

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/02/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA – UNESP ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO

JOÃO VICTOR BIAGI SANTIAGO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DO
HERBICIDA *PARAQUAT* EM URINA HUMANA**

ARARAQUARA – SP

2018

JOÃO VICTOR BIAGI SANTIAGO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DO
HERBICIDA *PARAQUAT* EM URINA HUMANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da UNESP de Araraquara (PPG IQ/CAr) como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em química.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Araraquara – SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S235d Santiago, João Victor Biagi
Desenvolvimento de método analítico para a
determinação do herbicida *paraquat* em urina humana /
João Victor Biagi Santiago. – Araraquara : [s.n.], 2018
86 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Leonardo Pezza

1. *Paraquat*. 2. Imagens digitais. 3. Quimiometria.
4. Química verde. 5. Planejamento experimental. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

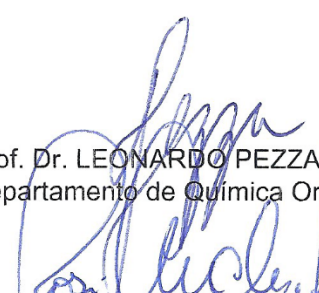
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desenvolvimento de método analítico para a determinação do herbicida *paraquat* em urina humana"

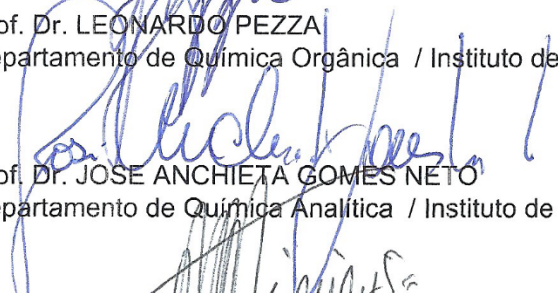
AUTOR: JOÃO VICTOR BIAGI SANTIAGO

ORIENTADOR: LEONARDO PEZZA

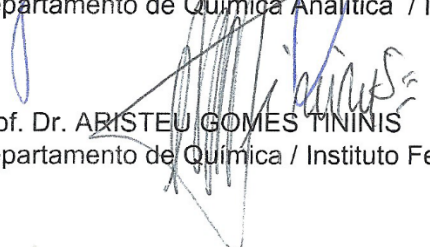
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LEONARDO PEZZA

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. JOSE ANCHIETA GOMES NETO

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. ARISTEU GOMES TININIS

Departamento de Química / Instituto Federal de São Paulo - IFSP - Matão

Araraquara, 21 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES

I. DADOS PESSOAIS:

Nome: João Victor Biagi Santiago.
Data de nascimento: 20 de maio de 1993.
Naturalidade: Viradouro – SP.
Nacionalidade: Brasileiro.
Filiação: João Manoel Santiago.
 Maria Emília Biagi Santiago.
E-mail: j.victorbiagi@hotmail.com
Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0425001407199859>

II. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

Em andamento. Mestrado em química analítica – Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP IQ-CAr), Araraquara SP.
Orientador: Prof.º Dr. Leonardo Pezza.

De 2011 a 2014. Bacharelado em química tecnológica – Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (UNIFEB), Barretos SP.
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Ana Flávia Canovas Martinez.

III. PRÊMIOS:

2015. “**Certificado de Mérito**” Aluno destaque no ENADE – Exame Nacional de Desempenho dos Estudantes de 2014, Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (UNIFEB), Barretos SP.

IV. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS:

XIX Semana Científica e Cultural do Curso de Bacharelado em Química Tecnológica “A Química Fazendo História”, Barretos – São Paulo, realizada no período de 17 a 21 de outubro de 2016.

Palestra: “Desenvolvimento de métodos analíticos aplicando os conceitos da química verde”; Autoria: João Victor Biagi Santiago (Palestrante).

V. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL:

De ago./2014 a jul./2015. Mariol Industrial Ltda., Avenida Mario de Oliveira, Barretos - São Paulo. Tipo: Indústria; Departamento: Controle da Qualidade; Setor: Laboratório de Análises Físico-Químicas (CQ-FQ).

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares, especialmente meus pais João Manoel Santiago e Maria Emilia Biagi Santiago, que trabalharam incansável e incessantemente para garantir a formação dos filhos, sempre apoiando em nossas decisões, e desde cedo, mostrando-nos a importância do estudo, do hábito de questionar e de buscar o conhecimento.

A minha parceira e namorada Thaiz Rosa Ribeiro, que me apoiou incondicionalmente em minhas principais jornadas e decisões desde a graduação, estando sempre ao meu lado para a realização deste objetivo.

A Nicola Bloise (*in memoriam*), grande cientista e professor, com quem tive o prazer de compartilhar um imenso conhecimento e experiências, mesmo que, por apenas um breve período de minha jornada.

A vocês dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à minha família, que esteve sempre ao meu lado dando-me suporte em tudo aquilo que necessitei; durante essa jornada ao longo dos últimos anos, foram incontáveis as vezes em que recebi o apoio deles. Em especial gostaria de agradecer aos meus pais, João Manoel Santiago e Maria Emília Biagi Santiago a minha parceira e namorada Thaíz Rosa Ribeiro e aos meus irmãos Rafaela Santiago Pasquim e Matheus Biagi Santiago, sem vocês, eu não seria eu mesmo.

Não posso deixar de mencionar minha avó materna Maria de Lourdes, minha tia Marta e meus avós paternos Ernesto e Tereza, que nos momentos mais árduos dessa caminhada, garantiram que eu pudesse prosseguir; sem esses pilares não teria alcançado a finalização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador prof. Dr. Leonardo Pezza pela paciência e pelos “puxões de orelha”, mesmo quando o projeto não parecia caminhar, e também pelos conselhos e apoio durante este período; à prof.^a Dr.^a Helena Redigolo Pezza, bem como, aos amigos de laboratório, por me acolherem no grupo de pesquisa Fritz Feigl e compartilharem conselhos, ideias e conhecimentos durante o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus amigos Danilo, Dênis, Fabricio, Gisele e Isaac, que, mesmo após meu distanciamento, continuaram me apoiando durante a realização deste objetivo e buscando sempre uma maneira de estarem presentes.

As professoras Dr.^a Edilene Cristina Ferreira e Dr.^a Fabíola Manhas Verbi Pereira por disponibilizarem seu tempo para a leitura, correção e arguição na minha qualificação, e pelas inúmeras sugestões por elas apresentadas.

Aos professores Dr. Aristeu Gomes Tininis e Dr. José Anchieta Gomes Neto por disponibilizarem seu tempo para a leitura, correção e arguição na minha defesa de dissertação, e pelas inúmeras sugestões por eles apresentadas.

A toda equipe de funcionários do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, que foram sempre solícitos e prestativos para comigo.

A agência de fomento CNPq, pela bolsa de mestrado concedida, possibilitando a conclusão deste trabalho.

Àqueles acima citados e a todos que, de maneira direta ou indireta, quer consciente ou inconscientemente, contribuíram de alguma forma com meu trabalho, tornando possível a conclusão desta etapa, meu mais sincero obrigado.

EPÍGRAFE

“Separabis terram ab igne, subtile a spisso, suaviter, cum magno ingênio”.

Hermes Trismegisto (Tabula Smaragdina)

“É melhor acender uma vela do que praguejar contra a escuridão”.

Adágio

“Saber muito não significa ser inteligente, a inteligência não é só informação, mas também julgamento, a forma como você recolhe, infere, maneja e, sobretudo, onde e como você aplica esta informação”.

Carl Sagan (Cosmos)

RESUMO

A proposta apresentada por este trabalho foi estudar e desenvolver um método analítico para a determinação do herbicida *paraquat* em urina humana, de modo que este seja rápido, sensível, econômico e com uma menor geração de resíduos em relação aos métodos disponíveis, atualmente empregados para esta finalidade, atendendo assim os princípios e requisitos da Química Verde (*Green Chemistry*) e da Química Analítica Verde (*Green Analytical Chemistry*). Outro aspecto também abordado, é o emprego da técnica de análise por imagem digital utilizando software analítico através da geração de imagens digitais por meio das fotografias obtidas dos *spot-tests*, tornando a metodologia portátil e consequentemente mais acessível. O método desenvolvido consiste na reação de redução do dicátion *paraquat* (PQ^{2+}) para a formação de um cátion radicalar (PQ^{*+}) de coloração azul, utilizando uma solução de glicose (Glc) em meio alcalino (NaOH) como reagente redutor. As concentrações dos reagentes foram otimizadas para obter a maior resposta analítica possível, com o auxílio de ferramentas quimiométricas. O produto colorido possui máxima absorbância em torno de 600 nm, e, devido a coloração azul intenso desenvolvida na sua redução, tornou-se possível sua detecção e quantificação por análise das imagens digitais dos *spot-tests* da reação no canal de cor vermelho (canal *Red* do sistema *RGB*), utilizando-se o software livre “*ImageJ – Image Processing and Analysis in Java*”. Através da análise da intensidade efetiva (A_r) da coloração, medida no canal de cor vermelho, foi gerada uma curva analítica que apresentou linearidade na faixa de concentração entre 2,5 e 75 mg L⁻¹ de *paraquat*. A equação da reta para essa curva analítica obtida por meio de regressão linear pode ser descrita pela função $A_r = 0,0191C_{PQ^{2+}} + 0,1904$ e apresenta um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9922. A repetitividade foi verificada calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) de cinco pontos da curva, obtendo-se valores médios de DPR de 1,47% para a intra-dia e 1,85% para inter-dia, os limites de detecção (*LOD*) e limite de quantificação (*LOQ*) obtidos foram de 0,4 e 1,3 mg L⁻¹, respectivamente. Dessa maneira o método analítico proposto permite a detecção e quantificação do *paraquat* com baixo custo, simplicidade operacional, rapidez, elevada robustez, além de possibilitar que essas análises sejam realizadas em locais isolados (*in-situ*) e/ou com grande número de suspeitas de intoxicação, garantindo um diagnóstico rápido e seguro para a imediata elaboração da propedêutica clínica a ser empregada.

Palavras-chave: *Paraquat*. Análise de *spot-test*. Química analítica verde.

ABSTRACT

This work was proposed study and develop an analytical method for determination and quantification of paraquat herbicide in human urine samples, so that this is rapid, sensible, economic, and lesser waste generating that the related methods in literature, currently employed for this purpose, following with Green Chemistry (G.C.) and Green Analytical Chemistry (GAC) principles. Another approached aspect is employ of Digital Image Analysis (DIA) technique using analytical software through the generating digital images photographed of the spot-tests, making the methodology portable and consequently most accessible. The method developed is based in reduction reaction between paraquat dication (PQ^{2+}) for this formation of the radicalar cation (PQ^{*+}) of blue coloring, using a glucose (Glc) solution in alkaline mean (NaOH) as reducing reagent, the reagent concentrations was being optimized for the highest analytical response possible, with the help of the chemometric tools. The colored product has max absorbance at 600 nm, and, because intense blue coloring developed in the reduction, was possible to the detection and quantification from analysis of the digital images of the spot-tests of reaction in red color channel (Red channel of the model RGB), employing the free software ImageJ – Image Processing and Analysis in Java. Through of the analysis of effective intensity (A_r) of the coloring, measured in the red color channel, was plotted an analytical curve that present linearity in the concentrations range of 2,5 to 75 mg L⁻¹ of paraquat, it was obtained from linear regression the line equation for this analytical curve, which is described by function $A_r = 0,0191C_{PQ^{2+}} + 0,1904$ and it has a determination coefficient (R^2) of 0,9922. The repeatability was verified through of the relative standard deviation (RSD) of five points of the curve, obtaining mean RSD values of 1,47% for intra-day and 1,85% for inter-day, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) obtained was of 0,4 and 1,3 mg L⁻¹, respectively, besides good results of the precision and accuracy. Getting this way an analytical method that possibility the detection and quantification of the paraquat as from the digital images analysis, permitting these analyses are realized in isolated areas (*in-situ*) and with great number of intoxication suspicions, with high robustness in results, without demand equipment or sophisticated installations for the analysis, promoting a fast and secure diagnosis for the immediately treatment initiation.

