

EMANUELLA MESQUITA PIMENTA

**EXTRAÇÃO DE GLIFOSATO E ÁCIDO
AMINOMETILFOSFÔNICO DA MADEIRA DE EUCALIPTO
E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC-ICP-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Vegetal, área de concentração em Produção Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério

Montes Claros – MG

2016

P644e
2016

Pimenta, Emanuella Mesquita.

Extração de glifosato e ácido aminometilfosfônico da madeira de eucalipto e quantificação por HPLC-ICP-MS/MS / Emanuella Mesquita Pimenta. Montes Claros (MG): Instituto de Ciências Agrárias/UFMG, 2016.

119 f.: il.

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

Orientador: Prof. Flaviano Oliveira Silvério.

Banca examinadora: Gevany Paulino de Pinho, Ulisses Alves Pereira, Fábio Ferreira da Silva, Flaviano Oliveira Silvério.

Inclui referências: f. 98-110.

1. Glifosato. 2. Eucalipto. 3. HPLC-ICP-MS/MS. I. Silvério, Flaviano Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 632.154

EMANUELLA MESQUITA PIMENTA

**EXTRAÇÃO DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO DA
MADEIRA DE EUCALIPTO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC-ICP-MS/MS**

Professor Flaviano Oliveira Silvério
Orientador (ICA/UFMG)

Aprovada em 01 de dezembro de 2016.

Montes Claros – MG
2016

AGRADECIMENTOS

A Deus que está sempre presente em todos os momentos da minha vida guiando os meus passos e mostrando o melhor caminho a seguir. Aquele que nas horas difíceis proporciona descanso e alívio para minha alma.

Aos meus orientadores, o professor Flaviano Oliveira Silvério e à professora Gevany Paulino de Pinho pela atenção em todos os momentos e pela confiança demonstrada ao longo deste trabalho.

Aos órgãos de fomento à pesquisa FINEP, CAPES, CNPq e FAPEMIG pela concessão de bolsas e suporte financeiro deste trabalho e de outros desenvolvidos neste centro de pesquisa. À Universidade Federal de Minas Gerais pela infraestrutura disponibilizada.

À equipe da Agilent Technologies, em especial Fábio Silva, pela partilha de experiências e inestimável incentivo e apoio.

À coordenação e aos professores da pós-graduação, pelos ensinamentos e pela disponibilidade em resolver quaisquer problemas.

A todos os amigos do laboratório de química LPA pelo apoio, amizade e convivência. Em especial Ane, Érica e Najara pela paciência, confiança e partilha das dificuldades e conquistas.

Aos meus pais, pelos ensinamentos, cuidados, incentivo e confiança. E à minha irmã, pelo companheirismo, amizade, carinho, brincadeiras e confidências.

Ao meu namorado André, pelo amor, paciência e apoio em todos os momentos.

Por fim, a todos aqueles que colaboraram direta e indiretamente na conclusão deste trabalho. Palavras nunca serão suficientes para expressar toda a minha alegria e gratidão neste momento.

MUITO OBRIGADA!

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

Albert Einstein

RESUMO

O glifosato é um herbicida organofosforado pós-emergente não seletivo, que pode ser absorvido pelas folhas e translocado por toda a planta. Devido à sua alta eficiência, é o principal herbicida utilizado no mundo e, por isso, alvo de diversas pesquisas. Entretanto escassas são as metodologias de detecção desse composto em eucalipto. Por isso, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver e validar uma técnica para extrair o glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) do lenho do eucalipto e analisar por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS/MS). As etapas do trabalho consistiram em: (i) comparar as técnicas de cromatografia gasosa (GC-MS e GC-NPD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD e HPLC-ICP-MS/MS), na quantificação de glifosato e AMPA; (ii) estabelecer as condições ótimas para analisar glifosato e o seu metabólito por HPLC-ICP-MS/MS; (iii) desenvolver uma metodologia de extração desses compostos em amostras de lenho de eucalipto e (iv) validar o método otimizado realizando os testes estatísticos exigidos para confirmação das figuras de mérito: linearidade, seletividade, limite de detecção e quantificação, efeito de matriz, precisão e exatidão. Para o estudo dos sistemas cromatográficos, foram avaliados parâmetros como: seletividade, linearidade e limite de detecção (LD). A linearidade foi confirmada para todas as técnicas investigadas com coeficiente de determinação (R^2) superiores a 0,99 nas faixas de concentração estudadas. Foi observada seletividade em todos os sistemas cromatográficos avaliados, com boa resolução dos cromatogramas e separação dos compostos em menos de 5 minutos por HPLC-ICP-MS/MS e maior tempo de análise (20 minutos) obtido por HPLC-DAD. Neste estudo, o HPLC-ICP-MS/MS foi considerada a técnica mais adequada para a quantificação de glifosato e AMPA. O método de extração proposto consistiu na adição de 5 mL de água ultrapura com pH = 11, em 0,5g de amostra, com agitação em vórtex por 60 segundos e centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm. O extrato foi concentrado e reconstituído com solução tampão de 50 mM ácido acético/acetato de amônio: 5 mM tetrabutilamônio: 1% metanol (pH=4,7) e injetado no HPLC-ICP-MS/MS. A separação dos compostos foi satisfatória com tempo total de análise menor que 5 minutos. Foi obtida recuperação média de 72% (DPR \pm 4,08) para o glifosato e acima de 100% para o AMPA. Esse valor elevado na recuperação do AMPA foi ocasionado por interferentes observados no mesmo tempo de retenção que o analito e, para removê-lo, foram estudados dois métodos de limpeza dos extratos. O método foi seletivo e linear para o glifosato, com limite de detecção de 0,82 mg kg⁻¹ e limite de quantificação de 2,72 mg kg⁻¹, abaixo dos limites máximos de resíduos definidos para soja (10 mg kg⁻¹) e algodão (3 mg kg⁻¹). O método apresenta potencial para quantificação de glifosato e AMPA em lenho de eucalipto, porém foi observada baixa precisão e exatidão, sendo necessários estudos futuros para a limpeza dos extratos e minimização do efeito de matriz.

Palavras-Chave: Glifosato. HPLC-ICP-MS/MS. Eucalipto. Lenho. Especificação.

ABSTRACT

Glyphosate is a non-selective post-emergent organophosphate herbicide that can be absorbed by leaves and translocated throughout the plant. Due to its high efficiency, it is the main herbicide used in the world and therefore the target of several researches. However, scarce are the methodologies of detection of this compound in eucalyptus. Because of it, the objective of this research was to develop and validate a technique to extract the glyphosate and the aminomethylphosphonic acid (AMPA) from the eucalyptus wood and to analyze by high performance liquid chromatography coupled to the triple quadrupole mass spectrometer with inductively coupled plasma (HPLC-ICP - MS / MS). The steps of the work consisted in (i) comparing gas chromatography techniques (GC-MS and GC-NPD) and high performance liquid chromatography (HPLC-DAD and HPLC-ICP-MS / MS) in the quantification of glyphosate and AMPA; (ii) to establish the optimal conditions to analyze glyphosate and its metabolite by HPLC-ICP-MS / MS; (iii) to develop a methodology for the extraction of these compounds in samples of eucalyptus wood and (iv) to validate the optimized method by performing the statistical tests required to confirmation of the merit figures: linearity, selectivity, limit of detection and quantification, matrix effect, precision and accuracy. For the study of the chromatographic systems were evaluated parameters such as selectivity, linearity and limit of detection (LD). Linearity was confirmed for all the techniques investigated with determination coefficient (R^2) higher than 0.99 in the concentration ranges studied. It was observed selectivity in all chromatographic systems evaluated, with good resolution of the chromatograms and separation of the compounds in less than 5 minutes by HPLC-ICP-MS / MS and longer analysis time (20 minutes) obtained by HPLC-DAD. In this study, the HPLC-ICP-MS / MS was considered the most adequate technique for quantification of glyphosate and AMPA. The proposed extraction method consisted of the addition of 5 mL of ultrapure water with pH = 11 in 0.5 g of sample with vortexing for 60 seconds and centrifugation for 10 minutes at 4000 rpm. The extract was concentrated and reconstituted with buffer solution of 50 mM acetic acid / ammonium acetate: 5 mM tetrabutylammonium: 1% methanol (pH = 4.7) and injected into HPLC-ICP-MS / MS. Separation of the compounds was satisfactory with total analysis time less than 5 minutes. An average recovery of 72% ($DPR \pm 4.08$) was obtained for glyphosate and above 100% for AMPA. This high value in AMPA recovery was caused by interferences observed at the same retention time of the analyte and to remove it, two methods of cleaning the extracts were studied. The method was selective and linear for glyphosate, with a detection limit of 0.82 mg kg^{-1} and a quantification limit of 2.72 mg kg^{-1} , below the maximum residue limits defined for soybean (10 mg kg^{-1}) and cotton (3 mg kg^{-1}). The method presents potential for quantification of glyphosate and AMPA in eucalyptus wood, however, it was observed low precision and accuracy, and future studies are necessary to the cleaning the extracts and minimization of the matrix effect.

Key words: Glyphosate. HPLC-ICP-MS / MS. Eucalyptus. Wood. Speciation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	–	Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	–	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSTFA	–	<i>N,O</i> -bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
CONAMA	–	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAD	–	Detector de arranjo de diodos
EUA	–	Estados Unidos da América
FMOC-CI	–	Cloroformiato de 9-fluorenilmetila
GC	–	Cromatografia gasosa
GLI	–	Glifosato
HPLC	–	Cromatografia líquida de alta eficiência
IARC	–	International Agency for Research on Cancer
IBAMA	–	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICP-MS/MS	–	Inductively Coupled Plasma Tandem Mass Spectrometry
LD	–	Limite de detecção
LMR	–	Limite máximo de resíduo
LQ	–	Limite de quantificação
MAPA	–	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	–	Espectrômetro de massas
NPD	–	Detector de nitrogênio e fósforo
SIM	–	Monitoramento de íons seletivos
SINDAG	–	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
TFAA	–	Ácido trifluoroacético anidro
TFE	–	Trifluoroetanol
TIC	–	Monitoramento de íons totais
TMCS	–	Trimetilsililclorosilano
US EPA	–	United States Environmental Protection Agency
UV-Vis	–	Ultravioleta - Visível

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 -	REFERENCIAL TEÓRICO	
Figura 1 -	Estruturas químicas do glifosato e do ácido aminometilfosfônico.....	20
Figura 2 -	Estruturas químicas e ionização do glifosato (GLI) e AMPA.....	21
Figura 3 -	Fotografia de folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> expostas à deriva de diferentes formulações de glifosato (129.6 g ha ⁻¹), 14 dias após a aplicação. A. Tratamento controle. B. Cloroses (Cl). C. Necroses marginais e intervenais (Ne). D. Necrose na base da folha. Barras = 25 mm.....	27
CAPÍTULO 2 -	ESTUDO COMPARATIVO DE QUATRO DETECTORES CROMATOGRÁFICOS PARA ANÁLISE DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA)	
Figura 1 -	Reação de derivatização de glifosato (GLI) e AMPA com BSTFA e piridina produzindo os respectivos compostos derivatizados.....	48
Figura 2 -	Cromatogramas obtidos dos padrões derivatizados glifosato (GLI) e AMPA (A) 10 mg L ⁻¹ análise por GC-MS modo TIC e (B) 40 µg L ⁻¹ análise por GC-MS modo SIM.....	50
Figura 3 -	Cromatograma obtido dos padrões derivatizados de glifosato (GLI) e AMPA na concentração de 40 mg L ⁻¹ por GC-NPD.....	51

Figura 4 -	Reação de derivatização do glifosato (GLI) e AMPA com FMOCCl produzindo os respectivos compostos derivatizados.....	52
Figura 5 -	Cromatogramas obtidos dos padrões derivatizados de glifosato (GLI) e AMPA a 6 mg L^{-1} das análises por HPLC-DAD nos comprimentos de onda de 250 nm (A), 260 nm (B) e 264 nm (C).....	54
Figura 6 -	Cromatograma obtido da análise simultânea dos padrões de glifosato (GLI) e AMPA a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (de fósforo) por HPLC-ICP-MS/MS.....	56
Figura 7 -	Curvas de calibração dos analitos glifosato (GLI) e AMPA obtidas por GC-MS modo TIC, GC-MS modo SIM e GC-NPD nas faixas de concentração estudadas, com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2).....	61
Figura 8 -	Curvas de calibração dos analitos glifosato (GLI) e AMPA obtidas por HPLC-ICP-MS/MS e HPLC-DAD nas faixas de concentração estudadas, com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2).....	62
CAPÍTULO 3 -	ESTUDO DO pH NA EXTRAÇÃO DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) EM LENHO DE EUCALIPTO E ESPECIAÇÃO POR HPLC-ICP-MS/MS	
Figura 1 -	Fotografia do lenho de eucalipto moído e peneirado em tamis com tela de 32 mesh.....	71
Figura 2 -	Esquema do modo de deslocamento de massa utilizando célula de gás oxigênio para a medição de P.....	74

Figura 3 -	Esquema do processo de extração e análise por HPLC-ICP-MS/MS.....	75
Figura 4 -	Cromatograma obtido da quantificação do P ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) proveniente das moléculas de glifosato (GLI) e AMPA (soluções padrão em tampão acetato (pH=4,7)) em análise por HPLC-ICP-MS/MS.....	81
Figura 5 -	Gráficos das variações médias dos valores de pH das amostras durante o processo de extração.....	82
Figura 6 -	Médias das porcentagens de recuperação de glifosato (GLI) e AMPA e desvios padrões relativos.....	85
Figura 7 -	Cromatograma obtido do extrato da matriz isento dos analitos de interesse sem ampliação (esquerda) e ampliação (direita).....	86
Figura 8 -	Cromatograma do extrato da matriz sem remoção do fosfato (A) e extrato fortificado submetido à remoção do fosfato (B).....	87
Figura 9 -	Cromatogramas obtidos do extrato branco da matriz (A) e dos padrões na matriz (B) sem <i>clean up</i> com resina aniônica. Extratos branco (C) e adicionados de padrão (D) após <i>clean up</i> com resina aniônica.....	89
Figura 10 -	Cromatogramas obtidos do extrato da matriz isento dos analitos de interesse (branco) e do extrato da matriz fortificado com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo presentes nas moléculas de glifosato (GLI) e AMPA.....	90

Figura 11 -	Representação gráfica dos testes de valores extremos (Jackknife), normalidade (Ryan-Joiner) e independência (Durbin-Watson). Curvas de calibração em matriz e solvente com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2).....	92
Figura 12 -	Curvas analíticas obtidas das soluções de 50 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo presente na molécula do glifosato (GLI) em solvente e na matriz. Respectivas equações da reta e coeficientes de determinação (R^2).....	94

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 -	REFERENCIAL TEÓRICO	
Tabela 1 -	Classificação ambiental dos agrotóxicos segundo a Portaria Normativa nº 84 do IBAMA.....	19
Tabela 2 -	Limites máximos de resíduos (LMR) para o herbicida glifosato definidos pela ANVISA no Brasil.....	24
Tabela 3 -	Determinação de glifosato e AMPA em amostras de água.....	30
Tabela 4 -	Determinação de glifosato e AMPA em amostras de solo e vegetais.....	31
CAPÍTULO 2 -	ESTUDO COMPARATIVO DE QUATRO DETECTORES CROMATOGRÁFICOS PARA ANÁLISE DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA)	
Tabela 1 -	Condições de operação otimizadas do HPLC-ICP-MS/MS.....	44
Tabela 2 -	Concentrações analisadas para obtenção das curvas analíticas e estudo da linearidade de resposta dos detectores nas análises de glifosato e AMPA.....	47
Tabela 3 -	Comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas por HPLC-DAD em 250 nm, 260 nm e 264 nm para glifosato e AMPA.....	55
Tabela 4 -	Dados das curvas analíticas e LD para glifosato (GLI) e AMPA.....	57

Tabela 5 -	Representação da homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão das curvas do glifosato e AMPA nos sistemas cromatográficos investigados pelo teste de Levene modificado.....	59
Tabela 6 -	Estatísticas da análise de variância da regressão para as curvas do glifosato e AMPA nos sistemas cromatográficos investigados.....	59
Tabela 7 -	Comparação das características gerais dos sistemas cromatográficos estudados para análise de glifosato e AMPA.....	66
CAPÍTULO 3 -	ESTUDO DO pH NA EXTRAÇÃO DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) EM LENHO DE EUCALIPTO E ESPECIAÇÃO POR HPLC-ICP-MS/MS	
Tabela 1 -	Ensaio realizado para a redução ou remoção do fosfato das amostras.....	77
Tabela 2 -	Precisão e exatidão para determinação de glifosato e AMPA.....	95

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
1.1.INTRODUÇÃO.....	16
1.2. Revisão de literatura.....	18
1.2.1. Defensivos agrícolas: uma visão geral.....	18
1.2.2. O herbicida glifosato.....	20
1.2.3. Toxicidade do glifosato e legislação.....	22
1.2.4. Uso do glifosato na silvicultura.....	25
1.2.5.Métodos de extração e análise de glifosato e ácido aminometilfosfônico.....	28
1.2.5.1. Cromatografia líquida e cromatografia gasosa na quantificação de glifosato e ampa.....	32
1.2.5.2. Detectores cromatográficos empregados nas análises de glifosato e ampa.....	33
1.2.6. Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado.....	34
1.3. OBJETIVOS.....	37
1.3.1. Objetivo geral.....	37
1.3.2. Objetivos específicos.....	37
CAPÍTULO 2 - ESTUDO COMPARATIVO DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO.....	38
2.1.INTRODUÇÃO.....	39
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.2.1. Reagentes e soluções.....	41
2.2.2. Instrumentação e condições cromatográficas.....	41
2.2.3. Cromatógrafo a gás acoplado ao detector espectrômetro de massas (GC-MS).....	42
2.2.4. Cromatógrafo a gás acoplado ao detector de nitrogênio e fósforo (GC-NPD).....	42

2.2.5. Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).....	43
2.2.6. Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector espectrômetro de massas triplo quadrupolo por plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS/MS).....	43
2.2.7. Derivatização.....	45
2.2.8. Curvas analíticas e linearidade.....	46
2.2.9. Limite de detecção.....	47
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
2.3.1. Análises por cromatografia gasosa.....	48
2.3.1.1. Derivatização.....	48
2.3.1.2. GC-MS.....	49
2.3.1.2.1. Monitoramento de íons totais.....	49
2.3.1.2.2. Monitoramento de íons selecionados.....	49
2.3.1.3. GC-NPD.....	51
2.3.2. Análises por cromatografia líquida.....	52
2.3.2.1. Derivatização.....	52
2.3.2.2. HPLC-DAD.....	53
2.3.2.3. HPLC-ICP-MS/MS.....	55
2.3.3. Comparação dos sistemas cromatográficos investigados.....	57
2.4. CONCLUSÃO.....	67

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DO PH NA EXTRAÇÃO DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) EM LENHO DE EUCALIPTO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC-ICP-MS/MS.....	68
3.1. INTRODUÇÃO.....	69
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	71
3.2.1. Amostras.....	71
3.2.2. Reagentes e soluções.....	71
3.2.3. Instrumentação.....	72
3.2.4. Especificação do fósforo na análise de glifosato e ampa por HPLC-ICP-MS/MS.....	73

3.2.5. Estudo do ph para extração de glifosato e ampa em lenho de eucalipto.....	74
3.2.6. Limpeza dos extratos.....	76
3.2.6.1. Estudo da remoção do fosfato (PO_4^{3-}).....	76
3.2.6.2. Clean up com resina aniônica.....	77
3.2.7. Validação do método.....	78
3.2.7.1. Seletividade.....	78
3.2.7.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	78
3.2.7.3. Linearidade e efeito de matriz.....	78
3.2.7.4. Precisão e exatidão.....	79
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
3.3.1. Especificação do fósforo na análise de glifosato e ampa por HPLC-ICP-MS/MS.....	80
3.3.2. Estudo do ph para extração de glifosato e ampa em lenho de eucalipto.....	81
3.3.3. Limpeza dos extratos.....	86
3.3.3.1. Estudo da remoção do fosfato (PO_4^{3-}).....	86
3.3.3.2. Clean up com resina aniônica.....	88
3.3.4. Validação do método.....	89
3.3.4.1. Seletividade.....	89
3.3.4.2. Limites de detecção e limite de quantificação.....	90
3.3.4.3. Linearidade e efeito de matriz.....	91
3.3.4.4. Precisão e exatidão.....	95
3.4. CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS.....	98
APÊNDICE A – AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE: GRÁFICOS DOS TESTES DAS PREMISSAS PARA USO APROPRIADO DO MMQO.....	111

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. INTRODUÇÃO

Em práticas agrícolas, os herbicidas são utilizados na eliminação de plantas competidoras nos primeiros anos do desenvolvimento de uma cultura. A demanda por esses produtos tem aumentado ao longo dos anos, devido ao constante desenvolvimento da agricultura, tornando-se necessário conhecer os comportamentos e efeitos desses compostos no ambiente.

O glifosato (*N*-fosfonometilglicina) é um herbicida não seletivo, sistêmico e pós-emergente e o seu uso tornou-se amplamente difundido no mundo devido à sua toxicidade relativamente baixa (BOTERO-COY *et al.*, 2013). Nas culturas, é comumente pulverizado, sendo absorvido pelas folhas e caulículos novos e translocado para todas as partes da planta (AMARANTE JÚNIOR *et al.*, 2002b). Tem como principal metabólito o ácido aminometilfosfônico (AMPA), gerado na degradação da molécula de glifosato (BERNAL *et al.*, 2012). Na planta, atua no ciclo do ácido chiquímico inibindo a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), afetando a produção de aminoácidos aromáticos essenciais, os quais são precursores de compostos importantes para as plantas, como a lignina, flavonoides e ácidos benzoicos (DIMITRAKOPOULOS *et al.*, 2010).

O glifosato é aplicado no controle de plantas daninhas em diferentes culturas, como ameixa, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, maçã, milho, nectarina, pastagens, pêra, pêssego, seringueira, algodão, arroz, soja, trigo, uva e em florestas de pinus e eucalipto (ANVISA, 2003). Assim como nas culturas agrícolas, o eucalipto também pode ser prejudicado, principalmente em seus estádios iniciais, pela presença das plantas daninhas que se desenvolvem nas áreas cultivadas. O manejo inadequado dessas plantas pode acarretar em perdas da produção, sendo a estratégia mais utilizada para o controle a aplicação do glifosato (PEREIRA *et al.*, 2013).

