

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

JOÃO PAULO FERNANDES TIAGO

**MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA E APLICAÇÃO EM
AMOSTRAS DE ÁGUA DE CULTIVO HIDROPÔNICO DE MUDAS DE EUCALIPTO**

**Montes Claros
2019**

João Paulo Fernandes Tiago

**MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA E APLICAÇÃO EM
AMOSTRAS DE ÁGUA DE CULTIVO HIDROPÔNICO DE MUDAS DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Gevany Paulino de Pinho.

Montes Claros

Maio de 2019

Tiago, João Paulo Fernandes.

T551m
2019 Método analítico para determinação de Glifosato e AMPA e aplicação em amostras de água de cultivo hidropônico de mudas de eucalipto / João Paulo Fernandes Tiago. Montes Claros, 2019.
44 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Área de concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Flaviano Oliveira Silvério.

Banca examinadora: Giovana Ribeiro Ferreira, Douglas Lopes Cassimiro, Fábio dos Santos Grasel.

Inclui referências: f. 21-24, 42-44.

1. Eucalipto. 2. Herbicidas. I. Silvério, Flaviano Oliveira II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 630

João Paulo Fernandes Tiago

Método analítico para determinação de Glifosato e AMPA e aplicação em amostras de água de cultivo hidropônico de mudas de eucalipto

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof.^a Dr.^a Giovana Ribeiro Ferreira
IECT / UFVJM

Prof. Dr. Douglas Lopes Cassimiro
Unimontes

Prof. Dr. Fábio dos Santos Grasel
UFRGS

Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério
Orientador – ICA / UFMG

Montes Claros, 22 de maio de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão, pela compreensão, atenção, ajuda e por sempre me compreenderem e acreditarem na minha capacidade de crescimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, por iluminar o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos.

Ao meu orientador, Professor Flaviano, pela atenção e pela confiança demonstrada ao longo deste trabalho.

À professora Gevany Paulino de Pinho, pela orientação e ensinamentos fundamentais a esta pesquisa.

Aos professores Giovana, Douglas e Fábio, por aceitarem compor a banca avaliadora e por suas contribuições.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa em Agroquímica (LPA), pela paciência, parceria e pelo aprendizado.

Ao Lázaro e ao Rodrigo, pelo incentivo e pela contribuição em todas as etapas de execução do projeto.

Aos servidores e funcionários, especialmente Ane e Érica, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

A todos os professores e servidores envolvidos com o Programa de Pós-graduação em Produção vegetal, por contribuírem para minha formação acadêmica e profissional.

Ao ICA/UFMG, à FAPEMIG, ao CNPq e à CAPES pela estrutura física, pela bolsa e pelos recursos financeiros disponibilizados.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista.”

Aldo Novak

Método analítico para determinação de Glifosato e AMPA e aplicação em amostras de água de cultivo hidropônico de mudas de eucalipto

RESUMO

O uso indiscriminado de produtos químicos tem contribuído para a contaminação de organismos e ecossistemas. Os herbicidas a base de glifosato são muito utilizados devido ao custo relativamente baixo e excelente eficiência na eliminação de plantas daninhas. Além de sua elevada eficácia, esse herbicida é classificado como pouco tóxico, sendo rapidamente convertido no seu principal metabólito, o Ácido Aminometilfosfônico (AMPA), embora estudos apontem possíveis efeitos deletérios para organismos e o ambiente. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar e validar um método analítico para a determinação de glifosato e AMPA em amostras de águas, utilizando a extração em fase sólida e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectômetro de massas por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS/MS). Houve separação dos compostos com tempo total de análise inferior a 5 minutos. O método foi seletivo, não apresentando interferentes no tempo de retenção dos analitos e apresentou-se linear. Os limites de quantificação de $1,09 \mu\text{g L}^{-1}$ para o glifosato e $0,29 \mu\text{g L}^{-1}$ para o AMPA foram abaixo dos valores máximos de resíduos definidos pela resolução CONAMA N° 430 para os cursos hídricos. O método foi preciso e exato, sendo obtida uma recuperação média de $99\% \pm 0,99$ para o glifosato e $98\% \pm 5,41$ para o AMPA, e não se apresentou efeito de matriz. O método foi aplicado em amostras de água de cultivo hidropônico de mudas de eucalipto, para verificar se ocorreu a exsudação. Os resultados mostraram que foi detectado glifosato nas amostras, revelando sensibilidade suficiente para detectar a exsudação do glifosato pelas raízes de eucalipto. Nessas amostras, o glifosato oriundo do processo de exsudação foi de $1,38$ a $1,54 \mu\text{g L}^{-1}$ do analito na solução hidropônica.

Palavras-chave: HPLC-ICP-MS/MS. Fósforo. SPE. Herbicida. Validação.

Analytical method for Glyphosate and AMPA determination and application in eucalyptus seedlings hydroponic cultivation water samples

ABSTRACT

The indiscriminate use of chemicals has contributed to the contamination of organisms and ecosystems. Glyphosate-based herbicides are widely used due to their relatively low cost and excellent weeding efficiency. In addition to its high efficacy, this herbicide is classified as low toxic and rapidly converted to its main metabolite, Aminomethylphosphonic Acid (AMPA), although studies indicate possible deleterious effects on organisms and the environment. In this context, the objective of this work was to optimize and validate an analytical method for glyphosate and AMPA determination in water samples using solid phase extraction and detection by high performance liquid chromatography coupled to the inductively coupled plasma mass spectrometer (HPLC-ICP-MS/MS). Compounds were separated with a total analysis time of less than 5 minutes. The method was selective, not interfering with the retention time of the analytes and was linear. The limits of quantification of $1,09 \mu\text{g L}^{-1}$ for glyphosate and $0,29 \mu\text{g L}^{-1}$ for AMPA were below the maximum residue values defined by resolution CONAMA N° 430 for the water courses. The method was precise and accurate, obtaining an average recovery of $99\% \pm 0,99$ for glyphosate and $98\% \pm 5,41$ for AMPA, and there was no matrix effect. The method was applied to water samples from hydroponic cultivation of eucalyptus seedlings, to verify if the exudation occurred. The results showed that glyphosate was detected in the samples, revealing sufficient sensitivity to detect glyphosate exudation by eucalyptus roots. In these samples, glyphosate from the exudation process was $1,38$ to $1,54 \mu\text{g L}^{-1}$ of the analyte in the hydroponic solution.

Keywords: HPLC-ICP-MS/MS. Phosphor. SPE. Herbicide. Validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Estruturas químicas das moléculas de glifosato e ampa15
- Figura 2 – Principais espécies químicas de glifosato e ampa em equilíbrio na fase aquosa.....16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de Glifosato e AMPA em ambientes aquáticos.....	17
Tabela 2 - Métodos de extração e quantificação de glifosato e AMPA em amostras de água	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Ácido Aminometilfosfônico
CNBF	4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto
DPR	Desvio-padrão relativo
FLD	Detector por fluorescência
FMOC-Cl	Cloroformiato de 9-fluorenilmetila
GC	Cromatografia Gasosa
HFB	Heptafluorobutila
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-ICP-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado
IC	Cromatografia Iônica
ICP-MS	Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MOBS-F	Fluoreto de 4-metoxibenzenosulfonil
MS	Espectrômetro de massas
OPA	O-ftalaldeído
SPE	Solid Phase Extraction (Extração em fase sólida)
TFA	Ácido Trifluoracético Anidro
TFAA	Anidrido Trifluoroacético
TFE	Trifluoroetanol
UV-Vis	Ultravioleta-Vísivel

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	O herbicida glifosato.....	15
3.2	Detecção de glifosato e AMPA em ambientes aquáticos	17
3.3	Métodos de extração e análise de glifosato e AMPA.....	18
3.4	Cromatografia líquida na quantificação de glifosato e AMPA	20
3.5	Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado	20
3.6	Referências	21
4	ARTIGO.....	25
4.1	Otimização e Validação de Extração em Fase Sólida de Glifosato e AMPA com determinação direta por HPLC-ICP-MS/MS	27

1 INTRODUÇÃO

A atividade agrícola brasileira, ao longo do tempo, passou por diversas mudanças, dentre elas, a necessidade de alta produtividade, promovida pela expansão populacional. Entretanto, alguns fatores são condicionantes para a redução da produtividade nas culturas agrícolas, entre os quais se destaca a incidência das plantas daninhas (PEREIRA *et al.*, 2013).

As plantas daninhas são altamente competitivas por espaço, luz e nutrientes. Por conta dessa característica, elas acabam causando prejuízos na qualidade e na produtividade das culturas. Consequentemente, o uso de herbicidas para o controle ou eliminação das plantas daninhas tornou-se cada vez mais comum, devido a sua eficácia. Porém, com o uso intensivo desses produtos químicos, faz-se necessário compreender o comportamento e o efeito dessas substâncias no ambiente.

De acordo com Galli e Montezuma (2005), o glifosato N-(fosfometil)-glicina é um herbicida de ação pós-emergente, classificado como não-seletivo, de ação sistêmica. Ele é o mais utilizado mundialmente para o controle das plantas daninhas em áreas agrícolas, urbanas, aquáticas e de conservação (KITTLE *et al.*, 2018), devido a sua baixa toxicidade, pela rápida transformação em seu principal metabolito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), e pela sua forte adsorção aos solos e sedimentos, contribuindo para a redução no escoamento para as águas superficiais (POIGER *et al.*, 2016). Contudo, já foi relatado na literatura indícios de contaminação da água e do solo por esses compostos, que podem provocar impactos sobre a saúde humana e de outros organismos e ao ambiente (IBÁÑEZ *et al.*, 2005).

Desse modo, é recomendável que ocorra um acompanhamento sobre a presença desses dois compostos em amostras ambientais, tendo em vista sua vasta utilização e os impactos associados. Esse acompanhamento deve ser realizado através de metodologias analíticas validadas que possibilitem determinar essa contaminação, e que sejam capazes de fornecer dados cada vez mais precisos, mesmo em baixas concentrações.

Para a determinação de defensivos agrícolas em água, geralmente o pré-tratamento das amostras é necessário para isolar e pré-concentrar os analitos de interesse, e a extração em fase sólida é uma técnica bastante utilizada para esta finalidade (CALDAS *et al.*, 2011). Pode-se, posteriormente, analisar-se por um método instrumental, como a cromatografia em fase líquida ou em fase gasosa. Em virtude da realização da análise elementar com baixos limites de detecção, da alta sensibilidade e da capacidade de eliminação de interferentes durante a análise, o uso do espectrômetro de massas triplo quadrupolo com plasma indutivamente acoplado (do inglês ICP-MS/MS) como detector é uma alternativa para análise de traços em amostras aquosas (AMMANN, 2007).

