¹ para AMPA)

" - " = Amostras com concentrações abaixo do limite de detecção (0,0125 µg L⁻¹ para GLY e 0,025 µg L⁻¹ para AMPA)

Ao todo foram analisados 124 amostras de águas superficiais no segundo semestre de 2017 coletadas semanalmente, de forma consecutiva, sendo que a amostra da microbacia rio Bonito, com previsão de coletas entre os dias 4 -10 Set, bem como da microbacia Alto Taturi, com previsão de coleta entre os dias 8 - 13 Out, não foram coletadas devido à falta de amostrador no local nestas datas. Das amostras analisadas, 37,1% contiveram a presença de glifosato: 19,3% detectadas e 17,7% quantificadas, sendo: 0,36 – 1,65 $\mu\text{g L}^{-1}$ mínima e máxima concentração observada, respectivamente). Enquanto que AMPA foi encontrada em 21,8% das amostras: 20,2% detectadas e 1,6% quantificadas (0,65 e 0,75 $\mu\text{g L}^{-1}$). Glifosato e AMPA foram encontrados em conjunto em 12,1% de todas as amostras analisadas.

A quantificação de glifosato e AMPA apresentaram valores abaixo da concentração máxima permitida para águas superficiais de classe II, conforme preconizada pela CONAMA 357/2005, classe na qual se enquadra as microbacias em estudo.

As amostragens extras, em dias com precipitação acima de 10 mm de água dentro do período amostral, coletadas como demonstrada anteriormente (vide 5.3.4, Capítulo 1) são representadas na Tabela 25.

Tabela 31. Teores de glifosato (GLY) e AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas microbacias selecionadas em períodos de chuva (segundo semestre de 2017).

Ponto	Analito	Datas no mês de Setembro					Datas no mês de Outubro									
		19	25	26	29	30	1	2	2*	6	7	8	9	10	15	
P01	GLY				D						-	0,46				
	AMPA				-						0,90	D				
P02	GLY				-						D	-				
	AMPA				D						-	-				
P03	GLY				0,44			D			-			0,39		
	AMPA				-			-			-			-		
P04	GLY										D	0,91				
	AMPA										-	0,50				
P05	GLY			0,58	-						0,48		0,58			
	AMPA			D	0,7						-		-			
P06	GLY	0,31			0,38			D		0,49	0,43					
	AMPA	-			-			-		-	-					
P07	GLY											D	-			
	AMPA											-	D			
P08	GLY				-			-			-					
	AMPA				-			-			D					
P09	GLY				-			D				-				
	AMPA				D			-				-				
P11	GLY							D	D	-		-				
	AMPA							-	-	-		-				
P12	GLY							D	0,47	D						
	AMPA							D	D	D						
P13	GLY				0,42			-				D	0,41			
	AMPA				1,4			D				-	0,50			
P14	GLY				-			-		D		-				
	AMPA				-			-		-		-				

Tabela 32. Continuação.

P15	GLY	D					0,36	0,37	
	AMPA	D					-	D	
P16	GLY		0,63					0,37	-
	AMPA		D					D	D
P17	GLY		0,37		D		0,37	D	
	AMPA		D		-		D	D	
P18	GLY			D			0,46		
	AMPA			-			D		
P19	GLY		0,56		-		D	-	
	AMPA		D		-		D	-	
P20	GLY			0,37	-		0,38	-	
	AMPA			D	-		-	-	
P21	GLY	0,31			D		0,40		
	AMPA	-			D		D		
P22	GLY				-				
	AMPA				1,03				

Fonte: Autoria do próprio autor.

* Chuva na hora da coleta

D = Amostras com concentrações abaixo do limite de quantificação (0,025 µg L⁻¹ para GLY e 0,25 µg L⁻¹ para AMPA)

" - " = Amostras com concentrações abaixo do limite de detecção (0,0125 µg L⁻¹ para GLY e 0,025 µg L⁻¹ para AMPA)

Ao todo foram analisadas 69 amostras de chuva no período de coleta do primeiro semestre de 2017. O glifosato foi encontrado em 65,2% das amostras: 27,5% detectadas e 37,7 % quantificadas (0,31 – 0,91 $\mu\text{g L}^{-1}$). AMPA foi encontrado em 33,5% das amostras: 24,8% detectadas e 8,7% quantificadas (0,5 – 1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$). Glifosato e AMPA foram encontrados em conjunto em 30,4% de todas as amostras analisadas.