Keywords: Paraquat. Spot-test analysis. Green analytical chemistry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura molecular do *paraquat* na forma de seu sal de dicloreto.....21
- Figura 2 – Ciclo redox do *paraquat* com consequente formação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e mecanismo da formação de EROs e peroxinitrito ($ONOO^-$), principais espécies responsáveis pelos danos e morte celular.26
- Figura 3 – Representação gráfica do cubo de cores do modelo *RGB* (para os níveis normalizados dos canais). Cada cor possível é representada por um ponto, sendo, vermelha (1,0,0), verde (0,1,0), azul (0,0,1), amarela (1,1,0), magenta (1,0,1) e ciano (0,1,1) as cores dos vértices.....32
- Figura 4 – Representação (desenho técnico) do suporte fotográfico equipado com lâmpadas de *LED* utilizado para a obtenção das imagens digitais dos *spot-tests*.....39
- Figura 5 – *Spot-tests* da reação entre a solução de borohidreto de sódio em meio alcalino e a solução de *paraquat*. À esquerda solução de dicloreto de *paraquat* 200 mg L⁻¹ e à direita solução de dicloreto de *paraquat* 20 mg L⁻¹.42
- Figura 6 – *Spot-tests* do produto da reação entre a solução de ditionito de sódio em meio alcalino e a solução de *paraquat*. À esquerda solução de dicloreto de *paraquat* 200 mg L⁻¹ e à direita solução de dicloreto de *paraquat* 20 mg L⁻¹.42
- Figura 7 – *Spot-tests* da reação entre a solução de ditionito de sódio em meio alcalino e a solução de *paraquat*, cerca de 3 minutos após o surgimento da coloração. À esquerda solução de dicloreto de *paraquat* 200 mg L⁻¹ e à direita solução de dicloreto de *paraquat* 20 mg L⁻¹.42
- Figura 8 – *Spot-tests* da reação entre a solução de glicose em meio alcalino e a solução de *paraquat*. À esquerda solução de dicloreto de *paraquat* 200 mg L⁻¹ e à direita solução de dicloreto de *paraquat* 20 mg L⁻¹.42
- Figura 9 – *Spot-tests* do produto da reação entre a solução de ditionito de sódio + ácido ascórbico em meio alcalino e a solução de *paraquat*. À esquerda solução de dicloreto de *paraquat* 200 mg L⁻¹ e à direita solução de dicloreto de *paraquat* 20 mg L⁻¹. ...43
- Figura 10 – *Spot-tests* da reação entre a solução de ditionito de sódio + ácido ascórbico em meio alcalino e a solução de *paraquat*, cerca de 3 minutos após o surgimento da coloração. À esquerda solução de dicloreto de *paraquat* 200 mg L⁻¹ e à direita solução de dicloreto de *paraquat* 20 mg L⁻¹.43
- Figura 11 – Fotografia dos *spot-tests* nas placas de toque após a adição dos reagentes redutores.44
- Figura 12 – Fotografia dos *spot-tests* nas placas de toque após cerca de 40 minutos de reação.44
- Figura 13 – Modelo *RGB* representado no anel externo e algumas de suas respectivas cores complementares representadas no anel interno da imagem.45

Figura 14 – Intensidades efetivas (A_I) para os canais <i>R</i> , <i>G</i> e <i>B</i> , obtidas com a reação utilizando como reagente redutor a solução de ditionito de sódio em NaOH.....	46
Figura 15 – Intensidade efetiva obtida no canal de cor vermelho para a solução reagente de ditionito de sódio no intervalo de 5 a 100 mg L ⁻¹ de dicloreto de <i>paraquat</i>	47
Figura 16 – Intensidades efetivas (A_I) para os canais <i>R</i> , <i>G</i> e <i>B</i> , obtidas com a reação utilizando como reagente redutor a solução de glicose em NaOH.	48
Figura 17 – Intensidade efetiva obtida no canal de cor vermelho para a solução reagente de glicose no intervalo de 5 a 100 mg L ⁻¹ de dicloreto de <i>paraquat</i>	48
Figura 18 – Gráfico da influência da base na intensidade efetiva calculada para o canal de cor vermelho (dados da Tabela 6).	50
Figura 19 – Influência da resolução da imagem digital obtida com a máquina fotográfica na intensidade efetiva calculada.	52
Figura 20 – Faixa linear de 5 a 50 mg L ⁻¹ de íon <i>paraquat</i> , para os reagentes adicionados na proporção de 3:1 (analito : redutor).	53
Figura 21 – Sensibilidade dos dispositivos fotográficos empregados para a obtenção das imagens digitais.	54
Figura 22 – Gráfico de efeitos principais das variáveis analisadas do nível baixo (-1) ao nível alto (1) para a intensidade efetiva obtida.	56
Figura 23 – Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações de segunda e terceira ordem das variáveis do planejamento fatorial completo.	57
Figura 24 – Gráfico das interações entre as variáveis estudadas para a intensidade efetiva.	57
Figura 25 – Gráfico de superfície de resposta obtido através dos dados da Tabela 10, para A_r em função das variáveis [OH ⁻] e [Glc], solução de <i>paraquat</i> a 50 mg L ⁻¹ , n = 3.	60
Figura 26 – Gráfico de contorno obtido através dos dados da Tabela 10, para os valores de A_r em função das variáveis [OH ⁻] e [Glc], solução de <i>paraquat</i> a 50 mg L ⁻¹ , n = 3.	60
Figura 27 – Gráfico com os valores dos coeficientes e seus respectivos intervalos de confiança para o modelo de regressão proposto, para um nível de 95% de confiança.	61
Figura 28 – Gráfico de resposta prevista (A_r) versus resíduo (A_r), comportamento da distribuição dos resíduos.	63
Figura 29 – Gráfico de estabilidade ótica do cátion radicalar (PQ ^{*+}) produto da reação de redução do <i>paraquat</i> , intensidade efetiva em função do tempo de reação.	65
Figura 30 – Curva analítica para os valores de A_r em função da CP _{Q2+} com equação da reta e coeficiente de determinação (R^2), n = 5.	66
Figura 31 – Dispersão dos resíduos, gráfico da resposta prevista (A_r) versus resíduos (A_r), para a curva analítica.	67

- Figura 32 – Representação gráfica de alguns dos cromatograma das soluções padrão de *paraquat* utilizados para a construção da curva analítica do método comparativo..73
- Figura 33 – Curva analítica para os valores de Área do pico em função da concentração de *paraquat* com equação da reta, $n = 3$ 74
- Figura 34 – Cromatogramas obtidos em 268 nm para as amostras 1 (5 mg L^{-1}), 4 (20 mg L^{-1}) e 5 ($12,5 \text{ mg L}^{-1}$) indicando o tempo de retenção do *paraquat*. 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Participação e posição do Brasil na produção de alguns alimentos e produtos de origem agrícola no ano de 2016.....	19
Tabela 2 – Culturas, modalidade de emprego e limite máximo de resíduos permitidos no Brasil para o herbicida <i>paraquat</i>	22
Tabela 3 – Efeitos toxicológicos da intoxicação pela ingestão de <i>paraquat</i>	24
Tabela 4 – Óbitos registrados em casos de intoxicações com agrotóxicos de uso agrícola por ano no Brasil.	27
Tabela 5 – Valores de intensidade efetiva calculados para os três canais de cor (R, G e B), através da análise pelo software <i>ImageJ</i> , para a reação de redução do <i>paraquat</i> utilizando a solução de ditionito de sódio em NaOH como reagente redutor.....	46
Tabela 6 – Valores de intensidade efetiva calculados para os três canais de cor (R, G e B), através da análise pelo software <i>ImageJ</i> , para a reação de redução do <i>paraquat</i> utilizando a solução de glicose em NaOH como reagente redutor.	47
Tabela 7 – Efeito da base na intensidade efetiva calculada para o canal de cor vermelho.	49
Tabela 8 – Ensaio de ordem de adição e influência do uso de água deionizada tratada com fluxo contínuo de nitrogênio (N ₂), n = 3.	51
Tabela 9 – Dados de intensidade efetiva obtidos no canal de cor vermelho para a reação entre as soluções de <i>paraquat</i> e redutora na proporção de 3:1, respectivamente, n = 3. ..	53
Tabela 10 – Matriz de dados, valores codificados, reais e intensidade efetiva obtidos no experimento de planejamento fatorial 2 ³ , n = 4.	55
Tabela 11 – Matriz de dados do planejamento fatorial composto central (tipo estrela com ponto central), n=3.	59
Tabela 12 – Tabela ANOVA (<i>Analysis of Variance</i>) construída para a análise do modelo de regressão recalculado, após a exclusão dos coeficientes não significativos.	62
Tabela 13 – Dados de intensidade efetiva em função do tempo, obtidos no ensaio de estabilidade ótica, C _{PQ2+} = 50 mg L ⁻¹ , n = 4.....	65
Tabela 14 – Dados de intensidade efetiva em função da concentração de <i>paraquat</i> para a curva analítica, n = 5.....	66
Tabela 15 – Tabela ANOVA construída para a análise do modelo de regressão obtido para curva analítica.	67
Tabela 16 – Dados de A _r obtidos no ensaio de repetitividade intra-dia.	68
Tabela 17 – Dados de A _r obtidos no ensaio de repetitividade inter-dia.	68
Tabela 18 – Valores das medidas do branco e limites de detecção e quantificação calculados, t _{crítico} = 2,447 (95% de confiança e 6 graus de liberdade).	69