Assim sendo, procurou-se otimizar uma metodologia analítica eficiente e confiável para detecção do Glifosato e do AMPA, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS/MS), por ser uma técnica com alta sensibilidade na determinação de elementos e traços.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Otimizar e validar a extração em fase sólida para a determinação de glifosato e AMPA em amostras de águas, utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS/MS).

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar uma metodologia de extração e pré-concentração dos analitos, por meio de uma extração em fase sólida;
- Validar o método através dos parâmetros seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão;
- Determinar a presença de glifosato e AMPA em amostras de água de cultivo hidropônico de mudas de eucalipto.

3 REVISÃO DE LITERATURA

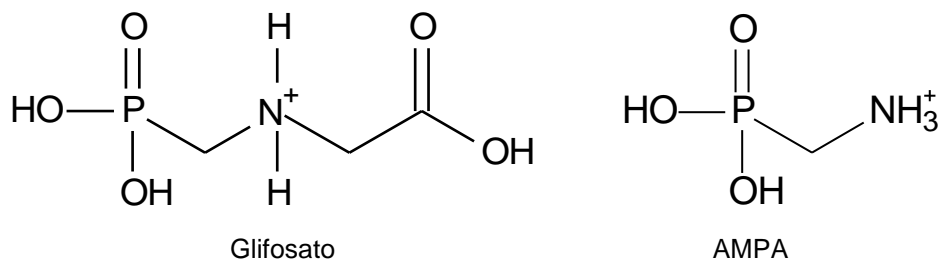
3.1 O herbicida glifosato

O glifosato N-(fosfonometil) glicina (Figura 1) é um herbicida organofosforado, pós-emergente, não seletivo e de ação sistêmica. Esse herbicida de largo espectro de ação possibilita o controle de ervas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas, é absorvido pelas folhas e tecidos verdes e translocado, principalmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos (GALLI; MONTEZUMA, 2005).

Sua eficiência pode ter relação à pequena massa molecular e à alta solubilidade em água, atribuindo ao composto uma rápida absorção e translocação pelos tecidos das plantas (ANADÓN *et al.*, 2009). Entretanto, o glifosato não possui atividade herbicida sobre as sementes das ervas daninhas no solo e, portanto, deve ser aplicado apenas quando as espécies a serem eliminadas já estiverem em desenvolvimento e principalmente em solo seco (SILVA; SILVA; REZENDE, 2015).

Quando presente no solo, o glifosato pode ser imobilizado por meio de colóides, que têm a capacidade de atrair e reter elementos de carga positiva (DANIELE *et al.*, 1997). No solo, os microrganismos são os principais responsáveis pela degradação do glifosato, gerando dois compostos distintos, dentre estes, a sarcosina e o ácido aminometilfosfônico (AMPA), que é o seu principal metabólito (BERNAL *et al.*, 2012). Este, de grande persistência ambiental e mobilidade no solo (KJÆR *et al.*, 2005), é um composto que apresenta um comportamento anfótero e zwitteriônico, contendo grupos amino, carboxílico e fosfonatos (FRANZ J.E., MAO M.K., 1997 *apud* JAYASUMANA; GUNATILAKE; SENANAYAKE, 2014). As estruturas químicas das moléculas do glifosato e AMPA podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1 - Estruturas químicas das moléculas de glifosato e AMPA

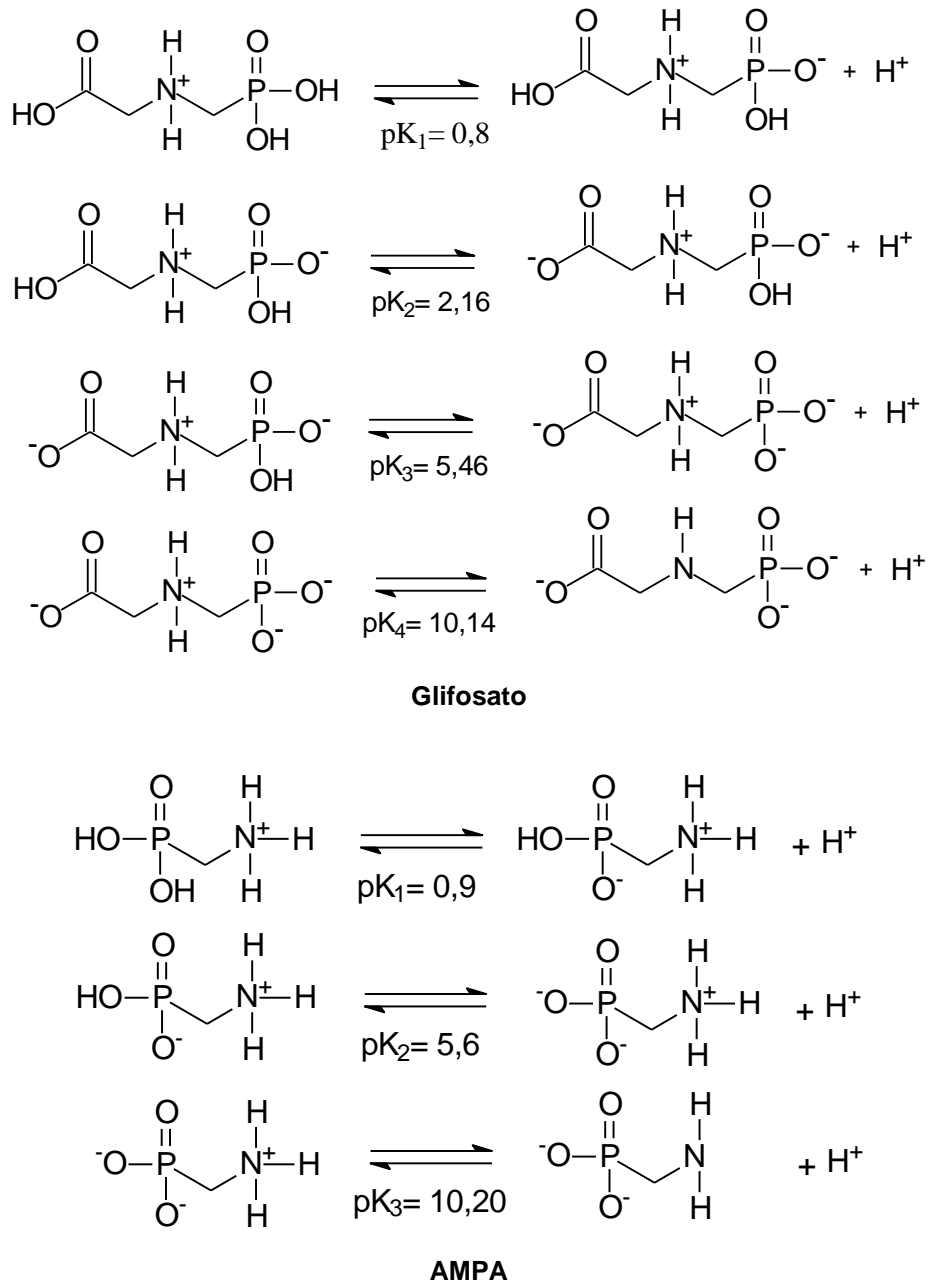


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Em condições ambientes, o glifosato e o AMPA se apresentam na forma de sólido cristalino, com alta solubilidade em água e baixa solubilidade em solventes orgânicos. Não possuem grupos cromóforos e fluoróforos, dificultando a sua detecção por detectores convencionais (como o de absorção na região do UV/VIS e os detectores de fluorescência). Podem ser encontrados em diferentes formas, protonados ou

desprotonados, quando solubilizados em água (GOODWIN *et al.*, 2003). As principais espécies químicas de glifosato e AMPA em equilíbrio na fase aquosa podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2 – Principais espécies químicas de glifosato e AMPA em equilíbrio na fase aquosa



Fonte: LIU *et al.*, 2016

O glifosato e o AMPA são polares, tendem a permanecer altamente retidos em argila e matéria orgânica do solo, mas, devido à alta solubilidade em água, podem sofrer lixiviação e escoamentos, podendo ser detectados distantes do ponto original de aplicação (PIRIYAPITTAYA *et al.*, 2008).

3.2 Detecção de glifosato e AMPA em ambientes aquáticos

O glifosato é classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em classe toxicológica IV (pouco tóxico) e em classe de periculosidade ambiental III (perigoso ao meio ambiente). O ácido aminometilfosfônico (AMPA), embora tenha baixa toxicidade aguda ($DL50 = 8.300 \text{ mg kg}^{-1}$), é mais nocivo que o glifosato no que diz respeito à persistência tanto no ambiente como em alguns animais (SOUZA *et al.*, 2006).

No Brasil, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), na Resolução nº 430/2011, que complementa e altera a Resolução CONAMA nº 357/2005, estabelece para águas superficiais de classe 1 e 2 limite máximo de glifosato de $65 \mu\text{g L}^{-1}$, e para águas superficiais de classe 3 limite máximo de $280 \mu\text{g L}^{-1}$. Já em âmbito internacional, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) estabelece limite de $700 \mu\text{g L}^{-1}$ para o glifosato em água potável. Na legislação europeia, o limite máximo tolerável é de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ definido para todos os pesticidas (BORGGAARD; GIMSING, 2008).

Devido à capacidade de ficar adsorvidos nas partículas do solo, a contaminação das águas superficiais ou subterrâneas com os analitos é considerada de baixo potencial (BORGGAARD E GIMSING, 2008). Entretanto, alguns trabalhos disponíveis na literatura evidenciam a detecção de glifosato e AMPA em diferentes ambientes aquáticos. Conforme pode ser observado na Tabela 1, a concentração dos analitos em amostras de águas superficiais variou de 1,082 a $1600 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato e 0,90 a $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de AMPA, valores muito superiores aos determinados em águas subterrâneas, cujos valores máximos detectados foram de 24 e $19 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato e AMPA, respectivamente.