6.6. Conclusão

A otimização do método de preparo de amostra por liofilização demonstram maior sensibilidade na detecção dos analitos, reduzindo o limite de quantificação e detecção para o glifosato e AMPA. Além disto, houve uma redução no uso de solventes orgânicos utilizados durante o preparo e análise quando comparado ao método de SPE, apresentando-se um método ambientalmente mais amigável.

As microbacias situadas na Bacia do Paraná 3 apresentaram baixas concentrações de glifosato e AMPA, menores que o limite máximo permitido para águas superficiais de classe II, preconizado pela CONAMA 357/2005, classe na qual se enquadra as microbacias em estudo, não sendo, portanto, consideradas quantidades significativas.

Maiores investigações fazem-se necessárias para a determinação da estabilidade dos analitos, tanto na matriz como em água ultra, com a utilização de padrão interno estável e/ou acidificação das amostras antes do seu armazenamento. Tanto os resultados das análises quanto a bibliografia nos sugerem que o glifosato não permanece em águas superficiais, sendo provavelmente fixado no solo. Desta forma, a continuidade do trabalho seria o estudo da dinâmica deste analito entre água e solo. Apesar de já existirem alguns estudos sobre o assunto, uma peculiar característica da região é a presença do lato-solo, no qual não existe nenhum estudo publicado sobre este tipo de dinâmica.

Referências

- 96/23/CE. (2002). Directiva do Conselho relativo ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. *Jornal Oficial Europeu*, 26.
- ABDULLAH, M. P. (1995). Improved method for the determination of glyphosate in water. *Journal of Chromatography A*, v. 697, n. 1-2, 363.
- ALVES, L. R., & PAIVA, C. A. (2008). *Determinantes do desempenho diferenciado de mesorregiões selecionadas do Sul do Brasil no período de 1970 e 2000*. Sergipe: VI ENABER – Encontro Nacional da Associação Brasileira de Estudos Regionais e Urbanos, Anais.
- AMARANTE, O. P. (2002). Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova*, 25, 4, p. 589 e 591.
- AMELIN, V. G., BOL'SHAKOV, D. S., & TRETIAKOV, A. V. (2012). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface water and vegetable oil by capillary zone electrophoresis. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 67, n. 4, 386.
- AOAC, A. o. (2012). *Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F)*. Gaithersburg: AOAC International.
- ATKINS, P. W., & JONES, L. (2009). *Princípios de Química-: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente*. 3 ed, p. 389: Bookman Editora, .
- BÁEZ, M. E. (2014). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in aqueous soil matrices: A critical analysis of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization reaction and application to adsorption studies. *Journal of Separation Science*, v. 37, n. 21, 3125.
- BARLEY, J. (s.d.). *Basic Principles of Freeze Drying*. SP Scientific. Fonte: <https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics/>. Último acesso: 04 Dez 2017.
- BENASSI, S. F. (2016). Relatório Sobre as Microbacias de Estudo para o Projeto de Monitoramento de Micropoluentes (Glifosato e Atrazina). *Divisão de Reservatórios – Itaipu Binacional*, 5.
- BHASKARA, B. L., & NAGARAJA, P. (2006). Direct sensitive spectrophotometric determination of glyphosate by using ninhydrin as a chromogenic reagent in formulations and environmental water samples. *Helvetica chimica acta*, v. 89, n. 11, 2686.