Tabela 19 – Composição da urina sintética empregada no ensaio de adição de padrão e recuperação, pH 6,00.	70
Tabela 20 – Tabela de resultados do ensaio de adição de padrão e recuperação obtidos para a urina sintética, coeficiente de variação (CV) crítico = 16, n = 5.	71
Tabela 21 – Tabela de resultados do ensaio de adição de padrão e recuperação obtidos para a urina natural, coeficiente de variação (CV) crítico = 16, n = 5.	71
Tabela 22 – Dados obtidos na análise das amostras de urina natural fortificadas com <i>paraquat</i> , analisadas com o método proposto, intervalo de confiança (I.C.) para 95% de confiança, n = 5.	73
Tabela 23 – Dados obtidos para a construção da curva analítica do método comparativo (CLAE), n = 3.	74
Tabela 24 – Dados obtidos na análise das amostras de urina natural fortificadas com <i>paraquat</i> , analisadas com o método comparativo, intervalo de confiança (I.C.) para 95% de confiança, n = 3.	75
Tabela 25 – Tabela de comparação dos dados referentes as análises das amostras fortificadas pelos métodos comparativo e proposto, valores de F crítico para 4 e 2 graus de liberdade e t crítico para 6 graus de liberdade, ambos a um nível de 95% de confiança.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância (do inglês, <i>analysis of variance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (do inglês, <i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
C.V.	Coeficiente de variação
CG	Cromatografia gasosa
CIATs	Centros de Informações e Assistência Toxicológica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
DIA	Análise de imagem digital (do inglês, <i>digital image Analysis</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EC	Eletroforese capilar
EPIs	Equipamentos de proteção individual
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G.C.	Química verde (do inglês, <i>green chemistry</i>)
GAC	Química analítica verde (do inglês, <i>green analytical chemistry</i>)
Glc	Glicose
I.C.	Intervalo de confiança
LED	Diodo emissor de luz (do inglês, <i>light emitting diode</i>)
LMR	Limite máximo de resíduos
LOD	Limite de detecção (do inglês, <i>limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês, <i>limit of quantification</i>)
MP	Megapixels
PIB	Produto Interno Bruto
PNDA	Programa Nacional de Defensivos Agrícolas
PQ ^{*+}	<i>Paraquat</i> (cátion radicalar)
PQ ²⁺	<i>Paraquat</i> (dicátion)
RGB	Vermelho, Verde e Azul (do inglês, <i>Red, Green and Blue</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
RP	Fase reversa (do inglês, <i>reverse phase</i>)
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
UNA	Uso não alimentar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	<i>SOBRE A AGRICULTURA.....</i>	18
1.1.1	Agricultura no Brasil.....	18
1.2	<i>HERBICIDAS.....</i>	20
1.2.1	O Paraquat.....	20
1.2.1.1	<i>Características físico-químicas e reatividade.....</i>	20
1.2.1.2	<i>Emprego e atividade.....</i>	21
1.2.1.2.1	<i>Mecanismo de ação (atividade herbicida).....</i>	23
1.2.1.3	<i>Intoxicação e quadro de sintomas.....</i>	23
1.2.1.3.1	<i>Mecanismo da ação tóxica em humanos (via ingestão).....</i>	25
1.2.1.4	<i>Intoxicações e acidentes relatados.....</i>	26
1.3	<i>MATERIAL BIBLIOGRÁFICO.....</i>	28
1.4	<i>MÉTODO PROPOSTO NO PRESENTE TRABALHO.....</i>	29
1.4.1	Química analítica verde.....	29
1.4.2	<i>Spot-test.....</i>	30
1.4.3	Análise de imagem digital.....	30
1.4.3.1	<i>Imagens digitais.....</i>	31
1.4.3.2	<i>O modelo de cores RGB.....</i>	31
1.4.3.3	<i>A análise.....</i>	33
1.4.4	Ferramentas quimiométricas.....	34
2	OBJETIVOS.....	35
2.1	<i>OBJETIVO GERAL.....</i>	35
2.2	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</i>	35
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	35
3.1	<i>REAGENTES E MATERIAIS.....</i>	35
3.1.1	Reagentes.....	35
3.1.2	Materiais.....	36
3.2	<i>EXPERIMENTOS E TÉCNICA.....</i>	37
3.2.1	Soluções.....	37
3.2.2	Reação em papel de filtro qualitativo.....	37
3.2.3	Reação em placa de toque.....	38
3.2.4	Obtenção das imagens digitais.....	38

3.2.5	Análise das imagens digitais.....	39
3.2.6	Método comparativo (CLAE)	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	<i>TESTES PRELIMINARES.....</i>	<i>40</i>
4.2	<i>OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO</i>	<i>54</i>
4.2.1	Planejamento fatorial completo	55
4.2.2	Planejamento composto central.....	58
4.3	<i>VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO</i>	<i>64</i>
4.3.1	Estabilidade ótica	64
4.3.2	Curva analítica e faixa linear	66
4.3.3	Repetitividade intra e inter-dia.....	68
4.3.4	Limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ)	69
4.3.5	Adição de padrão e recuperação.....	70
4.3.6	Comparação de métodos	72
4.3.6.1	<i>Método comparativo.....</i>	<i>73</i>
4.3.6.1.1	<i>Curva analítica para o método comparativo.....</i>	<i>74</i>
4.3.6.1.2	<i>Análise das amostras pelo método comparativo</i>	<i>75</i>
4.3.6.2	<i>Comparação dos resultados obtidos</i>	<i>76</i>
5	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a demanda por alimentos vem crescendo em todo o mundo, bem como a exigência do mercado global em relação aos níveis de qualidade dos mesmos. (1) Esse fenômeno que é causado por diversos fatores, dentre eles o crescimento populacional, a concentração de população em áreas urbanas, o aumento de renda e da qualidade de vida *etc.* (2-4), acarreta a dúvida a respeito da capacidade das nações em atender as necessidades alimentares de sua população e dos mercados exteriores, dúvida esta que é muito frequente em discussões no meio científico e de políticas públicas. Nesse sentido, diversos trabalhos acadêmicos têm sido publicados buscando uma resposta em consenso ou uma alternativa à questão.

Diante deste desafio alimentar, a agricultura ganha um certo destaque, especialmente no Brasil, uma vez que o país ainda não explorou toda sua área cultivável disponível, e é uma grande potência em termos de produtividade agrícola. (5) Se por um lado a agricultura pode ser um dos principais pilares de sustentação para garantir a segurança alimentar, por outro, a sua expansão traz um aumento quase que obrigatório no emprego de defensivos agrícolas, e por consequência dos mecanismos utilizados para obter um constante crescimento da produção agrícola nacional. Dentro desse contexto o Brasil assumiu a alguns anos o posto de maior “consumidor” mundial de agrotóxicos. (6,7)

Ainda que, com a disseminação da filosofia da Química Verde (*Green Chemistry*), haja uma motivação maior para o desenvolvimento de produtos seguros e planejados para degradação inócua (8,9), estimulando a produção de defensivos agrícolas não tóxicos ou menos tóxicos. Os principais princípios ativos das formulações utilizadas no presente, possuem potencial toxicidade ao homem e ao meio ambiente, além do fato de alguns deles não possuírem antídotos conhecidos, tornando comum casos de intoxicação e acidentes fatais, além da contaminação de solos e águas por esses compostos.

Dentre os defensivos agrícolas mais comumente empregados pelos grandes países produtores de alimentos vegetais no mundo, uma classe de importante impacto na produtividade dos campos é a dos herbicidas, os quais agem de maneira rápida e eficaz no combate à densidade populacional de ervas daninhas, que competem com o cultivo pela absorção de água e nutrientes. (10) Tais compostos são intensamente empregados nos mais diversos produtos agrícolas, sendo que naqueles que são destinados a alimentação humana, o emprego desses compostos se dá, de acordo com suas características de seletividade e modo de ação.

1.1 SOBRE A AGRICULTURA

A agricultura é, sem sombra de dúvidas, um campo extremamente promissor para a economia e segurança alimentar de diversos países, embora, ainda necessite de mais atenção em grande parte deles, sendo de considerável importância a ampliação dos investimentos em desenvolvimento tecnológico de maquinaria, sementes (estirpes), fertilizantes, dos defensivos químicos e projetos de implantação de fazendas verticais, fatores estes que já vem garantindo um crescimento considerável na produção agrícola.

Tratando-se da capacidade produtiva, a agricultura mundial, caso explorada ao seu limite, possui um potencial de atender as necessidades alimentares de uma população global superior a 8 bilhões de pessoas, podendo satisfazer até 10 bilhões (11), embora, seja importante destacar que, na maioria das vezes, existe um aumento concomitante no consumo de insumos agrícolas (dentre eles os agrotóxicos). (12) Uma grande barreira a ser superada é conquistar o desejado aumento na produtividade de alimentos vegetais, reduzindo ao mínimo possível os impactos ambientais e o consumo de insumos externos, ou seja, produzindo de forma sustentável. (1,11)

Dos principais alimentos de origem vegetal destinados a alimentação humana e animal, aqueles que, na maioria das vezes estão presentes nas dietas em geral são os grãos, raízes e oleaginosas. No grupo dos grãos os mais consumidos em todo o mundo são o arroz, trigo, milho, centeio, cevada entre outros. A mandioca é a principal raiz consumida e no grupo das oleaginosas temos a soja, dendê, girassol e coco. (13) O Brasil ganha certo destaque dentre os países produtores de alimentos, em primeiro lugar por já ser uma grande potência agrícola, e ainda apresentar um crescimento anual relativamente alto neste setor e em segundo lugar por estar entre os principais produtores dos produtos alimentícios anteriormente mencionados.

1.1.1 Agricultura no Brasil

Com o intuito de ingressar e conquistar seu espaço participando significativamente na economia global, o Brasil passou a apostar na agricultura e ampliar o uso de defensivos agrícolas após a década de 40, acelerando por volta da década de 60 com a isenção de impostos e das taxas de importação de produtos não produzidos no país. Com o lançamento do programa nacional de defensivos agrícolas (PNDA) em 1975, o governo investiu na implantação e desenvolvimento das indústrias direcionadas a este setor. Outro grande incentivo governamental para a produção e consumo de agrotóxicos no país, veio com o condicionamento

do crédito rural à compra do defensivo. (14) Após a década de 80, os avanços tecnológicos e a expansão das áreas cultiváveis no país, transformaram-no em uma verdadeira potência na produção de alimentos de origem vegetal e no uso de agrotóxicos, principalmente de herbicidas, que apresentaram um crescimento vertiginoso de cerca de 540% no período de 1978 a 1998. (14,15)

Hoje a agricultura é um dos principais pilares de sustentação da economia brasileira, e é responsável por uma parcela significativa do produto interno bruto (PIB), sendo que, no ano de 2016 as atividades ligadas ao setor movimentaram cerca de 23% do PIB. (16) Atualmente o Brasil é um grande exportador de produtos agrícolas, estando entre os maiores produtores mundiais; o país lidera a produção mundial de café, caju, cana-de-açúcar, laranja e erva mate, é o segundo maior produtor de abacaxi, castanha do Pará, mamão e soja e o terceiro maior produtor de feijão, mandioca, milho e tabaco. A Tabela 1 abaixo, traz alguns dados sobre a participação da produção agrícola brasileira no mundo no ano de 2016.

Tabela 1 – Participação e posição do Brasil na produção de alguns alimentos e produtos de origem agrícola no ano de 2016.

Produto	Brasil		Produção Mundial (10 ³ toneladas)	Participação do Brasil (%)
	Posição mundial	Produção nacional (10 ³ toneladas)		
Abacaxi	2º	2.694,6	25.809,0	10,44
Banana	4º	6.764,3	113.280,3	5,97
Café	1º	3.019,1	9.221,5	32,74
Caju	1º	1.775,3	1.921,5	92,39
Cana-de-açúcar	1º	768.678,4	1.890.661,8	40,66
Caqui	5º	161,0	5.430,4	2,97
Castanha do Pará	2º	42,3	119,3	35,48
Coco	4º	2.649,2	59.010,6	4,49
Feijão	3º	2.615,8	26.833,4	9,75
Laranja	1º	17.251,3	73.187,6	23,57
Limão e lima	5º	1.262,4	17.347,2	7,28
Mamão	2º	1.424,7	13.050,7	10,92
Mandioca	3º	21.082,9	277.102,6	7,61
Erva mate	1º	616,2	937,3	65,74
Melancia	4º	2.090,4	117.022,6	1,79
Milho	3º	64.143,4	1.060.107,5	6,05
Pimentas	4º	54,4	546,3	9,96
Sementes de algodão	5º	3.464,1	65.391,5	5,30
Soja	2º	96.296,7	334.894,1	28,75
Tabaco	3º	675,5	6.664,2	10,14

Fonte: Elaborada pelo autor, dados: FAO/FAOSTAT.

Na quinta coluna da tabela acima, intitulada “participação do Brasil (%)”, temos a porcentagem da produção brasileira em relação a produção mundial dos respectivos produtos

agrícolas, para algumas culturas apresentadas, a produção nacional no ano de 2016 ultrapassou 1/5 da produção total mundial, com destaque para as produções de café, caju, cana-de-açúcar, castanha do Pará, erva mate e soja, as quais a produção do país superou 28% da produção mundial.

Atualmente os Estados Unidos, a União Europeia e o Brasil são, respectivamente, o primeiro, segundo e terceiro maiores produtores agrícolas no mundo (17,18), sendo que o Brasil diferentemente dos dois primeiros, ainda possui uma grande área de terra cultivável inexplorada, podendo no futuro aproveitar-se dessa reserva de terras para expandir significativamente a capacidade produtiva do país. (5,13)

Segundo as estimativas realizadas pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a safra de grãos referente ao período de 2016/17 deverá ultrapassar 219 milhões de toneladas (19), dos quais 105,6 milhões de toneladas corresponderão a produção de soja, ultrapassando as safras anteriores e registrando a maior produção desse grão. Muito desse avanço nos índices de produção se deve ao emprego das tecnologias de máquinas e ao uso dos diferentes tipos de insumos nos campos, principalmente de agrotóxicos como os herbicidas.