Tabela 1 - Concentração de Glifosato e AMPA em ambientes aquáticos

Amostras	Concentração de Glifosato ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração de AMPA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Local do estudo	Referências
Superficiais	1600	-	Argentina	AVIGLIANO <i>et al.</i> , 2015
	1,082	1,925	França	BOTTA <i>et al.</i> , 2009
	7,7	-	Portugal	PINTO; SOARES; FERREIRA, 2018
	430	400	EUA	COUPE <i>et al.</i> , 2011
	427	41	EUA	SCRIBNER <i>et al.</i> , 2007
	50	48,9	Europa	HORTH <i>et al.</i> , 2009
	45	-	Sri Lanka	GUNARATHNA <i>et al.</i> , 2018
	4,52	0,90	Argentina	BERMAN <i>et al.</i> , 2018
Subterrâneas	4	11	Sri Lanka	GUNARATHNA <i>et al.</i> , 2018
	4,7	2,6	EUA	SCRIBNER <i>et al.</i> , 2007
	24	19	Europa	HORTH <i>et al.</i> , 2009

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

3.3 Métodos de extração e análise de glifosato e AMPA

Normalmente, os métodos analíticos disponíveis para as análises de glifosato e AMPA requerem uma série de etapas de preparação das amostras. Dentre elas, a derivatização, para tornar os analitos passíveis de serem separados pelas técnicas de cromatografia líquida ou pela gasosa e detectados por detectores, tais como o de absorvância no UV-Visível e por fluorescência (KOSKINEN; MAREK; HALL, 2016). O reagente de derivatização mais comumente usado é o cloroformiato de 9-fluorenilmetila – FMOC-Cl (PERUZZO; PORTA; RONCO, 2008; KUSTERS; GERHARTZ, 2010). Há outros agentes derivantes que também usados, como o o-ftalaldeído – OPA (COLOMBO; MASINI, 2011) e o 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto – CNBF (QIAN *et al.*, 2009). Algumas metodologias de detecção dos analitos não exigem etapa de pré-concentração, em virtude de os métodos de detecção empregados serem bastante sensíveis, como o uso do ICP-MS como detector (KOSKINEN; MAREK; HALL, 2016).

Nos últimos anos, uma grande parte dos estudos publicados utilizou vários métodos de pré-concentração de amostras aquosas. O método de pré-concentração mais comumente utilizado para o glifosato e o AMPA tem sido a extração em fase sólida (SPE – do inglês *Solid Phase Extraction*), com discos de C18 (NAGATOMI *et al.*, 2013) e cartuchos Oasis HLB, que possuem com equilíbrio hidrofílico-lipofílico (IBÁÑEZ *et al.*, 2005), cartuchos de troca aniônica (SÁNCHEZ-BAYO; HYNE; DESSEILLE, 2010). Outros métodos de utilização menos comum incluíram a pré-concentração a vácuo (KUDZIN *et al.*, 2002), por aquecimento/evaporação (TZASKOS *et al.*, 2012) e liofilização (RAMIREZ; BELLMUND; GARDINALI, 2014).

Conforme observado, a extração em fase sólida (SPE) tem sido a técnica de preparo de amostras mais aplicada para a concentração/extração de defensivos agrícolas em amostras aquosas, por demandar pouca quantidade de solventes e por ser uma técnica que exige pouco tempo para ser realizada. Além disso, sua principal vantagem é a pré-concentração dos analitos presentes em níveis baixíssimos, característica importante para a análise de traços (CALDAS *et al.*, 2011). O processo de extração de fase sólida pode ser dividido em: condicionamento, percolação da amostra, lavagem e eluição dos analitos. Para o isolamento e pré-concentração dos analitos, a amostra aquosa é percolada por um cartucho ou uma coluna compactada contendo o adsorvente, onde os compostos são adsorvidos e posteriormente são desorvidos com um solvente orgânico (RIALOTERO *et al.*, 2007).

A determinação de glifosato e AMPA em matrizes aquosas e os principais métodos de extração e quantificação encontrados na literatura estão relatados na Tabela 2, tendo a cromatografia líquida de alta eficiência com o detector de fluorescência, o método de extração em fase sólida e a derivatização dos analitos com o reagente FMOC-Cl como as técnicas de análises mais utilizadas na quantificação dos compostos.

Tabela 2 - Métodos de extração e quantificação de glifosato e AMPA em amostras de água

Matriz	Extração/ Pré-concentração	Derivatização	Técnica de Análise	Referências
Água superficial e subterrânea	SPE	FMOC-CI	HPLC – MS/MS	SANCHIS <i>et al.</i> , 2011
	SPE	FMOC-CI	HPLC – MS/MS	DAOUK <i>et al.</i> , 2013
	-	FMOC-CI	HPLC - MS	GUNARATHNA <i>et al.</i> , 2018
Água superficial	Liofilização	FMOC-CI	HPLC-FLD	RAMIREZ; BELLMUND; GARDINALI, 2014
	SPE	FMOC-CI	HPLC-FLD	MA <i>et al.</i> , 2014
	Éter Dietílico	FMOC-CI	HPLC-FLD	FREUZE <i>et al.</i> , 2007
	-	TFAA, TFE, TFA, HFB	GC-MS	RAMWELL <i>et al.</i> , 2014
	Evaporador Rotativo	TFAA e TFE	GC-MS	PUÉRTOLAS <i>et al.</i> , 2010
	SPE	-	HPLC-ICP-MS	POPP <i>et al.</i> , 2008
Água Potável	SPE	FMOC-CI	HPLC-FLD	KUSTERS; GERHARTZ, 2010
Água	-	CNBF	HPLC-FLD	QIAN <i>et al.</i> , 2009
	Evaporação	MOBS-F	HPLC-FLD	SUN <i>et al.</i> , 2010
	SPE	HFB, TFAA	GC-MS	KJAER <i>et al.</i> , 2005
Água potável e subterrânea	-	-	HPLC-ICP-MS	GUO <i>et al.</i> , 2005

SPE= Extração em Fase Sólida / FMOC-CI= Cloroformiato de 9-fluorenilmetila / TFAA= Anidrido Trifluoroacético / TFE= Trifluoroetanol / TFA= Ácido Trifluoroacético Anidro / HFB= Heptafluorobutila / CNBF= 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoreto / MOBS-F= Fluoreto de 4-metoxibenzenosulfonil / HPLC=Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / GC =Cromatografia Gasosa / FLD=Detector por fluorescência / MS=detector espectrômetro de massas / ICP-MS= espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

3.4 Cromatografia líquida na quantificação de glifosato e AMPA

Para o glifosato e o AMPA, a técnica mais empregada para a determinação desses analitos em amostras aquosas é a cromatografia líquida de alta eficiência, devido à alta polaridade das suas moléculas. A ausência de grupos cromóforos nos analitos dificulta a identificação e a quantificação dos compostos em detectores convencionais, como o de absorvância (UV-vísivel) e por fluorescência. Por isso, a derivatização é um procedimento necessário (AMARANTE *et al.*, 2002). O cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) é o agente derivatizante mais utilizado para a determinação de glifosato e AMPA em amostras de água (IBÁNEZ *et al.*, 2005; FREUZE *et al.*, 2007; PERUZZO; PORTA; RONCO, 2008; KUSTERS; GERHARTZ, 2010; SANCHIS *et al.*, 2011; DAOUK *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2014; RAMIREZ; BELLMUND; GARDINALI, 2014;). Dessa maneira, a derivatização pode aumentar a sensibilidade e a seletividade para a análise desses analitos por cromatografia (GHANEM *et al.*, 2007).

Contudo, na literatura, a análise desses compostos em amostras de água sem a etapa de derivatização já foi efetuada utilizando-se o ICP-MS (GUO *et al.*, 2005), o que tornou o procedimento de preparo das amostras menos laborioso e de baixo custo, pois o uso de reagentes derivatizantes pode elevar os custos da técnica (SILVA; COLLINS, 2011).

3.5 Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado

O espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado, ICP-MS (do inglês - *inductively coupled plasma mass spectrometry*), é uma técnica analítica em que ocorre a ionização do analito e, pela diferença massa/carga (m/z), os íons selecionados são detectados. É composto por um sistema de introdução de amostras, uma fonte de íons (tocha), um cone de amostragem, do *skimmer* para a focalização dos íons, um analisador de massas (quadrupolo) e detector (NUNES, 2009). Devido a suas características, dentre as quais capacidade multielementar, obtenção de baixos limites de detecção, ampla faixa linear, alta sensibilidade e especificidade, o uso do ICP-MS/MS tornou-se uma importante ferramenta para a detecção de traços de defensivos agrícolas em amostras ambientais (POPP; HANN; KOELLENSPERGER, 2010).

Apesar da sua alta sensibilidade e especificidade, o ICP-MS pode sofrer interferências, especialmente nas análises de metais, sejam por interferentes isobáricos, íons de dupla carga ou poliatômicos. A interferência isobárica ocorre quando dois elementos apresentam isótopos de mesma massa. Os íons de dupla carga, quando aparecem no espectro com metade da razão de massa do íon desejado, podem influenciar a sensibilidade e a geração de isótopos. E os íons poliatômicos, cujas espécies mais abundantes Ar, O, H, N, S ou Cl podem combinar entre si ou com outros elementos provenientes da matriz (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Para as análises, levando-se em consideração a massa atômica do P, há interferência de íons poliatômicos $^{14}\text{N}^1\text{H}^{16}\text{O}^+$, $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ e $^{12}\text{C}^1\text{H}_3^{16}\text{O}^+$, estes que são formados a partir do plasma de gás argônio, podendo alterar a resposta de detecção (BECKER *et al.*, 2003).

Em virtude disso, a cela de reação e/ou colisão tem como objetivo diminuir a ação dos interferentes durante as análises (AMMANN, 2007). Com a entrada dos íons na cela, os mesmos interagem com um gás, que pode ser o He ou H₂ no modo de colisão e O₂ para o modo de reação, modificando o interferente ou o analito de interesse em uma massa diferente e, conseqüentemente, minimizando as interferências isobáricas ou poliatômicas (AGILENT, 2008).

3.6 Referências

AGILENT TECHNOLOGIES. **Agilent 7500 Series ICP-MS**: hardware manual. Tokyo: Agilent Technologies, 2008.

AMMANN, Adrian A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. **Journal Of Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 42, n. 4, p. 419-427, 2007.

AMARANTE Jr., O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, uso e legislação. **Química Nova**, v. 25, p. 589-593, 2002.

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

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografia GO1 Glifosato da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2009. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[19554-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[19554-1-0].PDF). Acesso em: 2 Jun. 2019.

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

BECKER, J. S.; BOULYGA, S. F.; BECKER, C. P. J.; BUDDRUS, S.; PRZYBYLSKI, M. Determination of phosphorus in small amounts of protein samples by ICP-MS. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p. 561- 566, 2003.

BERNAL, José *et al.* Development and Application of a Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Method to Evaluate the Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid Dissipation in Maize Plants after Foliar Treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 60, n. 16, p.4017-4025, 2012.

BERMAN, M. Castro *et al.* Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. **Chemosphere**, [s.l.], v. 200, p. 513-522, 2018.

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

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

BRASIL. Resolução CONAMA, nº 430, de 16 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Diário Oficial da União**, n. 92, de 16 de maio de 2011, seção 1, p. 89.