Apesar de ser considerado um agrotóxico de baixa toxicidade, a *International Agency for Research on Cancer* o classifica como um provável

agente carcinogênico para humanos (WHO, 2015). Dessa forma, é possível que o uso generalizado do glifosato seja responsável pela contaminação ambiental e humana, tornando necessário o desenvolvimento de métodos sensíveis e eficientes para o monitoramento desse herbicida em diversas culturas.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. Defensivos agrícolas: uma visão geral

A primeira legislação criada para regular os usos dos defensivos agrícolas no Brasil data de 1934, o Decreto nº 24.114 (REBELO *et al.*, 2009). Atualmente, a referência legal mais importante para o uso de defensivos agrícolas no país é a Lei nº 7802/89, regulamentada pelo Decreto nº 4074/02, a qual aborda um amplo espectro de temas relacionados aos defensivos agrícolas como registro, comercialização, fiscalização, disposição final de embalagens, entre outros. Essa legislação ainda define os defensivos agrícolas e afins como: “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”.

O Ministério do Meio Ambiente divide os defensivos agrícolas em duas classes, (a) os agrícolas: aplicados em pastagens, produtos agrícolas e florestas plantadas e (b) os não agrícolas: utilizados em florestas nativas, ambientes hídricos, ambientes urbanos, domiciliares e industriais (BRASIL, [20--]). Quanto à diversidade de uso dos defensivos agrícolas, são classificados em relação ao modo de ação de cada produto, podendo agir contra plantas (herbicidas), insetos (inseticidas), fungos (fungicidas), microrganismos de solo (nematicidas), moluscos (moluscicidas), entre outros (REBELO *et al.*, 2009).

No Brasil, os defensivos agrícolas recebem ainda uma classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental, por meio da Portaria Normativa nº 84 do IBAMA (1996). Para dividi-los em classes (TABELA 1), o documento avalia parâmetros como bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico. Os principais órgãos que fiscalizam e registram esses

produtos no país são a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

Tabela 1 - Classificação ambiental dos agrotóxicos segundo a Portaria Normativa nº 84 do IBAMA

Classe I	Produto Altamente Perigoso
Classe II	Produto Muito Perigoso
Classe III	Produto Perigoso
Classe IV	Produto Pouco Perigoso

Fonte: Elaborado pela autora.

Em 2008, o Brasil assumiu o posto de maior mercado consumidor de defensivos agrícolas do mundo (REBELO *et al.*, 2009). Segundo levantamento feito pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), as vendas de defensivos agrícolas somaram US\$ 7,125 bilhões e dentre as classes desses produtos, os herbicidas representaram o maior uso, respondendo por 3,200 milhões de toneladas, sendo esse valor correspondente a 44,9 % do consumo (TECNOLOGIA..., 2009).

O uso em larga escala de defensivos agrícolas no Brasil começou nos anos 1970, e, até o final dos anos 1980, as preocupações com esses produtos em relação à presença e/ou contaminação do solo e da água, tanto superficial quanto subterrânea, eram praticamente inexistentes (GOMES; BARIZON, 2014). Com o crescimento da produção agrícola e destaque no cenário mundial, torna-se necessário o monitoramento e a avaliação dos impactos do uso dessas substâncias no país, a fim de proporcionar a sustentabilidade dos sistemas de produção agropecuários que utilizam esses insumos.

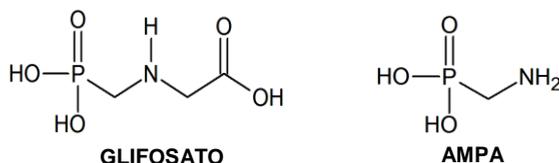
Sabe-se que uma quantidade considerável de defensivos agrícolas utilizados para fins agrícolas atinge rios, lagos, aquíferos e oceanos por meio do transporte desse material por correntes atmosféricas, eliminação incorreta

do produto, limpeza de acessórios e recipientes e o carregamento pela ação erosiva da chuva (CALDAS *et al.*, 2011). Os defensivos agrícolas, em geral, são tóxicos e podem causar problemas em menor ou maior grau de periculosidade. Geram consequências como contaminação de solos e corpos d'água, redução da biodiversidade de ecossistemas e da população microbiana do solo, mudanças em relações ecológicas importantes e prejuízos à saúde humana. Portanto, é importante conhecer o comportamento ambiental desses produtos em diferentes culturas.

1.2.2. O herbicida glifosato

O glifosato [N-(fosfonometil)glicina] tem fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (MM = 169,1 g mol⁻¹) e, na forma de sal de isopropilamônio, apresenta-se acrescido do grupo $(CH_3)_2CHNH_3^+$ (MM = 228,2 g mol⁻¹) (AMARANTE JÚNIOR *et al.*, 2002b). Foi desenvolvido como herbicida para uso agrícola pela Monsanto no início dos anos 1970 e apresenta elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas (WOODBURN, 2000). É um herbicida organofosforado pós-emergente não seletivo, o qual é absorvido pelas folhas e tecidos verdes e translocado, preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos (GALLI; MONTEZUMA, 2005). Imobiliza-se no solo por meio de coloides e, quando sofre degradação por microrganismos, transforma-se em produtos inofensivos (DANIELE *et al.*, 1997). Microorganismos são os principais responsáveis pela degradação do glifosato no solo e, quando ocorre a clivagem das moléculas, é produzido o ácido aminometilfosfônico, seu principal metabólito secundário (BERNAL *et al.*, 2012). As estruturas do glifosato e AMPA estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1 – Estruturas químicas do glifosato e do ácido aminometilfosfônico

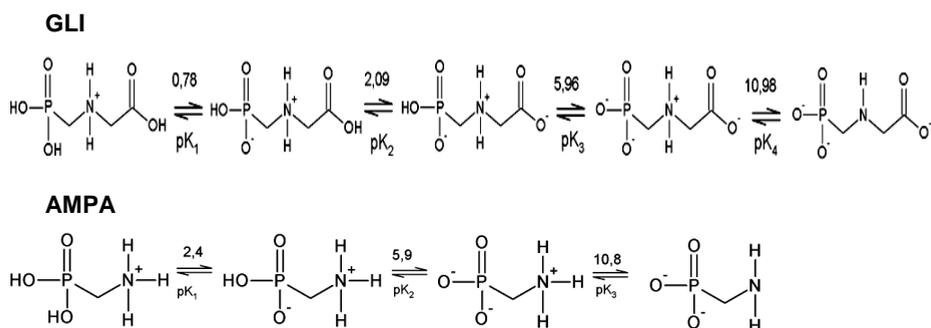


Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Na planta, o glifosato atua no ciclo do ácido chiquímico inibindo a ação da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, afetando a síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais, fenilalanina, tirosina e triptofano, precursores de outros produtos, como lignina, alcaloides, flavonoides e ácidos benzoicos. Isso leva ao amarelecimento dos meristemas, necrose e morte da planta em dias ou semanas (ABREU, MATTA, MONTAGNER, 2008). Essa eficiência do glifosato como um herbicida pode estar relacionada à pequena massa molecular e à alta solubilidade em água, conferindo ao composto uma rápida absorção e translocação pelos tecidos das plantas (ANADÓN *et al.*, 2009).

O glifosato e o AMPA são polares e apresentam semelhanças em suas estruturas químicas. Ambos 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). São ainda anfotéricos, não voláteis, e não possuem grupos cromóforos ou fluoróforos. O glifosato apresenta quatro valores de pKa, enquanto o AMPA possui três (FIGURA 2). Essas propriedades químicas dificultam a detecção desses compostos, especialmente em níveis de resíduos em matrizes ambientais (CHEN *et al.*, 2013).

Figura 2 – Estruturas químicas e ionização do glifosato (GLI) e AMPA



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Por apresentar o grupo fosfonato, o glifosato tem a habilidade de formar complexos estáveis com metais (BARJA; HERSZAGE; AFONSO, 2001). O herbicida também possui os grupos funcionais amino e carboxilato, que podem se coordenar fortemente com íons metálicos, principalmente com os de transição em pH próximo ao neutro, onde os grupos carboxilato e fosfonato estão desprotonados (COUTINHO; MAZO, 2005).

1.2.3. Toxicidade do glifosato e legislação

A toxicidade relativamente baixa do glifosato pode ser relacionada ao modo de ação do composto nas plantas em um caminho metabólico, denominado mecanismo do ácido chiquímico, semelhante ao existente em alguns micro-organismos mais complexos, não existindo, entretanto, em animais. Porém, já foi verificado que o glifosato pode prejudicar algumas funções enzimáticas nos animais. Pois, quando injetado no abdômen de ratos, ocasionou redução na atividade de algumas enzimas (AMARANTE *et al.*, 2002b).

Em seres humanos, são citados entre os efeitos agudo e crônico: dermatite de contato e síndrome tóxica após a ingestão de doses elevadas, epigastralgia, ulceração ou lesão de mucosa gástrica, hipertermia, anúria, oligúria, hipotensão, conjuntivite, edema orbital, choque cardiogênico, arritmias cardíacas, edema pulmonar não carcinogênico, pneumonite, necrose tubular aguda, elevação de enzimas hepáticas, aumento da quantidade de leucócitos, acidose metabólica e hipercalemia (AMARANTE *et al.*, 2002b).

Em 1985, a *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) classificou o glifosato como um agente possivelmente cancerígeno para os seres humanos, enquadrando-o no Grupo C. Pouco tempo depois, em 1991, após estudos de reavaliação com ratos, a US EPA alterou a classificação do glifosato para não carcinogênico aos seres humanos, reduzindo-o de categoria para o Grupo E (WHO, 2015). Porém, em 2015, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) publicou um documento reconhecendo a carcinogenicidade de cinco agrotóxicos, entre eles o

glifosato, enquadrando-os em dois grupos distintos: 2A (provavelmente carcinogênicos para humanos) e 2B (possivelmente carcinogênicos para humanos). O glifosato foi classificado no Grupo 2A, sendo essa categoria utilizada quando existe uma evidência limitada de carcinogenicidade em humanos e provas experimentais suficientes de carcinogenicidade em animais. Evidência limitada significa que uma associação positiva foi observada entre a exposição ao agente causador e o câncer (WHO, 2015).

No Brasil, o IBAMA classifica o glifosato como medianamente tóxico a pouco tóxico (classes III e IV), sendo considerado danoso ao meio ambiente. Apesar do glifosato e AMPA apresentarem baixa persistência no ambiente, podem ser transferidos por meio do solo, dos rios, das águas subterrâneas ou dos reservatórios de água destinados à alimentação e ao consumo humano (DIMITRAKOPOULOS *et al.*, 2010). No país, os limites permitidos de glifosato em amostras ambientais são definidos para água doce entre $65 \mu\text{g L}^{-1}$ e $280 \mu\text{g L}^{-1}$, dependendo da classificação do curso d'água (BRASIL, 2005). Para águas subterrâneas, são estabelecidos limites de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ quando utilizada para o consumo humano, $280 \mu\text{g L}^{-1}$ para dessedentação de animais, $0,13$; $0,06$ e $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ para irrigação, $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para recreação (BRASIL, 2008). Já a US EPA estabelece limite de $700 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato em água potável, enquanto, na Europa, o nível tolerado é de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Essa discrepância entre os níveis admissíveis americanos e europeus é devido a diferenças políticas. Na Europa, $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ é o limite máximo tolerável definido para todos os pesticidas, enquanto o limite de $700 \mu\text{g L}^{-1}$ para os EUA baseia-se em testes de toxicidade apenas sobre o glifosato (BORGGAARD; GIMSING, 2008).

A ANVISA reconhece a aplicação de glifosato em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, coco, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagem, pêra, pêssego, seringueira, soja, trigo e uva. Reconhece, ainda, como maturador de cana-de-açúcar, na eliminação de soqueira no cultivo de arroz e cana-de-açúcar, em pós-emergência das plantas infestantes em florestas de eucalipto e pinus e para o controle da rebrota do eucalipto e ainda como dessecante nas culturas de aveia preta,

azevém e soja. A ANVISA também estabelece os limites máximos de resíduos (LMR) para essas culturas, exceto para eucalipto, pinus e seringueira (TABELA 2), os quais não são considerados de uso alimentar (ANVISA, 2003). Dessa forma, não há no Brasil LMR definido para o eucalipto.

Tabela 2 – Limites máximos de resíduos (LMR) para o herbicida glifosato definidos pela ANVISA no Brasil

(Continua)

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg kg⁻¹)
Algodão	Pós-emergência	3,0
Ameixa	Pós-emergência	0,2
Arroz	Pós-emergência	0,2
Aveia preta	Dessecante	20
Azevém	Dessecante	10
Banana	Pós-emergência	0,02
Cacau	Pós-emergência	0,1
Café	Pós-emergência	1,0
Cana-de açúcar	Maturador	1,0
Cana-de açúcar	Pós-emergência	1,0
Citros	Pós-emergência	0,2
Coco	Pós-emergência	0,1
Eucalipto	Pós-emergência	UNA
Feijão	Pós-emergência	0,05
Fumo	Pós-emergência	UNA
Maçã	Pós-emergência	0,2
Mamão	Pós-emergência	0,1
Milho	Pós-emergência	1,0
Nectarina	Pós-emergência	0,2
Pastagem	Pós-emergência	0,2
Pêra	Pós-emergência	0,2
Pêssego	Pós-emergência	0,2
Pinus	Pós-emergência	UNA

Tabela 3 – Limites máximos de resíduos (LMR) para o herbicida glifosato definidos pela ANVISA no Brasil

(Conclusão)

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg kg⁻¹)
Seringueira	Pós-emergência	UMA
Soja	Dessecante	10,0
Soja	Pós-emergência	10,0
Trigo	Pós-emergência	0,05
Uva	Pós-emergência	0,2

UNA = Uso não alimentar

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

1.2.4. Uso do glifosato na silvicultura

No Brasil, a cultura do eucalipto tem apresentado rápida expansão, emergindo como um dos principais produtores de madeira e celulose no mercado internacional e, a cada ano, apresenta um aumento no rendimento médio de produção. Em 2012, a área brasileira de plantios de *Eucalyptus* e *Pinus* atingiu 6,66 milhões de hectares, sendo que os plantios de *Eucalyptus* representaram 76,6% dessa área (ABRAF, 2013). Mediante o crescimento do setor florestal, é necessário que se articulem medidas que promovam o desenvolvimento do setor e priorizem a melhoria dos processos silviculturais, atendendo aos preceitos ambientais.

Com considerável destaque dentre os tratos culturais, as plantas daninhas são um dos grandes problemas enfrentados na silvicultura, apresentando reflexos diretos no rendimento e nos custos de produção. É principalmente nos anos iniciais da produção que essas plantas prejudicam, de forma acentuada, o eucalipto. Em algumas áreas, pode-se estender o controle até o final da cultura. Fatores como redução na produtividade, o elevado custo de controle, a grande demanda de mão de obra e o impacto do controle químico no ambiente fazem das plantas daninhas um dos piores problemas nos plantios de eucalipto (SANTOS *et al.*, 2006a).

Em relação ao manejo de plantas daninhas em áreas florestais, em várias fases do processo de produção, são efetuados, principalmente os métodos mecânicos e químicos, isolados ou combinados (BRIGHENTI *et al.*, 2015). Esses métodos contribuem para a melhoria da produção, visando à eficiência e ao baixo impacto ambiental, pois a matocompetição provoca redução na produtividade, devido, principalmente, à diminuição do diâmetro do caule e da estatura da planta (TAROUCO *et al.*, 2009).

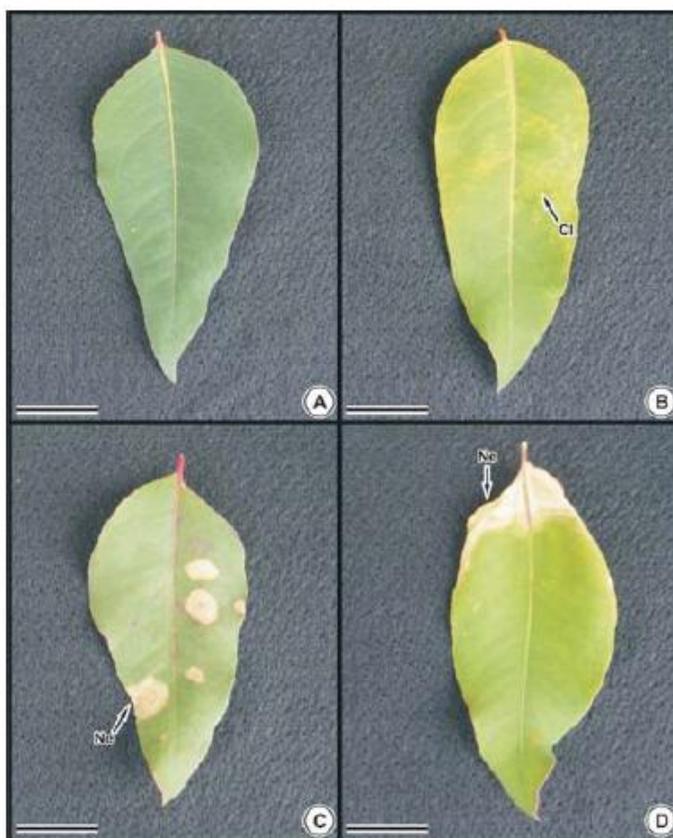
O método químico é o mais adotado devido à sua eficiência e à facilidade de execução. O herbicida amplamente usado para controle de plantas daninhas em eucalipto é o glifosato, por ser um dos poucos ingredientes ativos registrados para essa cultura (SANTOS *et al.*, 2007). Pode ser aplicado em toda a área antes do plantio para dessecação de plantas já existentes, para controlar ervas daninhas entre as fileiras de eucalipto e no controle de brotos indesejados quando há condução de rebrota (PEREIRA *et al.*, 2013).

Apesar da eficiência desse herbicida, pouco se sabe a respeito dos seus efeitos sobre as plantas de eucalipto, sendo muito comum a ocorrência de deriva, ou seja, o desvio de partículas ou gotas de tamanho reduzido formadas durante a pulverização, o que provoca danos em organismos não alvos que estão próximos ou na mesma área de aplicação, prejudicando o crescimento do fuste principal (SANTOS *et al.*, 2007). Já foi observado que, em aplicações dirigidas de produtos não seletivos, como no caso do glifosato, a própria cultura pode ser afetada por diferentes formas de contato, ocasionando intoxicação, redução no crescimento e até a morte das plantas (SANTOS *et al.*, 2006b). Diante disso, estudos a respeito dos efeitos de deriva causados por esse herbicida têm sido realizados em plantas de eucalipto com o propósito de conhecer as consequências na micromorfologia e o crescimento das folhas (FIGURA 3) (TUFFI SANTOS *et al.*, 2008).

Dessa forma, o desenvolvimento de um método de extração e quantificação do glifosato e AMPA em eucalipto permitiria o monitoramento desses compostos na planta e auxiliaria ainda em estudos sobre a influência desses compostos na qualidade da madeira, quantidades ideais e seguras a serem aplicadas na cultura do eucalipto, tempo de permanência na planta e

pontos de concentração (caule, ápice, folhas) e desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico de impacto a organismos não alvo (efeito de deriva).

Figura 3 – Fotografia de folhas de *Eucalyptus grandis* expostas à deriva de diferentes formulações de glifosato (129.6 g ha^{-1}), 14 dias após a aplicação. **A.** Tratamento controle. **B.** Cloroses (Cl). **C.** Necroses marginais e intervenais (Ne). **D.** Necrose na base da folha. Barras = 25 mm.



Fonte: SANTOS *et al.*, 2008.

1.2.5. Métodos de extração e análise de glifosato e ácido aminometilfosfônico

Em comparação com todos os herbicidas utilizados na agricultura, o glifosato é um dos mais difíceis de serem quantificados. Essas dificuldades estão principalmente relacionadas às suas propriedades químicas, como elevada solubilidade em água e natureza polar, que limitam as opções para a aplicação de métodos padrões (KHROLENKO; WIECZOREK, 2005). Propriedades químicas que contribuem para a eficácia do glifosato como um herbicida também tornam difícil a quantificação, bem como a do AMPA, especialmente em nível de resíduo na variedade de matrizes ambientais onde podem ser encontrados (ALFERNES; IWATA, 1994).

Geralmente, a preparação das amostras para a quantificação de glifosato e AMPA requer elevado número de etapas, variando de acordo com o método analítico, a matriz estudada e o limite mínimo de detecção desejado. Na maioria das vezes, é necessária uma etapa adicional de derivatização, que pode ser realizada por uma variedade de agentes derivatizantes (KOSKINEN; MAREK; HALL, 2015).

Muitos métodos têm sido descritos para a análise de glifosato em amostras de água (HANKE; SINGER; HOLLENDER, 2008), solo (DRUART *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2006), frutas (HE *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2013), soja (ABREU; MATTA; MONTAGNER, 2008) e vegetais (MAREK; KOSKINEN, 2014). Nos processos de extração do glifosato em solo são comumente utilizadas soluções de bases fortes como KOH e NaOH, sais de bases fortes como KH_2PO_4 , bases fracas como trietilamina e NH_4OH ou ácidos fracos, seguindo-se, na maioria das vezes, de etapas de purificação com resinas de troca iônica (AMARANTE *et al.*, 2002a). Nas análises de amostras de água, embora em algumas publicações não seja realizada a pré-concentração das amostras, em grande parte dos trabalhos publicados essa técnica ainda é a mais adotada. Os cartuchos e discos de extração em fase sólida (SPE), como C18 (IBANEZ *et al.*, 2005; NAGATOMI *et al.*, 2013; HANKE; SINGER; HOLLENDER, 2008) e de troca aniônica (HIDALGO *et al.*, 2004; CORBERA; HIDALGO; SALVADÓ, 2006) são os mais comumente

empregados para quantificação de glifosato e AMPA. Já para a quantificação desses compostos em materiais vegetais é necessário um procedimento de extração, sendo água com pH neutro e acidificada as fases extratoras mais utilizadas, seguidos pelos processos de homogeneização por agitação ou sonicação (KOSKINEN; MAREK; HALL, 2015). Nas Tabelas 3 e 4 estão apresentados alguns dos métodos mais empregados na determinação de glifosato e AMPA em matrizes de água, solo e vegetais, respectivamente.