1.2 HERBICIDAS

Herbicidas são substâncias químicas sintéticas ou de base natural, utilizadas para a interrupção do crescimento ou eliminação de plantas, em especial das ervas daninhas. Segundo Zimdahl a etimologia da palavra herbicida origina do latim pela junção das palavras *herba* que significa planta herbácea e *caedere* que significar para matar. (20,21) Essas substâncias podem ser divididas em grupos de acordo com suas características, como: modo de ação, método e condições de aplicação, modalidade de emprego e período de aplicação. (10,21,22) Dentre os herbicidas mais utilizados no mundo está o *paraquat* (23,24), que se destaca não apenas pela elevada eficiência e baixo custo, mas também por combater um amplo espectro de ervas daninhas.

1.2.1 O Paraquat

1.2.1.1 Características físico-químicas e reatividade

O íon 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio ou íon 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio, também conhecido como metil viologênio ou *paraquat*, representado na Figura 1, é um dicátion de

fórmula molecular $C_{12}H_{14}N_2$ e peso molecular de $186,258 \text{ g mol}^{-1}$, é extremamente solúvel em água, ligeiramente solúvel em etanol e metanol e praticamente insolúvel em solventes orgânicos apolares, possui baixa volatilidade, pressão de vapor inferior a $1,0 \times 10^{-4} \text{ Pa}$ e decompõe-se a 300°C . (25,26) Em formulações de herbicidas o *paraquat* é comumente comercializado como sais de dicloreto ou dimetilsulfato, com fórmulas $C_{12}H_{14}N_2Cl_2$ e $C_{12}H_{14}N_2(CH_3SO_4)_2$, respectivamente. (27)

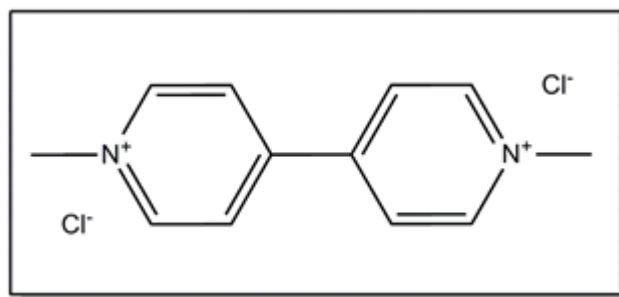


Figura 1 – Estrutura molecular do *paraquat* na forma de seu sal de dicloreto.
Fonte: elaborada pelo autor.

Dissolvido em água produz uma solução incolor, estável em meio ácido e neutro, porém, em meio alcalino pode sofrer a hidrólise de um grupo metil, podendo ser facilmente reduzido para formar um cátion radicalar bastante estável em solução e de coloração azul intensa, com máxima absorbância em 600 nm , permitindo dessa maneira a sua detecção e quantificação por espectrofotometria na região visível do espectro eletromagnético. (25)

1.2.1.2 Emprego e atividade

O *paraquat* é um poderoso princípio ativo de formulações de herbicidas, possuindo registro em mais de 90 países ao redor do planeta, dentre os quais estão o Brasil, Canadá, Estados Unidos, Japão e Nova Zelândia (28,29), sendo amplamente utilizado devido sua alta eficiência e rápida ação, além do fato de ser um herbicida não seletivo, que o torna eficaz para o combate de um amplo espectro de ervas-daninhas e por apresentar uma boa relação custo/benefício se comparado com outros ingredientes ativos disponíveis no mercado.

Devido suas características e mecanismo de ação, o *paraquat* pode ser empregado tanto para o combate pós-emergente quanto para a dessecação de culturas. No Brasil seu uso é permitido pelos órgãos responsáveis, tendo os seus limites máximos de resíduos (LMR) determinados pela ANVISA. Com o intuito da eliminação de vegetação infestante na plantação, pode ser aplicado em culturas como algodão, arroz, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, coco, milho, pastagens, soja, sorgo e trigo, já para o emprego como dessecante da cultura pode ser

aplicado no algodão, arroz, cana-de-açúcar, milho, soja e sorgo. Os valores de LMR para cada cultura estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2 – Culturas, modalidade de emprego e limite máximo de resíduos permitidos no Brasil para o herbicida *paraquat*.

Cultura	Modalidade de aplicação	LMR* (mg/kg)
Abacate	Pós-emergência	0,05
Abacaxi	Pós-emergência	0,05
Algodão	Dessecação	0,2
	Pós-emergência	0,2
Arroz	Dessecação	0,5
	Pós-emergência	0,5
Aspargo	Pós-emergência	0,05
Banana	Pós-emergência	0,05
Batata	Dessecação	0,2
	Pós-emergência	0,2
Beterraba	Pós-emergência	0,05
Cacau	Pós-emergência	0,05
Café	Pós-emergência	0,05
Cana-de-açúcar	Dessecação	0,1
	Pós-emergência	0,1
Citros	Pós-emergência	0,05
Coco	Pós-emergência	0,05
Couve	Pós-emergência	0,05
Feijão	Pós-emergência	0,05
Maçã	Pós-emergência	0,05
Milho	Dessecação	0,1
	Pós-emergência	0,1
Pastagens	Pós-emergência	5,0
Pera	Pós-emergência	0,05
Pêssego	Pós-emergência	0,05
Seringueira	Pós-emergência	UNA
Soja	Dessecação	0,1
	Pós-emergência	0,1
Sorgo	Dessecação	0,5
	Pós-emergência	0,5
Trigo	Pós-emergência	0,01
Uva	Pós-emergência	0,05

* Considerando-se a concentração do cátion; UNA = Uso não alimentar.

Fonte: Elaborada pelo autor, adaptado de: Índice monográfico P01 Anvisa, 2014.

Além do uso como herbicida, o *paraquat* é corriqueiramente utilizado na eletroquímica, em reações de transferência eletrônica como reagente transportador de elétrons. Isso se dá por sua capacidade de ser reduzido à um cátion radicalar estável na ausência de oxigênio, retornando ao seu estado oxidado (dicatônico) quando na presença de oxigênio. (23)

1.2.1.2.1 Mecanismo de ação (atividade herbicida)

O *paraquat* é classificado como sendo um herbicida de contato não seletivo, agindo direta e rapidamente no tecido verde, de uma vasta gama de vegetais. (25) A causa de sua atividade herbicida ocorre devido a interferência ocasionada nas reações de transferência de elétrons, durante as reações da fotossíntese, no fotossistema I. No meio intracelular, o *paraquat* captura um dos elétrons liberados pela clorofila a, formando um cátion radicalar (representado como PQ^{*+}) e impedindo que esse par de elétrons seja capturado pela ferredoxina, e posteriormente, transferido na redução do $NADP^+$ (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato) para a formação do NADPH. (30-32)

Além de interferir no processo de síntese de carboidratos, que necessitam do NADPH para o transporte de elétrons e prótons durante a redução do dióxido de carbono, o PQ^{*+} formado reage espontaneamente com o O_2 desencadeando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que, por sua vez, causa o desequilíbrio das atividades oxidativas, provocando a peroxidação lipídica e posterior morte celular. (30-32)

1.2.1.3 Intoxicação e quadro de sintomas

Devido sua elevada toxicidade e larga utilização nos campos, diversos casos de intoxicação foram registrados ao longo dos anos, ocasionando a sua proibição em vários países, embora raramente sejam registradas intoxicações laborais, acidentes domésticos e homicídios, sendo mais comuns os casos de tentativa de suicídio. (27,33)

Um dos principais motivos para sua proibição em alguns países, é o fato de ainda não possuir antídoto conhecido ou tratamento eficaz, o que torna a recuperação das vítimas mais complicada e com baixa taxa de sucesso, em grande parte dos casos resultando em óbito. (27,34) Estudos apontam que o *paraquat* pode ser tóxico por via respiratória, dérmica e oral, embora dificilmente ocorra intoxicação por via respiratória por não ser uma substância volátil; por via dérmica, ocorre principalmente se a vítima possuir lesões na pele, o que pode aumentar consideravelmente a sua absorção. (33) No caso da ingestão, maior responsável pelas intoxicações agudas e óbitos, a absorção é baixa, variando entre 5 e 20% da quantidade ingerida. (33,35)

Após ingerido, o *paraquat* alcança seu pico sérico dentro do intervalo de 30 minutos à 4 horas e rapidamente se distribui pelo corpo através do sistema circulatório (25,33,34,36), cerca de 5 a 6 horas após a ingestão parte do composto já se acumulou nos tecidos de diversos

órgãos e parte foi excretado na urina e nas fezes, assim sua concentração no sangue é reduzida drasticamente. (33,34,36)

O quadro clínico desenvolvido pelo paciente intoxicado está diretamente ligado a dose e rota de intoxicação, podendo variar de assintomático a óbito em poucas horas. (27) Com o intuito de diminuir a absorção do composto pelo organismo, é comum as formulações possuírem agentes eméticos. A Tabela 3 apresenta a relação dose/efeitos clínicos.

Tabela 3 – Efeitos toxicológicos da intoxicação pela ingestão de *paraquat*.

Dose	Quantidade*	Efeitos toxicológicos	Prognóstico
Dose baixa	< 20 mg Kg ⁻¹	O paciente pode não apresentar sintomas ou desenvolver vômito ou diarreia. O quadro reversível com recuperação completa, mas a função pulmonar pode apresentar deficiência transitória.	Quadro reversível com recuperação completa.
Dose moderada	20 – 40 mg Kg ⁻¹	Nas primeiras horas há dor orofaríngea, vômito diarreia <i>etc.</i> Disfunção renal e hepática são comumente observadas. As membranas mucosas da boca podem apresentar descamação com lesões aparentes. Em casos mais graves pode-se desenvolver dispneia após alguns dias. Geralmente desenvolvem-se crepitações e sinais radiológicos de lesão pulmonar. Pode ocorrer a morte ocasionada por fibrose pulmonar maciça, entre 2 e 4 semanas.	A maioria dos casos resulta em óbito entre 2 a 4 semanas.
Dose alta	> 40 mg Kg ⁻¹	Causa falência múltipla dos órgãos podendo levar a óbito entre 24 e 48 horas, devido à gravidade da intoxicação. Desenvolvem-se graves lesões gástricas (gastrointestinais) com considerável perda de líquido. Insuficiência renal, arritmias cardíacas, coma, convulsões e perfuração do esôfago em seguida morte.	A morte ocorre dentro de 24 horas, em raros casos levando alguns dias.

* Valor estabelecido em mg do íon/Kg de massa corporal

Fonte: elaborada pelo autor.

O envenenamento fatal por *paraquat* é dividido em dois tipos distintos, por intoxicação aguda fulminante, que leva o indivíduo a morte em um curto período de tempo, ou pelo desenvolvimento de fibrose pulmonar, que, de acordo com o grau de intoxicação pode levar algumas semanas para resultar em falecimento. (27) Os principais efeitos da intoxicação aguda causada pelo herbicida são provocados nos rins e pulmões, sendo neste último, os mais graves e que geralmente levam o indivíduo intoxicado a óbito, danos severos na orofaringe e esôfago estão geralmente relacionados a ingestão do produto concentrado.

Estudos recentes apontam também que a ação tóxica do *paraquat* pode contribuir como fator ambiental para doenças neurodegenerativas, podendo estar relacionado ao desenvolvimento e agravamento do mal de Parkinson, sendo assim considerado um fator de risco para essa doença. (23,37,38)

1.2.1.3.1 Mecanismo da ação tóxica em humanos (via ingestão)

Em casos de intoxicação por ingestão, o *paraquat* é rapidamente absorvido pelo organismo devido sua elevada afinidade com água, sendo majoritariamente absorvido no intestino delgado, e como apresenta alto poder de corrosão (principalmente quando se apresenta em formulações concentradas do produto), pode causar lesões na mucosa gastrintestinal elevando sua taxa de absorção. (30,39) Após ser absorvido neste órgão, ele é transportado pelos capilares sanguíneos, de onde irá se distribuir pelo organismo através do sistema circulatório.