CALDAS, Sergiane Souza *et al.* Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

COLOMBO, Sandro de Miranda; MASINI, Jorge C. Developing a fluorimetric sequential injection methodology to study adsorption/desorption of glyphosate on soil and sediment samples. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 98, n. 2, p. 260-266, 2011.

COUPE, R. H *et al.* Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 68, n. 1, p. 16-30, 2011.

DANIELE, P. G.; STEFANO, C.; PRENESTI, E.; SAMMARTANO, S. Copper(II) complexes of N-(phosphonomethyl) glycine in aqueous solution: a thermodynamic and spectrophotometric study. **Talanta**, v. 45, p. 425-431, 1997.

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

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

GALLI, Antonio J. B; MONTEZUMA, Marcelo C; RODRIGUES, Joao Domingos; GUAGGIO, José Antonio; CHRISTOFFOLETI, Pedro Jacob. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. [S.l: s.n.], 2005.

GHANEM, A *et al.* Glyphosate and AMPA Analysis in Sewage Sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOOC Derivatization on Strong Anion-Exchange Resin as Solid Support. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 79, n. 10, p. 3794-3801, 2007.

GOODWIN, Lee *et al.* Analysis of glyphosate and glufosinate by capillary electrophoresis–mass spectrometry utilising a sheathless microelectrospray interface. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1004, n. 1-2, p. 107-119, 2003.

GUNARATHNA, Shankani *et al.* Glyphosate and AMPA of agricultural soil, surface water, groundwater and sediments in areas prevalent with chronic kidney disease of unknown etiology, Sri Lanka. **Journal Of Environmental Science And Health, Part B**, [s.l.], p. 1-9, 2018.

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

HORTH, H.; BLACKMORE, K., Survey of Glyphosate and AMPA in Groundwaters and Surface Waters in Europe. **Pesticides News**, n.30-3, 1996, p. 28- 29. 2009.

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

JAYASUMANA, C.; GUNATILAKE, S.; SENANAYAKE, P. Glyphosate, Hard Water and Nephrotoxic Metals: are they the culprits behind the epidemic of chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka? **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 2125-2147, 2014.

KJÆR, J. *et al.* Leaching of Glyphosate and Amino-Methylphosphonic Acid from Danish Agricultural Field Sites. **Journal Of Environment Quality**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 608-620, 2005.

KOSKINEN, W. C; MAREK, L. J; HALL, Kathleen E. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, plant materials and soil. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 72, n. 3, p. 423-432, 2016.

KUDZIN, Z. H. *et al.* Novel approach for the simultaneous analysis of glyphosate and its metabolites. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 947, n. 1, p. 129-141, 2002.

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

LIU, B. *et al.* Thermodynamic Study on the Protonation Reactions of Glyphosate in Aqueous Solution: potentiometry, calorimetry and NMR spectroscopy. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 120, n. 9, p. 2132-2137, 2016.

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

NAGATOMI, Y.; YOSHIOKA, T.; YANAGISAWA, M.; UYAMA, A.; MOCHIZUKI, N. Simultaneous LC-MS/MS analysis of glyphosate, glufosinate, and their metabolic products in beer, barley tea, and their ingredients. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 77, p. 2218-2221, 2013.

NUNES, J. A. **Desenvolvimento de método para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino.** 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

PEREIRA, F. C. M.; NEPOMUCENO, M. P.; PIRES, R. N.; PARREIRA, M. C.; ALVES, P. L. C. A. Response of eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*) plants at different doses of glyphosate. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, p. 66-74, 2013.

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

PINTO, E; SOARES, A. G.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Quantitative analysis of glyphosate, glufosinate and AMPA in irrigation water by in situ derivatization–dispersive liquid–liquid microextraction combined with UPLC-MS/MS. **Analytical Methods**, [s.l.], v. 10, n. 5, p. 554-561, 2018.

PIRIYAPITTAYA, M.; JAYANTA, S.; MITRA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-performance liquid chromatography and postcolumn derivatization with fluorescence detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, p. 483-492, 2008.

POPP, M.; HANN, S.; MENTLER, A.; FUERHACKER, M.; STINGEDER, G.; KOELLENSPERGER, G. Determination of glyphosate and AMPA in surface and waste water using high performance ion chromatography coupled to inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry (HPIC–ICP–DRC–MS). **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 695-699, 2008.

POPP, M.; HANN, S.; KOELLENSPERGER, G. Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, n. 2, p.114-129, 2010.

PUÉRTOLAS, L *et al.* Evaluation of side-effects of glyphosate mediated control of giant reed (*Arundo donax*) on the structure and function of a nearby Mediterranean river ecosystem. **Environmental Research**, [s.l.], v. 110, n. 6, p. 556-564, 2010.

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

RAMIREZ, C. E.; BELLMUND, S.; GARDINALI, P. R.. A simple method for routine monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters using lyophilization and LC-FLD + MS/MS. Case study: canals with influence on Biscayne National Park. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 496, p. 389-401, 2014.

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

RIALOTERO, R *et al.* Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. **Talanta**, [s.l.], v. 71, n. 2, p. 503-514, 2007.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; HYNE, R. V.; DESSEILLE, K. L.. An amperometric method for the detection of amitrole, glyphosate and its aminomethyl-phosphonic acid metabolite in environmental waters using passive samplers. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 675, n. 2, p. 125-131, 2010.

SANCHIS, J. *et al.* Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 402, n. 7, p. 2335-2345, 2011.

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

SILVA, B. M. da; SILVA, P. R. D.; REZENDE, M. O. O. Desenvolvimento de metodologia verde por HPLC/UV para determinação de glifosato em amostras ambientais de solo. **Eclética Química Journal**, [s.l.], v. 40, n. 1, p. 106-116, 2015.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H.. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SOUZA, T. A. *et al.* Estudo da recuperação de glifosato e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1372-1376, 2006.

SUN, Y. *et al.* Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Water by LC Using a New Labeling Reagent, 4-Methoxybenzenesulfonyl Fluoride. **Chromatographia**, [s.l.], v. 72, n. 7-8, p. 679-686, 2010.

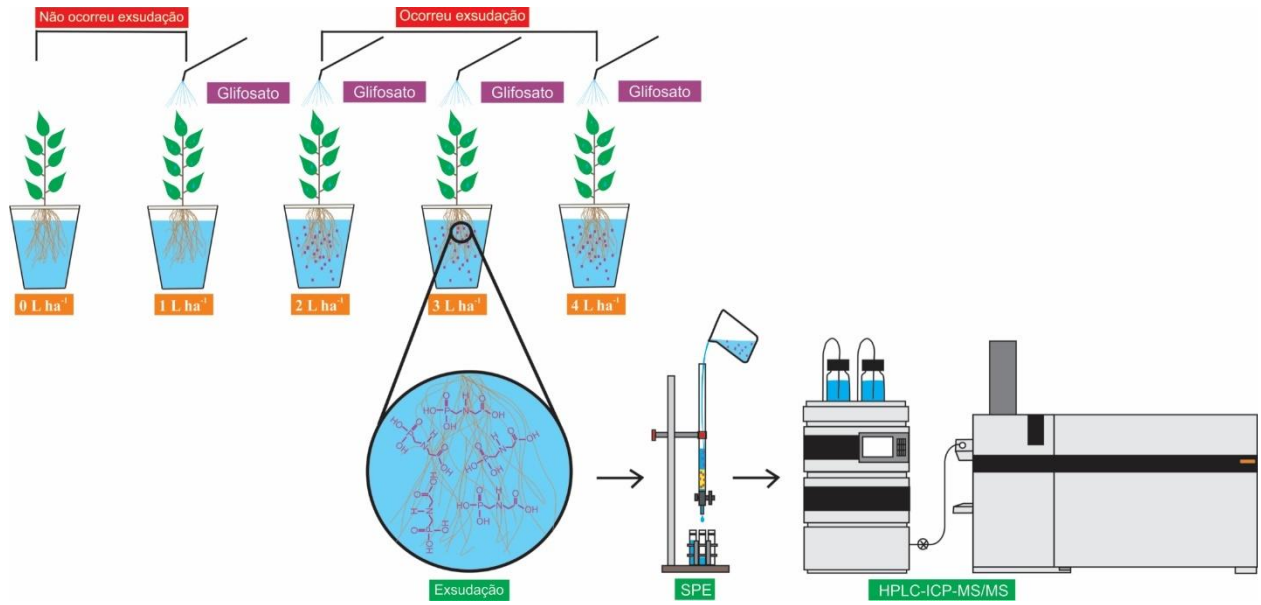
TZASKOS, D. F. *et al.* Development of sampling for quantification of glyphosate in natural waters. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 36, n. 4, p. 399-405, 2012.

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

4 ARTIGO

Otimização e validação de extração em fase sólida de glifosato e AMPA com determinação direta por HPLC-ICP-MS/MS

Este artigo foi elaborado conforme as normas do periódico "Journal Of the Brazilian Chemical Society"



Resumo Gráfico (RG) representando a extração em fase sólida combinada com HPLC-ICP-MS/MS na determinação direta de glifosato e AMPA.

4.1 Otimização e Validação de Extração em Fase Sólida de Glifosato e AMPA com determinação direta por HPLC-ICP-MS/MS

João P. F. Tiago,^a Lázaro C. Sicupira,^b Rodrigo E. Barros,^a Gevany P. de Pinho^a and Flaviano O. Silvério^{1,a}

^a Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, 39404-547, Montes Claros-MG, Brasil.

^b Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 39447-790, Janaúba-MG, Brasil.

¹flavianosilverio@ufmg.br

Resumo

O glifosato tem sido o herbicida mais utilizado no mundo devido à grande aplicabilidade e eficiência no controle de ervas daninhas em muitas culturas. Atualmente, tem sido considerado não seguro, o que a longo prazo pode levar a impactos indesejáveis ao meio ambiente e à saúde humana. Portanto, uma nova metodologia de extração mais simples e de menor custo é altamente desejável. O presente estudo teve como objetivo otimizar e validar a extração em fase sólida de glifosato e ácido aminometilfosfônico em amostras de água, seguida de cromatografia líquida de alta eficiência combinada com o espectrômetro de massas triplo quadrupolo com plasma indutivamente acoplado. A porcentagem de recuperação dos analitos foi próxima a 100% e o desvio-padrão relativo foi menor que 6%. A metodologia foi precisa, exata, linear e seletiva, com um limite de quantificação de 1,09 e 0,29 $\mu\text{g L}^{-1}$ para glifosato e ácido aminometilfosfônico, respectivamente. A metodologia alcançou o fator de concentração de 250 vezes e foi aplicada em amostras de água provenientes do cultivo hidropônico de mudas de eucalipto para verificar o processo de exsudação deste analito alvo. Os resultados mostraram que esses analitos foram detectados.