- BOMBARDI, L. M. (2011). Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado. *Núcleo de Estudos, Pesquisas e Projetos de Reforma Agrária-v. 30*, 1.
- BORGES, K. B., FIGUEIREDO, E. C., & QUEIROZ, M. E. (2015). *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: Editora LTC: GEN, editor.
- BORRGAARD, O. K., & GIMSING, A. L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest management science*, v. 64, n. 4, 450.
- BÖRJESSON, E., & TORSTENSSON, L. (2000). New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid in water and soil. *Journal of Chromatography A*, v. 886, n. 1, 207.
- BRANDÃO, C. J. (2011). *Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos*. São Paulo: CETESB, p.40 e 54: 2011.
- BRITO, N. M. (2003). Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, 130.
- BYER, J. D. (2008). Low cost monitoring of glyphosate in surface waters using the ELISA method: an evaluation. *Environmental science & technology*, v. 42, n. 16, 6052.
- CATRINCK, T. C. (2014). A simple and efficient method for derivatization of glyphosate and AMPA using 9-fluorenylmethyl chloroformate and spectrophotometric analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, n. 7, 1195.
- CCME. (2012). *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality*. Fonte: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/reports-publications/water-quality/guidelines-canadian-drinking-water-quality-summary-table-health-canada-2012.html#t2>. Último acesso 1 Dez 2017.
- CETESB, A. N. (2011). *Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos*. Brasília - DF.
- COLIN, R. e. (2000). Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl) phosphonic acid (AMPA) in water by liquid chromatography and fluorescence

- detection, Part II: Direct determination using pre-column derivatization with NBD-Cl. *Analisis*, v. 28, n. 9, 819.
- COLLINS, C. H., & BRAGA, G. L. (1988). *Introdução a métodos cromatográficos*. In: *Introdução a métodos cromatográficos*. Campinas (SP): Unicamp, 7 ed.,.
- COLOMBO, S. M., & MASINI, J. C. (2011). Developing a fluorimetric sequential injection methodology to study adsorption/desorption of glyphosate on soil and sediment samples. *Microchemical Journal*, v. 98, n. 2, 260.
- Company, M. (1992). A Monsanto Advertising Supplement in Farmer*s Weekly. Roundup *92. 295.
- CONAB. (2017). *COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO: Central de Informações Agropecuárias*. Fonte: <http://www.conab.gov.br/conabweb>. Último acesso em: 18 nov 2017
- CONAMA. (2005). Conselho Nacional do Meio Ambiente. *Resolução. 357, de 17 de março de 2005*. .
- Coppex, L. (2000). Derivatives for HPLC Analysis Thesis – Faculty of Chemistry and Pharmacy (University of Genève – Suíça) p.26, 2000. Faculty of Chemistry and Pharmacy (University of Genève – Suíça), Faculty of Chemistry and Pharmacy (University of Genève – Suíça) p.26, 2000. Diploma Thesis: Diploma Thesis.
- CORBERA, M., HIDALGO, M., & SALVADÓ, V. (2006). Extraction and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA using anion-exchange solid phases. *Microchimica Acta*, v. 153, n. 3-4, 203.
- COSTA NETO, P. R. (2000). Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. *Quim. Nova*, 4.
- COUTINHO, C. F., & MAZO, L. H. (2005). Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. *Quím. Nova*, v. 28, n. 6, 1038 e 1041.
- DA SILVA, A. S. (2011). A simple and green analytical method for determination of glyphosate in commercial formulations and water by diffuse reflectance spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 79, n. 5, 1881.