Tabela 4 – Determinação de glifosato e AMPA em amostras de água

Tratamento da amostra	Derivatização	Análise	Referência
Concentração com resina iônica	FMOC-CI	HPLC-FLD	Hidalgo <i>et al.</i> , 2004
Filtrada em membrana de nylon 0,45 μm	FMOC-CI	HPLC-FLD	Nedelkoska; Low, 2004
Liofilização	FMOC-CI	HPLC-FLD	Ramirez; Bellmund; Gardinali, 2014
Concentração com resina iônica	FMOC-CI	HPLC-FLD	Corbera; Hidalgo; Salvadó, 2006
----	FMOC-CI	HPLC-UV	Peruzzo; Porta; Ronco, 2008
Filtrada em membrana de nylon 0,45 μm	-	CLAE-ECD	Sanchez-Bayo; Hyne; Deseille, 2010
Concentração com cartuchos de resina AG1-X8 e CHELEX	-	HPLC-ICP-MS	Popp <i>et al.</i> , 2008
Concentração por meio de vácuo	TFA E TFAA	GC-MS	Kudzin <i>et al.</i> , 2002
Concentração em evaporador rotatório	TFAA E TFE	GC-MS	Puertolas <i>et al.</i> , 2010

HPLC=Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / GC =Cromatografia Gasosa / FLD=Detector por fluorescência / UV = Detector UV-Visível / ECD=Detector por condutividade elétrica / ICP-MS= detector espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado / MS=detector espectrômetro de massas

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Tabela 5 – Determinação de glifosato e AMPA em amostras de solo e vegetais

Matriz	Extração	Clean up	Derivatização	Análise	Referência
Solo	KH ₂ PO ₄ , agitação e centrifugação	-	FMOC-Cl	HPLC-FLD	Veiga <i>et al.</i> , 2001
	KH ₂ PO ₄ , agitação e centrifugação	-	FMOC-Cl	HPLC-UV	Peruzzo; Porta; Ronco, 2008
	KOH agitação e centrifugação	Cartucho Oasis HLB	FMOC-Cl	HPLC-MS/MS	Botero-Coy; Ibáñez; Hernández, 2013
	NaOH centrifugação	-	TFAA-TFE	GC-MS	Börjesson; Torstensson, 2000
	NaOH agitação, sonicação e centrifugação	-	TFAA-TFE	GC-MS	Bergstrom; Börjesson; Stenström, 2011
Soja	Água, agitação manual, centrifugação	Clorofórmio e resina aniônica	TFAA-TFE	GC-MS	Abreu; Matta; Montagner, 2008
Vegetal	Água, liquidificador, centrifugação	Clorofórmio e resina catiônica	HFB –TFAA	GC-MS	Alfernes; Iwata, 1994
Milho	Água-metanol, agitação mecânica, centrifugação	-	FMOC-Cl	HPLC-FLD-MS	Bernal <i>et al.</i> , 2012
Raiz	água, liquidificador, centrifugação	Diclorometano e resina catiônica	FMOC-Cl	HPLC-FLD	Laitnen <i>et al.</i> , 2009
Cereais	Água-diclorometano, agitação e sonicação, centrifugação	-	FMOC-Cl	HPLC-ESI-MS	Kruve <i>et al.</i> , 2011

HPLC=Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / GC =Cromatografia Gasosa / FLD=Detector por fluorescência / UV = Detector UV-Visível / ESI=Detector de ionização por eletrospray / MS=detector espectrômetro de massas

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

1.2.5.1. Cromatografia líquida e cromatografia gasosa na quantificação de glifosato e AMPA

Devido à alta polaridade da molécula do glifosato e do AMPA, a maioria das investigações relatadas na literatura para esses compostos se refere à cromatografia líquida de alta eficiência. É necessário um processo de derivatização para a obtenção de compostos com grupos cromóforos ou fluoróforos, aplicando-se, assim, detecção colorimétrica, por UV ou detecção fluorimétrica (AMARANTE *et al.*, 2002a).

O glifosato não absorve radiação eletromagnética visível, o que dificulta a detecção por métodos colorimétricos ou fluorescência, a não ser de forma indireta ou com devida derivatização (AMARANTE *et al.*, 2002b). O cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) é o agente derivatizante mais utilizado para análises em cromatografia líquida de alta eficiência (IBÁNEZ *et al.*, 2005; IBÁNEZ *et al.*, 2006; HIDALGO *et al.*, 2004; LAITINEN *et al.*, 2009; NEDELKOSKA; LOW, 2004; HANKE; SINGER; HOLLENDER, 2008; RAMIREZ; BELLMUND; GARDINALI, 2008; CORBERA *et al.*, 2005; CORBERA; HIDALGO; SALVADÓ, 2006; BERNAL *et al.*, 2010; PERUZZO; PORTA; RONCO, 2008). Dessa forma, este processo torna-se uma importante etapa na análise de glifosato e AMPA. Porém, ainda é considerada a principal desvantagem de preparação da amostra necessária principalmente, antes das análises em cromatografia gasosa. No entanto promove o aumento da seletividade, sensibilidade, identificação e quantificação da espécie estudada (ARKAN; MOLNÁR-PERL, 2015).

A técnica de cromatografia gasosa é a segunda mais empregada para determinação de glifosato e, para a quantificação desse composto, faz-se necessária prévia derivatização para a obtenção do composto volátil (AMARANTE *et al.*, 2002a). O ácido trifluoroacético anidro (TFAA), combinado com trifluoroetanol (TFE), são os agentes derivatizantes mais usados em GC (BERGSTRÖM; BÖRJESSION; STENSTRÖM, 2011; KRÜGER *et al.*, 2014; KYLIN, 2013; PUÉRTOLAS *et al.*, 2010; BÖRJESSION; TORSTENSSON, 2000). A etapa de derivatização é imprescindível em análises por GC, ao contrário da HPLC, que, em alguns casos, pode ser

desconsiderada, pois ainda não há, na literatura, método adequado para a determinação de glifosato por GC, sem prévia derivatização (ARKAN; MOLNÁR-PERL, 2015).

1.2.5.2. Detectores cromatográficos empregados nas análises de glifosato e AMPA

Os métodos de quantificação empregados na separação e na detecção de GLI e AMPA têm sido variados. Já foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à fluorescência (HIDALGO *et al.*, 2004; LAITINEN *et al.*, 2006; RAMIREZ; BELLMUND; GARDINALI, 2014; CORBERA; HIDALGO; SALVADÓ, 2006), ultravioleta (PERUZZO; PORTA; RONCO, 2008), detecção eletroquímica (SANCHEZ-BAYO; HYNE; DESSEILLE, 2010), espectrometria de massas (KYLIN, 2013; BERNAL *et al.*, 2012) e espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (KAZUI; SETO; INOUE, 2014; POPP *et al.*, 2008); cromatografia iônica acoplada à detecção por condutividade (DIMITROKOPAULOS *et al.*, 2010) e ICP-MS (GUO; CAI; YANG, 2005; GUO; CAI; YANG, 2007); eletroforese capilar acoplada à detecção ultravioleta (CORBERA *et al.*, 2005); cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (BERGSTROM; BÖRJESSION; STENSTRÖM, 2011; KYLIN, 2013; KUDZIN *et al.*, 2002; PUERTOLAS *et al.*, 2010; BÖRJESSION; TORSTENSSON, 2000; GHAFOOR; THIERFELDER; STENSTRÖM, 2011; RAMWELL; KAH; JOHNSON, 2014).

Entre as características ideais de um detector estão: alta sensibilidade e baixo limite de detecção, seletividade, ampla linearidade de resposta, estabilidade a mudanças na temperatura e na vazão da fase móvel, que não cause destruição do soluto, entre outras. Porém ainda não existe um detector que apresente todas essas propriedades, então, deve-se escolher aquele que melhor se adapte ao tipo de análise a ser realizada (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2011). Por isso, o desenvolvimento e o estudo de metodologias de análise possibilitam obter novas aplicações para os detectores e fornece

informações que auxiliam na escolha adequada do modo de análise e detecção de um composto.

1.2.6. Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado

Os primeiros equipamentos de ICP-MS foram comercializados em 1983 e hoje apresentam aplicabilidade em diversos campos, como a geoquímica, ciências ambientais, indústrias (alimentos, produtos químicos, semicondutores e nuclear), ciência forense e arqueologia (AMMANN, 2007). A espectrometria de massas proporciona benefícios significativos para o ICP, como a capacidade de atingir limites de detecção na faixa de 0,1 a 0,001 $\mu\text{g L}^{-1}$ em soluções aquosas, para cerca de 90% dos elementos químicos da tabela periódica (VEIGA, 2001). O ICP-MS é composto, basicamente, de um sistema de introdução de amostras, de uma fonte de íons, de uma interface que promove a focalização dos íons (cone de amostragem e o skimmer), de um sistema analisador de massas (quadropolo) e de um sistema de detecção (NUNES, 2009).

No sistema de introdução de amostra, há uma bomba peristáltica que controla, continuamente, o fluxo da solução de amostra para um nebulizador, que a dispersa, usando uma corrente de gás argônio e um canal de drenagem remove excessos e impurezas. A amostra em forma de aerossol sai da câmara de nebulização e passa diretamente pela tocha (o plasma acoplado), que é composta por três tubos de quartzo concêntricos por meio dos quais passam correntes de gás argônio (gás de plasma, gás auxiliar e gás carreador). No centro do plasma, as temperaturas variam de 8.000 a 10.000 Kelvin (K), e a amostra em forma de aerossol sofre, instantaneamente, os processos de dessolvatação, vaporização, atomização e ionização (AGILENT, 2008).

O feixe de íons de análise formado passa por uma interface que irá transferi-lo e focalizá-lo para um sistema analisador. O feixe entra na interface, por meio de um primeiro orifício, chamado cone de amostragem e percorre uma curta distância para um segundo orifício, chamado cone *skimmer* (cone de separação), que é, geralmente, menor e mais agudo do que o cone

de amostragem. A interface faz uma conexão entre o sistema de amostras e o sistema analisador de massas, tendo como principal função reduzir a pressão e a densidade do feixe, diminuindo a perda de íons. Ao sair da interface, o feixe é direcionado para as lentes iônicas, que desempenham o papel de focalizar os íons antes de atingirem o analisador de massas quadrupolar, melhorando a sensibilidade e os limites de detecção instrumental (PEDREIRA FILHO, 2000).

O analisador de massa quadrupolar é composto por quatro hastes metálicas, que estão dispostas paralelamente uma à outra, sobre as quais é aplicada voltagem por corrente contínua (DC) e radiofrequência (RF). A variação dessas tensões faz com que as hastes atuem como um filtro, permitindo passar apenas íons de uma razão massa/carga específica, por meio do centro do quadrupolo. Essas tensões são aceleradas para que o quadrupolo possa realizar uma varredura de todas as massas (2- 260 a.m.u) em 100 milissegundos (AGILENT, 2008). Após passarem pelo quadrupolo, os íons são medidos por um detector. Nos sistemas mais antigos, a detecção era feita com uma tela fluorescente. Já as versões mais novas de ICP-MS são compostas por um sistema de detecção simultânea de íons, como o detector multiplicador de elétrons, o copo de Faraday e o detector Daly (SANTOS, 2007).

Apesar de ser uma técnica com alta sensibilidade na determinação de elementos traço, o ICP-MS apresenta suscetibilidade a interferências, que podem ser divididas em dois grupos: espectrais e não espectrais. As interferências espectrais são os íons de óxido (provenientes da dissociação incompleta da amostra ou recombinação dos íons no plasma); íons de dupla carga (aparecem no espectro com metade da razão de massa do íon desejado, que podem influenciar a sensibilidade e a geração de isótopos); íons poliatômicos (onde as espécies mais abundantes Ar, O, H, N, S ou Cl podem combinar entre si ou com outros elementos provenientes da matriz); sobreposição isobárica (quando dois elementos apresentam isótopos de mesma massa). As interferências não espectrais são os efeitos de supressão e aumento do sinal (efeito de matriz provocado por um excesso de elementos facilmente ionizáveis presentes na matriz, como Na, Mg, K, Ca, Cs, B, Al e U); efeitos físicos (um primeiro é o efeito de memória provocado

principalmente pelo excesso de analito, e um segundo efeito é a deposição de sal ou carbono nos cones de amostragem e skimmer, provocando obstrução dos orifícios, o que reduz a eficiência de ionização) (VEIGA, 2001).

Para minimizar ou mesmo eliminar as interferências na espectrometria de massas com plasma acoplado tem sido proposto o uso de diferentes tecnologias, como um sistema de reação e/ou colisão (CHEN *et al.*, 2009; SADI; VONDERHEIDE; CARUSO, 2004). Esse sistema, geralmente, fica posicionado entre as lentes e o analisador de massas. À medida que os íons entram na cela interagem com um gás, mais frequentemente He ou H₂ para o modo de colisão e O₂ para o modo de reação. A reação ou colisão com esses gases modifica o interferente ou o analito de interesse em uma massa diferente, de modo que interferências isobáricas ou poliatômicas sejam minimizadas (AGILENT, 2008).

Os equipamentos de ICP-MS estão em constante desenvolvimento tecnológico, buscando atender a demandas analíticas cada vez mais precisas e sensíveis. Dessa forma, uma mudança recente e inovadora tem aumentando a sensibilidade do ICP-MS e diminuindo interferências nas análises, que são os equipamentos de ICP-MS/MS (triplo quadrupolo). Esses equipamentos se diferenciam do ICP-MS, por apresentarem dois analisadores de massa separados por um sistema de reação/colisão. Isso permite um maior controle de interferentes, aumentando a precisão e a sensibilidade de análise, principalmente em amostras de matrizes complexas, contribuindo com um alto nível de desempenho nas análises (AGILENT, 2015).

O ICP-MS/MS e o ICP-MS têm se apresentado como uma alternativa inovadora de detecção em cromatografia gasosa e líquida (NELSON *et al.*, 2015; KLENCŠÁR *et al.*, 2016) e como ferramenta promissora para quantificação de glifosato e AMPA em matrizes como água e solo (SADI; VONDEHEIDE; CARUSO, 2004; GUO; CAI; YANG, 2005; CHEN *et al.*, 2009). Quando o ICP-MS é acoplado às técnicas de cromatografia, é possível realizar análises de especiação, ou seja, cada espécie elementar pode ser quantificada isoladamente (SILVA, 2014). Essa ferramenta aumenta a especificidade das análises e permite a quantificação em níveis baixos de concentração.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo Geral

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e validar um método de extração do glifosato e do ácido aminometilfosfônico do lenho de eucalipto e aplicar análise de especiação química do P em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do inglês HPLC-ICP-MS/MS).

1.3.2. Objetivos específicos

- Comparar os detectores espectrômetro de massas (modo TIC e SIM) e NPD acoplados à cromatografia gasosa, na quantificação de glifosato e AMPA, quanto à seletividade, à linearidade e ao limite de detecção;
- Comparar os detectores DAD e ICP-MS/MS acoplados à cromatografia líquida de alta eficiência, na quantificação de glifosato e AMPA, quanto à seletividade, à linearidade e ao limite de detecção;
- Estabelecer as condições ótimas para detectar o glifosato e seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico por HPLC-ICP-MS/MS;
- Estudar a influência do pH na extração do glifosato e AMPA do lenho de eucalipto;
- Validar o método de extração, realizando os testes estatísticos exigidos para confirmação das figuras de mérito: linearidade, seletividade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão e efeito de matriz.

CAPÍTULO 2 - ESTUDO COMPARATIVO DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO

RESUMO

Este estudo compara as técnicas de cromatografia gasosa (GC) acoplada aos detectores espectrômetro de massa (MS) ajustado para o monitoramento de íons totais (TIC) e monitoramento de íons seletivos (SIM) e o detector de nitrogênio e fósforo (NPD); e a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada ao detector de arranjo de diodos (DAD) e ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS/MS), na análise de glifosato e AMPA. Curvas de calibração foram construídas e os sistemas cromatográficos foram comparados quanto à seletividade, à linearidade e ao limite de detecção (LD). Foi observada seletividade em todos os sistemas cromatográficos estudados, com boa resolução dos cromatogramas e separação dos compostos em menos de 5 minutos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao ICP-MS/MS e maior tempo de análise (20 minutos) obtido por HPLC-DAD. A linearidade foi confirmada para os sistemas cromatográficos investigados com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99 nas faixas de concentração estudadas. Os limites de detecção obtidos foram de 0,0082 mg L⁻¹ para o ICP-MS/MS, 0,0015 mg L⁻¹ para o GC-MS (SIM), 0,3 mg L⁻¹ para o HPLC-DAD, 1,5 mg L⁻¹ para o GC-MS (TIC) e 1,5 mg L⁻¹ para o GC-NPD. O HPLC-ICP-MS/MS foi considerado o sistema mais adequado para análises de glifosato e AMPA, pois apresentou resultados positivos de seletividade, linearidade e limite de detecção. Além disso, não foi necessária etapa de derivatização, a qual demanda grande atenção e esforço, pois requer estudo minucioso de todos os processos envolvidos na reação e dos fatores que contribuem ou afetam a sua eficiência. Dessa forma, o uso de técnicas que não demandam essa etapa, tornam-se mais simples, eficientes e viáveis no estudo de compostos de difícil análise e detecção como o glifosato e o AMPA, além de facilitar a análise desses compostos em matrizes mais complexas.

Palavras-chave: Glifosato. HPLC-ICP-MS/MS. HPLC-DAD. GC-MS. GC-NPD.

2.1. INTRODUÇÃO

Glifosato é um herbicida de grande expressão do ponto de vista agronômico, devido à sua ampla aplicabilidade e à eficiência no controle de plantas daninhas em diferentes culturas. Além disso, por muitos anos, foi considerado toxicológica e ambientalmente seguro, o que resultou em um aumento considerável de aplicações na agricultura, tornando-se o herbicida mais adotado no mundo (MAREK; KOSKINEN, 2014). No entanto, nos últimos anos, esse incremento tem ocasionado dúvidas e preocupações a respeito do uso cada vez mais elevado, o que, em longo prazo, pode acarretar em impactos indesejáveis ao meio ambiente e à saúde humana.

Para lidar com esse problema, estudos a respeito do glifosato e o seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), têm sido conduzidos, a fim de investigar e desenvolver métodos simples, sensíveis e eficientes na extração e na análise desses compostos. Porém propriedades químicas do glifosato e AMPA, como alta polaridade, baixa solubilidade em solventes orgânicos, ausência de grupos cromóforos e baixa volatilidade, tornam difíceis os processos de separação e detecção (KOSKINEN; MAREK; HALL, 2016). Tais características implicam a necessidade de realizar uma etapa adicional de derivatização, a qual pode promover o aumento da seletividade e sensibilidade na identificação e na quantificação da espécie estudada. Contudo esse processo ainda é considerado a principal desvantagem de preparação da amostra necessária, principalmente antes das análises por cromatografia (ARKAN; MOLNÁR-PERL, 2015).

Cromatografia gasosa (GC) e líquida de alta eficiência (HPLC) têm sido amplamente estudadas e difundidas para a análise e a determinação de diversas classes químicas de compostos e em matrizes variadas (alimentícias, ambientais, farmacêuticas e médicas), apresentando aplicações científicas e industriais. As principais vantagens da cromatografia incluem capacidade de realizar separação, identificação e quantificação de espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria e espectrometria de massas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2011). Além disso, proporciona

resultados em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e repetibilidade.

Considerando a importância das técnicas cromatográficas, o objetivo deste estudo foi comparar alguns dos principais sistemas cromatográficos empregados na determinação de glifosato e AMPA. Foram avaliados parâmetros como seletividade, faixa de linearidade, limite de detecção e outras características de cada sistema, como uso de gases e solventes e etapa de derivatização. Os sistemas avaliados foram o GC-MS ajustado para o monitoramento de íons totais (TIC) e para o monitoramento de íons seletivos (SIM), o GC-NPD, o HPLC-DAD e o HPLC-ICP-MS/MS.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Reagentes e soluções

Padrões de glifosato (99,2% m/m) e ácido aminometilfosfônico (99,0% m/m) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Foram preparadas soluções de glifosato e ácido aminometilfosfônico na concentração de 500 mg L⁻¹ (solução estoque), separadamente, em água ultrapura (resistividade 18 MΩ cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). A partir dessa, preparou-se uma solução para cada composto na concentração de 25 mg L⁻¹ e 5 mg L⁻¹, no mesmo solvente (solução de trabalho). A partir dessas soluções, fizeram-se as diluições para obtenção das curvas analíticas. Todas as soluções foram estocadas a 4 °C no refrigerador em frascos plásticos, para evitar a complexação dos padrões com íons metálicos presentes nos frascos de vidro (MAREK; KOSKINEN, 2014). Também foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) acetonitrila, metanol, piridina, N-O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) combinado com o trimetilclorosilano 1% (TMCS), cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl), ácido fosfórico, solução de ácido acético (49% m/v), hidróxido de tetrabutilamônio, acetato de amônio (65%) e borato de sódio da QM (São Paulo, Brasil).

2.2.2. Instrumentação e condições cromatográficas

Neste estudo, foram avaliadas as técnicas de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) ajustado para o monitoramento de íons totais (TIC) e monitoramento de íons seletivos (SIM) e ao detector de nitrogênio e fósforo (NPD), e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (DAD) e ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS/MS). Foram avaliados parâmetros como seletividade, linearidade, limite de detecção (LD). Além disso, também foram observadas

características inerentes a cada sistema cromatográfico, como tempo de análise, etapa de derivatização e consumo de gases e solventes.