Uma vez no sistema circulatório, o *paraquat* é distribuído por todos os órgãos, sendo, que sua acumulação ocorre preferencialmente nos pulmões, atingindo neste órgão concentrações cerca de 6 a 10 vezes maiores que as concentrações plasmáticas. (30,40) A toxicidade seletiva do *paraquat* aos tecidos pulmonares foi relacionada à participação do sistema de transporte de poliaminas, que, devido a semelhança estrutural entre o herbicida e alguns compostos endógenos, o transportaria para o interior dos pneumócitos do tipo I e II, onde ocorreria seu acúmulo. (25,30,41,42)

Os mecanismos específicos, bem como, as espécies finais geradas pelo ciclo redox, diretamente responsáveis pela citotoxicidade e lesões ocasionadas pelo *paraquat* permanecem ainda sem total esclarecimento, porém, sabe-se que, em parte, essas lesões possam estar relacionadas a fatores como estresse oxidativo induzido pela produção de EROs altamente tóxicas, interrupção de importantes processos bioquímicos envolvendo o NADPH e danos membranares acarretados por reações de peroxidação lipídica. (30,40,43,44)

A formação, neutralização e eliminação de EROs durante os processos biológicos ocorrem naturalmente, possuindo importante papel em diversas reações nesses sistemas, mas, quando ocorre um desequilíbrio, que é caracterizado como estado de estresse oxidativo, a geração dessas espécies supera os níveis aos quais esse sistema pode eliminá-las. (45,46) O estresse oxidativo acarreta danos a biomoléculas e aos tecidos de diversos órgãos, inativação de proteínas e ruptura do DNA, podendo ainda estar associado a inúmeras doenças, inclusive as neurodegenerativas como o mal de Parkinson. (45,47,48,49) O esquema de geração das EROs no meio intracelular estimuladas pelo *paraquat* estão representadas na Figura 2.

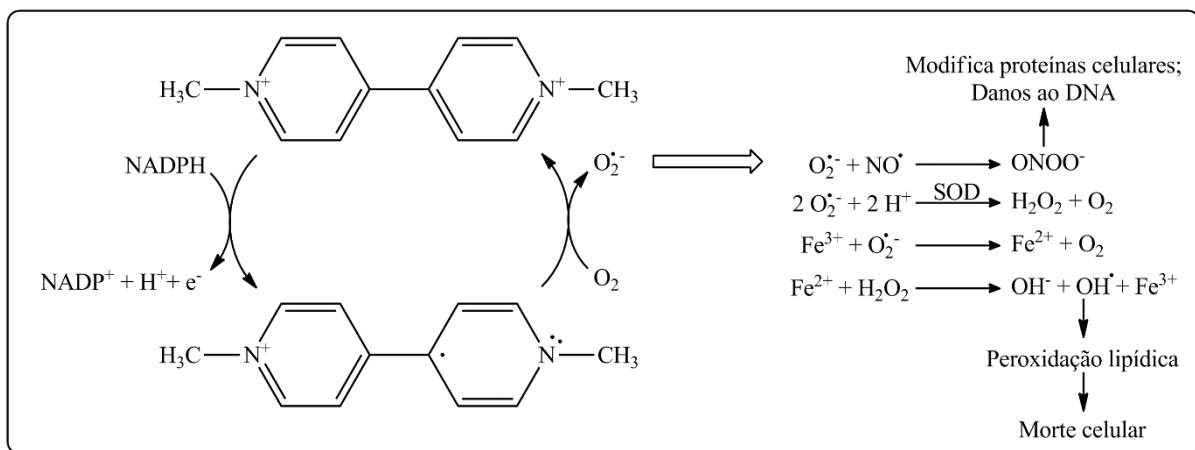


Figura 2 – Ciclo redox do *paraquat* com consequente formação do ânion superóxido (O₂⁻•) e mecanismo da formação de EROs e peroxinitrito (ONOO⁻), principais espécies responsáveis pelos danos e morte celular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.2.1.4 Intoxicações e acidentes relatados

Diversos casos de intoxicações e acidentes envolvendo o mau uso do *paraquat* foram relatados no decorrer dos anos, os primeiros relatos de intoxicações agudas provocadas pelo *paraquat* que resultaram em óbitos, ocorreram em 1964 sendo reportadas dois anos mais tarde. (25,27,33) Dentre as primeiras causas de intoxicações envolvendo o herbicida, a ingestão da solução concentrada armazenada em recipientes inadequados, como garrafas de bebidas e embalagens não etiquetadas foram as mais comumente descritas. (27,50,51) Também há registros de casos em que a formulação concentrada fora aplicada para a eliminação de piolhos, e, alguns raros casos onde ocorreram as intoxicações durante a aplicação e preparo do herbicida decorrente do não uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), defeitos nos aplicadores ou erros na diluição do produto. (27)

Estimativas apontam que todos os anos sejam registradas cerca de 3 milhões de intoxicações agudas por diversos tipos de agrotóxicos, com aproximadamente 220 mil casos de óbitos em todo o mundo, sendo que esses números correspondem apenas àqueles registrados, tornando desconhecida a quantidade real de intoxicações. (52)

No Brasil, os dados referentes aos casos notificados de intoxicações e envenenamentos são coletados, compilados, analisados e divulgados pelo órgão SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas). (53,54) Embora as informações divulgadas pelo órgão não façam distinção das substâncias químicas envolvidas nos casos registrados, o SINITOX disponibiliza os dados anualmente, segundo os grupos de agentes tóxicos, como por exemplo:

medicamentos, agrotóxicos de uso agrícola, agrotóxicos de uso doméstico, produtos veterinários, raticidas, produtos químicos industriais, metais, drogas de abuso, plantas *etc.* A Tabela 4 foi elaborada com base nos dados disponíveis na página do SINITOX, nela estão agrupados os registros de óbitos por intoxicação com agrotóxicos de uso agrícola no Brasil nos últimos anos.

Tabela 4 – Óbitos registrados em casos de intoxicações com agrotóxicos de uso agrícola por ano no Brasil.

Ano	Acidentes*	Ocupacional	Tentativa de suicídio	Violência/homicídio	Ignorada	Outros	Total
1999	11	2	133	-	7	1	154
2000	17	1	118	-	5	-	141
2001	7	10	130	2	5	3	157
2002	7	8	123	5	7	-	150
2003	16	2	149	4	8	3	182
2004	9	8	132	1	14	-	164
2005	13	5	172	1	10	1	202
2006	11	4	161	4	9	1	190
2007	21	2	177	-	8	1	209
2008	16	4	130	1	8	-	159
2009	18	3	147	1	1	1	171
2010	9	3	175	3	5	-	195
2011	6	2	114	3	4	-	129
2012	3	2	117	2	2	2	128
2013	7	1	80	3	1	-	92
2014	1	1	56	-	-	1	59

* Acidentes individuais, coletivos e ambientais;

- Valor igual a zero.

Fonte: Elaborada pelo autor, dados: Ministério da Saúde/FIOCRUZ/SINITOX.

Conforme mostrado na Tabela 4 (acima), nota-se, que dos 2.482 casos de óbito registrados entre os anos de 1999 e 2014, decorrentes de intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola, 2.114 foram ocasionados por tentativas de suicídio, correspondendo a 85,2% dos casos contabilizados, 172 (6,9%) dos casos ocorreram de maneira acidental (incluindo acidentes individuais, coletivos e ambientais), 58 (2,3%) casos por intoxicação ocupacional e 30 (1,2%) casos de óbito onde a vítima foi intencionalmente envenenada.

Embora os dados da tabela sugiram um declínio no número de óbitos registrados nos últimos anos, ela não deve ser utilizada como um indicativo de redução da ocorrência, uma vez que, essa diminuição ocorreu por conta da menor participação no envio de dados pelos Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CIATs) nos levantamentos recentemente realizados.

(55)

Dentre os acidentes com agrotóxicos registrados no Brasil, um evento que deve ser destacado, é o ocorrido em Lucas do Rio Verde, município do estado do Mato Grosso, em que um avião monomotor teria lançado uma nuvem de agrotóxico sobre a cidade, este ocorrido foi noticiado em diversas mídias inclusive a história de sua reportagem é contada no livro “Um avião contorna o pé de jatobá e a nuvem de agrotóxico pousa na cidade: História da reportagem”, escrito pelo repórter Paulo Machado. Felizmente, mesmo com a gravidade do acidente, não foi registrado nenhum óbito relacionado à intoxicação pelo agrotóxico, mas, anos de pesquisas de um horto medicinal foram perdidos juntamente com grande parte da vegetação da cidade, inclusive àquela destinada a alimentação humana. (56-58)

Devido a necessidade do uso de agrotóxicos e o risco de acidentes associados a essas substâncias, é de grande valia o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, portáteis e confiáveis para propiciar a escolha da adequada propedêutica terapêutica, contribuindo para o aumento da taxa de sucesso nesses tratamentos.

1.3 MATERIAL BIBLIOGRÁFICO

A literatura referente às metodologias analíticas disponíveis para a determinação do herbicida *paraquat* é bastante vasta, entretanto, ainda carece daquelas que possam ser consideradas “verdes” (ambientalmente amigáveis), portáteis e de baixo custo analítico.

Dentre os métodos desenvolvidos para a determinação do herbicida em diferentes tipos de amostras, os mais comuns são aqueles que empregam cromatografia líquida (CLAE) (29,37,59-63) e espectrofotometria. (64-69) Outros métodos tais como a cromatografia gasosa (CG) (70,71), potenciometria (72), voltametria (73), eletroforese capilar (EC) (74) e ressonância magnética nuclear (RMN) (75) também são empregados.

Em sua grande maioria, as técnicas empregadas para a determinação e quantificação de *paraquat* em amostras de urina humana são cromatográficas (36), o que pode ser facilmente justificado pelo fato destas apresentarem bons resultados de precisão e exatidão, baixos níveis de detecção e quantificação, robustez, reprodutibilidade e capacidade de eliminar interferências. (76) Por outro lado, necessitam de instalações adequadas, equipamentos de custo elevado (como cromatógrafo líquido ou gasoso), demandam grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos (como metanol, acetonitrila etc.) que podem trazer prejuízos à saúde do analista, além de gerar resíduos que devem ser posteriormente tratados.

1.4 MÉTODO PROPOSTO NO PRESENTE TRABALHO

Com base nas informações apresentadas anteriormente, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de metodologias para a determinação do *paraquat* em matrizes biológicas, que possam garantir resultados precisos de maneira simples, rápida, confiável e que reduza ou elimine o emprego de reagentes nocivos bem como a geração de resíduos. Para isto, o presente trabalho propôs um método analítico para a determinação de *paraquat* em urina humana, empregando-se a técnica de análise por *spot-test* associada à técnica de análise de imagem digital (*Digital Image Analysis - DIA*).