- DA SILVA, A. S. (2011). Determination of glyphosate in water samples by multi-pumping flow system coupled to a liquid waveguide capillary cell. *Analytical Sciences*, v. 27, n. 10, 1031.
- DAOUK, S., DE ALENCASTRO, L. F., & PFEIFER, H. (2013). The herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in the Lavaux vineyard area, western Switzerland: proof of widespread export to surface waters. Part II: The role of infiltration and surface runoff. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 48, n. 9, 719.
- DELHOMME, O. e. (2011). Analytical method for assessing potential dermal exposure to pesticides of a non-agricultural occupationally exposed population. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 399, n. 3, 1325.
- DONG, Y.-I. e. (2015). Magnetic solid phase extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in river water using Ti⁴⁺-immobilized Fe₃O₄ nanoparticles by capillary electrophoresis. *Analytical Methods*, v. 7, n. 14, 5862.
- DRUART, C. e. (2011). Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 399, n. 4, 1725-1732.
- DUKE, S. O., & POWLES, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest management science*, v. 64, n. 4, 320.
- DUKE, S. O., & POWLES, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest management science*, v. 64, n. 4, 320.
- E., F. J., K., M. M., & A, S. J. (1997). Glyphosate: A Unique and Global Herbicide. ACS Monograph. *American Chemical Society, Washington, DC, N. 189*, 653.
- EBP. (2015). Fonte: <http://www.saskh2o.ca/pdf/epb356.pdf>. Último acesso: 1 Dez 2017
- EPA, U. (2016). Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential, September 12, p.140. United States.
- FANG, F., WEI, R., & LIU, X. (2014). Novel pre-column derivatisation reagent for glyphosate by high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 94, n. 7, 661.

- FENG, J. C., & THOMPSON, D. G. (1990). Fate of glyphosate in a Canadian forest Watershed. 2: persistence in foliage and soil. . *Journal of Agriculture and Food Chemistry, California*, v.38, n.4, 1118.
- GALLI, A. J., & MONTEZUMA, M. C. (2005). *Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura*. Fonte: ACADCOM: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Plantas_daninhas_glifosatoID-VCQ0aRyNYE.pdf. Último acesso: 24 Nov 2017.
- GARCIA DE LLASERA, M. P. (2005). 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*, v. 1093, n. 1, 139.
- GAZZIERO, D. L., ADEGAS, F. S., & VOLL, E. (2007). Indicações para o uso de glyphosate em soja transgênica. Londrina (PR): Embrapa Soja.
- GIESY, J. P., DOBSON, S., & SOLOMON, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, New York*, v.167, n.1, 35.
- GREY, L., NGUYEN, B., & YANG, P. (2001). Liquid chromatography/electrospray ionization/isotopic dilution mass spectrometry analysis of n-(phosphonomethyl) glycine and mass spectrometry analysis of aminomethyl phosphonic acid in environmental water and vegetation matrixes. *Journal of AOAC International*, v. 84, n. 6, 1770.
- HAGE, D. S., & CARR, J. D. (2012). *Química analítica e análise quantitativa*. 1. Ed. São Paulo: Person Prentice Hall, p. 2 e 70.
- HANKE, I., SINGER, H., & HOLLENDER, J. (2008). Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 391, n. 6, 2265.
- HIDALGO, C. e. (2004). Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, v. 1035, n. 1, 156.

- HINCHEE, M. A. (1993). Herbicide-tolerant crops. In: KUNG, S.; WU, R. (Eds.). *Transgenic plants. San Diego: Academic Press*, 243.
- HOGENDOORN, E. A. (1999). Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 833, n. 1, 67.
- IARC, ©. (2015). Evaluation of Five Organophosphate Insecticides and Herbicides, v. 112, p. 2. France.
- IBÁÑEZ, M. e. (2005). Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1081, n. 2, 146.
- Instituto Nacional de Metrologia, Q. e.-C.-0.-A. (2016). *Validação dos métodos otimizados segundo orientações sobre validação de métodos analíticos*. DOQ-CGCRE-008 Revisão 05.
- IPARDES. (2013). *Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social do estado do Paraná: Indicadores de desenvolvimento sustentável por bacias hidrográficas*. Curitiba-PR , p.245.
- Itaipu. (2011). *Características Gerais da Bacia. Universidade Estadual do Oeste do paraná. Comitê da Bacia Hidrográfica do Paraná 3*.
- Itaipu Binacional. (2011). *Características Gerais da Bacia. Universidade Estadual do Oeste do paraná. Comitê da Bacia Hidrográfica do Paraná 3*. Fonte: Cascavel, p.3 e 54: <http://www.aguasparana.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=239>. Último acesso: 11 Nov 2017.
- Itaipu Binacional. (2011). *Diagnóstico da Disponibilidades Hídricas Superficiais. Universidade Estadual do Oeste do paraná. Comitê da Bacia Hidrográfica do Paraná 3 - Itaipu Binacional*. Fonte: Cascavel, p 3: <http://www.aguasparana.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=239>. Último acesso 12 Nov 2017.
- JAYASUMANA, C., GUNATILAKE, S., & SENANAYAKE, P. (2014). Glyphosate, hard water and nephrotoxic metals: are they the culprits behind the epidemic