2.2.3. Cromatógrafo a gás acoplado ao detector espectrômetro de massas (GC-MS)

Análises foram realizadas em cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (GC 7890A) acoplado ao espectrômetro de massas (MS 5975C), utilizando coluna capilar DB-5MS (Agilent Technologies), fase estacionária de sílica fundida, composta de 5% fenil e de 95% dimetilsiloxano, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 μm . O hélio (99,9999% de pureza) foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL min^{-1} e o volume de injeção dos padrões foi de 1 μL , sem divisão de fluxo do injetor (*splitless*). As condições cromatográficas utilizadas foram: temperatura do injetor de 280 $^{\circ}\text{C}$, temperatura do forno iniciando em 100 $^{\circ}\text{C}$, elevada para 160 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 12 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, em seguida, aumentando a uma taxa de 25 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ para a temperatura final de 230 $^{\circ}\text{C}$, na qual permaneceu por 2 minutos. A temperatura do detector e da interface do sistema GC-MS foi de 280 $^{\circ}\text{C}$.

Para aquisição de dados no monitoramento de íons totais (TIC), o detector de massas foi operado no modo impacto de elétrons (70 eV) e analisador de massas quadrupolar operando com varredura na faixa de 50 a 600 u. Já o monitoramento de íons seletivo (SIM) foi dividido em dois grupos de íons. No grupo 1 (5-6,99 min), foram considerados os íons m/z 102,20; 298,10 e 312,20 para o AMPA e, no grupo 2 (7-9,8 min), os íons m/z 232,2; 312,2 e 340,2 para o glifosato.

2.2.4. Cromatógrafo a gás acoplado ao detector de nitrogênio e fósforo (GC-NPD)

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás Agilent Technologies (GC 7820A), equipado com coluna capilar HP-5 (Agilent Technologies), fase estacionária de sílica fundida, composta de 5% fenil e de

95% dimetilsiloxano, com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 μm e foi acoplado ao detector de nitrogênio e fósforo. As condições cromatográficas utilizadas foram idênticas às descritas no item 2.2.3. Porém N_2 (99,9999% de pureza) foi usado como o gás de arraste a um fluxo constante de 1 mL min^{-1} e *make up* a um fluxo de 5 mL min^{-1} .

2.2.5. Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD)

Análises foram realizadas em um cromatógrafo a líquido Agilent 1290 (Agilent Technologies, Alemanha), que consiste de uma bomba quaternária, de um amostrador automático, de um desgaseificador e de detector de arranjo de diodos. Na separação do glifosato e AMPA, foi empregada coluna analítica ZORBAX SB-C8 (4,6 x 150 mm, 5 μm). A condição cromatográfica foi adaptada de Druart *et al.* (2011), com fase móvel constituída de ácido fosfórico 0,2 % (v/v) (solvente A) e de acetonitrila (solvente B), a um fluxo de 1 mL min^{-1} . A temperatura da coluna foi ajustada para 25 °C. O volume de injeção foi de 20 μl . A eluição em gradiente foi programada para um aumento do solvente B de 10 % a 45 % em 18 minutos. Após esse tempo, houve um decréscimo do solvente B de 45 %, para 10 % em 2 minutos, reestabelecendo o equilíbrio da coluna na condição inicial para a próxima corrida. O detector de arranjo de diodos foi programado em três comprimentos de onda: $\lambda = 250 \text{ nm}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$ e $\lambda = 264 \text{ nm}$.

2.2.6. Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao detector espectrômetro de massas triplo quadrupolo por plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS/MS)

Foi utilizado nas análises o ICP-MS/MS modelo 8800® (Agilent Technologies, Hachioji, Japão), equipado com auto-amostrador CETAC ASX, com 220 posições, bomba peristáltica de baixa pulsação com 3 canais (amostra, padrão interno e dreno). O sistema de introdução de amostras de quartzo composto de nebulizador concêntrico feito câmara de nebulização de

duplo passo, envolvida 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. O gerador de rádio frequência de 27,12 MHz de estado sólido com bobinas helicoidais pode operar entre 500 e 1600 Watts de potência, alimentado com Argônio 99,998%, para a sustentação do plasma. O 8800® conta com o quadrupolo para a seleção dos íons que entrarão no sistema de reação octopolar de terceira geração (Octopole Reaction System - ORS3®) para a remoção de interferentes isobáricos pressurizado com Helio 99,999% ou O₂ 99,999%, por meio da discriminação de energia cinética ou reação. Após o ORS³, há outro espectrômetro de massas do tipo quadrupolo com barras hiperbólicas, com sistema de detecção composto de eletromultiplicadora de duplo estágio (pulsado e analógico), que cobre o espectro de massas entre 2–260 u.m.a. O módulo de cromatografia líquida de alta eficiência (modelo 1260 Infinity Series, Agilent Technologies, CA, Estados Unidos) é equipado com bomba quaternária, autoamostrador, de gás de vácuo e compartimento de coluna com termostato. Para a separação do glifosato e AMPA, utilizou-se coluna analítica ZORBAX SB-C8 (4.6 x 150 mm, 5 µm, Agilent Technologies, CA, Estados Unidos). As condições de operação do sistema HPLC-ICP-MS/MS estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições de operação otimizadas do HPLC-ICP-MS/MS
(Continua)

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 Makeup	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

Tabela 2 – Condições de operação otimizadas do HPLC-ICP-MS/MS
(Conclusão)

Parâmetros ICP-MS/MS	
Massas monitoradas	Q1 (m/z ^{31}P) e Q2 (m/z 47 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$)
Dwell time	0,1 s por isótopo
Sistema de reação octopolar	O ₂
Fluxo do gás de reação	1,5 L min ⁻¹
Parâmetros HPLC	
Coluna de separação	ZORBAX SB-C8 (4.6 x 150 mm, 5 μm)
Temperatura	30 °C
Fase móvel	Tampão 50 Mm ácido acético/acetato de amônio: 5 Mm tetrabutilamônio como íon pareador: 1% metanol, pH=4,7
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	50 μL

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

2.2.7. Derivatização

Padrões de glifosato e AMPA para a obtenção da curva analítica foram derivatizados previamente às análises por cromatografia gasosa, a fim de obter esses compostos volatilizáveis. Foram transferidos 100 μL dessas soluções para um frasco de derivatização (capacidade de 0,3 mL) e submetidas à secura em estufa com circulação de ar (60 °C). Após isso, foram adicionados 100 μL do reagente de derivatização (BSTFA + TMCS 1 %), seguidos de 60 μL de piridina. A mistura foi aquecida a 60 °C em banho-maria com glicerina, durante 30 minutos (CATRINCK *et al.*, 2013).

Para as análises por HPLC-DAD, padrões de glifosato e AMPA para a obtenção da curva analítica também foram derivatizados previamente, a fim de adicionar grupos cromóforos aos compostos. Foram transferidos 100 μL dessas soluções para um frasco de derivatização (capacidade de 0,3 mL), adicionados 100 μL de solução tampão borato 1,25 mM (pH 9), seguido por

100 μl de reagente FMOC-Cl a 10 mM. A mistura foi deixada em repouso por 30 minutos à temperatura de 25 °C, para que ocorresse a reação (ANÁDON *et al.*, 2009). O derivatizado foi filtrado em membrana de nylon 0,45 μm e imediatamente injetado no HPLC-DAD.

2.2.8. Curvas analíticas e linearidade

Foram preparadas soluções padrão em água ultrapura, em cinco níveis de concentrações crescentes dos analitos (TABELA 2) em triplicata. Para as análises em cada sistema cromatográfico os padrões foram derivatizados conforme descrito no item 2.2.7 e, em seguida, injetados, obtendo-se as áreas no tempo de retenção dos compostos.

As curvas analíticas foram obtidas colocando-se os valores de concentração do glifosato e AMPA no eixo das abscissas e as áreas obtidas no eixo das ordenadas, com o auxílio do *software* Microsoft® Excel, o qual forneceu o coeficiente de determinação (R^2) e os coeficientes angulares (a) e lineares (b) das curvas analíticas. Foi feita a investigação e a exclusão de valores extremos pelo método dos resíduos padronizados Jackknife, com exclusão máxima de 22,2% do número original de resultados e, para cada exclusão, o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi aplicado novamente aos dados.

Foram verificadas as premissas relativas aos resíduos da regressão e ajuste ao modelo linear, que validam o uso do MMQO: i) normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner; ii) homoscedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe; iii) independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson; e iv) teste F para verificar a significância da regressão e ajuste do modelo linear.

Tabela 3 - Concentrações analisadas para obtenção das curvas analíticas e estudo da linearidade de resposta dos detectores nas análises de glifosato e AMPA

Sistema cromatográfico	Detector	Concentrações
GC	MS (TIC)	5, 10, 20, 30 e 40 mg L ⁻¹
	MS (SIM)	5, 10, 20, 30 e 40 µg L ⁻¹
	NPD	5, 10, 20, 40 e 80 mg L ⁻¹
HPLC	DAD	1, 2, 4, 6 e 8 mg L ⁻¹
	ICP-MS/MS	5, 10, 20, 30 e 40 µg L ⁻¹

GC= Cromatografia gasosa / HPLC = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / MS= Espectrômetro de massas / TIC= monitoramento de íons totais / SIM= Monitoramento de íons seletivos / NPD= Detector de nitrogênio e fósforo / DAD= Detector de arranjos de diodos / ICP-MS/MS= Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

2.2.9. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) deve ser a menor concentração detectada nas amostras adicionadas, mas não necessariamente quantificada. Nesse estudo o LD foi obtido por meio da relação sinal/ruído (S/N), sendo determinado como três vezes essa relação.

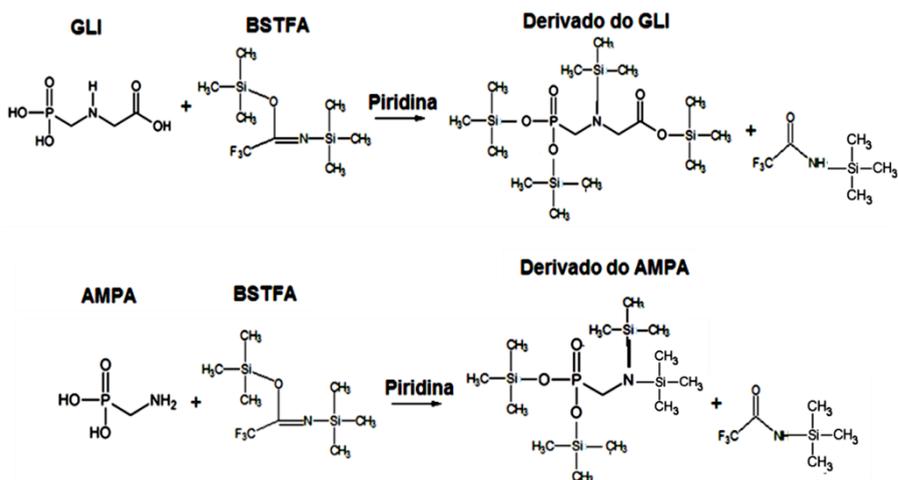
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Análises por Cromatografia Gasosa

2.3.1.1. Derivatização

O grupo acrescentado às moléculas de glifosato e AMPA tornou os compostos volatilizáveis e possibilitou a separação e detecção por cromatografia gasosa acoplada aos detectores MS e NPD (FIGURA 1). Muitos são os agentes derivatizantes utilizados para reações com glifosato e AMPA, entre eles o N-O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA), empregado neste estudo comparativo com o trimetilclorosilano (TMCS) e a piridina. BSTFA combinado com o TMCS fornece o grupo trimetilsilil (TMS) que substitui o hidrogênio lábil dos compostos. Piridina é usada como agente desprotonante, facilitando a reação de troca do hidrogênio lábil da hidroxila (-OH) com o grupo oriundo do agente derivatizante.

Figura 1- Reação de derivatização de glifosato (GLI) e AMPA com BSTFA e piridina produzindo os respectivos compostos derivatizados



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

2.3.1.2 . GC-MS

2.3.1.2.1. Monitoramento de íons totais

Na Figura 2 (A) está representado um cromatograma da solução padrão dos derivatizados de glifosato e AMPA, na concentração de 10 mg L^{-1} . O pico com tempo de retenção igual a 6,2 minutos corresponde ao AMPA, e o pico em 8,4 minutos corresponde ao glifosato, com tempo total de análise de 9,8 minutos. Pode-se observar que o cromatograma dos padrões apresentou resolução cromatográfica satisfatória, com linha de base estável e baixa intensidade de ruídos. O sistema cromatográfico foi seletivo, pois proporcionou adequada separação e detecção dos compostos.

Os testes de linearidade indicaram que a resposta do GC-MS ajustado para o monitoramento de íons totais foi linear (FIGURA 7 p. 61) para os dois compostos analisados na faixa de concentração de 5 mg L^{-1} a 40 mg L^{-1} , com coeficientes de determinação superiores a 0,99. Na Tabela 4 (pg.57) são apresentados os dados da curva analítica e o LD para os dois compostos.

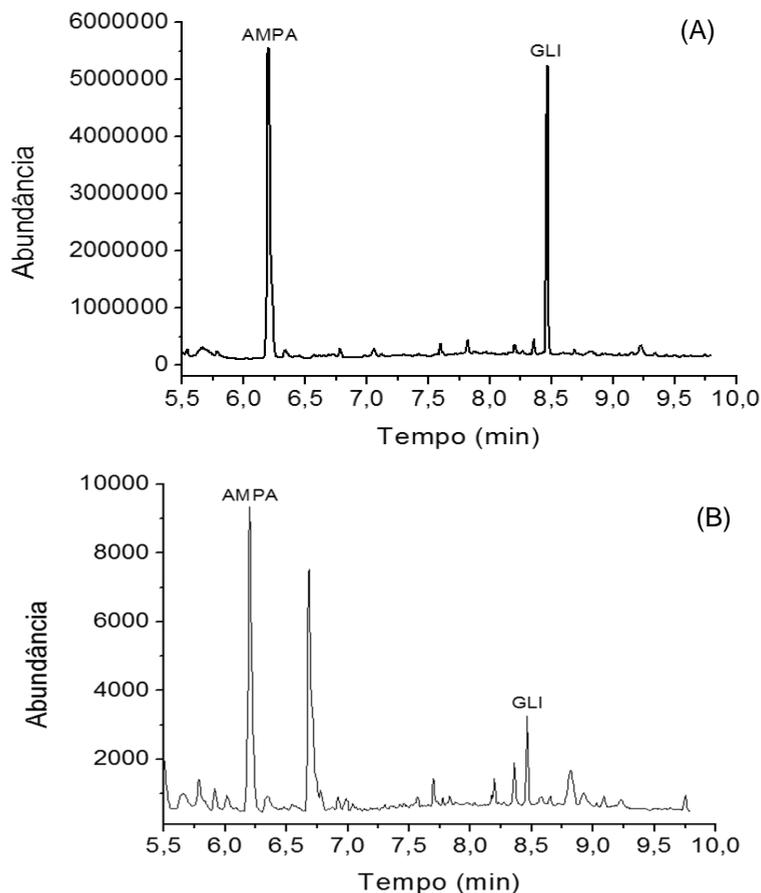
2.3.1.2.2. Monitoramento de íons selecionados

O cromatograma representado na Figura 2 (B) foi obtido da análise da solução padrão dos derivatizados de glifosato e AMPA a $40 \mu\text{g L}^{-1}$ pelo monitoramento de íons selecionados, o qual similarmente ao modo de íons totais apresentou boa resolução cromatográfica com linha de base estável. O GC-MS modo SIM também proporcionou a separação e detecção dos compostos sendo, portanto, seletivo, com tempo de retenção de 6,2 minutos para AMPA e 8,4 minutos para glifosato, com tempo total de análise de 9,8 minutos.

Foi confirmada linearidade na faixa de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ a $40 \mu\text{g L}^{-1}$ para o GC-MS no modo SIM, com coeficientes de determinação superiores a 0,99 (FIGURA 7 p. 61). Na Tabela 4 (p. 57) são também apresentados os dados da curva analítica e o LD para os dois compostos.

O GC-MS ajustado para o monitoramento de íons seletivos já foi empregado na análise de glifosato e AMPA em matrizes vegetais como a soja (ABREU; MONTAGNER, 2008), em água (KYLIN, 2013) e em solo (BÖRJESSON; TORSTENSSON, 2000). Dificilmente são encontrados na literatura estudos empregando o GC-MS no modo TIC. Apesar de ter apresentado maior sinal para glifosato, permanecendo semelhante ao AMPA, o MS no modo TIC forneceu a detecção dos compostos em concentrações 1000 vezes mais altas que no modo SIM.

Figura 2 – Cromatogramas obtidos dos padrões derivatizados glifosato (GLI) e AMPA (A) 10 mg L⁻¹ análise por GC-MS modo TIC e (B) 40 µg L⁻¹ análise por GC-MS modo SIM



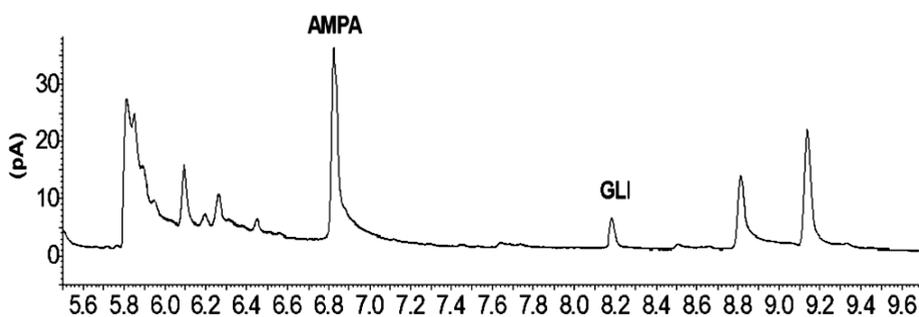
Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

2.3.1.3. GC-NPD

Pode-se observar na Figura 3, o cromatograma obtido de análise simultânea dos padrões derivatizados de glifosato e AMPA a 40 mg L^{-1} , o qual apresentou sinais com baixa intensidade para os compostos, principalmente para o glifosato, demonstrando menor sensibilidade do GC-NPD em relação ao GC-MS. O sistema cromatográfico foi considerado seletivo, pois os picos não ficaram sobrepostos, havendo separação e detecção adequada dos analitos com tempo de retenção de 6,8 minutos para AMPA e 8,1 minutos, para glifosato e tempo total de análise de 9,8 minutos. Esse detector é pouco descrito na literatura para análise de glifosato e AMPA. Quando empregado em análises de solo por Hu *et al.* (2008), foi obtido tempo de retenção acima de 14 minutos para o glifosato derivatizado com TFAA e TFE.

O GC-NPD apresentou resposta linear na faixa de 5 mg L^{-1} a 80 mg L^{-1} , com coeficientes de determinação superiores a 0,99 (FIGURA 7 p. 61). Dados da curva analítica e o LD para os dois compostos são apresentados na Tabela 4 (p. 57).

Figura 3 – Cromatograma obtido dos padrões derivatizados de glifosato (GLI) e AMPA na concentração de 40 mg L^{-1} por GC-NPD



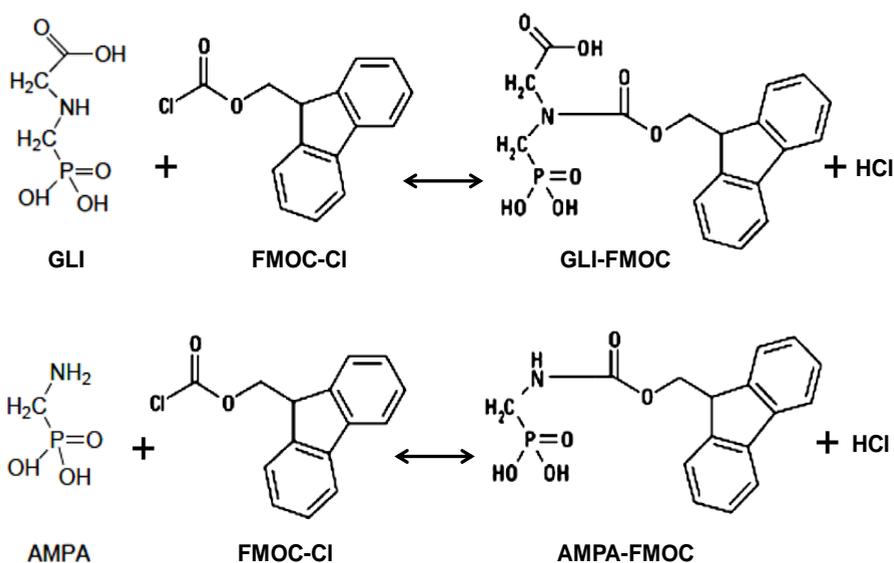
Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

2.3.2. Análises por cromatografia líquida

2.3.2.1. Derivatização

O acréscimo do grupo cromóforo às moléculas de glifosato e AMPA pela reação de derivatização possibilitou a detecção dos compostos nas análises por HPLC-DAD. Os produtos da reação de derivatização podem ser observados na Figura 4. Para análises por HPLC acoplado a detectores de UV-Vis, um dos agentes derivatizantes mais empregados é o cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) (KOSKINEN; MAREK; HALL, 2015). No processo, ocorre substituição do átomo de hidrogênio do grupo amina presente nas moléculas do glifosato e AMPA por anéis aromáticos contendo duplas alternadas (BERNAL *et al.*, 2012), proporcionando a detecção dos compostos.

Figura 4 – Reação de derivatização do glifosato (GLI) e AMPA com FMOC-Cl produzindo os respectivos compostos derivatizados



Fonte: Adaptado de BERNAL *et al.*, 2012.