1.4.1 Química analítica verde

No início da década de 90, surgia uma nova maneira de abordar as questões ambientais e de inovações dentro da ciência, esse período ficou marcado pela gênese e difusão da *Green Chemistry* ou Química Verde, que foi fundamentalmente definida por Anastas como sendo o planejamento de produtos e processos químicos que reduzam ou eliminem o uso e a geração de substâncias que possam ser perigosas ao homem e ao ambiente. (8,9,77)

A filosofia da química verde ao longo das duas últimas décadas ganhou notoriedade em diversos países, seus 12 princípios foram bastante disseminados, abrangendo a indústria, instituições de ensino e a pesquisa em química. (9) Desde o início do século XXI, diversos eventos têm sido realizados no Brasil, com o intuito de promover e implementar a química verde nas instituições nacionais de ensino e pesquisa, além disso, nos últimos dez anos foi criada a Rede Brasileira de Química Verde, houveram também as primeiras publicações de livros nacionais com ênfase no tema e a inclusão dessa filosofia na maioria dos programas de pós-graduação em química do país. (78)

No ano 2000, devido a necessidade da realização de algumas adequações nos princípios da química verde, para que estes pudessem atender plenamente à química analítica, dava-se início a uma nova vertente, a *Green Analytical Chemistry* ou química analítica verde, esta nova subárea da química verde, compartilhava das mesmas origens fundamentadas no desenvolvimento sustentável, entretanto, apresentava algumas adaptações nas diretrizes propostas, tornando-as mais concisas e direcionadas para as práticas analíticas. (79,80) Contudo, em suma, fora mantida a base da química verde, prezando por metodologias que reduzam o consumo de reagentes e solventes, empregando principalmente àqueles obtidos a partir de fontes renováveis, que apresente baixo consumo energético, gerem resíduos de fácil

tratamento, sejam portáteis (possibilite a análise *in-situ*), que não utilizem ou gerem substâncias tóxicas e garantam a segurança do operador. (79)

1.4.2 *Spot-test*

Spot-test ou análise de toque, é uma técnica analítica que consiste na realização de ensaios em semi-micro, micro ou ultra microescala, empregando equipamentos e materiais simples, de baixo custo, fácil manuseio e fornecendo resultados rápidos. (81,82) Geralmente consiste em testes de caráter qualitativo ou semiquantitativo, aplicados em análises clínicas, forenses, ambientais (água e ar), alimentares e de monitoramento de solos. (81,83)

Os métodos clássicos de *spot-test* envolvem diferentes procedimentos, sendo que os principais são: a reação entre um pequeno volume ou algumas gotas da amostra e da solução reagente, aplicadas em uma superfície porosa como papel de filtro, sílica gel *etc.* ou não-porosa como placas de porcelana ou vidro (81,83,84); a aplicação de um pequeno volume da amostra em uma superfície previamente impregnada com reagentes (81,83); ou a exposição de uma gota da solução reagente ou um pequeno pedaço de papel reativo à ação dos gases liberados pela amostra, que pode ser uma solução ou um sólido. (81)

A técnica de *spot-test*, como já foi mencionado, é tradicionalmente aplicada em ensaios onde a formação dos produtos é seguida de avaliação visual, seja através do desenvolvimento de coloração, formação de precipitado ou desprendimento de gás (81,85), o que insere subjetividade na análise. Com os avanços na tecnologia de imagens digitais e o surgimento de técnicas de análise baseadas na decomposição e quantização dessas imagens, esse problema pode ser reduzido, ou até mesmo eliminado.

1.4.3 **Análise de imagem digital**

A junção de reações colorimétricas com detecção e quantificação por análise de imagem digital, oferece uma alternativa com grande potencial de aplicabilidade para a química analítica, haja vista que, dispositivos fotográficos capazes de gerar imagens de alta qualidade e resolução, estão disponíveis a preços cada vez mais acessíveis. (86) Esta estratégia pode ser considerada relativamente recente, mas tem sido extensamente empregada no desenvolvimento de métodos para a determinação de compostos de interesse, seja na química (87-91), no monitoramento da qualidade de alimentos (92-95) ou no ensino de química. (96-98)

Dentre as vantagens do emprego de câmeras fotográficas como detectores analíticos para as reações colorimétricas, podemos salientar o baixo custo desses equipamentos, a rapidez na geração das imagens e obtenção dos resultados, o caráter não destrutivo da análise, a vasta gama de aparelhos equipados com dispositivos fotográficos disponíveis no mercado, a grande quantidade de dados gerados por imagem, a eliminação da subjetividade das análises visuais e a capacidade de aplicação em determinações quantitativas. (86,92)

1.4.3.1 Imagens digitais

Uma imagem digital é uma representação gráfica em duas dimensões (2D) de uma cena ou objeto, formada por um conjunto finito de unidades básicas denominadas “pixels”, que contêm informações de localização espacial e intensidade luminosa, armazenadas na forma de uma matriz numérica. (91,99,100) Como a localização espacial dos pixels é dada pelas posições na abscissa e ordenada (eixos x e y, respectivamente) correspondentes a sua coordenada na imagem, os softwares de análise podem gerar projeções tridimensionais (3D) da imagem, onde a cota (eixo z) representa a intensidade luminosa de cada pixel.

A quantização da intensidade luminosa depende diretamente da sensibilidade dos sensores do dispositivo que captura a imagem, como as informações armazenadas e processadas por computadores baseiam-se em bits (sistema binário, representado pelos algarismos 0 e 1), a quantidade de níveis de intensidade obtidas em uma imagem será determinada pela resolução em bits/pixel, por exemplo, uma resolução de 1 bit/pixel produz imagens em 2^1 níveis, já 8 bits/pixel produz imagens em 2^8 níveis, os dispositivos mais utilizados possuem 24 bits/pixel e geram imagens com 2^{24} níveis de intensidade luminosa.

1.4.3.2 O modelo de cores RGB

O modelo aditivo ou *RGB*, baseia-se na geração de cores compostas através da adição de diferentes intensidades das cores primárias, vermelho (*Red*), verde (*Green*) e azul (*Blue*) (91), as imagens digitais coloridas apresentam 24 bits/pixel, cada canal é representado por 8 bits, resultando em 256 níveis para cada canal (variando de 0 a 255), como cada cor possui valores em três canais, são possíveis mais de 16,77 milhões (256^3) de combinações diferentes de cores (100), uma variedade de cores maior do que o olho humano é capaz de distinguir, além disso, esse modelo possibilita a representação numérica das cores através de sua medição.

Uma maneira mais simples de visualizar esse modelo é através da representação do cubo de cores *RGB* (Figura 3), onde é possível demonstrar graficamente como as cores primárias se combinam para a formação das demais. Nesse cubo os canais de cores *R*, *G* e *B* correspondem a abscissa, ordenada e cota, respectivamente, os valores iguais a 0 representam a ausência de intensidade luminosa e valores iguais a 1 correspondem a intensidade máxima no canal (para valores normalizados de intensidade luminosa), assim, a origem (0,0,0) corresponde a cor preta e o ponto (1,1,1) a cor branca.

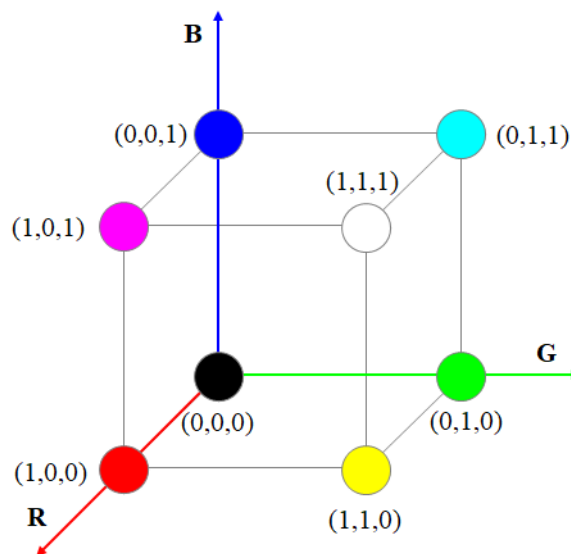


Figura 3 – Representação gráfica do cubo de cores do modelo *RGB* (para os níveis normalizados dos canais). Cada cor possível é representada por um ponto, sendo, vermelha (1,0,0), verde (0,1,0), azul (0,0,1), amarela (1,1,0), magenta (1,0,1) e ciano (0,1,1) as cores dos vértices.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esse sistema de geração de cores foi elaborado mimetizando o mecanismo tricromata de reconhecimento das cores empregado pelo olho humano (91,99,101), que, apresenta na retina três tipos de células cone, cada uma contendo pigmentos responsáveis por responder à luz em uma determinada faixa de comprimentos de onda, assim, essas células possuem sensibilidade para detectar as cores azul, verde e vermelha, com sensibilidade máxima à 430, 540 e 570 nm, respectivamente, produzindo no cérebro através dos impulsos nervosos gerados, a sensação das demais cores possíveis. (102)

Nesse modelo, as intensidades de luz das cores vermelho, verde e azul respondem de maneira direta à absorção de radiação eletromagnética nas faixas de comprimentos de onda entre 600-700 nm, 500-600 nm e 400-500 nm, respectivamente (92,96,98), assim, de acordo com comprimento de onda de máxima absorção do produto de reação obtido, é possível prever em qual canal de cor a resposta será mais significativa.

1.4.3.3 A análise

A análise das imagens digitais pode ser realizada com o auxílio de diferentes softwares gráficos, sendo que, alguns deles são livres outros de licença paga, dentre os softwares livres disponíveis, o empregado no presente trabalho para o tratamento das imagens e obtenção dos dados analíticos foi o “*ImageJ - Image Processing and Analysis in Java*”.

Basicamente, essa análise consiste em medir a intensidade luminosa dos canais de cor (R, G e B) através da decomposição dos pixels na região selecionada da imagem, o que resulta em valores numéricos inteiros (variando entre 0 e 255, como mencionado na seção 1.4.3.2) para cada canal, correspondentes à intensidade das cores primárias naquela região, em seguida esses valores são agrupados em histogramas (gráfico de distribuição de frequência) fornecendo uma média para cada canal na leitura.

Com a finalidade de quantificar compostos por meio de reações colorimétricas na espectrofotometria, emprega-se a lei de Beer-Lambert (**Equação 1**), na qual, relacionam-se a potência de um feixe eletromagnético ao comprimento do caminho percorrido por este feixe em um meio absorvente e a concentração das espécies químicas presentes nesse meio. (103)

$$A = -\log_{10} \left(\frac{P}{P_0} \right) = \epsilon lc \text{ (Equação 1)}$$

Onde, **A** é a absorbância, **P** é a potência do feixe transmitido pela amostra, **P₀** é a potência do feixe incidida na amostra, ϵ é o coeficiente de absortividade molar, **l** é o comprimento do caminho percorrido pelo feixe na amostra e **c** é a concentração da espécie na amostra.

Utilizando a técnica de detecção e quantificação por análise de imagem digital, os valores médios de intensidade luminosa obtidos nos histogramas são transformados em valores de intensidade efetiva (**A_I**) por meio de cálculos análogos a absorbância (96,97), utilizando a **Equação 2**:

$$A_I = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) \text{ (Equação 2)}$$

Onde **A_I** é a intensidade efetiva, **I** é a intensidade luminosa na região selecionada da imagem e **I₀** é a intensidade luminosa máxima da matriz (correspondente ao branco). E essa equação pode ser dividida em três equações similares, de acordo com cada canal de cor analisado (**Equações 3, 4 e 5**). (98,104)

$$A_r = -\log_{10} \left(\frac{R}{R_0} \right) \text{ (Equação 3)}$$

$$A_g = -\log_{10} \left(\frac{G}{G_0} \right) \text{ (Equação 4)}$$

$$A_b = -\log_{10} \left(\frac{B}{B_0} \right) \text{ (Equação 5)}$$

Onde A_r , A_g e A_b são a intensidade efetiva nos canais vermelho, verde e azul, respectivamente; R , G e B são os valores de intensidade luminosa nos canais vermelho, verde e azul, respectivamente; e R_0 , G_0 e B_0 são o valor máximo de intensidade luminosa para o canal (ou seja, 255).

Em seguida é estabelecida uma relação matemática entre os valores de intensidade efetiva e concentração do analíto, como na maioria das técnicas analíticas, obtendo-se uma função que possibilite a quantificação do mesmo.

Com isso, propõe-se o acoplamento da técnica analítica de *spot-test* com a técnica de análise de imagens digitais, para a obtenção de um método analítico simples, rápido, de baixo custo, portátil e ambientalmente mais amigável para a determinação do herbicida *paraquat* em urina humana.