- of chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka? *International journal of environmental research and public health*, v. 11, n. 2, 2131.
- JIANG, J., & LUCY, C. A. (2007). Determination of glyphosate using off-line ion exchange preconcentration and capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection. *Talanta*, v. 72, n. 1, 113.
- K., T., D., H., & HERBIG, E. (s.d.). *HPLC Analisis: The Role of Ultrapure Water*. Sartorius AG Company, Germany. Fonte: <http://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis>. Último acesso: 03 Dez 2017
- KACZYŃSKI, P., & ŁOZOWICKA, B. (2015). .. Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection. *Open Chemistry*, v. 13, n. 1, 1011.
- KAWAI, S., UNO, B., & TOMITA, M. (1991). Determination of glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid by high-performance liquid chromatography after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. *Journal of Chromatography A*, v. 540, 411.
- KHROLENKO, M. V., & WIECZOREK, P. P. (2005). Determination of glyphosate and 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*, v. 1093, n. 1, 111.
- LE BOT, B. e. (2002). Optimization and performance evaluation of the analysis of glyphosate and AMPA in water by HPLC with fluorescence detection. *Chromatographia*, v. 56, n. 3-4, 161.
- LUNDGREN, L. N. (1986). A new method for the determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid residues in soils. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 34, n. 3, 535.
- MALLAT, E., & BARCELÓ, D. (1998). 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, 129.

- MERÁS, I. D., DÍAZ, T. G., & FRANCO, M. A. (2005). Simultaneous fluorimetric determination of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in water, previous derivatization with NBD-Cl and by partial least squares calibration (PLS). *Talanta*, v. 65, n. 1, 65.
- MESNAGE, R. e. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, v. 84, 134.
- MILES, C. J., & MOYE, H. A. (1988). Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 36, n. 3, 486.
- MORAES, P. V., & ROSSI, P. (2010). Comportamento ambiental do glifosato. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 9, n. 3, 23.
- NEDELKOSKA, T. V., & LOW, G.-C. (2004). High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate.
- NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., & BRUNS, R. E. (2010). *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Bookman Editora, p. 110.
- NPDWR. (2017). *National Primary Drinking Water Regulations of Environmental Protection Agency of Unites States*. Fonte: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations#three>, Último acesso: 1 Dez 2
- OLIVO, V. E. (2015). Rapid method for determination of glyphosate in groundwater using high performance liquid chromatography and solid-phase extraction after derivatization. *Revista Ambiente & Água*, v. 10, n. 2, 286.
- PATERSON, M. (2004). *Gliphosate Análisis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead*. Fonte: <https://pdfs.semanticscholar.org/669d/9a86d7230ce6daf2e987d0ea219d6c6d8c55.pdf>
- PATSIAS, J., PAPADOPOULOU, A., & PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. (2001). Automated trace level determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction