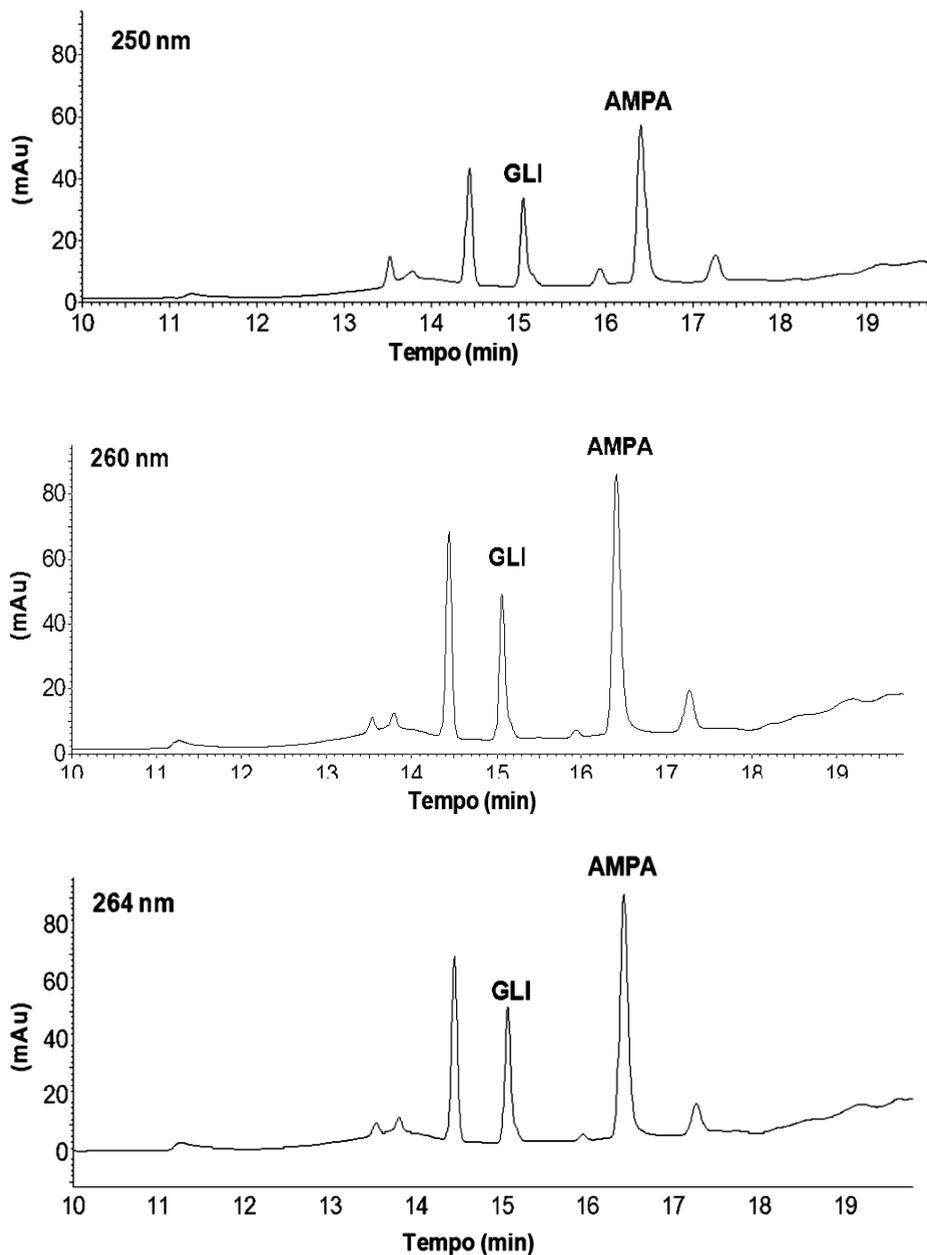
2.3.2.2. HPLC-DAD

Na Figura 5 podem ser observados os cromatogramas obtidos das análises dos padrões derivatizados de glifosato e AMPA na concentração de 6 mg L^{-1} por HPLC-DAD. Foram observados boa resolução cromatográfica, linha de base estável e poucos ruídos. O sistema cromatográfico foi seletivo para os compostos, proporcionando a separação e a detecção adequadas, com tempo de retenção de 15 minutos para o glifosato e 16,4 minutos para o AMPA e tempo total de análise de 20 minutos. Druart *et al.* (2011), utilizando a mesma fase móvel empregada neste estudo, obtiveram tempos de retenção de 16,68 minutos para o GLI e 20,20 minutos para AMPA, utilizando coluna analítica de fase reversa (Waters NovaPak C18, $300 \times 3.9 \text{ mm}$).

Neste estudo, foram avaliados os comprimentos de onda 250 nm, 260 nm e 264 nm simultaneamente nas análises e os coeficientes angulares obtidos pelas curvas analíticas foram estatisticamente diferentes quando avaliados pelo teste t ($\alpha = 5 \%$) (TABELA 3 p.55), indicando maior sensibilidade do detector para os compostos no comprimento de 264 nm, o qual obteve maior coeficiente angular. Na literatura, os comprimentos de onda empregados nas análises de glifosato e AMPA são bastante variados, sendo que já foram adotados com sucesso os comprimentos de 260 nm (CHANG; WEI, 2005), 240 nm (KROLENKO; WIECZOREK, 2005), 254 nm (CORBERA *et al.*, 2005), 206 nm (PERUZZO *et al.*, 2008), 210 nm (AMELIN; BOL'SHAKOVA; TRETIAKOV, 2012) e 360 nm (QIAN *et al.*, 2009).

A linearidade também foi confirmada para o HPLC-DAD na faixa de concentração de 1 mg L^{-1} a 8 mg L^{-1} , com coeficiente de determinação superior a 0,99 (FIGURA 8 p. 62). Dados da curva analítica e o LD para os dois compostos são apresentados na Tabela 4 (p. 57).

Figura 5 – Cromatogramas obtidos dos padrões derivatizados de glifosato (GLI) e AMPA a 6 mg L^{-1} das análises por HPLC-DAD nos comprimentos de onda de 250 nm (A), 260 nm (B) e 264 nm (C)



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Tabela 3 – Comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas por HPLC-DAD em 250 nm, 260 nm e 264 nm para glifosato e AMPA

Composto	Detector	Coefficiente angular	$t_{\text{calculado}}$	t_{tabelado}
GLI	DAD 250 nm	2238220	11642,32	2,06
	DAD 260 nm	3521270		
	DAD 250 nm	2238220	29513,61	2,11
	DAD 264 nm	4122900		
	DAD 260 nm	3521270	10546,92	2,11
	DAD 264 nm	4122900		
AMPA	DAD 250 nm	6656780	16840,07	2,11
	DAD 260 nm	10801600		
	DAD 250 nm	6656780	22337,73	2,10
	DAD 264 nm	1128560		
	DAD 260 nm	10801600	79129,86	2,07
	DAD 264 nm	1128560		

GLI= glifosato; $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$ = inclinações diferem entre si

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

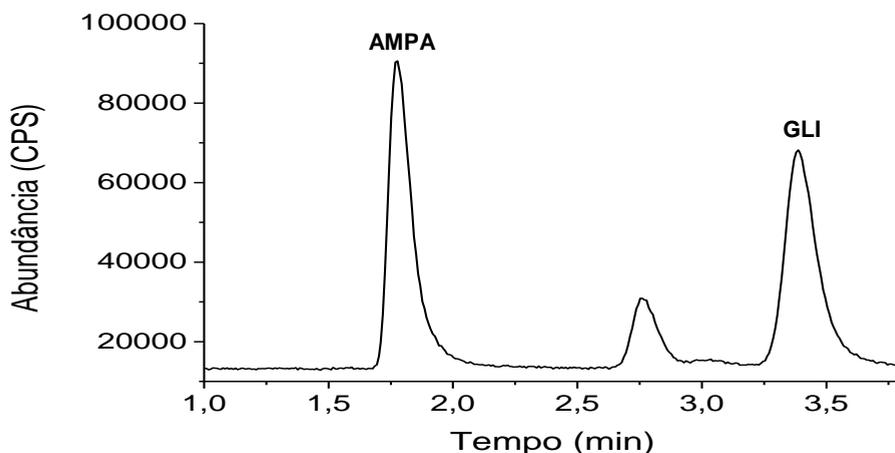
2.3.2.3. HPLC-ICP-MS/MS

Glifosato e AMPA foram detectados por meio do monitoramento do ^{31}P presente nas moléculas desses compostos (NELSON *et al.*, 2015). O primeiro quadrupolo foi ajustado para monitorar o P $m/z = 31$ e, na cela de reação e colisão, foi explorada a reação do ^{31}P com o O_2 , com o objetivo de alterar a massa atômica do P a ser detectada no segundo quadrupolo ($m/z = 47$). Pois íons poliatômicos, como $^{14}\text{N}^{1}\text{H}^{16}\text{O}^+$, $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ e $^{12}\text{C}^1\text{H}_3^{16}\text{O}^+$, formados no plasma de gás argônio, podem contribuir com a intensidade do sinal $m/z = 31$ (CHEN *et al.*, 2009), podendo alterar a resposta da detecção (BECKER *et al.*, 2003).

As condições de análise empregadas promoveram separação e detecção dos compostos, além da estabilidade da linha de base e baixa intensidade dos ruídos. O tempo de análise foi inferior a 5 minutos, com tempo de retenção de 1,8 minutos para o AMPA e 3,4 minutos para o glifosato (FIGURA 6).

A curva analítica na faixa de 5 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ (de fósforo) para o glifosato e AMPA, apresentou linearidade de resposta (FIGURA 8 p. 62) com coeficiente de determinação acima de 0,99 para os dois compostos estudados, mostrando que existe uma forte correlação entre as concentrações estudadas e o sinal gerado pelo equipamento. Dados da curva analítica e o LD para os dois compostos são apresentados na Tabela 4 (p. 57).

Figura 6 – Cromatograma obtido da análise simultânea dos padrões de glifosato (GLI) e AMPA a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (de fósforo) por HPLC-ICP-MS/MS



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

2.3.3. Comparação dos sistemas cromatográficos investigados

Na Tabela 4, são apresentados os limites de detecção estimados para glifosato e AMPA em cada sistema cromatográfico, bem como as respectivas faixas lineares, equação da reta e R^2 . Quanto aos limites de detecção obtidos nas condições empregadas, GC-NPD e GC-MS modo TIC obtiveram LD na faixa de ppm, enquanto HPLC-DAD, GC-MS modo SIM e HPLC-ICP-MS/MS na faixa de ppb.

Tabela 4 – Dados das curvas analíticas e LD para glifosato (GLI) e AMPA

Equipamento	Composto	Equação	R^2	LD
GC-MS (modo TIC)	AMPA	$y = 8222307,53x + 6801095,37$	0,9922	1,5 mg L ⁻¹
	GLI	$y = 5821561,93x + 17059751,88$	0,9950	
GC-MS (modo SIM)	AMPA	$y = 3464,92x + 47064,56$	0,9950	0,0015 mg L ⁻¹
	GLI	$y = 814,07x + 3689,90$	0,9943	
GC-NPD	AMPA	$y = 6606,80x + 483,58$	0,9935	1,5 mg L ⁻¹
	GLI	$y = 1396,31x + 9570,43$	0,9973	
HPLC-DAD 250 nm	AMPA	$y = 6572657,20x + 5881252,91$	0,9957	0,3 mg L ⁻¹
	GLI	$y = 2238223,00x + 1196975,26$	0,9903	
HPLC-DAD 260 nm	AMPA	$y = 3491324,45x + 2463801,01$	0,9983	0,3 mg L ⁻¹
	GLI	$y = 10801551,92x + 8522157,91$	0,9928	
HPLC-DAD 264 nm	AMPA	$y = 11264133,82x + 8325673,55$	0,9955	0,3 mg L ⁻¹
	GLI	$y = 4080380,95x + 2036800,03$	0,9946	
HPLC-ICP- MS/MS	AMPA	$y = 14585,25x + 27843,33$	0,9967	0,0082 mg L ⁻¹
	GLI	$y = 13878,97x + 18737,21$	0,9930	

R^2 = coeficiente de determinação; LD= limite de detecção; GLI=glifosato

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Para a avaliação da linearidade, foram identificados todos os valores extremos pelo critério $\pm t_{(1-\alpha/2;n-2)}S_{res}$ e confirmados pelos teste de resíduos padronizados Jackknife. Os gráficos dos resíduos da regressão, com indicação dos valores extremos detectados, estão apresentados no Apêndice A. O número máximo de valores extremos removidos foi três, correspondente

ao limite de 22,2% dos 15 dados originais. O diagnóstico desses pontos permitiu tratar daqueles que afetavam, claramente, o ajuste do modelo.

A premissa de que os resíduos da regressão devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner. Os gráficos de probabilidade normal obtidos para as curvas examinadas encontram-se ilustrados no Apêndice A com os respectivos coeficientes de correlação calculados e os valores críticos estabelecidos.

A estatística t de Levene não foi significativa em todas as curvas examinadas (TABELA 5) demonstrando homoscedasticidade dos resíduos. Independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson, no entanto, para a curva do glifosato obtida no HPLC-DAD no comprimento de onda de 260 nm, o resultado da estatística foi inconclusivo. Porém a independência também pode ser avaliada pela distribuição dos pontos nos quatro quadrantes dos gráficos de Durbin-Watson e todas as curvas demonstraram um perfil homogêneo sem tendências positivas ou negativas (APÊNDICE A). A confirmação das três premissas (normalidade, homoscedasticidade e independência) indicou adequação do uso do MMQO, sem ponderações, para estimativa dos parâmetros de regressão.

Alta significância de regressão foi observada para todas as curvas (TABELA 6), indicando ajuste ao modelo linear nos níveis de concentração estudados para cada analito em cada sistema cromatográfico. Nas Figuras 7 e 8 estão demonstradas as curvas de calibração com suas respectivas equações e coeficientes de determinação.

Tabela 5 – Representação da homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão das curvas do glifosato e AMPA nos sistemas cromatográficos investigados pelo teste de Levene modificado

Analito	Estatística	HPLC-DAD 250nm	HPLC-DAD 260nm	HPLC-DAD 264nm	HPC-ICP- MS/MS	GC-MS (TIC)	GC-MS (SIM)	GC-NPD
GLI	<i>n</i>	15	13	12	14	12	12	12
	<i>t_L</i>	-301545,03	-29017,51	-250874,63	-1913,43	-718776,88	-231,98	-659,59
	<i>t_{crítico}</i>	2,14	2,14	2,14	2,14	2,14	2,14	2,14
AMPA	<i>n</i>	12	13	12	14	12	12	12
	<i>t_L</i>	-387264,90	-264261,90	-351908,88	-1602,72	-1925741,95	-1442,36	-155,181
	<i>t_{crítico}</i>	2,14	2,14	2,14	2,14	2,14	2,14	2,14

n = número de observações; *t_L* = estatística t de Levene; *t_{crítico}* = valor tabelado para $\alpha = 0,05$; GLI=glifosato

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Tabela 6 – Estatísticas da análise de variância da regressão para as curvas do glifosato e AMPA nos sistemas cromatográficos investigados

Analito	Estatística	HPLC-DAD 250nm	HPLC-DAD 260nm	HPLC-DAD 264nm	HPC-ICP- MS/MS	GC-MS (TIC)	GC-MS (SIM)	GC-NPD
GLI	<i>F</i>	$1,33 \times 10^{+3}$	$6,55 \times 10^{+3}$	$1,83 \times 10^{+3}$	$1,71 \times 10^{+3}$	$1,99 \times 10^{+3}$	$1,75 \times 10^{+3}$	$3,72 \times 10^{+3}$
	<i>F_{crítico}</i>	$1,75 \times 10^{-14}$	$1,28 \times 10^{-16}$	$1,16 \times 10^{-12}$	$2,63 \times 10^{-14}$	$7,76 \times 10^{-13}$	$1,46 \times 10^{-12}$	$3,41 \times 10^{-14}$
AMPA	<i>F</i>	$2,33 \times 10^{+3}$	$1,51 \times 10^{+3}$	$2,21 \times 10^{+3}$	$3,57 \times 10^{+3}$	$1,15 \times 10^{+3}$	$2,01 \times 10^{+3}$	$1,39 \times 10^{+3}$
	<i>F_{crítico}</i>	$3,55 \times 10^{-13}$	$3,92 \times 10^{-13}$	$4,59 \times 10^{-13}$	$3,17 \times 10^{-16}$	$8,43 \times 10^{-11}$	$7,33 \times 10^{-13}$	$3,61 \times 10^{-11}$

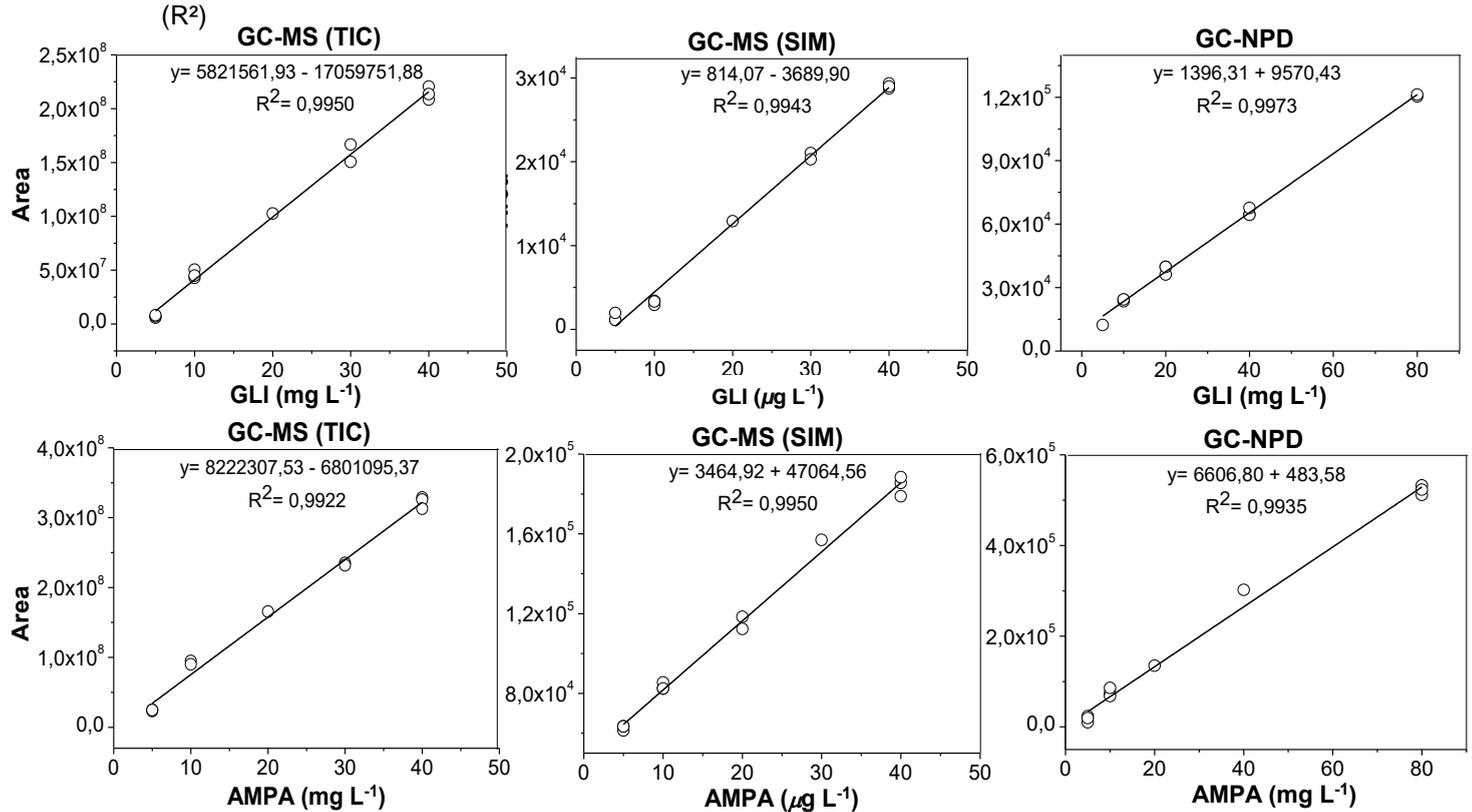
F = estatística do teste; *F_{crítico}* = valor de F tabelado.

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Quanto ao custo relacionado aos sistemas cromatográficos, o HPLC-ICP-MS/MS, GC-NPD e GC-MS foram considerados os de custo mais elevado, pois necessitam da utilização de gases de alta pureza, Ar, N₂ e He, respectivamente, para correto funcionamento e desempenho. O HPLC-ICP-MS/MS foi considerado entre esses, o de maior custo, pois enquanto necessita de gás argônio a um fluxo na escala de 15 a 18 L min⁻¹, o GC-MS e o GC-NPD utilizam os gases He e N₂, respectivamente, na escala de mL min⁻¹, conferindo mais economia às análises em relação ao consumo de gás. Entre os sistemas estudados, o HPLC-DAD foi considerado o de menor custo, pois é necessário apenas que a fase móvel seja compatível com o detector. Neste estudo, foram usados como fase móvel água ultrapura e acetonitrila, que apresentam custo relativamente baixo em relação aos gases utilizados pelos outros sistemas cromatográficos.

Em relação à etapa de derivatização, essa foi indispensável nas análises por cromatografia gasosa, pois ainda não há na literatura um método adequado para a determinação desses compostos por GC sem prévia derivatização (ARKAN; MOLNÁR-PERL, 2015). Para a quantificação dos compostos por HPLC-DAD, também foi realizada etapa de derivatização, pois glifosato e AMPA não absorvem na região do visível. Dentre os sistemas estudados, apenas para o HPLC-ICP-MS/MS não foi realizada derivatização, sendo essa característica considerada uma vantagem em relação aos demais. Apesar de conferir maior sensibilidade e seletividade aos compostos estudados (ARKAN; PERL MOLNÁR-PERL, 2015), a derivatização não é um processo simples. Muitos fatores podem afetar a eficiência da reação, dificultando as análises de matrizes complexas, pois interferentes presentes nessas matrizes podem prejudicar o desempenho da reação e a quantificação dos compostos. Isso foi verificado por Hernández; Hidalgo e Sancho (2000), analisando glifosato em tomate e azeitona. Esses autores perceberam que grandes quantidades de compostos extraídos da matriz podiam reagir com o agente derivatizante, afetando a quantificação dos compostos. Além disso, a aplicabilidade dos agentes de derivatização deve ser avaliada para cada matriz, pois a reação desenvolvida para determinada matriz pode não funcionar em outra com características diferentes; o que contribui com o aumento do custo e do tempo das análises (KOSKINEN; MAREK; HALL, 2015).