Palavras-chaves: Ácido aminometilfosfônico. N-(fosfometil) glicina. Especificação. Método de extração. Exsudação.

INTRODUÇÃO

O glifosato é um herbicida organofosforado, pós-emergente, não seletivo, que pode ser absorvido pelas folhas e translocado para toda a planta. Devido a sua alta eficiência, é o principal herbicida utilizado no mundo e, portanto, alvo de várias pesquisas.¹ Embora tenha sido considerado seguro do ponto de vista toxicológico e ambiental por muitos anos, o que resultou em um aumento considerável de aplicações agrícolas, tornando-se o herbicida mais amplamente adotado no mundo,² atualmente existem dúvidas e preocupações quanto ao seu uso crescente, que a longo prazo pode levar a episódios de contaminação do meio ambiente e prejudicar a saúde humana. Em 2015, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou o glifosato como provável cancerígeno para humanos³ e em 2019 associou-o ao linfoma não-Hodgkin.⁴

Embora a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) tenha definido o limite máximo de resíduos (LMR) para o glifosato em água potável como $700 \mu\text{g L}^{-1}$, a legislação europeia estabelece $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$.^{5,6} Várias metodologias de extração foram desenvolvidas para quantificar e monitorar esse herbicida em amostras de água e outras matrizes.^{7,8} A extração em fase sólida tem sido a principal metodologia utilizada para determinação desses analitos. Em geral, essa metodologia envolve a derivatização desses analitos-alvo antes da análise,^{7,9} entretanto, essa etapa torna a metodologia mais cara e complexa.

Por isso, nos últimos anos, as pesquisas mostraram que é possível determinar o glifosato e seu principal metabólico, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), simultaneamente, sem a etapa de derivatização,^{10,11,12} usando novos tipos de detectores cromatográficos, como o espectrômetro de massas triplo quadrupolo por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS/MS) combinado a um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC).¹² Esse detector monitora a massa 47, que é o produto da reação de oxigênio (m/z^{16}) com fósforo (m/z^{31}), que ocorre na célula de reação do detector.

Essa metodologia foi empregada com sucesso na determinação desse analito-alvo e os resultados mostraram aumento na seletividade e diminuição do limite de detecção, quando comparado ao ICP-MS de quadrupolo único ou detecção molecular de glifosato derivatizado por detector de arranjo de diodos ou detecção ultravioleta.^{7,9,10,11,13}

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi otimizar e validar a extração em fase sólida (SPE) de glifosato e AMPA em amostras de água, seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência combinada com espectrômetro de massa triplo quadrupolo com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS/MS), e aplicar essa metodologia para monitorar o processo de exsudação desse herbicida em mudas de eucalipto cultivadas em sistema hidropônico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e Soluções

O glifosato (99,2% m/m) e o ácido aminometilfosfônico (99,0% m/m) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Soluções de glifosato e ácido aminometilfosfônico foram preparadas a 500 mg L⁻¹ (solução estoque) separadamente, em água ultrapura (resistividade de 18 MΩ cm), obtida pelo sistema Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Uma solução para cada composto foi preparada a partir de solução estoque a 25 mg L⁻¹ no mesmo solvente (solução de trabalho). Em seguida, foram feitas diluições dessas soluções para obtenção das curvas analíticas. Todas as soluções foram armazenadas a 4°C no refrigerador em frascos plásticos, para evitar a complexação dos padrões de íons metálicos em frascos de vidro.¹⁴ Além disso, o metanol de grau de HPLC; o ácido fosfórico, a solução de ácido acético (49% m/v), o hidróxido de tetrabutilamônio e o acetato de amônio (65%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA); o ácido clorídrico PA, da Anidrol (Diadema, São Paulo); o hidróxido de sódio PA, da Dinâmica (Indaiatuba, São Paulo); e a Amberlite IRA 402 (*chloride form*) foi comprada da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

Instrumentação

A análise foi realizada em um módulo de cromatografia líquida de alta eficiência (Modelo 1260 Infinity Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), equipado com bomba quaternária, amostrador automático, desgaseificador e compartimento da coluna com termostato. O detector utilizado foi o ICP-MS/MS modelo 8800® (Agilent Technologies, Hachioji, Japão), equipado com bomba peristáltica de baixa pressão de 3 canais (amostra, padrão interno e dreno) e sistema de introdução de amostra, que consiste em um nebulizador concêntrico, câmara de pulverização de dupla passagem rodeada por um sistema de controle de temperatura, tocha de quartzo com tubo injetor de 2,5 mm de diâmetro, cones de amostragem e *skimmer* de platina, com orifícios de 1 e 0,4 mm de diâmetro, respectivamente. Um gerador de frequência de 27,12 MHz em estado sólido, com bobinas helicoidais operando entre 500 e 1600 Watts de potência, alimentado com Argônio 99,998%, foi usado para sustentar o plasma. O 8800® possui um quadrupolo para seleção de íons que entrarão no sistema de reação octopolar de terceira geração (Octopole Reaction System-ORS3®), pressurizado com 99,999% de Hélio ou 99,999% de oxigênio para remover as interferências isobáricas, através da energia cinética de discriminação ou reação. Depois do ORS³, há outro espectrômetro de massas quadrupolo com barras hiperbólicas, com um sistema de detecção de multiplicador de elétrons de fase dupla (pulsado e analógico) no final, que cobre o espectro de massa entre 2-260 u.m.a.

O preparo da amostra utilizou: um pHmetro (Quimis, Brasil); um compressor de ar (Primatec, São Paulo, Brasil); uma chapa de aquecimento e agitador magnético (Ethik Technology, Brasil); e uma balança analítica (Tecnal, São Paulo, Brasil).

Análise HPLC-ICP-MS/MS

Para a detecção e quantificação dos analitos-alvo, o fósforo presente nas moléculas desses compostos foi monitorado, utilizando metodologia adaptada por Abreu *et al.*¹⁵ Para a separação do glifosato e do AMPA, utilizou-se uma coluna analítica ZORBAX SB-C8 (4,6 x 150 mm, 5 μ m, Agilent Technologies, CA, Estados Unidos). O volume de injeção foi de 50 μ L, fase móvel composta de solução de acetato de amônio/ácido acético 50 mM: tetrabutylamônio 5 mM: metanol a 1% com pH = 4,7, eluição isocrática com 1,0 mL min⁻¹. As condições de análise do ICP-M /MS estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições de operação otimizadas do ICP-MS/MS

Parâmetros ICP-MS/MS	
Radiofrequência	1600 W
Fluxo do gás de plasma	15 L min ⁻¹
Fluxo do gás carreador	1,0 L min ⁻¹
Fluxo do gás de <i>Makeup</i>	2,0 L min ⁻¹
Profundidade de amostragem	3 mm
Nebulizador	Concêntrico
Câmara de nebulização	Duplo-passo
Cones de amostragem e <i>skimmer</i>	Níquel
Massas monitoradas	Q1 (m/z ³¹ P) e Q2 (m/z 47 ³¹ P ¹⁶ O ⁺)
<i>Dwell time</i>	0,1 s por isótopo
Sistema de reação octopolar	O ₂
Fluxo do gás de reação	1,5 L min ⁻¹

Q1: Quadrupolo 1; Q2: Quadrupolo 2

Otimização de condições de extração

Para melhorar a eficiência de extração dos analitos-alvo de amostras de água, foi realizada uma otimização univariada da quantidade de massa de resina; volume de água para condicionamento de coluna; volume de eluição, concentração e taxa de fluxo da solução de HCl. Cada experimento de otimização foi realizado em triplicata e os parâmetros otimizados e os níveis avaliados estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros avaliados para a extração de glifosato e AMPA por SPE

Parâmetro otimizado	Níveis avaliados
Massa de resina	1, 2 e 3 g
Volume de água para condicionamento da coluna	10, 20 e 30 mL
Concentração da solução de HCl	1, 3 e 6 mol L ⁻¹
Volume da solução de HCl	15, 20, 25 e 30 mL
Fluxo do eluente (solução de HCl)	0,5 e 1,0 mL min ⁻¹

Em cada parâmetro otimizado, após eluição, o volume da fase extratora contendo os analitos-alvo foi completamente evaporado e o resíduo obtido foi ressuscitado com a fase móvel. Avaliamos 100, 200, 300 e 400 μL da fase móvel para ressuscitar cada resíduo.

Método de Extração Otimizado

Utilizou-se uma coluna de vidro (20 cm x 1,5 cm de diâmetro interno) com 1 g de resina de troca aniônica. Em seguida, a resina foi condicionada com 10 mL de água ultrapura, no fluxo de 0,5 mL min⁻¹, para a remoção do excesso de íons cloreto.¹⁵ A amostra de água ultrapura livre dos analitos foi fortificada com 2,18 e 2,03 $\mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato e AMPA, respectivamente. Esse valor corresponde a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ do fósforo para cada analito. A amostra de água fortificada foi ajustada para pH 10,5, com solução aquosa de NaOH a 1,0 mol L⁻¹, e 100 mL foram eluídos na coluna, no fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Posteriormente, os analitos alvos retidos na resina foram eluídos com 10 mL de água ultrapura e três eluições de 10 mL de solução aquosa de HCl a 6,0 mol L⁻¹ na vazão de 0,5 mL min⁻¹. O eluato recolhido (40,0 mL) foi completamente evaporado sob de fluxo de ar contínuo a 60°C. Finalmente, cada resíduo obtido foi ressuscitado em 400 μL de fase móvel (ácido acético 50 mM / solução de acetato de amônio: 5 mM tetrabutylamônio: 1% metanol com pH = 4,7) e armazenado a 4°C até a análise por HPLC-ICP-MS/MS. O fator de concentração obtido foi de 250 vezes. A quantificação dos analitos-alvo foi realizada utilizando-se uma curva analítica de 1,09 a 5,45 $\mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato e de 0,29 a 3,87 $\mu\text{g L}^{-1}$ de AMPA.

Validação do Método

Após otimização da extração, o método foi validado em termos de seletividade, linearidade, efeito matriz, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão.^{16,17}

A seletividade do método foi investigada através da comparação de cromatogramas dos extratos das amostras fortificadas e isentas dos analitos, em seis repetições independentes. A ausência de interferentes com sinais cromatográficos com o mesmo tempo de retenção dos analitos-alvo assegura a seletividade do método.

Para avaliar a linearidade e o efeito matriz, foram construídas duas curvas analíticas, uma em solvente puro (água ultrapura) e outra no extrato da matriz, contendo seis níveis de concentração: 1,09, 2,18, 3,27, 4,36, 5,45 e 6,54 $\mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato e 0,29, 1,00, 2,44, 3,15 e 3,87 $\mu\text{g L}^{-1}$ de AMPA, com três repetições independentes em cada nível.