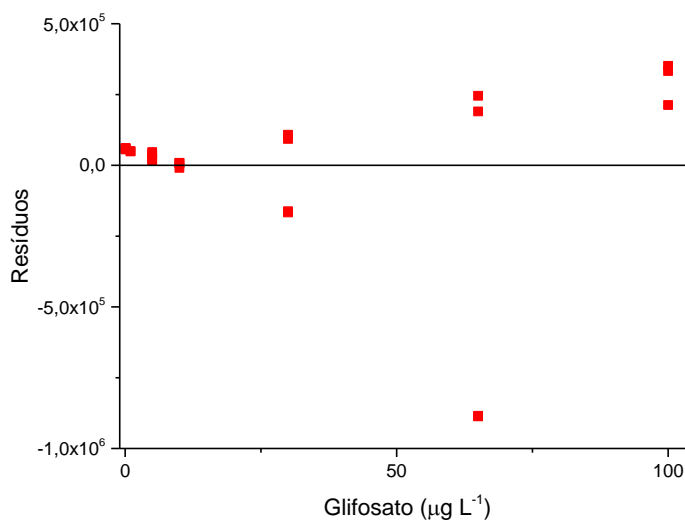
- followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization. *Journal of Chromatography A*, v. 932, n. 1, 83.
- PERUZZO, P. J., PORTA, A. A., & RONCO, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, v. 156, n. 1, 61.
- Pesticide, N. S. (2011). Venda de Defensivos Bate Recorde no Brasil. Sindag News.
- POOLE, C. F., & POOLE, S. K. (2012). *Chromatography today*. Elsevier.
- PORTARIA, M. S. (2011). Nº 2914 DE 12/12/2011 (Federal). Data DO, v. 14, n. 02.
- QIAN, K. e. (2009). Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3, 5-dinitrobenzotrifluoride. *Analytica Chimica Acta*, v. 635, n. 2, 222.
- RAMIREZ, C. E., BELLMUND, S., & GARDINALI, P. R. (2014). A simple method for routine monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters using lyophilization and LC-FLD+ MS/MS. Case study: canals with influence on Biscayne National Park. *Science of the Total Environment*, v. 496, 389-401.
- RIBANI, M. e. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím. Nova*, vol. 27, n.5, 779.
- RIBEIRO, F. A. (2008). Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim Nova*, 165.
- RONCO, A. E. (2016). Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environmental monitoring and assessment*, v. 188, n. 8, 1-3.
- RUEPPEL, M. L. (1977). Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, California*, v.25, n. 3, 517.
- SANCHÍS, J. e. (2012). Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, n. 7, 2335.

- SASAL, M. C. (2015). Glyphosate loss by runoff and its relationship with phosphorus fertilization. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 63, n. 18, 4444.
- SCHÖNBRUNN, E. e. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 4, 1376.
- ScienceDirect, B. d. (2017). Fonte: <http://www.sciencedirect.com>. Último acesso: 22 Nov de 2017
- SEAB/ADAPAR/SIAGRO. (2012). Fonte: http://www.ipardes.pr.gov.br/anuario_2013/estrutura.html. Último acesso em 18 nov 2017.
- SEMA. (2010). *Bacias Hidrográficas do Paraná: Série Histórica. Secretaria do Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos*. Fonte: http://www.meioambiente.pr.gov.br/arquivos/File/corh/Revista_Bacias_Hidrograficas_do_Parana.pdf. Último acesso: 16 Nov 2017.
- SINHA, S. N. (2011). Quantification of organophosphate insecticides in drinking water in urban areas using lyophilization and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry techniques. *International Journal of Mass Spectrometry*, 300, 12.
- SUN, Y. e. (2010). Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by LC using a new labeling reagent, 4-methoxybenzenesulfonyl fluoride. *Chromatographia*, v. 72, n. 7-8, 679.
- SUNDARAM, K. M., & CURRY, J. (1997). A comparison of UV and fluorescence detectors in the liquid chromatographic analysis of glyphosate deposits after post-column derivatization. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, v. 20, n. 4, 511.
- SYNDER, L. R., & GLAJCH, J. L. (1997). *Practical HPLC Method Development*. New York,: 2 ed. Wiley, cap.15.
- SYNDER, L. R., J., K. J., & GLAJCH, J. L. (1997). *Practical HPLC Method Development*. New York: 2 ed. Wiley, cap.15.
- TONI, L. R., SANTANA, H., & ZAIA, D. A. (2006). Adsorção de glyphosate sobre solos e minerais. . *Quim. Nova*, v.29, n.4,, 829.