Figura 7 – Curvas de calibração dos analitos glifosato (GLI) e AMPA obtidas por GC-MS modo TIC, GC-MS modo SIM e GC-NPD nas faixas de concentração estudadas, com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2)



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Figura 8 – Curvas de calibração dos analitos glifosato (GLI) e AMPA obtidas por HPLC-ICP-MS/MS e HPLC-DAD nas faixas de concentração estudadas, com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2)

(Continua)

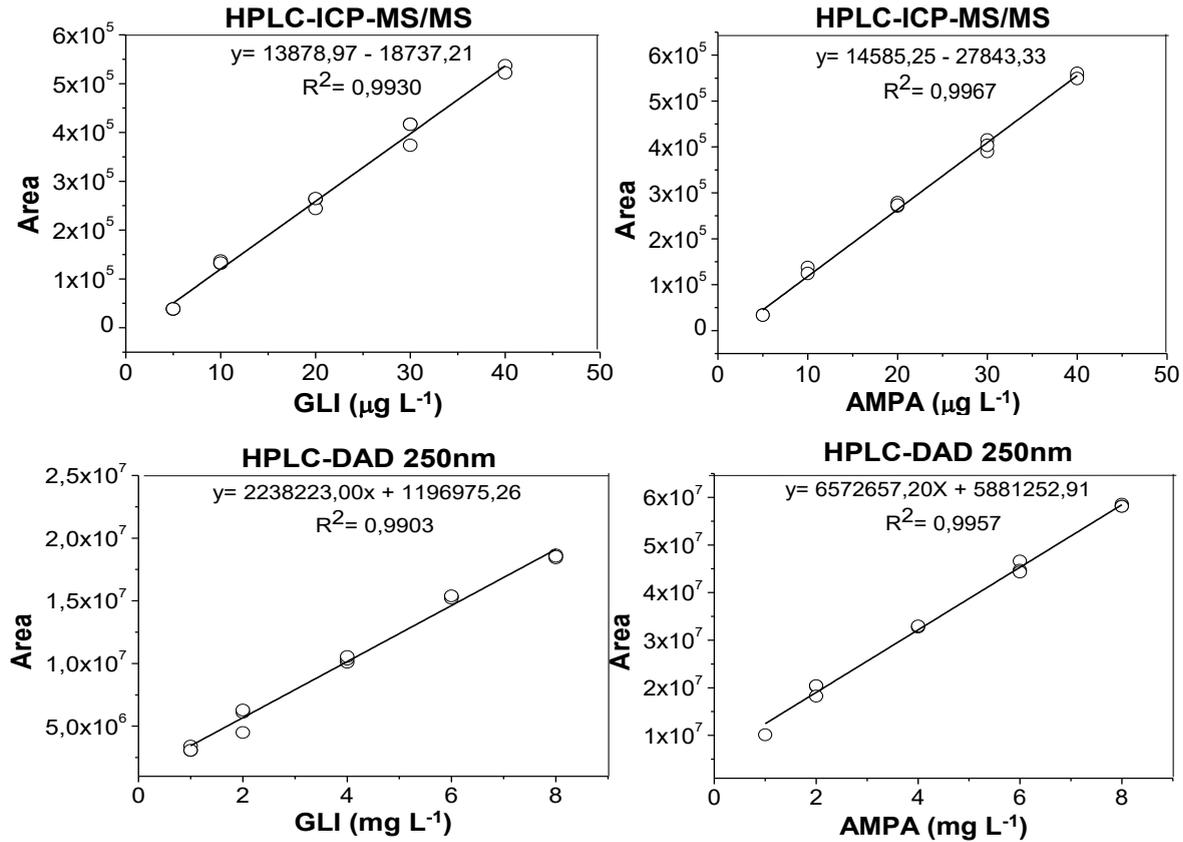
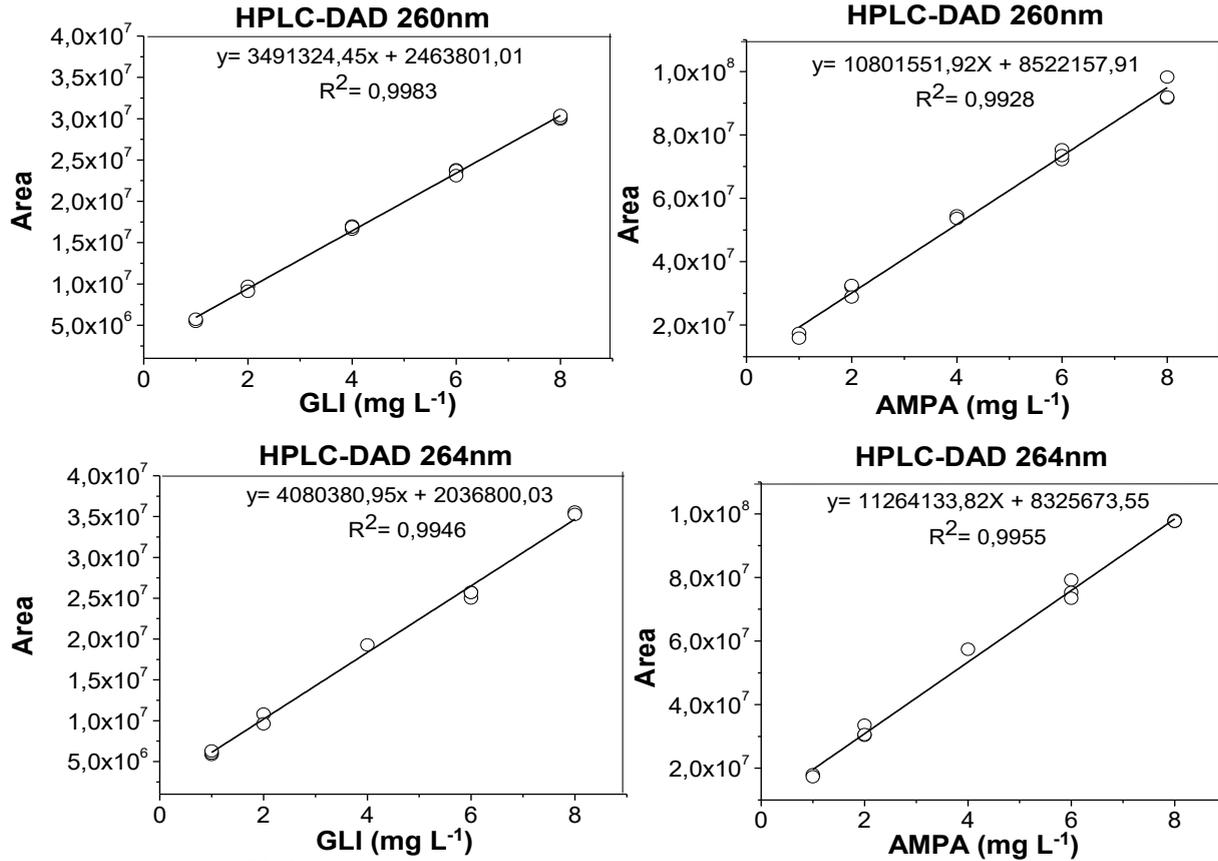


Figura 9 – Curvas de calibração dos analitos glifosato (GLI) e AMPA obtidas por HPLC-ICP-MS/MS e HPLC-DAD nas faixas de concentração estudadas, com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2)

(Conclusão)



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Quanto ao tempo de análise, o HPLC-ICP-MS/MS proporcionou menor tempo de corrida (5 minutos), utilizando a mesma coluna adotada na análise por HPLC-DAD, sendo que esse último obteve o maior tempo de análise entre os métodos estudados (20 minutos). O GC-MS (modo TIC e SIM) e o GC-NPD apresentaram mesmo tempo de corrida (9,8 minutos).

Diante esses resultados, o HPLC-ICP-MS/MS foi considerado mais adequado para o estudo de glifosato e AMPA, em matrizes complexas, pois apresentou menor tempo de análise e não houve necessidade de derivatização prévia às análises. Apesar de possuir um custo mais elevado que os demais sistemas cromatográficos estudados, a especificidade inerente a esse detector e etapa de derivatização prévia dos compostos desnecessária são vantagens consideráveis para o emprego dessa técnica. Menor número de etapas prévias à análise confere maior confiabilidade a um método, pois reduz a possibilidade de perdas do analito. A detecção por meio do átomo de P ainda confere maior sensibilidade e seletividade em nível de análise elementar, podendo atingir LDs na faixa de partes por trilhão (ppt) como obtido em análise de GLI em água por Sadi, Vonderheide e Caruso (2004). Outro estudo analisou glifosato e AMPA em amostras de solo com o ICP-MS, obtendo LD de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (expresso como concentração de P) (CHEN *et al.*, 2009). Guo, Cai e Yang (2005) analisaram esses compostos em água também por ICP-MS e obtiveram LD de $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$. Esses resultados confirmam a sensibilidade desse detector aos compostos glifosato e AMPA, e a possibilidade de uso em diferentes matrizes.

O GC-MS no modo SIM permitiu aumentar o desempenho e a especificidade no modo de detecção, em relação ao modo TIC, pois foi possível eleger os íons específicos mais abundantes dos compostos, obtendo LD de $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$, semelhante ao HPLC-ICP-MS/MS. Porém, neste estudo, foi considerado o segundo sistema mais adequado para análise de glifosato e AMPA, pois esse sistema cromatográfico apresentou maior tempo de análise que o HPLC-ICP-MS/MS e etapa prévia de derivatização. O GC-MS no modo SIM já foi empregado em análises de glifosato e AMPA em matrizes vegetais como soja com LD de $60 \mu\text{g kg}^{-1}$ (ABREU; MONTAGNER, 2008), em milho com LD menor que $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ (BERNAL *et al.*, 2012), em água e solo com LD

de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ e $3 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente (BORJESSON; TORSTENSSON, 2000).

Apesar de possuir alta seletividade e sensibilidade e ainda fornecer informações estruturais a respeito dos compostos eluídos da coluna, o GC-MS no modo TIC apresentou resultado semelhante ao GC-NPD, ambos com LD de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Esses sistemas cromatográficos foram considerados os menos sensíveis nas análises e ainda foi necessária etapa de derivatização, pois ambos estavam acoplados à técnica de cromatografia gasosa.

Detector de nitrogênio-fósforo, como o próprio nome indica, é um detector altamente seletivo para compostos contendo nitrogênio ou fósforo. Dessa forma, torna-se adequado para a detecção de glifosato e AMPA (HU; CHEN; LI, 2008). Por ser considerado um detector seletivo, esperava-se maior sensibilidade na análise dos compostos, pois apresentam esses átomos em sua composição. Porém, neste estudo, o GC-NPD foi considerado o menos sensível entre as técnicas de análise investigadas. Isso pode ter ocorrido, pois há somente um átomo de nitrogênio e um de fósforo nas moléculas estudadas e sabe-se que a sensibilidade desse detector é proporcional à presença desses átomos nas moléculas dos compostos que são analisados. Além disso, a especificidade e a detectabilidade desse detector podem sofrer influência de variáveis experimentais, como corrente de aquecimento da pérola, potencial do queimador, vazão do gás e posição da pérola (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2011). O GC-NPD foi empregado poucas vezes na determinação de glifosato, sendo empregado em análises de amostras de solo por Hu, Chen, Li (2008), e Roy et al. (1989).

O HPLC-DAD apresentou desempenho intermediário em relação aos demais, com LD instrumental de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$, sendo menos sensível que o HPLC-ICP-MS/MS e o GC-MS modo SIM. Alguns trabalhos já empregaram o HPLC-DAD na análise de glifosato e AMPA em água obtendo LD de $0,009 \text{ mg L}^{-1}$ (QIAN et al., 2009) e em maçã LD de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (QIAN et al., 2009b). O DAD pode ser um detector especialmente útil para o desenvolvimento de métodos, por possibilitar uma “varredura” da região UV-visível em uma única corrida cromatográfica, fornecendo dados e informações importantes para análises qualitativas de amostras desconhecidas (MEYER, 2010). A

absorbância em todos os comprimentos de onda determinada de modo simultâneo também confere maior sensibilidade ao DAD que os demais detectores de UV-visível. O espectro de absorbância obtido para o composto estudado pode ser comparado com uma biblioteca online, quando disponível, podendo fornecer informações que auxiliam na confirmação do composto, além de possibilitar uma detecção mais precisa e redução de interferentes (MEYER, 2010).

A Tabela 7 apresenta a comparação de algumas características gerais dos sistemas cromatográficos estudados.

Tabela 7 – Comparação das características gerais dos sistemas cromatográficos estudados para análise de glifosato e AMPA

Sistemas cromatográficos					
	GC-MS (TIC)	GC-MS (SIM)	GC- NPD	HPLC- DAD	HPLC-ICP- MS/MS
Linearidade	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear
Sensibilidade	+	+++	+	++	++++
Fácil para usar	+++	+++	+++	++	+
Preço	++	++	++	+++	+
Aplicabilidade em matrizes complexas	++	+++	++	+++	++++

Escala de desempenho: + = moderado, ++ = bom, +++ = muito bom, ++++ = excelente

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

2.4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem concluir que os sistemas cromatográficos estudados são eficientes para a análise de glifosato e AMPA. Todos apresentaram seletividade para os compostos e a linearidade foi confirmada para as curvas dos dois compostos, nos níveis de concentração estudados nos sistemas cromatográficos.

Considerando o limite máximo de resíduo estabelecido pela EPA para água doce ($0,7 \text{ mg L}^{-1}$), os sistemas cromatográficos que permitem a quantificação de glifosato e AMPA abaixo desse valor são o HPLC-ICP-MS/MS (LD $0,0082 \text{ mg L}^{-1}$), o GC-MS modo SIM (LD $0,0015 \text{ mg L}^{-1}$) e o HPLC-DAD (LD $0,3 \text{ mg L}^{-1}$).

Entre os sistemas cromatográficos estudados, apenas para as análises no HPLC-ICP-MS/MS, não foi necessária etapa de derivatização dos padrões para a construção da curva analítica. Isso foi considerado uma vantagem, pois o uso de técnicas que não demandam essa etapa torna-se mais simples, eficiente e viável, principalmente para a aplicação em matrizes complexas.

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DO PH NA EXTRAÇÃO DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) EM LENHO DE EUCALIPTO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC-ICP-MS/MS

RESUMO

Glifosato é um herbicida usado no controle de ervas daninhas anuais e perenes, podendo ser utilizado em diferentes culturas. Por ser considerado de toxicidade relativamente baixa, foi amplamente difundido no mundo e é um dos poucos ingredientes ativos registrados para o manejo de plantas daninhas na cultura do eucalipto. Apesar de sua eficiência, pouco se sabe a respeito dos seus efeitos sobre as plantas de eucalipto, sendo muito comum a ocorrência de deriva que prejudica o desenvolvimento da planta e acarreta perdas na produção. Dessa forma, o desenvolvimento de um método de extração e análise do glifosato e AMPA em eucalipto permitiria a detecção e a quantificação desses compostos na planta e auxiliaria em estudos a respeito da dinâmica do herbicida no vegetal. O método de extração proposto neste estudo consistiu na adição de 5 mL de água ultrapura com pH = 11, em 0,5 g de amostra, com agitação em vórtex por 60 s e centrifugação por 10 min a 4000 rpm. Em seguida, foram recolhidos 2 mL do sobrenadante, os quais foram submetidos à aquecimento em banho-maria com glicerina (50 °C) sob fluxo de ar contínuo, por 30 min. O extrato concentrado foi reconstituído com solução de 50 mM ácido acético/acetato de amônio: 5 mM tetrabutilamônio: 1% (v/v) metanol (pH=4,7) e injetado no HPLC-ICP-MS/MS. Houve separação dos compostos com tempo total de análise inferior a 5 min. Foi obtida recuperação média de 72% (DPR \pm 4,08) para o glifosato e acima de 100% para o AMPA. Esse valor elevado na recuperação do AMPA foi ocasionado por interferente observado no mesmo tempo de retenção que o analito. Para removê-lo, foi estudado dois métodos de limpeza dos extratos. Foi estudada a remoção do fosfato das amostras por reação de precipitação e *clean up* com resina aniônica. Ambos os métodos reduziram a presença de coextrativos nas análises, no entanto, removeram também os analitos de interesse. Dessa forma, o AMPA foi excluído das análises. O método foi seletivo e linear para o glifosato, com limite de detecção de 0,82 mg Kg⁻¹ e limite de quantificação de 2,72 mg Kg⁻¹, abaixo dos limites máximos de resíduos definidos para soja (10 mg kg⁻¹) e algodão (3 mg kg⁻¹). Porém foram observadas baixa precisão e exatidão do método, as quais foram pouco afetadas pelo efeito de matriz negativo, mas consideravelmente prejudicadas por interferentes presentes na matriz, os quais não foram removidos com êxito. Diante disso, o método apresenta potencial para quantificação de glifosato e AMPA em lenho de eucalipto. Contudo estudos futuros são necessários para a limpeza dos extratos e minimização do efeito de matriz, que prejudicaram a quantificação dos compostos.

Palavras-chave: Eucalipto. Glifosato. HPLC-ICP-MS/MS. Especificação.

3.1. INTRODUÇÃO

Glifosato [N- (fosfonometil) glicina] foi desenvolvido como herbicida pela Monsanto nos anos 1970 e se tornou amplamente utilizado no mundo, principalmente na agricultura, devido à alta eficiência desse composto no controle de plantas daninhas. O mercado mundial para o glifosato compreende tanto o uso como um herbicida agrícola, como também em áreas não agrícolas, como em jardins, indústrias, ferrovias, entre outros (WOODBURN, 2000).

Por apresentar potencial tóxico ao meio ambiente e à saúde humana, diversos países e organizações estabelecem limites máximos de resíduos (LMR) para o glifosato em água, no solo e em matrizes vegetais. Esses teores máximos de resíduos são estabelecidos em baixas concentrações, o que dificulta a análise desse composto em matrizes complexas. Dessa forma, há uma contínua necessidade de métodos analíticos capazes de auxiliar no monitoramento do glifosato em diferentes matrizes (CHEN *et al.*, 2013).

Métodos de extração e quantificação de glifosato e do principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), já foram desenvolvidos em diferentes matrizes como água (HANKE, SINGER, HOLLENDER, 2008), solo (DRUART *et al.*, 2011), soja (ABREU, MATTA, MONTAGNER, 2008) e frutas (CHEN *et al.*, 2013). Porém, nos últimos 15 anos, ainda são poucos os estudos desenvolvidos para análise desses compostos em matrizes complexas, como vegetais, solos e lodo de esgoto (KOSKINEN; MAREK; HALL, 2016).

Água com $\text{pH} \leq 7$ têm sido comumente utilizada para extrair glifosato e AMPA em diversas matrizes vegetais como: melancia, laranja, morango, pêra, maçã, repolho, pepino, espinafre, batata, tomate, açafrão, pimenta, coentro, café, arroz, chá, gengibre, café, rabanete, feijão, soja, milho, grãos de cereais, chá, folhas, alfafa, flores, arbustos (KOSKINEN; MAREK; HALL, 2016). Outras combinações, como água/metanol (BERNAL *et al.*, 2012; RAJI *et al.*, 2014), água/diclorometano (KRUBE *et al.*, 2011; MARTÍN-JÚNIOR *et al.*, 2009; ROYER *et al.*, 2000; SCHRUBBERS *et al.*, 2016) e água/clorofórmio (ABREU; MATTA; MONTAGNER, 2008; ARREGUI *et al.*,

2003; CESSNA; CAIN, 1992; COWEL *et al.*, 1986; KONAR; ROY, 1990; MOYE; MILES; SCHERER, 1983; ROY *et al.*, 1989; SEIBER *et al.*, 1984; TUINSTRA; KIENHUIS, 1987;), também têm sido estudadas para a extração desses compostos em matrizes vegetais.

Glifosato e AMPA apresentam estruturas químicas similares e alta solubilidade em solventes polares, como a água (WILLOUD *et al.*, 2005). Por ser derivado de um aminoácido, o glifosato apresenta comportamento zwitteriônico, sofrendo desprotonações e protonações conforme o pH do meio. A Figura 2 (pg. 21) ilustra as etapas de dissociação do glifosato nos quatro valores de pKa, 0,78; 2,09; 5,96 e 10,98 e os três valores de AMPA, 2,4; 5,9 e 10,8 (YOU; KOROPCHAK, 2003). Na etapa de extração, é importante conhecer, previamente, o comportamento desses compostos, pois essas propriedades químicas dificultam a detecção, especialmente em níveis de resíduos em matrizes ambientais (CHEN *et al.*, 2013).

Para a separação e a análise de glifosato e AMPA, os métodos mais utilizados são a cromatografia gasosa e a líquida (CHEN *et al.*, 2009). Porém a ausência de grupos cromóforos e a baixa volatilidade desses compostos requerem uma etapa de derivatização antes das análises. Nesse contexto, a análise utilizando o espectrômetro de massas triplo quadrupolo com plasma indutivamente acoplado (do inglês ICP-MS/MS) como detector apresenta vantagens, pois não é necessária etapa de derivatização, além de detecção específica do elemento, alta sensibilidade e capacidade de eliminar interferências provenientes da matriz (GUO; CAI; YANG, 2007).

Estudo recente realizado com o sistema de GC acoplado ao ICP-MS/MS apresentou excelentes resultados para a análise de compostos orgânicos que possuem na estrutura química heteroátomos de P, S e Cl, em amostras alimentares (NELSON *et al.*, 2015). Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi desenvolver e validar um método de extração do glifosato e do AMPA do lenho de eucalipto e realizar as análises por especiação em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector espectrômetro de massas triplo quadrupolo com plasma indutivamente acoplado (do inglês HPLC-ICP-MS/MS).

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Amostras

Amostras do lenho (FIGURA 1) foram obtidas de plantas adultas de eucalipto na Fazenda Experimental do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, município de Montes Claros (MG, Brasil). Foram secas em estufa por 72 horas a 50 °C, maceradas em moinho e peneiradas em tamis com tela de 32 *mesh* (0,500 mm). Em seguida, foram armazenadas em sacos de papel à temperatura ambiente, ao abrigo de luz e umidade.