1.4.4 Ferramentas quimiométricas

A quimiometria é uma área da química que busca, através do emprego de ferramentas matemáticas e estatísticas, entender e propor modelos capazes de descrever o comportamento das diversas variáveis durante um processo químico. (105,106) Geralmente, para o ensino, a quimiometria é dividida e abordada em quatro principais vertentes, sendo elas: análise exploratória de dados químicos, calibração multivariada, proposição de modelos de classificação e planejamentos fatoriais. (105)

Durante o desenvolvimento de métodos analíticos é comum o emprego de ferramentas quimiométricas como os planejamentos fatoriais, essas ferramentas contribuem de maneira significativa para a obtenção de informações relevantes a respeito das interações das variáveis na obtenção de respostas analíticas. (105,106) Com a utilização dos planejamentos de experimentos, pode-se reduzir a quantidade de experimentos necessários para a obtenção de informações relevantes, minimizando a geração de resíduos químicos e a obtenção de dados matemáticos irrelevantes.

Com o intuito de avaliar e mensurar a influência das variáveis no sistema em estudo, deve-se empregar o planejamento fatorial completo ou o planejamento fatorial fracionário; a escolha do planejamento utilizado baseia-se no número de variáveis estudadas. Já para a

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que o método proposto se mostrou eficaz para a determinação e quantificação do herbicida *paraquat* presente na urina humana em níveis de intoxicação. Durante o desenvolvimento do método foi demonstrada uma elevada robustez do mesmo frente a variações nas concentrações dos reagentes e a alterações nas resoluções das imagens digitais obtidas, demonstrando que o mesmo possui capacidade de apresentar resultados similarmente confiáveis mesmo mediante alterações nos parâmetros determinados na otimização.

O método possui capacidade de detectar o *paraquat* presente na urina em níveis de intoxicação nos pacientes, sem necessitar de etapas de pré-concentração das amostras, diminuindo assim o risco de inserção de erros analíticos. O método apresentou linearidade na relação entre a intensidade efetiva para o canal de cor vermelho (A_r) e a concentração do analito na faixa testada, bons resultados de repetitividade para ensaios realizados intra e inter-dias, bons níveis de detecção e quantificação, não apresentou efeito de matriz (urina sintética e natural) para as amostras analisadas, apresentou boa recuperação para amostras de urina sintética e urina natural além de demonstrar precisão e exatidão nos ensaios de adição de padrão e recuperação, bem como na comparação de métodos.

Também pode-se concluir que, o presente trabalho alcançou o objetivo de desenvolver uma metodologia ambientalmente mais amigável (utiliza reagentes pouco nocivos como a glicose e em volumes mínimos) e portátil, possibilitando a realização de análises *in-situ* com a obtenção de resultados rápidos e de baixo custo, tornando-a acessível a grupos que não dispõem de recursos abundantes para aquisição e manutenção de equipamentos sofisticados de análise.

REFERÊNCIAS

- 1 PITTELKOW, C. M. et al. Productivity limits and potentials of the principles of conservation agriculture. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 365-368, 2015.
- 2 BUAINAIN, A. M.; GARCIA, J. R.; VIEIRA, P. A. O desafio alimentar no século XXI. **Estudos Sociedade e Agricultura**, v. 24, n. 2, p. 497-522, out. 2016.
- 3 BALBINOT JUNIOR, A. A. et al. Integração lavoura-pecuária: intensificação de uso de áreas agrícolas. **Ciência Rural V 39**, p. 1925-1933, 06 mar. 2009.
- 4 DEFANTE, L. R.; NASCIMENTO, L. D. O.; DE OLIVEIRA LIMA-FILHO, D. Comportamento de consumo de alimentos de famílias de baixa renda de pequenas cidades brasileiras: O caso de Mato Grosso do Sul. **Interações (Campo Grande)**, v. 16, n. 2, p. 265-276, dez. 2015.
- 5 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Statistical Yearbook 2013 World Food and Agriculture**. 1st ed. Rome: FAO FIAT PANIS, ISBN 2225-7373; 978-92-5-107396-4, v. 1, 289 p. 2013.
- 6 MILDRED GUSTACK DELAMBRE. **Permaculture, Degrowth and Solidaritybased Economy: Experiences in Brazil and France**. 9th International Conference of the European Society for Ecological Economics ESEE. Istanbul - Turkey: [s.n.], p. 1-11, 2011.
- 7 SILVA, L. R. A. et al. Inheritance of bacterial spot resistance in *Capsicum annuum* var. *annuum*. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 16, n. 2, 20 Apr. 2017.
- 8 ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 9, p. 686-694, 4 Feb. 2002.
- 9 LENARDÃO, E. J. et al. Green chemistry: the 12 principles of green chemistry and its insertion in the teach and research activities. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.
- 10 DE OLIVEIRA JR., R. S. et al. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. 22ª. ed. Curitiba: Omnipax Editora Ltda, ISBN 978-85-64619-02-9; 978-85-64619-05-0, v. 1, 348 p. 2011.
- 11 TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671-677, Aug. 2002.
- 12 MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.
- 13 SCOLARI, D. D. G. Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil. **Área de Informação da Sede-Capítulo em livro técnico-científico (ALICE)**, 2006.
- 14 SOARES, W. L. **Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura**. Tese de Doutorado. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. Rio de Janeiro - RJ, p. 150. 2010.
- 15 FONSECA, M. D. G. D.; GONÇALVES, J. S. Política de desenvolvimento agroindustrial e crédito estatal de investimento: análise do Programa Nacional de Desenvolvimento

Agroindustrial (PNDA). **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, SP, v. 42, n. 3, p. 117-162, 1995.

16 TEODORO, C. B. A COMPETITIVIDADE DAS COOPERATIVAS PARANAENSES NO MERCADO INTERNACIONAL. **Gestão e Desenvolvimento em Revista**, v. 1, n. 1, p. 74-83, 2017.

17 ALMEIDA, F. M. **Medidas não tarifárias e comércio internacional agrícola: os efeitos dos objetivos das notificações aplicadas aos acordos TBT e SPS**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa - MG, p. 129. 2012.

18 RAMOS, R. C. O seguro rural no Brasil: origem, evolução e proposições para aperfeiçoamento. **Informações Econômicas**, v. 39, n. 3, p. 5-16, mar. 2009.

19 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA); COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Safra de grãos deve alcançar recorde com 219 milhões de toneladas. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 09 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/safra-de-graos-deve-alcancar-recorde-historico-de-219-milhoes-de-toneladas>>. Acesso em: 14 set. 2017.

20 ZIMDAHL, R. L. The etymology of herbicide. **Weed Science**, v. 17, n. 2, p. 137-139, Apr. 1969.

21 ZIMDAHL, R. L. **Fundamentals of weed science**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, ISBN 978-0-12-372518-9, 666 p, 2013.

22 ALMEIDA, R. M. D. **Desenvolvimento e aplicação das análises toxicológicas no diagnóstico e prognóstico da intoxicação aguda por paraquat e diquat**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo - SP, p. 111. 2007.

23 BRIGANTE, M.; ZANINI, G.; AVENA, M. Effect of humic acids on the adsorption of paraquat by goethite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 184, n. 1, p. 241-247, Aug. 2010.

24 SHEN, H. et al. Chloroquine attenuates paraquat-induced lung injury in mice by altering inflammation, oxidative stress and fibrosis. **International Immunopharmacology**, v. 46, p. 16-22, 2017.

25 LOCK, E. A.; WILKS, M. F. Chapter 70 Paraquat. In: CALIFORNIA, U. O. **Handbook of Pesticide Toxicology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, ISBN 978-0-12-426262-7, v. 2. Agents, Cap. 70, p. 1559-1603, 2001.

26 PUBCHEM. PARAQUAT - PubChem. **National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=15939**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15939#section=Top>>. Acesso em: 08 ago. 2017.

27 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 39 - Paraquat and Diquat**. World Health Organization. Geneva (Switzerland). (92 4 154099 4), 1984.

28 SYNGENTA CROP PROTECTION AG. Regulamentação: Centro de Informações sobre Paraquat. **Centro de Informações sobre Paraquat**, 2017. Disponível em: <<http://paraquat.com/portugues/seguran%C3%A7a/regulamenta%C3%A7%C3%A3o>>. Acesso em: 08 ago. 2017.

- 29 PIZZUTTI, I. R. et al. Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation. **Food Chemistry**, v. 209, p. 248-255, Apr. 2016.
- 30 DINIS-OLIVEIRA, R. J. et al. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 13-71, 2008.
- 31 BLANCO-AYALA, T.; ANDÉRICA-ROMERO, A. C.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. **Free Radical Research**, v. 48, n. 6, p. 623-640, June 2014.
- 32 MARTINS, T. Herbicida Paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 175-186, jul./dez. 2013.
- 33 SERRA, A.; DOMINGOS, F.; PRATA, M. M. Intoxicação por paraquat. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, n. 1, p. 25-32, 2003.
- 34 PINHEIRO, I. Intoxicação por paraquat - revisão bibliográfica. **Revista Portuguesa de Medicina Intensiva**, v. 9, n. 4, p. 229-232, 2002.
- 35 PONCE, P. et al. Tratamento da intoxicação por paraquat. Plasmaferese vs Hemodiálise. **Acta Médica Portuguesa**, v. 7, n. 5-6, p. 193-196, mar. 1986.
- 36 SCHMITT, G. C. et al. Aspectos gerais e diagnóstico clinicolaboratorial da intoxicação por paraquat. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 4, p. 235-243, ago. 2006.
- 37 ZOU, T. et al. Determination of Paraquat in Vegetables Using HPLC-MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 53, n. 2, p. 204-209, May 2014.
- 38 LANDRIGAN, P. J. et al. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 9, p. 1230-1233, Sept. 2005.
- 39 ALMEIDA, L. L. D. et al. Efeito protetor da melatonina sobre intoxicações por herbicidas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 174-180, mar. 2016.
- 40 YAO, R. et al. Adiponectin protects against paraquat-induced lung injury by attenuating oxidative/nitrative stress. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 9, n. 1, p. 131-136, 2015.
- 41 SMITH, L. L. Paraquat toxicity. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 311, n. 1152, p. 647-657, 17 Dec. 1985.
- 42 LOPES, Á. T.; MANSO, C. Paraquat and diquat: mechanisms of toxicity. **Acta Médica Portuguesa**, v. 2, n. 1, p. 35-39, 1989.
- 43 FUKUSHIMA, T. et al. Mechanism of cytotoxicity of paraquat: I. NADH oxidation and paraquat radical formation via complex I. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 5-6, p. 345-349, 1993.
- 44 SUNTRES, Z. E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. **Toxicology**, v. 180, n. 1, p. 65-77, 2002.
- 45 MERRITT, T. J. S. et al. Rapid and simple analysis of paraquat in tissue homogenate by ultra-high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 3, n. 6, p. 1428-1432, Apr. 2011.