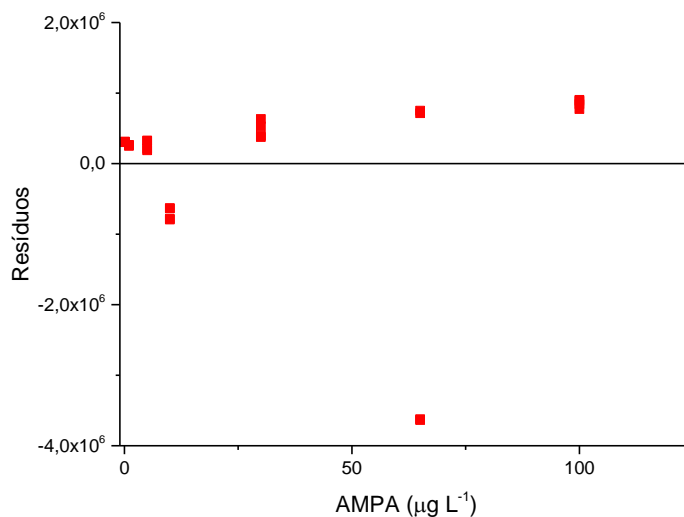
- VEIGA, F. e. (2001). Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *The Science of the Total Environment*, v. 271, n.1-3, 135.
- VREEKEN, R. J. (1998). Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 794, n. 1, 187.
- WANG, S. e. (2016). (Bio) degradation of glyphosate in water-sediment microcosms–A stable isotope co-labeling approach. *Water research*, v. 99, 91.
- WAUCHOPE, R. D. (1992). The SCS/ARS/CES pesticide properties database: select values for environmental decision making. . *Reviews of environmental contamination & toxicology*, New York, v.123, n.1, 164.
- YAMADA, T., & CASTRO, P. d. (2007). Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. *Informações Agronômicas*, n. 119, 2 e 7.
- ZADINELLO, R. e. (2012). Influência da aplicação de Glifosato na produtividade da soja. *Acta Iguazu*, v. 1, n. 4, 1.

Anexos

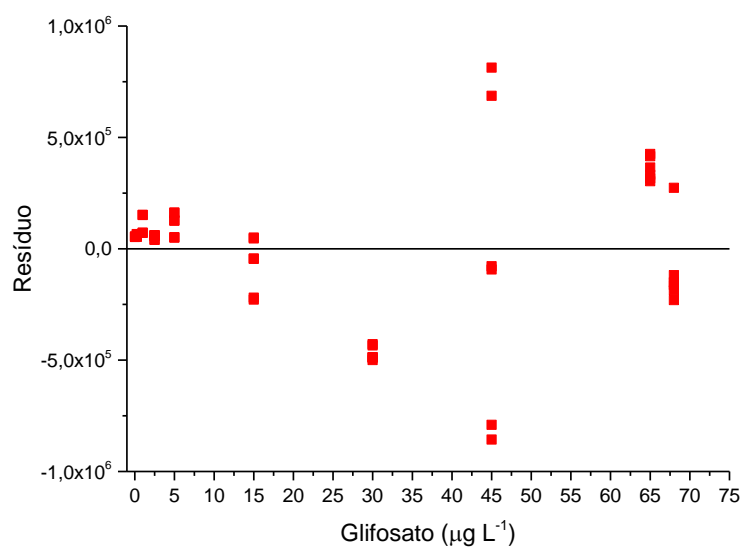
Anexo A – Gráfico de resíduos demonstrando anormalidades na curva analítica apresentada na Figura 15. Dados fornecidos pelo software Origin®.



Anexo B – Gráfico de resíduos demonstrando anormalidades na curva analítica apresentada na Figura 17. Dados fornecidos pelo software Origin®.



Anexo C – Gráfico de resíduos da curva analítica do glifosato preparada na matriz apresentados na Figura 35. Dados fornecidos pelo software Origin®.



Anexo D – Gráfico de resíduos da curva analítica do AMPA preparada na matriz apresentados na Figura 36. Dados fornecidos pelo software Origin®.