Figura 1 – Fotografia do lenho de eucalipto moído e peneirado em tamis com tela de 32 *mesh*



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

3.2.2. Reagentes e soluções

Os padrões analíticos de glifosato (99,2 % m/m) e AMPA (99,0 % m/m) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Soluções padrão estoque de glifosato e AMPA na concentração de 500 mg L⁻¹ foram preparadas individualmente em água ultrapura (resistividade 18 MΩ cm), obtida pelo sistema Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções estoque nas

concentrações de 25 e 5 mg L⁻¹ no mesmo solvente. Todas as soluções foram estocadas a 4 °C no refrigerador em frascos plásticos, para evitar a complexação dos padrões com íons metálicos presentes nos frascos de vidro (MAREK; KOSKINEN, 2014). Também foram adquiridos solução de ácido acético (49% m/v), acetato de amônio (65% m/m) metanol (grau HPLC) e hidróxido de tetrabutílamônio, todos obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), para o preparo da fase móvel.

Como o estudo envolveu a aplicação de método para a determinação dos elementos em nível de traço, foram tomados cuidados para evitar perdas e contaminações. Todas as vidrarias, recipientes e frascos para preparo e armazenamento das soluções e amostras foram lavados com detergente neutro, posteriormente, imersos em solução de HNO₃ 10 % (v/v) e enxaguados com água destilada.

3.2.3. Instrumentação

Para a análise de especiação do fósforo, presente nas moléculas do glifosato e do AMPA, foi utilizado um sistema hifenado, composto de cromatografia líquida de alta eficiência (*High Pressure Liquid Chromatographer* - HPLC) e de espectrômetro de massas triplo quadrupolo com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma Tandem Mass Spectrometry* – ICP-MS/MS).

O módulo de cromatografia líquida de alta eficiência (modelo 1260 Infinity Series, Agilent Technologies, Alemanha) é equipado com bomba quaternária, auto-amostrador, degás de vácuo e compartimento de coluna com termostato. Para a separação do glifosato e AMPA, utilizou-se coluna analítica ZORBAX SB-C8 (4.6 x 150 mm, 5 µm, Agilent Technologies, CA, Estados Unidos).

O ICP-MS/MS modelo 8800[®] (Agilent Technologies, Hachioji, Japão), equipado com auto-amostrador CETAC ASX com 220 posições, bomba peristáltica de baixa pulsação com 3 canais (amostra, padrão interno e dreno). O sistema de introdução de amostras de quartzo, composto de nebulizador concêntrico feito, de câmara de nebulização de duplo passo

envolvida 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. O gerador de rádio frequência de 27,12 MHz de estado sólido com bobinas helicoidais pode operar entre 500 e 1600 Watts de potência, alimentado com Argônio 99,998%, para a sustentação do plasma. O 8800[®] conta com o quadrupolo para seleção dos íons que entrarão no sistema de reação octopolar de terceira geração (Octopole Reaction System - ORS3[®]), para a remoção de interferentes isobáricos pressurizado com Hélio 99,999% ou O₂ 99,999%, por meio da discriminação de energia cinética ou reação. Após o ORS³, há outro espectrômetro de massas do tipo quadrupolo com barras hiperbólicas, com sistema de detecção composto de eletromultiplicadora de duplo estágio (pulsado e analógico), que cobre o espectro de massas entre 2–260 u.m.a.

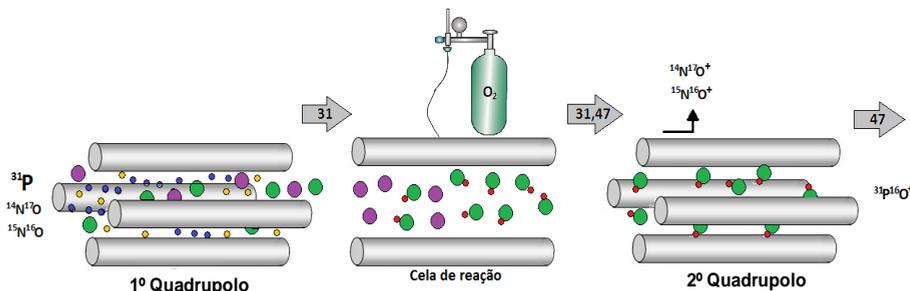
Para o preparo de amostras, utilizaram-se: (1) vórtex da Phoenix para homogeneização das amostras (São Paulo, Brasil); (2) pHmetro microprocessado da Quimis para controle do pH (São Paulo, Brasil); (3) purificador de água Elix 100 e Synergy[®] UV da Millipore (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha); (4) centrífuga modelo KC5 (Kindly, São Paulo, Brasil), espectrofotômetro de UV-Visível (Agilent Technologies, CA, Estados Unidos), para a determinação do fosfato nas amostras.

3.2.4. Especificação do fósforo na análise de glifosato e AMPA por HPLC-ICP-MS/MS

Foram submetidos à análise soluções padrão do herbicida glifosato e do metabólito AMPA, os extratos brancos e fortificados obtidos a partir do lenho de eucalipto. Para a detecção e a quantificação dos analitos de interesse, foi monitorado o fósforo presente nas moléculas desses compostos.

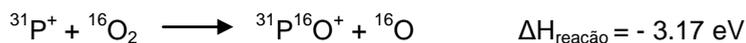
O primeiro quadrupolo foi regulado para detectar m/z 31 (³¹P), pois é a massa que apresenta alto grau de pureza isotópica (³¹P 100%) para o P. Além disso, o ICP-MS/MS possibilita utilizar uma segunda massa de análise, pois inclui uma cela de reação e colisão (CRC), que está posicionada entre dois analisadores de quadrupolo (FIGURA 2), a qual foi empregada para a remoção de interferentes isobáricos.

Figura 2 – Esquema do modo de deslocamento de massa utilizando célula de gás oxigênio para a medição de P



Fonte: Adaptado de NELSON *et al.*, 2015.

Na CRC foi introduzido o O₂ como gás de reação e o segundo quadrupolo foi ajustado para monitorar o produto da reação m/z 47 ($^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$), de modo que esses íons fossem detectados com o mínimo de interferências.



A separação dos compostos glifosato e AMPA foi realizada tomando-se como referência as condições empregadas por Sadi, Vondeheide e Caruso (2004). As condições de análise adotadas consistiram em coluna analítica ZORBAX SB-C8 (4,6 x 150 mm, 5 μm), volume de injeção de 50 μL , fase móvel composta de solução de 50 mM ácido acético/acetato de amônio: 5 mM tetrabutilamônio: 1% metanol com pH=4,7, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ com eluição isocrática. As condições de análise do ICP-MS/MS estão apresentadas na Tabela 1 (pg. 44).

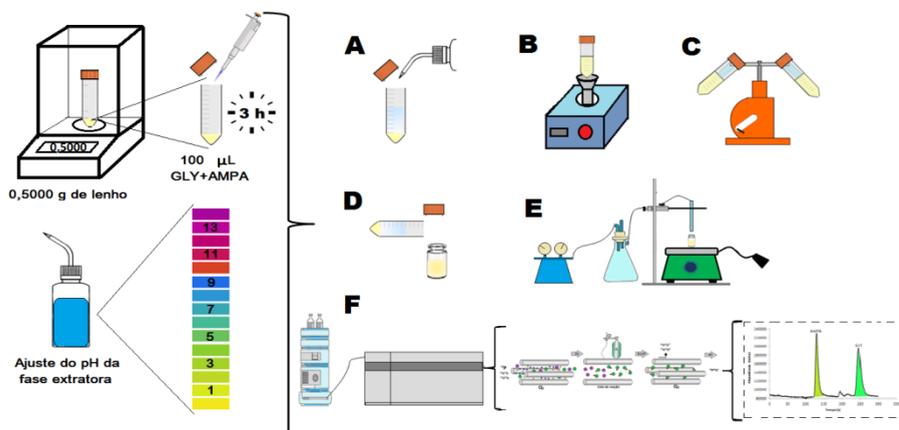
3.2.5. Estudo do pH para extração de glifosato e AMPA em lenho de eucalipto

Amostras de lenho de eucalipto (0,5000 g) foram fortificadas com 100,0 μL da solução de trabalho (2,5 mg L⁻¹) contendo glifosato e AMPA e deixadas em repouso por três horas. A fase extratora foi avaliada utilizando água ultrapura com valores de pH ajustados para 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13, com

solução de NaOH (1 mol L^{-1}) e HCl (1 mol L^{-1}). Nas amostras fortificadas, foram adicionadas 5 mL de água ultrapura, com pH devidamente ajustado. O sistema foi homogeneizado em vórtex por 60 segundos. Em seguida, centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. Foram coletados 2 mL do sobrenadante e submetidos ao aquecimento em banho-maria com glicerina ($50 \text{ }^\circ\text{C}$), sob fluxo de ar contínuo para a redução do volume. O extrato concentrado foi reconstituído para o volume inicial coletado (2 mL), com solução de 50 mM ácido acético/acetato de amônio: 5 mM tetrabutilamônio: 1% metanol, pH=4,7 (fase móvel).

Ainda foi realizado o monitoramento do pH das amostras durante todo o procedimento de extração, sendo inicialmente ajustada a (1) fase extratora e, em seguida, medidos os valores de pH (2) após homogeneização; (3) centrifugação; (4) redução do volume e reconstituição com fase móvel. Por fim, todas as amostras tiveram pH final ajustado para 4,7. Em seguida, foram filtradas em membrana de nylon $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e transferidas para vials de injeção, permanecendo sob refrigeração até o momento da análise. Na Figura 3, está esquematizado o processo de extração e análise para glifosato e AMPA.

Figura 3 – Esquema do processo de extração do glifosato e AMPA e análise por HPLC-ICP-MS/MS



(A) Adição da fase extratora. (B) Homogeneização em vórtex. (C) Centrifugação. (D) Coleta do sobrenadante. (E) Redução do volume e reconstituição com fase móvel. (F) Análise por HPLC-ICP-MS/MS

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

3.2.6. Limpeza dos extratos

Para análises de compostos em nível de resíduo em matrizes complexas, geralmente é necessária realizar a etapa de limpeza dos extratos, de modo a diminuir ou remover coextrativos que podem interferir nas análises. Neste estudo, foram investigados dois processos de *clean up*: o primeiro, avaliando a remoção do fosfato presente nas amostras, por meio de reação de precipitação, e o segundo, para a remoção do fosfato e de outros interferentes utilizando resina aniônica.

3.2.6.1. Estudo da remoção do fosfato (PO_4^{3-})

Para o estudo da remoção do fosfato proveniente do lenho, primeiramente foi construída uma curva analítica, para quantificar o fosfato nas amostras por espectrofotômetro de UV-Visível. Para isso, as amostras foram submetidas à reação de colorimetria para ortofosfatos, conforme descrito pelo método 365.3 da EPA (*Environmental Protection Agency*, 1978).

Conhecida a presença e feita a quantificação do fosfato na amostra, foi estudada a reação de precipitação desse composto. A precipitação dos íons PO_4^{3-} ocorre por meio da adição de solução de molibdato de amônio em meio de ácido nítrico. Para verificar a remoção do PO_4^{3-} dos extratos, foram avaliados: diferentes volumes de amostra, de reagentes e a ordem de adição desses na reação (TABELA 1).

Tabela 1 – Ensaios realizados para a redução ou remoção do fosfato das amostras

VOLUME DOS REAGENTES				
TESTE	Amostra	Solução de molibdato de amônio (0,1 mol L ⁻¹)	Solução de ácido nítrico (6 mol L ⁻¹)	Solução tampão acetato *
A	1 mL	1 mL	1 mL	-
B**	1 mL	1 mL	1 mL	-
C	2 mL	1 mL	1 mL	-
D	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
E	1 mL	1 mL	1 mL	0,5 mL

*50 mM ácido acético/acetato de amônio: 5 mM tetrabutilamônio: 1 % metanol, pH=4,7

**Nesse teste os volumes foram mantidos semelhante ao primeiro teste, porém o ácido nítrico foi adicionado na amostra antes da solução de molibdato de amônio.

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

3.2.6.2. *Clean up* com resina aniônica

Um segundo método de purificação dos extratos foi realizado com adaptações, conforme proposto por Abreu *et al.* (2008), utilizando-se resina trocadora de ânions Amberlite® IRA402 (*chloride form*). A coluna (20 cm x 1,5 cm diâmetro interno) foi empacotada com 4,0 mL da resina. Em seguida, foi condicionada com 50,0 mL de água ultrapura, para retirar o excesso de íons cloreto. Um volume de 2 mL de extrato foi ajustado para pH entre 10 e 11 e eluído na coluna. O recipiente foi lavado com três parcelas de 5,0 mL de água ultrapura. A passagem do extrato pela coluna ocorreu por gravidade, à vazão de 3 mL min⁻¹. O analito retido na resina foi eluído com 4,0 mL de HCl 6,0 mol L⁻¹, à vazão de 3 mL min⁻¹. O eluato coletado foi submetido à secura em banho-maria com glicerina a 50 °C em chapa de aquecimento sob fluxo de ar contínuo. O extrato seco foi ressuspensionado para um volume de 2 mL em balão volumétrico com solução de 50 mM ácido acético/acetato de amônio: 5 mM tetrabutilamônio: 1 % metanol, pH=4,7 (fase móvel).

3.2.7. Validação do método

Para verificar a adequação do método, foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, efeito de matriz, seletividade, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção, conforme sugerido por Thompson, Ellison e Wood (2002). Todas as análises foram realizadas por HPLC-ICP-MS/MS. Todos os cálculos e testes pertinentes à validação foram realizados com o auxílio do *software* Microsoft Excel®.

3.2.7.1. Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas dos extratos obtidos após extração dos componentes da matriz isenta dos compostos em estudo (branco), com os cromatogramas dos extratos da amostra de lenho de eucalipto fortificada, preparada e analisada conforme o procedimento otimizado.

3.2.7.2. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados fortificando amostras de lenho de eucalipto com o glifosato e o AMPA nas menores concentrações aceitáveis e submetendo à extração e quantificação por HPLC-ICP-MS/MS. Os limites foram considerados como três e dez vezes o sinal da linha de base obtidos nas análises para o LD e LQ, respectivamente.

3.2.7.3. Linearidade e efeito de matriz

Para avaliar a linearidade e o efeito de matriz nas análises por HPLC-ICP-MS/MS foram construídas duas curvas analíticas: uma, em solvente puro (água ultrapura) e outra, no extrato da matriz, contendo os analitos em cinco níveis de concentração: 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ (de fósforo), correspondente a 0,27, 0,5, 0,8, 1,1 e 1,4 mg L^{-1} de glifosato e 0,18, 0,37,

0,55, 0,68 e 0,92 mg L⁻¹ de AMPA, sendo três replicatas independentes em cada nível. Das curvas analíticas foram obtidas as equações da reta por regressão linear, utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Os valores dispersos foram tratados e confirmados pelo teste de Jacknife com exclusão máxima de 22,2% dos dados. Foram verificadas as premissas relativas aos resíduos da regressão e ajuste ao modelo linear, que validam o uso do MMQO: i) normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner; ii) homoscedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe; iii) independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson; e iv) teste F para verificar a significância da regressão e ajuste do modelo linear. Os efeitos produzidos pelos componentes da matriz foram avaliados pela razão entre os coeficientes angulares obtida da curva analítica na matriz e da curva analítica em água ultrapura, multiplicado por 100 [% = (Coeficiente angular_{matriz} / Coeficiente angular_{solvente}) x 100]. Assim, encontrado valor de 100% significa que nenhum efeito de matriz está presente. Se o valor foi inferior a 100%, indica que há supressão na área do analito provocada pela matriz. O valor superior a 100% indica que há aumento na resposta em presença de matriz (CHAMKASEM; HARMON, 2016).

3.2.7.4. Precisão e exatidão

Foram avaliados por meio das injeções de amostras do analito na matriz, após extração, nas concentrações de 1xLQ (50 µg L⁻¹), 2xLQ (100 µg L⁻¹) e 5xLQ (250 µg L⁻¹). A precisão, sob condições de repetitividade, foi expressa em termos de desvio padrão relativo (DPR), obtido para as replicatas de amostras fortificadas em cada nível de concentração. Esse parâmetro foi considerado aceitável quando ≤ 20% (THOMPSON *et al.*, 2002). A exatidão foi investigada por meio da média das recuperações aparentes obtidas para as replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração. Em seguida, foram confrontados com os intervalos aceitáveis de recuperação para a análise de resíduos, que geralmente estão entre 70 e 120%, com DPR de até ± 20% (THOMPSON *et al.*, 2002).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

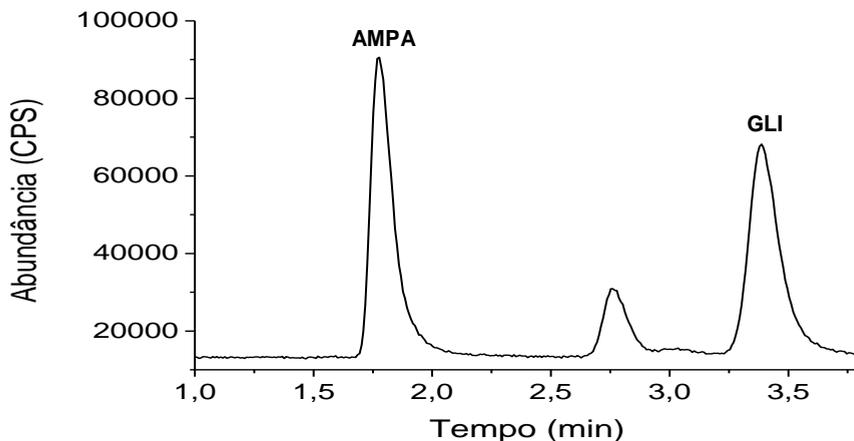
3.3.1. Especificação do fósforo na análise de glifosato e AMPA por HPLC-ICP-MS/MS

O ICP-MS/MS possibilita a análise elementar. Dentre os possíveis elementos constituintes das moléculas de glifosato e AMPA, foi escolhido o ^{31}P , para ser monitorado (NELSON *et al.*, 2015). O primeiro quadrupolo foi programado para detectar o P $m/z = 31$. O segundo foi ajustado para monitorar o produto da reação $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ $m/z 47$. A reação do ^{31}P com o O_2 na CRC foi explorada com o objetivo de alterar a massa atômica do P a ser detectada no segundo quadrupolo, pois há interferentes (íons poliatômicos) provenientes do plasma que podem alterar a resposta da detecção (BECKER *et al.*, 2003). Isso ocorre devido à formação de íons poliatômicos, como $^{14}\text{N}^1\text{H}^{16}\text{O}^+$, $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ e $^{12}\text{C}^1\text{H}_3^{16}\text{O}^+$ formados a partir do plasma de gás argônio, que contribuem com a intensidade do sinal $m/z = 31$ (CHEN *et al.*, 2009).

Diferentes gases, como He, H_2 , O_2 e NH_3 , podem ser utilizados na cela de reação e colisão (CRC) (BOLEA-FERNANDES *et al.*, 2015), sendo que, neste estudo, optou-se pelo uso do O_2 , pois, em alguns trabalhos, foi verificado que a reação com oxigênio potencializou a sensibilidade na detecção de compostos contendo fósforo, em matriz alimentar (NELSON *et al.*, 2015) e água (POPP *et al.*, 2008; SADI; VONDERHEIDE; CARUSO, 2004).

Na Figura 4, é possível observar que as condições de análise empregadas promoveram a separação dos compostos, além da estabilidade da linha de base e tempo de análise inferior a 5 minutos. Esses resultados foram eficientes, pois, quando comparada com diferentes técnicas de separação, utilizando ICP-MS como detector, foram observados tempos de análise entre 10 e 40 minutos na determinação desses compostos em amostras de água (GUO, CAI, YANG, 2005; POPP *et al.*, 2008), matrizes biológicas (KAZUI; SETO; INOUE, 2014) e vegetais (YANG *et al.*, 2009).

Figura 4 – Cromatograma obtido da quantificação do P ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) proveniente das moléculas de glifosato (GLI) e AMPA (soluções padrão em tampão acetato (pH=4,7)) em análise por HPLC-ICP-MS/MS



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

3.3.2. Estudo do pH para extração de glifosato e AMPA em lenho de eucalipto

A avaliação da água como fase extratora, ajustada em diferentes valores de pH, foi realizada para verificar a recuperação dos compostos glifosato e AMPA da matriz do lenho de eucalipto. Tanto o glifosato como o AMPA têm grupos amino, fosfônico e carboxílicos, em suas estruturas, permanecendo carregados positivamente ou negativamente, dependendo do pH da solução aquosa, apresentando predominância de cargas negativas em uma ampla faixa de pH (WAUCHOPE, 1976). Isso pode influenciar no modo de interação desses compostos com a fase extratora.

Os valores obtidos no monitoramento do pH durante o processo de extração estão representados na Figura 5. Foi observado que as fases extratoras constituídas de pH 5, 7, 9 e 11 ao entrar em contato com a matriz, apresentaram variação semelhante nos valores de pH, permanecendo em valores entre 4,37 e 4,85, após homogeneização no vórtex e centrifugação. Já as fases constituídas de pH 1 e 13 não apresentaram grandes variações de pH nessas etapas, mantendo esses valores próximos aos ajustados antes da extração.