A linearidade foi avaliada através dos parâmetros de regressão linear estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Os *outliers* foram tratados e confirmados pelo teste Jackknife com exclusão máxima de 22,2% dos dados. Os resíduos de regressão linear foram avaliados pelos parâmetros de normalidade (teste de Ryan-Joiner), homocedasticidade (teste de Brown-Forsythe) e independência (teste de Durbin-Watson). A análise de variância (ANOVA) foi aplicada às curvas analíticas para verificar quanto a linha de regressão explica os valores que foram utilizados para fazer o ajuste de linearidade.

O efeito matriz (EM) foi avaliado pela razão entre os coeficientes angulares obtidos a partir da curva analítica na matriz e em solvente (água ultrapura), multiplicada por 100, calculada de acordo com a Equação (1)

$$EM (\%) = \frac{\bar{A}_{\text{matriz}}}{\bar{A}_{\text{solvente}}} \times 100 \quad (1)$$

em que \bar{A}_{matriz} são os coeficientes angulares da curva analítica para cada analito alvo na matriz e $\bar{A}_{\text{solvente}}$ são os coeficientes angulares da curva analítica para cada analito-alvo no solvente (água ultrapura).

Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) foram determinados fortificando-se amostras de água com os analitos-alvo nas menores concentrações aceitáveis e aplicando-se a SPE nas condições otimizadas. LD e LQ foram considerados como três e dez vezes, respectivamente, o sinal da linha de base obtido nas amostras (branco) livres de glifosato e AMPA.

A exatidão foi avaliada através da recuperação dos analitos da matriz fortificada em três níveis de concentração, 1xLQ, 2xLQ e 5xLQ, em três repetições, e a precisão foi avaliada em sete repetições para o segundo nível. A precisão foi analisada pela recuperação de analitos, com valores entre 70 e 120% sendo considerados aceitáveis. A exatidão foi avaliada pelo desvio-padrão relativo (DPR) das repetições, com DPR menor que 20%, sendo o critério de aceitabilidade.

Amostras Reais

Após a otimização e a validação da extração em fase sólida, a mesma foi aplicada para analisar amostras de água provenientes de cultivo hidropônico de mudas de *Eucalyptos Urophylla*. Esse experimento foi desenvolvido exclusivamente para monitorar o processo de exsudação das raízes de mudas de eucalipto.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em que cinco doses de glifosato (0, 1, 2, 3, 4 L ha⁻¹) do produto comercial corresponde a 0, 370, 740, 1,110 e 1480 g ha⁻¹ de glifosato, respectivamente, em quatro repetições. O experimento foi conduzido em ambiente protegido. As plântulas foram cultivadas em sistema hidropônico em potes plásticos de 3,5 dm³, utilizando-se solução nutritiva

modificada de Hoagland.¹⁸ O sistema foi artificialmente oxigenado e as mudas permaneceram sob cultivo por 34 dias.

Após 22 dias de cultivo, o glifosato foi aplicado na parte aérea da planta, em ambiente aberto. Todas as precauções foram tomadas para evitar a contaminação da solução nutritiva com o herbicida. Seis dias após a aplicação do herbicida, foram coletados 500 mL de água para análise da exsudação radicular do glyphosate durante esse período. A partir dessa amostra, 100 mL foram utilizados para SPE otimizada e validada, seguida pela análise por HPLC-ICP-MS/MS.

Resultados e Discussão

Otimização do método de extração

Neste estudo, realizamos uma otimização univariada de cinco parâmetros. Inicialmente, avaliamos três massas de resina (1, 2 e 3 g) a serem utilizadas no procedimento de extração. As porcentagens de recuperação e os valores de desvio-padrão relativo obtidos podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Médias das porcentagens de recuperação dos analitos obtidos na etapa de otimização da extração em fase sólida

Parâmetros Otimizados		Recuperação±DPR ^a (%)	
		Glifosato	AMPA
Massa da resina	1g	90,5%±1,4	95,5%±9,6
	2g	77,8%±4,6	120,7%±13,8
	3g	30,3%±9,4	76,9%±16,6
Volume de água para condicionamento da coluna	10 mL	97,1%±8,4	99,4%±9,3
	20 mL	95,8%±10,9	107,4%±8,9
	30 mL	96,9%±7,3	98,6%±8,2
Concentração (Solução de HCl)	1 mol L ⁻¹	30,3%±15,6	45,2%±12,9
	3 mol L ⁻¹	65,5%±17,6	78,1%±14,5
	6 mol L ⁻¹	94,3%±7,6	97,2%±4,3
Volume de Eluição (Solução de HCl)	15 mL	34,5%±19,5	45,8%±12,6
	20 mL	59,5%±10,9	65,6%±14,5
	25 mL	89,2%±8,6	91,9%±9,4
	30 mL	103,9%±7,9	99,4%±9,9
Fluxo do Eluente (Solução de HCl)	0,5 mL min ⁻¹	90,5%±1,4	95,5%±9,6
	1,0 mL min ⁻¹	82,6%±8,1	85,9%±12,6

^a média de três repetições; DPR: desvio-padrão relativo.

O uso de 1 g de resina aniônica na extração em fase sólida alcançou as maiores porcentagens de recuperação e os menores valores de DPR. Portanto, 1 g de resina foi escolhida para o procedimento de extração em fase sólida neste estudo. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos anteriores que utilizaram a mesma massa.^{19,20} Outros trabalhos utilizaram maior massa de resina e obtiveram taxas de recuperação próximas a 90%.^{15,21}

O segundo passo desta pesquisa foi escolher o melhor volume de água necessário para remover o excesso de íons cloreto da resina.¹⁵ Observou-se que nos três volumes avaliados (10, 20 e 30 mL), as porcentagens de recuperação dos dois analitos-alvo foram superiores a 95% (Tabela 3). Nesse caso, optou-se pela eluição de 10 mL de água, pois nessa condição o tempo gasto no condicionamento é menor em relação aos demais volumes avaliados. Trabalhos anteriores usaram uma resina aniônica para a SPE e também empregaram 10 mL de água ultrapura para condicionar a resina.²²

O terceiro parâmetro avaliado nessa otimização foi a melhor concentração de solução de HCl, para eluir esses analitos pela resina. Os resultados mostraram que apenas a concentração de 6 mol L⁻¹ alcançou percentuais de recuperação superiores a 94% para os dois analitos, como pode ser observado na Tabela 3. Resultado semelhante foi obtido em trabalho anterior, que utilizou a mesma concentração de solução de HCl para eluir o glifosato em resina aniônica,¹⁵ atingindo taxas de recuperação superiores a 80%.

Após essa etapa, avaliamos o melhor volume da solução de HCl a 6 mol L⁻¹ necessário para remover eficientemente os analitos-alvo da resina. Os resultados mostraram que volumes menores que 20 mL não removeram completamente os dois analitos, pois as taxas de recuperação foram inferiores a 70% (Tabela 3). Por outro lado, 25 e 30 mL alcançaram altas taxas de recuperação e a menor DPR, porém o volume de 30 mL alcançou o maior percentual de recuperação e, portanto, esse volume foi definido para a próxima etapa deste estudo. Um estudo semelhante utilizou volume de HCl equivalente a 40% do volume da amostra e alcançou taxas de recuperação próximas a 80%.¹⁵ O volume de HCl utilizado no presente estudo corresponde a 30% do volume da amostra e, portanto, foi semelhante ao encontrado na literatura.

O quarto parâmetro avaliado foi o melhor índice de fluxo para a eluição da solução de HCl a 6 mol L⁻¹ através da coluna com essa resina. Realizamos extrações com eluições em 0,5 e 1,0 mL min⁻¹ e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3. Pode-se observar que a vazão de 0,5 mL min⁻¹ atingiu as maiores porcentagens de recuperação, os menores valores de DPR. Portanto, esse fluxo foi definido para essa metodologia. Estudos prévios usaram taxas de fluxo mais altas, mas obtiveram taxas de recuperação mais baixas dos analitos-alvo (63 a 83%).^{15,19,22}

Uma das principais características da extração em fase sólida é a possibilidade de realizar uma etapa de extração em conjunto com uma etapa de concentração.²³ Neste estudo, eluímos 100 mL de amostra de água pela coluna contendo a resina para reter o glifosato e o AMPA. Em seguida, 40 mL de fase extratora (solução de HCl a 6 mol L⁻¹) foram eluídos para remover esses analitos. Até essa etapa, o extrato era concentrado 2,5 vezes. Posteriormente, esse volume foi completamente evaporado e ressuspenso na fase móvel. Foram avaliados 100, 200, 300 e 400 μ L da fase móvel para ressuspendar cada resíduo, mas volumes menores que 400 μ L não permitiram a injeção das amostras; então, 400 μ L foram definidos para esta metodologia. Nessa fase, o extrato foi novamente concentrado 100 vezes. Então,

o fator de concentração total do extrato foi de 250 vezes. Em um trabalho anterior, os extratos foram concentrados e ressuspensos com 500 μL de diferentes solventes.^{19,24} Nesses estudos, o fator de concentração foi de 50 e 100 vezes.^{24,25} Desse ponto de vista, podemos dizer que essa é a principal vantagem deste método sobre os outros.

Após otimização dos parâmetros para a extração em fase sólida desses analitos em amostras de água, iniciamos a validação do método de extração.

Validação da metodologia

Neste estudo, a extração em fase sólida (SPE) foi validada, considerando-se os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, efeito matriz, limite de detecção (LQ) e quantificação (LQ), precisão e exatidão.^{16,17}

Seletividade

A SPE mostrou seletividade para o glifosato e o AMPA pela ausência de sinais cromatográficos no mesmo tempo de retenção dos analitos, como pode ser observado nos cromatogramas da Figura 1.