- 46 TÚNEZ, I. et al. Important role of oxidative stress biomarkers in Huntington's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5602-5606, 2011.
- 47 SIRNONIAN, N. A.; COYLE, J. T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 36, n. 1, p. 83-106, 1996.
- 48 KOOL, J. et al. An on-line post-column detection system for the detection of reactive-oxygen-species-producing compounds and antioxidants in mixtures. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 4, p. 871-879, Apr. 2007.
- 49 ĎURAČKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v. 59, n. 4, p. 459-469, 2010.
- 50 FENNELLY, J. J.; GALLAGHER, J. T.; CARROLL, R. J. Paraquat poisoning in a pregnant woman. **British Medical Journal**, v. 3, n. 5620, p. 722-723, 1968.
- 51 MASTERSON, J. G.; ROCHE, W. J. Another paraquat fatality. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5707, p. 482, 1970.
- 52 PERON, A. P. et al. Ação tóxica do herbicida paraquat sobre o homem. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 7, n. 3, p. 291-294, dez. 2003.
- 53 FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ E MINISTÉRIO DA SAÚDE. SINITOX - HOME. **SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas**. Disponível em: <<http://sinitox.icict.fiocruz.br/>>. Acesso em: 24 ago. 2017.
- 54 BOCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 73-89, 2007.
- 55 FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ E MINISTÉRIO DA SAÚDE. SINITOX - Eu já usei dados do Sinitox. **SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas**, 28 dez. 2016. Disponível em: <<https://sinitox.icict.fiocruz.br/eu-j%C3%A1-usei-dados-do-sinitox>>. Acesso em: 29 ago. 2017.
- 56 PIGNATI, W. A.; MACHADO, J. M. H.; CABRAL, J. F. Acidente rural ampliado: o caso das "chuvas" de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde - MT. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 105-114, 2007. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/630/63012110.pdf>>. Acesso em: 29 Agosto 2017.
- 57 MACHADO, P. **Um avião contorna o pé de jatobá e a nuvem de agrotóxico pousa na cidade: História da reportagem**. 1ª. ed. Brasília: Anvisa - Acessoria de Divulgação e Comunicação Institucional, v. 1, 278 p. 2008.
- 58 FGV - FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS. Home/Agrotóxico destrói anos de pesquisa e assusta moradores de Lucas do Rio Verde no Mato Grosso. **FGV EAESP - Centro de Estudos em Sustentabilidade**, 20 abr. 2006. Disponível em: <<http://gvces.com.br/agrotoxico-destroi-anos-de-pesquisa-e-assusta-moradores-de-lucas-do-rio-verde-no-mato-grosso?locale=pt-br>>. Acesso em: 29 ago. 2017.
- 59 ITO, S. et al. Simultaneous determination of paraquat and diquat in human tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 617, n. 1, p. 119-123, 1993.

- 60 SELLERO, I. S. et al. Liquid chromatographic method for simultaneous determination of paraquat and diquat in plasma, urine and vitreous humour. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 19, n. 12, p. 2009-2024, 1996.
- 61 ARYS, K. et al. Quantitative determination of paraquat in a fatal intoxication by HPLC-DAD following chemical reduction with sodium borohydride. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 24, n. 2, p. 116-121, Mar. 2000.
- 62 TAYLOR, P. J.; SALM, P.; PILANS, P. I. A detection scheme for paraquat poisoning: validation and a five-year experience in Australia. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 25, n. 6, p. 456-460, Sept. 2001.
- 63 FUKU, C. et al. Analysis of paraquat, diquat and two diquat metabolites in biological materials by high-performance liquid chromatography. **Legal Medicine**, v. 4, n. 3, p. 156-163, 2002.
- 64 GUIJARRO, E. C.; YANEZ-SEDENO, P.; DIÉZ, L. M. P. Determination of paraquat by flow-injection spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 199, p. 203-208, 1987.
- 65 JAIN, A.; VERMA, K. K.; TOWNSHEND, A. Determination of paraquat by flow-injection spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 284, n. 2, p. 275-279, 1993.
- 66 RAI, M. K.; DAS, J. V.; GUPTA, V. K. A sensitive determination of paraquat by spectrophotometry. **Talanta**, v. 45, n. 2, p. 343-348, 1997.
- 67 INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C. Development of a spectrophotometric sequential injection methodology for online monitoring of the adsorption of Paraquat on clay mineral and soil. **Spectroscopy Letters**, v. 40, n. 1, p. 3-14, 2007.
- 68 INFANTE, C. M. C. et al. A multicommuted flow system with solenoid micro-pumps for paraquat determination in natural waters. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1376-1381, 2008.
- 69 MAYA, F.; ESTELA, J. M.; CERDÀ, V. Improved spectrophotometric determination of paraquat in drinking waters exploiting a Multisyringe liquid core waveguide system. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 588-595, 2011.
- 70 KHAN, S. U. Determination of paraquat residues in food crops by gas chromatography. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 745-749, 1975.
- 71 MOREIRA, P. N. et al. Quantification of paraquat in postmortem samples by gas chromatography-ion trap mass spectrometry and review of the literature. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 3, p. 338-349, 2012.
- 72 SAAD, B.; ARIFFIN, M.; SALEH, M. I. Flow injection potentiometric determination of paraquat in formulations and biological samples. **Talanta**, v. 47, n. 5, p. 1231-1236, 1998.
- 73 HARMOUDI, H. E. et al. Sensitive determination of paraquat by square wave anodic stripping voltammetry with chitin modified carbon paste electrode. **Talanta**, v. 115, p. 172-177, 2013.
- 74 LANARO, R. et al. Detection of Paraquat in Oral Fluid, Plasma and Urine by Capillary Electrophoresis for Diagnosis of Acute Poisoning. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 274-279, 2011.

- 75 IMBENOTTE, M. et al. Determination by ^1H NMR spectroscopy of paraquat in urine from acutely poisoned patients. Comparison with second-derivative spectroscopy method. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 23, n. 7, p. 586-590, 1999.
- 76 ROSSINI, E. L. et al. A new eco-friendly methodology for the determination of Amaranth dye in foodstuffs using diffuse reflectance spectroscopy. **Analytical Methods**, v. 8, n. 20, p. 4086-4092, 2016.
- 77 ANASTAS, P. T.; WILLIAMSON, T. C. Green chemistry: an overview. In: ANASTAS, P. T.; WILLIAMSON, T. C. **Green chemistry: designing chemistry for the environment**. Washington, DC: American Chemical Society Symposium Series, v. Vol. 626, Cap. 1, p. 1-17, 1996.
- 78 ZUIN, V. G. A inserção da Química Verde nos programas de pós-graduação em Química do Brasil: tendências e perspectivas. **Revista Brasileira de Pós-Graduação**, Brasília, v. 10, n. 21, p. 557-573, 2014.
- 79 GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIESŃNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.
- 80 ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. D. L. Green Analytical Chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497-511, 2008.
- 81 JUNGREIS, E. Spot Test Analysis. In: MEYERS, R. A. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Larkspur: John Wiley & Sons, Ltd., ISBN 9780470027318, v. 15, p. 13606-13624, 2006.
- 82 WILSON, I. D. Spot test analysis. **Chromatographia**, v. 46, n. 11/12, p. 675-675, Dec. 1997.
- 83 LUIZ, V. H. M.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of nitrite in meat products and water using dapsone with combined spot test/diffuse reflectance on filter paper. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2546-2551, 2012.
- 84 GOTARDO, M. A. et al. Detection of propranolol in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 69, n. 4, p. 1103-1109, 2008.
- 85 MILANI, M. I. **Sistemas de screening para detecção de furfural e hidroximetilfurfural e amostras de cachaça por espectroscopia de reflectância difusa**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP). Araraquara - SP, p. 91. 2016.
- 86 BYRNE, L. et al. Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 517-522, 2000.
- 87 MALEKI, N.; SAFAVI, A.; SEDAGHATPOUR, F. Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera. **Talanta**, v. 64, n. 4, p. 830-835, 2004.
- 88 GAÍÃO, E. D. N. et al. Digital image-based titrations. **Analytica Chimica Acta**, v. 570, n. 2, p. 283-290, 2006.

- 89 LYRA, W. S. et al. Digital image-based flame emission spectrometry. **Talanta**, v. 77, n. 5, p. 1584-1589, 2009.
- 90 GODINHO, M. S.; OLIVEIRA, A. E.; SENA, M. M. Determination of interfacial tension of insulating oils by using image analysis and multi-way calibration. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 42-45, 2010.
- 91 PACIORNIK, S. et al. Scanner image analysis in the quantification of mercury using spot-tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 156-161, 2006.
- 92 SANTOS, P. M.; WENTZELL, P. D.; PEREIRA-FILHO, E. R. Scanner digital images combined with color parameters: A case study to detect adulterations in liquid cow's milk. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 1, p. 89-95, 2012.
- 93 BORAH, S.; BHUYAN, M. A computer based system for matching colours during the monitoring of tea fermentation. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 40, n. 6, p. 675-682, 2005.
- 94 BENEDETTI, L. P. D. S. et al. A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. **Analytical Methods**, v. 7, n. 10, p. 4138-4144, 2015.
- 95 MONOŠÍK, R.; DOS SANTOS, V. B.; ANGNES, L. A simple paper-strip colorimetric method utilizing dehydrogenase enzymes for analysis of food components. **Analytical Methods**, v. 7, n. 19, p. 8177-8144, 2015.
- 96 KOHL, S. K.; LANDMARK, J. D.; STICKLE, D. F. Demonstration of absorbance using digital color image analysis and colored solutions. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 4, p. 644-646, Apr. 2006.
- 97 SOLDAT, D. J.; BARAK, P.; LEPORE, B. J. Microscale colorimetric analysis using a desktop scanner and automated digital image analysis. **Journal of Chemical Education**, v. 86, n. 5, p. 617-620, May 2009.
- 98 COLZANI, H. et al. Determinação de fosfato em refrigerantes utilizando um scanner de mesa e análise automatizada de dados: Um exemplo didático para ensino de química. **Química Nova**, v. 40, n. 7, p. 833-839, 2017.
- 99 SOLOMON, C.; BRECKON, T. **Fundamentals of Digital Image Processing: A practical approach with examples in Matlab**. 1^a. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 328 p. 2011.
- 100 MORTEL, T.; ELOFF, J. H. P.; OLIVIER, M. S. **An Overview of Image Steganography**. Proceedings of the Fifth Annual Information Security South Africa Conference (ISSA2005). Sandton, South Africa: [s.n.]. p. 1-11, June/July 2005.
- 101 GILCHRIST, A.; NOBBS, J. Colorimetry, Theory. In: LINDON, J. C.; TRANTER, E.; KOPPENAAL, W. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. 2^a. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd, ISBN 978-0-12-374413-5, v. 1, p. 380-385, 1999.
- 102 TAKEOKA, Y. et al. Production of Colored Pigments with Amorphous Arrays of Black and White Colloidal Particles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 28, p. 7261-7265, 2013.

- 103 SWINEHART, D. F. The beer-Lambert law. **Journal of Chemical Education**, v. 39, n. 7, p. 333-335, 1962.
- 104 ABBASPOUR, A.; KHAJEHZADEH, A.; GHAFFARINEJAD, A. A simple and cost-effective method, as an appropriate alternative for visible spectrophotometry: development of a dopamine biosensor. **Analyst**, v. 134, n. 8, p. 1692-1698, June 2009.
- 105 PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. (Série Apontamentos). ed. São Carlos: EdUFSCar - Editora da Universidade Federal de São Carlos, ISBN 978-85-7600-397-7, 88 p. 2015.
- 106 BARROS NETO, B. D.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2^a. ed. Campinas: Editora da Unicamp, ISBN 85-268-0544-4, v. único, 401 p. 2001.
- 107 ASHTON, C.; LEAHY, N. IPCS INCHEM / Paraquat (Poisons Information Monograph 399). **IPCS INCHEM - International Programme on Chemical Safety**, 11 nov. 2000. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim399.htm>>. Acesso em: 22 nov. 2017.
- 108 TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
- 109 ABREU, A. B. G. D.; MATTA, M. H. D. R. D.; MONTAGNER, É. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 5-9, 2008.
- 110 SILVA, A. D. P.; ALVES, M. C. C. **Como iniciar a validação de métodos analíticos**. Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia Rede Metrológica do Estado de São Paulo, São Paulo. Anais, Remesp-Rede Metrológica do Estado de São Paulo. São Paulo: [s.n.], p. 8-15, 2006.
- 111 INMETRO - DOQ-CGCRE. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. [S.l.], p. 1-24, 2007.
- 112 LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, n. 1, p. 367-374, 2001.
- 113 BRITO, N. M.; OZELITO POSSIDÔNIO DE AMARANTE JUNIOR, L. P. M. L. R. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.