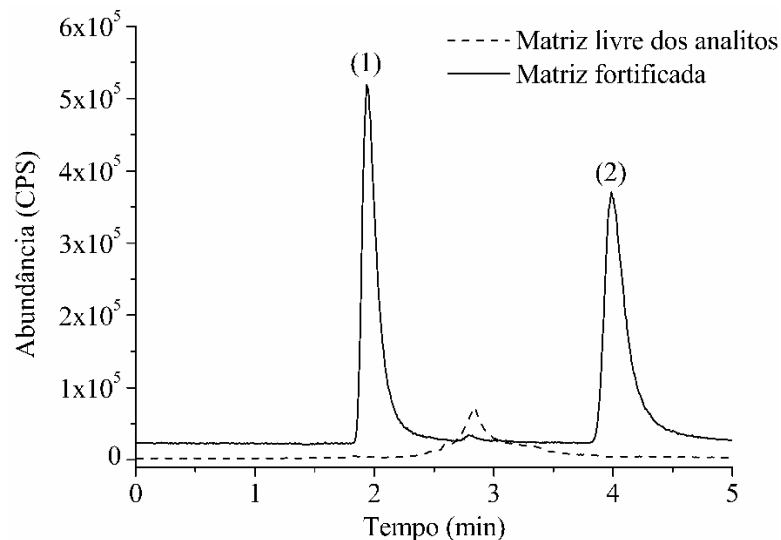


Figura 1. Cromatogramas de extrato de matriz livre de analito e extrato de matriz fortificada com AMPA (composto 1) e glifosato (composto 2) a $300 \mu\text{g L}^{-1}$

Linearidade

A linearidade foi avaliada através de seis níveis de concentração equidistantes, com três repetições independentes para cada nível, sendo o valor do LQ o primeiro nível de cada curva analítica, como pode ser visto na Figura 2. A Tabela 4 mostra os principais resultados do estudo de validação da SPE para extrair glifosato e AMPA a partir de amostras de água.

Tabela 4. Resultados do estudo de validação da SPE do glifosato e AMPA em amostras de água

Analito	Faixa de Linearidade	Equação Linear	R²	LD / µg L⁻¹	LQ / µg L⁻¹
Glifosato	1,09 - 6,54 µg L ⁻¹	Y = 1779,4x - 41499	0,9906	0,44	1,09
AMPA	0,29 - 3,87 µg L ⁻¹	Y = 1787,2x + 49078	0,9918	0,072	0,29

R²: coeficiente de determinação; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação

A linearidade e as faixas de concentração foram consistentes com os estudos de monitoramento desses compostos em matrizes ambientais.²⁶ As replicatas de cada ponto de calibração forneceram informações sobre a variabilidade inerente das medidas de resposta (erro puro). Os parâmetros de regressão linear foram avaliados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e com base na análise dos resíduos de regressão, com exclusão dos valores extremos realizados pelo teste de Jacknife. O diagnóstico desses pontos permitiu remover aqueles que claramente afetavam o ajuste do modelo. Assim, até 22,2% dos dados originais foram excluídos, obtendo-se os resíduos de regressão linear para o glifosato e o AMPA, como pode ser visto na Figura 2 (a e b).

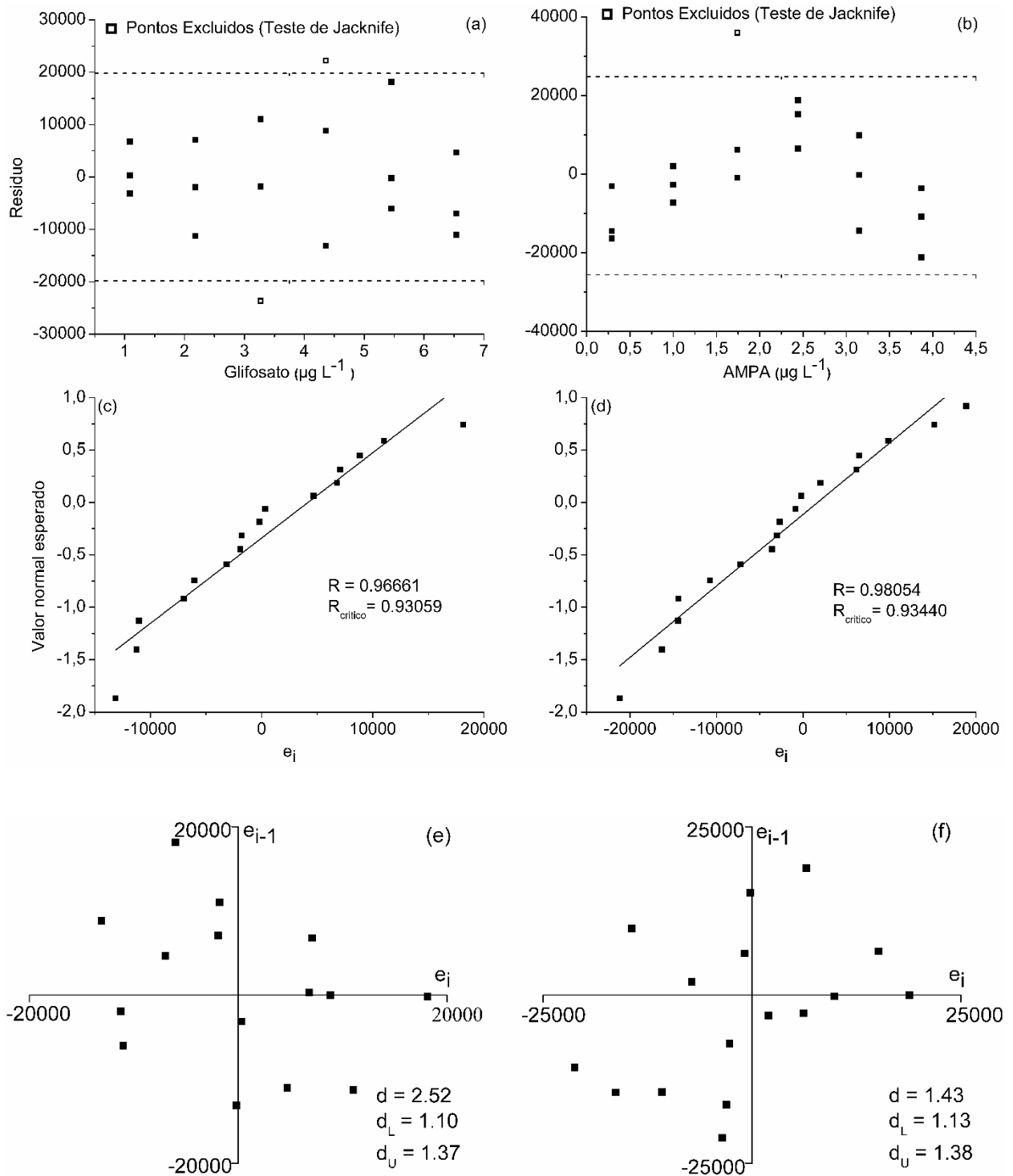


Figura 2. Gráficos obtidos no estudo de linearidade da metodologia SPE. Resíduos de regressão linear para o glifosato (a) e AMPA (b) após a exclusão de valores extremos (teste de Jackknife). Probabilidade normal de resíduos de regressão para glifosato (c) e AMPA (d). Autocorrelação de resíduos de regressão para glifosato (e) e AMPA (f), e_i : resíduo; R: coeficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner; d: estatísticas de Durbin-Watson; d_L : limite crítico inferior; d_U : limite crítico superior.

Após a exclusão dos pontos, o método dos mínimos quadrados ordinários foi aplicado novamente para cada exclusão, obtendo-se os valores de inclinação, interseção e coeficiente de determinação (R^2) mostrados na Tabela 4. Valores de R^2 superiores a 0,99, indicam a variabilidade dos dados coletados pelo modelo de regressão. No entanto, foi necessário avaliar o uso do MMQO por meio de proposições relacionadas aos resíduos da regressão (normalidade, homocedasticidade e independência) e fazer um ajuste ao modelo linear (análise de variância - ANOVA).

Avaliamos a normalidade dos resíduos de regressão pelo teste Ryan-Joiner e os resultados mostraram probabilidade normal para ambos os analitos, como pode ser visto na Figura 2 (c e d). Conseqüentemente, os coeficientes de correlação alcançados foram superiores ao coeficiente de correlação crítico obtido pela interpolação polinomial. Portanto, pode-se concluir que os resíduos seguiram a distribuição normal com um nível de significância de 0,05, permitindo assim o uso de testes de hipóteses que seguem esse tipo de distribuição.

A homocedasticidade dos resíduos de regressão foi investigada pelo teste de Brown-Forsythe, que determina a existência de diferenças entre as variâncias de resíduos através de uma adaptação do teste de Levene. Verificamos que a distribuição dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados foi homogênea, pois os valores de t foram sempre menores que os valores $t_{\text{críticos}}$, confirmando a homocedasticidade.

Nós avaliamos a independência dos resíduos de regressão pelo teste de Durbin-Watson, como pode ser visto na Figura 2 (e) e (f). Os resultados mostraram não haver autocorrelação no nível de significância de 0,05 para ambos os analitos, e o perfil homogêneo e a distribuição aleatória de pontos nos quatro quadrantes confirmam a independência de resíduos.

Os dados foram ajustados ao modelo linear ao longo do intervalo avaliado apresentado na Tabela 4, com regressão significativa e desvio de linearidade não significativo ao nível de significância de 0,05. Portanto, podemos concluir que o MMQO foi adequado para os dados estudados. Este estudo de linearidade seguiu os procedimentos propostos em trabalhos anteriores.²⁷

Efeito de matriz

Para avaliar esse parâmetro, comparamos duas curvas analíticas preparadas em extrato de matriz e solvente (água ultrapura) para cada analito, como mostrado na Figura 3.

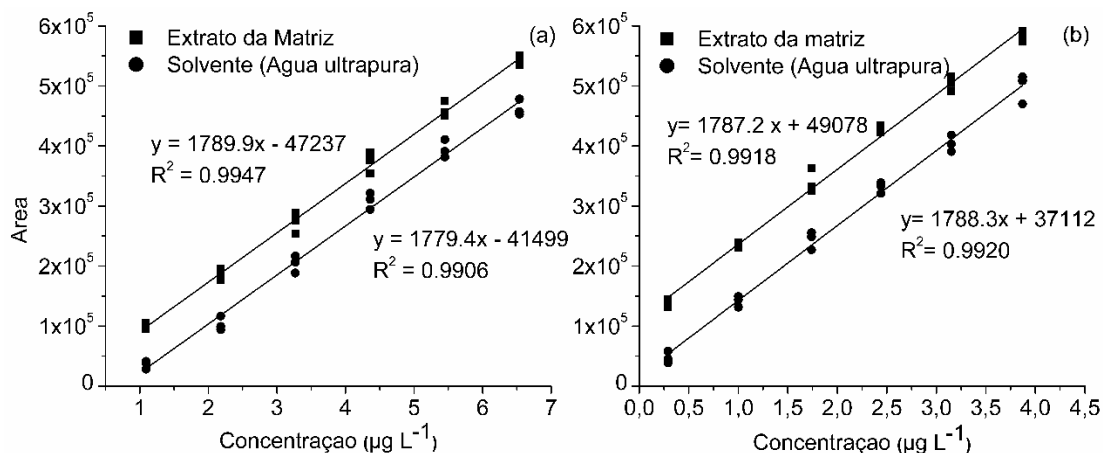


Figura 3. Curva analítica do glifosato e AMPA no extrato da matriz e solvente (água ultrapura), na faixa de concentração de 1,09 a 6,54 $\mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato (a) e 0,29 a 3,87 $\mu\text{g L}^{-1}$ de AMPA (b). R^2 : coeficiente de determinação.

As razões entre os coeficientes angulares obtidos a partir da curva analítica na matriz e no solvente (água ultrapura) foram multiplicadas por 100 e os valores calculados foram de 100,5 e 99,94% para o glifosato e o AMPA, respectivamente. Esses valores revelaram um efeito de matriz não significativo na determinação desses compostos em amostras de água por HPLC-ICP-MS/MS. Em estudos prévios realizados com esses mesmos analitos e matriz foi verificado que o efeito matriz variou de 75 a 95%.²⁸ Desse ponto de vista, podemos dizer que essa é uma vantagem desse método em relação a outros.

Limite de detecção e quantificação

A Tabela 4 mostra os valores LD e LQ para os analitos determinados por HPLC-ICP-MS/MS. Estudo semelhante utilizando HPLC acoplado ao ICP-MS para quantificar o glifosato em amostras de água alcançou o LD de 1,20 $\mu\text{g L}^{-1}$.²⁹ Esse valor está próximo ao LD determinado no presente estudo (0,44 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Os valores da Tabela 4 foram calculados em relação às moléculas de glifosato e AMPA. No entanto, vários trabalhos anteriores calcularam esses valores em relação ao átomo de fósforo presente nessas moléculas. Portanto, os valores de LD encontrados para o glifosato e o AMPA em relação à determinação de fósforo no presente estudo foram de 20 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Trabalhos recentes utilizando um método similar atingiram menor limite de detecção de fósforo total: 0,14 e 0,19 $\mu\text{g L}^{-1}$.¹² Neste trabalho, foi utilizado gás opcional (1% CO_2 em argônio) para efeito de aumento de carbono de até 3 vezes no limite de detecção. Em geral, esse efeito tem sido utilizado para determinação do arsênio e do selênio.³⁰

Os valores de LQ obtidos foram de 1,09 e 0,29 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o glifosato e o AMPA, respectivamente. Da mesma forma, estudos anteriores utilizando o SPE e o HPLC-ICP-DR-MS alcançaram valores de LQ próximos a 42 e 33 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o glifosato e o AMPA, respectivamente.¹¹

Esses valores alcançados em nosso estudo foram muito inferiores aos LMR estabelecidos pela EPA dos EUA ($700 \mu\text{g L}^{-1}$) e pela legislação brasileira ($65 \mu\text{g L}^{-1}$) para água potável, mas superiores aos determinados pela União Européia ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$).^{5,6,31}

Exatidão e precisão

Avaliamos simultaneamente a exatidão e a precisão da metodologia otimizada. Esse parâmetro foi avaliado utilizando-se experimentos de fortificação/recuperação em três níveis de concentração, 1xLQ, 2xLQ e 5xLQ, sob condições de repetibilidade. As médias de porcentagens de recuperação dos analitos da matriz enriquecida e dos desvios-padrão relativos (DPR) são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Porcentagens de recuperação dos analitos do extrato da matriz fortificada e dos desvios-padrão relativos

Analito	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação% \pm DPR (%)
Glifosato	1,09 ^a	98,77 \pm 5,41
	2,18 ^b	94,94 \pm 8,86
	6,54 ^a	95,38 \pm 4,55
AMPA	0,29 ^a	99,30 \pm 0,99
	0,58 ^b	98,33 \pm 9,09
	3,87 ^a	99,78 \pm 2,32

^a média de três repetições; ^b média de sete repetições; DPR: desvio-padrão relativo

A recuperação em três níveis de concentrações foram satisfatórias para ambos os analitos, com valores dentro da faixa recomendada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), que estabelece a faixa de 70 a 120%.¹⁶ Os valores de DPR apresentados na Tabela 5 foram menores que 20%, conforme recomendado pela IUPAC, confirmando a precisão do método.¹⁶

Amostras reais

Após a validação do método de extração em fase sólida, foram analisadas 20 amostras de água de cultivo hidropônico de mudas de eucalipto para verificar a ocorrência do processo de exsudação dos analitos-alvo pelas raízes das mudas.

Em todas as amostras, foi aplicado o SPE otimizado e validado e os extratos obtidos foram analisados por HPLC-ICP-MS/MS, para quantificação de glifosato e AMPA exsudados pelas raízes. Os resultados mostraram que na dose controle 0 L ha^{-1} e dose de tratamento 1 L ha^{-1} , a presença do herbicida na solução nutritiva não foi detectada. Esse resultado indica que a quantidade do herbicida liberada na solução via exsudação não foi suficiente para ser detectada por HPLC-ICP-MS/MS ou a exsudação não ocorreu.

No entanto, em doses nas quais 2, 3 e 4 L ha⁻¹ do herbicida foram aplicados em mudas de eucalipto, quantificamos o glifosato em concentrações de 1,54, 1,46 e 1,38 µg L⁻¹, respectivamente. Esse resultado mostrou que, em doses superiores a 2 L ha⁻¹, ocorreu a exsudação do herbicida pelas raízes das mudas de eucalipto. Esses valores estão acima do valor do LQ do método otimizado neste estudo.

Resultado semelhante foi observado em um trabalho anterior realizado com soja, que detectou resíduos de glifosato e AMPA na solução nutritiva, mostrando que exsudação desse herbicida ocorreu pelas raízes da planta.³² Em outro estudo com clones de eucalipto, a exsudação de raiz foi observada em baixas concentrações, em que menos de 2% do produto foi exsudado pelo sistema radicular da planta.³³

Conclusão

Neste trabalho, a extração em fase sólida acoplada com HPLC-ICP-MS/MS foi mais rápida, mais simples e não exigiu o uso de agentes de derivatização, o que tornou o método econômico. A validação da metodologia possibilitou avaliar as principais figuras de mérito (precisão, exatidão, linearidade, efeito matriz e seletividade) para certificar a confiabilidade dos resultados. Os níveis de detectabilidade encontrados por essa metodologia são similares aos de outras metodologias, principalmente devido ao fator de concentração atingido (250 vezes). Os resultados para amostras reais mostraram que a metodologia foi sensível o suficiente para detectar resíduos de glifosato nas amostras de água do cultivo hidropônico de mudas de eucalipto.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-01429-16), pelo apoio financeiro. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (420637 / 2016-8 e 307381 / 2015-3) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro de bolsas de pesquisa. E à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela infraestrutura fornecida.

Referências

1. Ibañez, M.; Pozo, O. J.; Sancho, J. V.; López, F. J.; Hernández, F.; *J. Chromat. A*, **2005**, *1081*, 145.
2. Huhn, C.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 3041.
3. *Some organophosphate insecticides and herbicides/ IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, vol.112, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, **2015**.
4. CENTNER, T. J.; RUSSELL, L.; Mays, M.; *Sci. Total Environ.* **2019**, *648*, 609. Disponível em: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>. Acesso em: 5 jun. 2019.

6. Council Directive; *Quality of Water Intended for Human Consumption*; Official Journal of the European Communities, Brussels, Belgium, 1998.
7. Gunarathna, S; Gunawardana, B; Jayaweera, M; Manatunge, J; Zoysa, K; *J. Envir. Sci. Health. Part B.* **2018**, [S.I.], 1.
8. Freuze, I.; Jadas-hecart, A.; Royer, A.; Pierre-yves, C.; *J. Chromat. A*, **2007**, 1175, 197.
9. Ramwell, C. T.; Kah, M.; Johnson, P. D.; *Pest manag. Sci*, **2014**, 70, 1823.
10. Guo, Z; Cai. Q; Yang, Z; *J. Chromat. A*. **2005**. 1100. 160.
11. Popp. M; Hann. S; Mentler. A; Fuerhacker. M; Stingeder. G; Koellensperger. G; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 695.
12. Lajin. B; Goessler. W; *Talanta*. **2019**, 196, 357.
13. Sadi, B. B. M.; Vonderheide, A. P.; Caruso, J. A; *J. Chromat. A*, **2004**, 1050, 95.
14. Marek, L. J.; Koskinen, W. C.; *Pest Manag.t Sci*. **2014**, 70, 1158.
15. Abreu, A. B. G.; Matta, M. H. R.; Montagner, E. *Quim. Nova*, **2008**, 31, 5.
16. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 835.
17. Chamkasem. N; Harmon. T; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, 408, 4995.
18. Hoagland, D. R; Arnon, D. I.; *Calif. Agr. Exp.*, **1950**, [S.I.], 347.
19. Ghanem, A; Bados, P; Kerhoas, L; Dubroca, J; Einhorn, J; *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 3794.
20. Corbera, M.; Hidalgo, M.; Salvadó, V.; *Microchimica Acta*, **2006**, 153, 203.
21. Wagner, R., Wetzal, S. J., Kern, J., Kingston, H. S.; *J. Mass Spectr.* **2012**, 47, 147.
22. Patsias, J; Papadopoulou, A; Papadopoulou-mourkidou, E; *J. Chromat. A*, **2001**, 932, 83.
23. Caldas, S. S.; Gonçalves, F. F.; Primel, E. G.; Prestes, O. D.; Martins, M. L.; Zanella, R.; *Quim. Nova* **2011**, 34, 1604.
24. Toss, V; Leito, I; Yurchenko, S; Freiberg, R; Krueve, A; *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2017**, 24, 7880.
25. Claude, B.; Berho, C.; Bayoudh, S.; Amalric, L.; Coisy, E.; Nehmé, R.; Morin, P.; *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, 24, 12293.
26. Okada. E; Coggan. T; Anumol. T; Clarke. B; Allinson. G; *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 411, 715.
27. Souza, S. V.; Junqueira, R. G.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, 552, 25.
28. Aparicio, V. C.; Gerónimo, E.; Marino, D.; Primost, J.; Carriquiriborde, P.; Costa, J. L.; *Chemosphere* **2013**, 93, 1866.
29. Guo, Z.; Cai, Q.; Yang, Z.; *Rapid Commun. Mass. Spectro.* **2007**, 21, 1606.
30. Kovačević, M.; Goessler, W.; Mikac, N., Veber, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 383, 145.

31. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>, acessado em junho 2019.
32. Berman, M. C.; Marino, D. J. G.; Quiroga, M. V.; Zagarese, H.; *Chemosphere* **2018**, *200*, 513.
33. Machado, A. F. L.; Ferreira, L. R.; Santos, L. D. T.; Santos, J. B.; Ferreira, F.A.; Viana, R. G. *Plant. Daninha* **2009**, *27*, 549.