Figura 5 – Gráficos das variações médias dos valores de pH das amostras durante o processo de extração

(Continua)

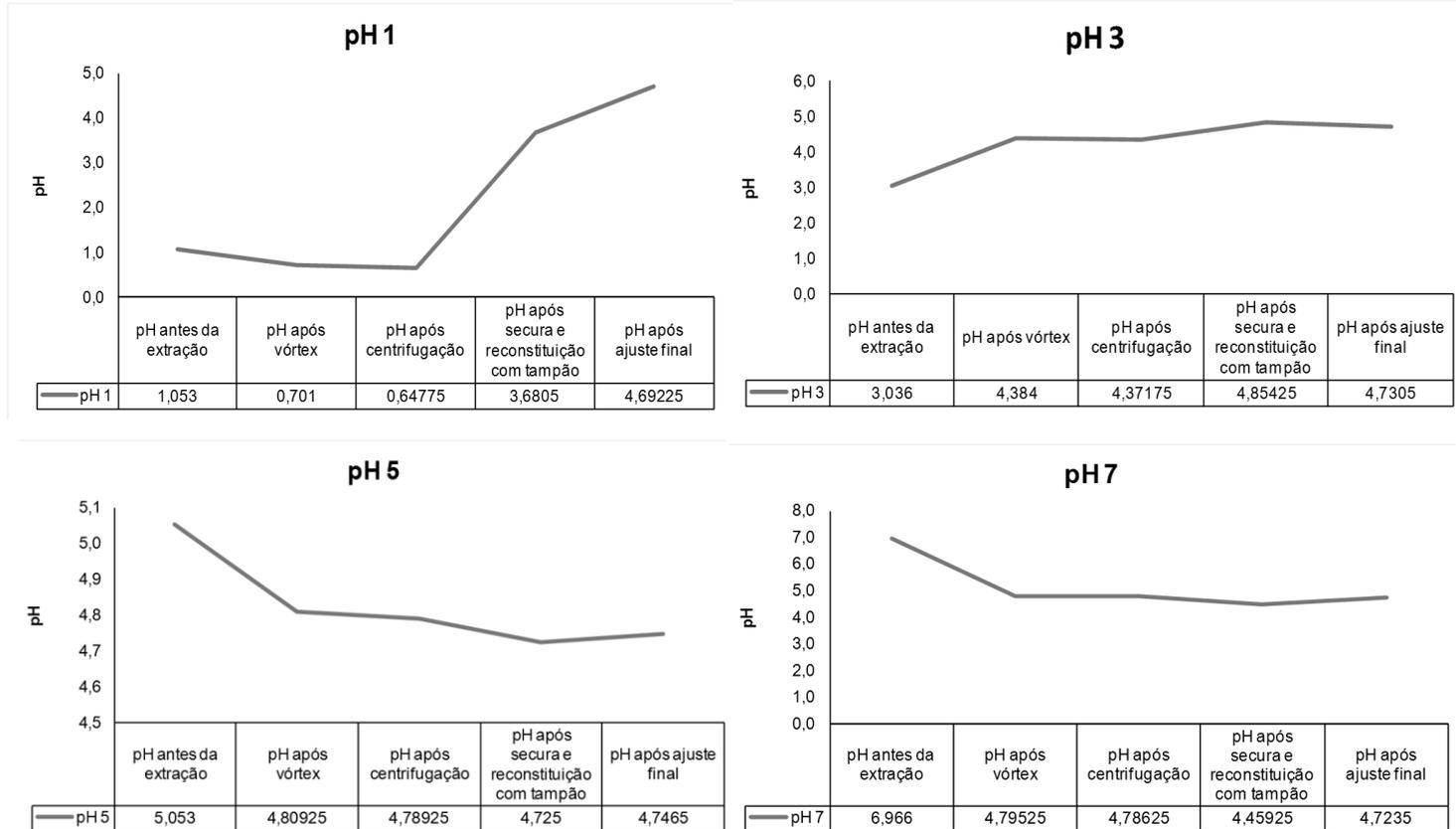
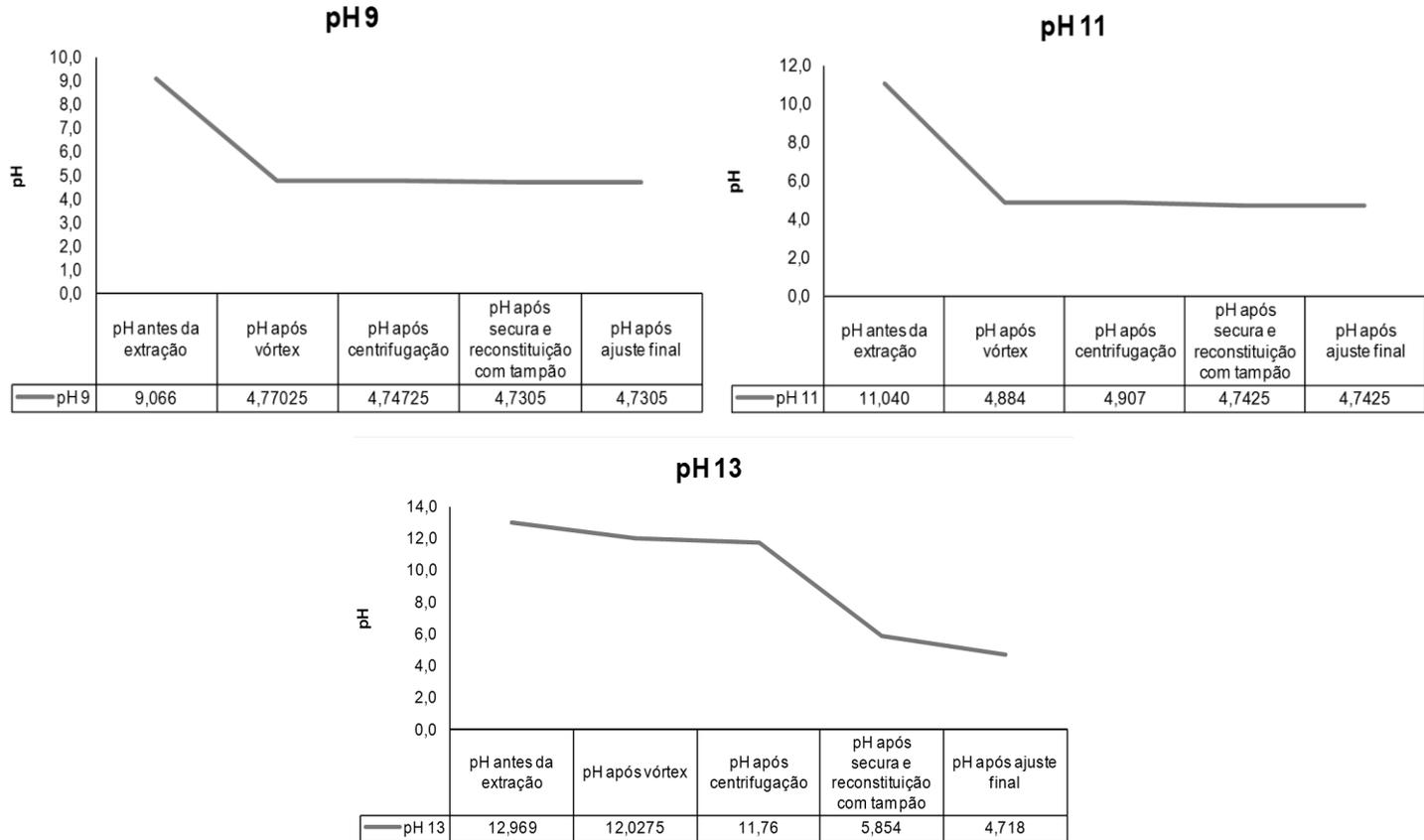


Figura 6 – Gráficos das variações médias dos valores de pH das amostras durante o processo de extração

(Conclusão)

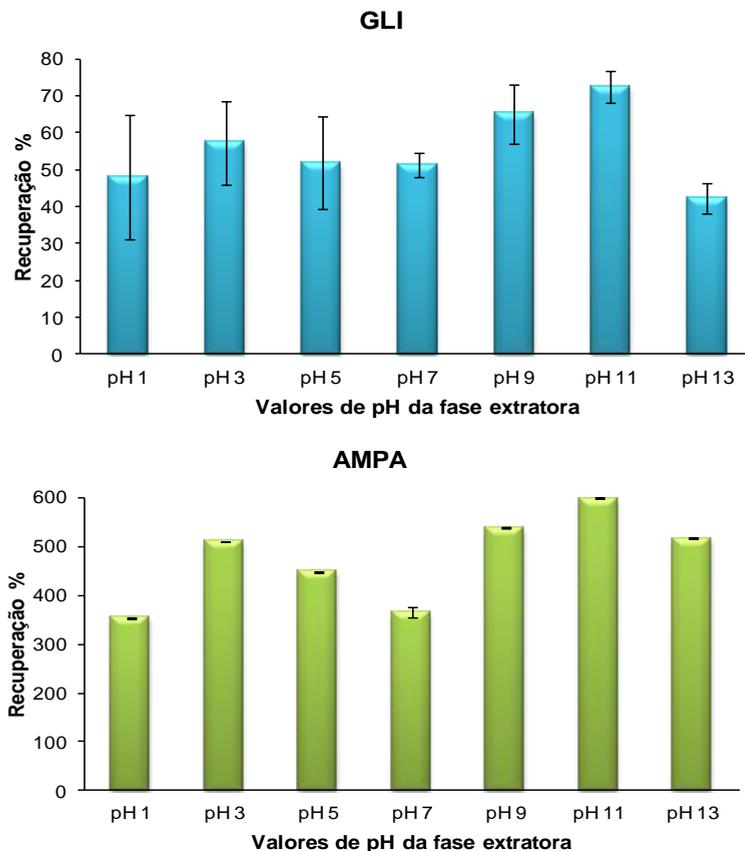


Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

A amostra em estudo é proveniente da madeira do eucalipto, que é composta de celulose, de hemicelulose, de lignina, de extrativos e de cinzas (compostos inorgânicos). Os extrativos compreendem uma ampla classe de compostos químicos, os quais podem ser removidos com água e solventes orgânicos (SUN; TOMKINSON, 2003; YOKOI *et al.*, 2003). Dentre os componentes solúveis em água estão os sais orgânicos, açúcares e algumas substâncias fenólicas (MORAIS *et al.*, 2005), as quais podem ser responsáveis pela variação do pH durante o processo de extração. Esses extrativos também podem estar relacionados com as recuperações acima de 100% para o AMPA (FIGURA 6). Alguns desses compostos estão presentes em alta concentração nas amostras e prejudicaram a quantificação do AMPA, apresentando mesmo tempo de retenção que o analito (1,5 min). Além disso, durante a análise foram observados outros sinais nos extratos da matriz (FIGURA 7 p. 86). No tempo de retenção de 2,8 min, foi observado um sinal intenso, que está associado aos fosfatos livres, os quais geralmente são abundantes em amostras vegetais.

A presença de coextrativos é comumente observada nas análises em matrizes complexas como vegetais, solos e sedimentos, as quais podem apresentar efeito de matriz pela combinação amostra-analito resultando em perdas na sensibilidade e na quantificação dos compostos (IBÁÑEZ *et al.*, 2005). Esse tipo de interferência pode ser minimizado com etapa adicional de limpeza, uso de padrão interno e calibração externa (IBÁÑEZ *et al.*, 2005). Diante desses resultados, foram investigados dois métodos de purificação dos extratos, descritos no item 3.2.6 e os resultados desses testes estão apresentados no item 3.3.3.

Figura 7 – Médias das porcentagens de recuperação de glifosato (GLI) e AMPA e desvios padrões relativos

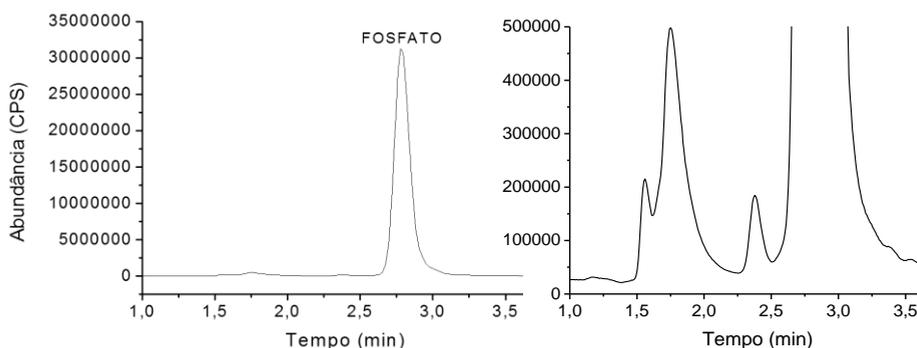


Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Na Figura 6 acima, estão apresentadas as médias de recuperação dos compostos glifosato e AMPA. Pode-se observar que a maior porcentagem de recuperação do glifosato foi obtida em pH 11 (72,42 % \pm 4,08). Em valores de pH acima de 10,14, o glifosato apresenta desprotonação total, aumentando a polaridade e, conseqüentemente, a afinidade do composto pela fase extratora. Além disso, estudo realizado por McConnell e Hosnner (1985) mostra que o pH possui forte influência sob a adsorção do glifosato em minerais, sendo que, o meio alcalino contribui com o decréscimo na taxa de adsorção do composto. Gimsing, Borggaard e Bang (2004) também estudaram a influência da composição do solo e do pH na adsorção do

glifosato e apresentaram resultados semelhantes. Esse comportamento pode ter ocorrido de forma semelhante na extração do glifosato com água em pH 11, das amostras sólidas do lenho de eucalipto, diminuindo a adsorção desse composto na matriz e aumentando a sua solubilidade na fase extratora.

Figura 8 – Cromatograma obtido do extrato da matriz isento dos analitos de interesse sem ampliação (esquerda) e ampliação (direita)



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

3.3.3. Limpeza dos extratos

3.3.3.1. Estudo da remoção do fosfato (PO_4^{3-})

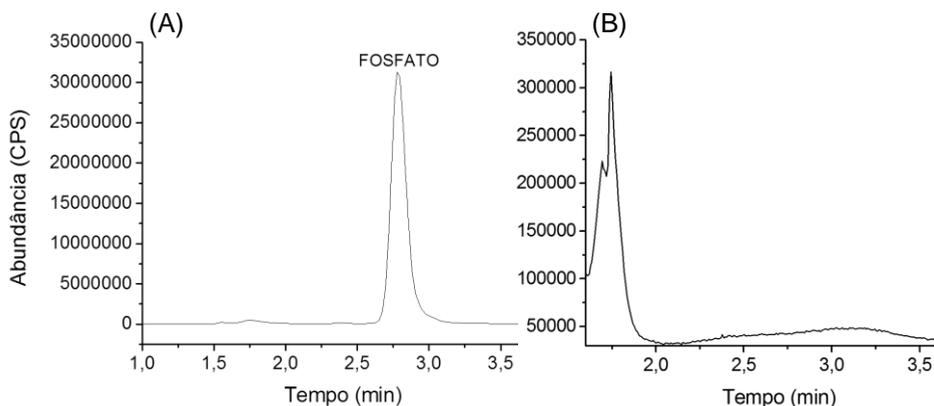
Após realizar o procedimento de extração, conforme descrito no item 3.2.5, o sobrenadante coletado do extrato foi submetido à reação de precipitação de fosfatos presentes na amostra. O fosfato está disponível na forma de hidrogenofosfato (HPO_4^{-2}) e, ao adicionar uma solução de molibdato de amônio em presença de ácido nítrico, ocorre a precipitação do sal duplo fosfomolibdato de amônio, o qual apresenta coloração amarela. Foi verificado que os experimentos A, B e C e E (TABELA 1, pg. 77) não promoveram a precipitação do fosfato. Já a condição do experimento D (TABELA 1, pg. 77) resultou em precipitação, sendo confirmada redução da concentração do fosfato na amostra, por meio de análise por UV-Vis. Esse resultado foi obtido pela adição do tampão acetato na amostra. A formação

do precipitado ocorre pelo efeito do íon comum, pois a solução tampão fornece íons amônio (NH_4^+) à reação, como pode ser verificado na reação descrita abaixo. O aumento da concentração do íon molibdato também poderia ter favorecido a formação do sal, porém a solubilidade desse íon em água é extremamente baixa, o que dificultou estudar o aumento da concentração do composto na reação.



No extrato obtido de 0,5 g de amostra, foram quantificados 19 mg L^{-1} de fosfato e houve redução para $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ após a reação de precipitação (teste D). Ensaios em triplicata foram feitos para serem injetadas no HPLC-ICP-MS/MS, a fim de verificar a influência desse procedimento na quantificação dos compostos glifosato e AMPA. Na Figura 8 pode ser observado um cromatograma obtido após procedimento de remoção do fosfato. O procedimento proposto promoveu a remoção do fosfato das amostras e de outros compostos fosforados como o glifosato e o AMPA, prejudicando a quantificação dos analitos de interesse.

Figura 9 – Cromatograma do extrato da matriz sem remoção do fosfato (A) e extrato fortificado submetido à remoção do fosfato (B)



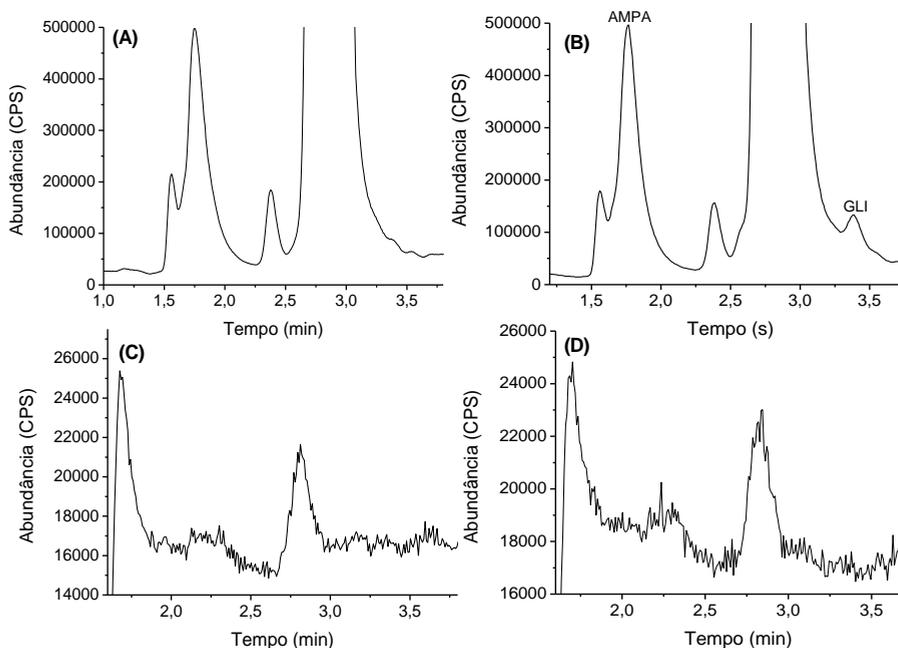
Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

3.3.3.2. *Clean up* com resina aniônica

A resina aniônica foi condicionada com água ultrapura para remover o excesso de íons cloreto e diminuir o caráter básico. Ao adicionar a amostra com pH entre 10 e 11, em que o glifosato e o AMPA estavam totalmente desprotonados, os ânions cloretos da resina foram substituídos pelos compostos. Em seguida, a resina foi reconstituída, eluindo excesso de íons cloreto e o eluato foi recolhido.

O eluato foi injetado no HPLC-ICP-MS/MS, para verificar a eficiência de purificação dos extratos. Ao comparar os cromatogramas obtidos dos extratos sem etapa de *clean up* (Figura 9, A e B) e após etapa de *clean up* (FIGURA 9, C e D), foi observado que houve remoção dos coextrativos da matriz e redução na concentração do fosfato. Em análises de glifosato em amostras de soja Abreu *et al.* (2008) utilizaram a resina aniônica para purificação das amostras e obtiveram os extratos livres de interferentes, possibilitando a quantificação do composto com confiabilidade. A mesma eficiência de limpeza foi obtida por Souza *et al.* (2006) em amostras de solo. No entanto, no presente trabalho a resina removeu os coextrativos e também os compostos glifosato e AMPA. Esses resultados indicaram que a resina é eficiente na limpeza dos extratos, porém, as condições empregadas nesse estudo devem ser otimizadas de modo a não prejudicar a detecção do glifosato e do AMPA.

Figura 10 – Cromatogramas obtidos do extrato branco da matriz (A) e dos padrões na matriz (B) sem *clean up* com resina aniônica. Extratos branco (C) e adicionados de padrão (D) após *clean up* com resina aniônica



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

3.3.4. Validação do método

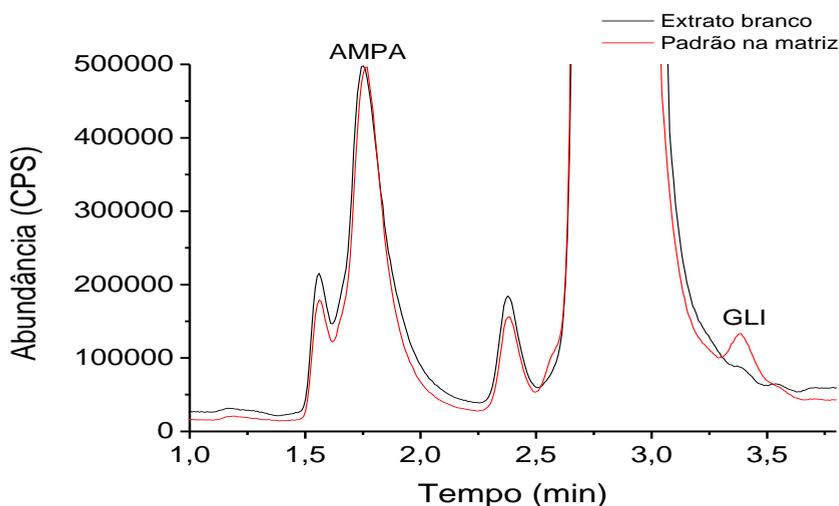
3.3.4.1. Seletividade

Para avaliar a seletividade do método de extração e a análise por cromatografia compararam-se os cromatogramas do extrato obtido da matriz de lenho de eucalipto isenta dos compostos glifosato e AMPA com os extratos de amostras de lenho de eucalipto fortificadas com os compostos em estudo (FIGURA 10).

A amostra de lenho de eucalipto, apesar de possuir uma composição complexa, não apresentou interferentes no mesmo tempo de retenção do glifosato (3,4 minutos) o que torna a metodologia seletiva para esse

composto. Porém, um interferente foi observado no mesmo tempo de retenção do AMPA (1,7 minutos). Para remover essa interferência foram estudados dois métodos de limpeza do extrato, mas a quantificação dos compostos foi prejudicada, pois o *clean up* removeu também os analitos de interesse. Diante desses resultados, o método foi considerado não seletivo para o AMPA e optou-se por seguir a validação apenas com o glifosato.

Figura 11 – Cromatogramas obtidos do extrato da matriz isento dos analitos de interesse (branco) e do extrato da matriz fortificado com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo presentes nas moléculas de glifosato (GLI) e AMPA



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

3.3.4.2. Limites de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados pela relação de 3 e 10 vezes a relação sinal/ruído. Os valores de LD e LQ para análise de glifosato, relativos ao equipamento nas condições analíticas usadas, foram de $8,2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $27,3 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Já os valores de LD e LQ relativos ao método foram, respectivamente, de $0,82 \text{ mg kg}^{-1}$ e $2,72$

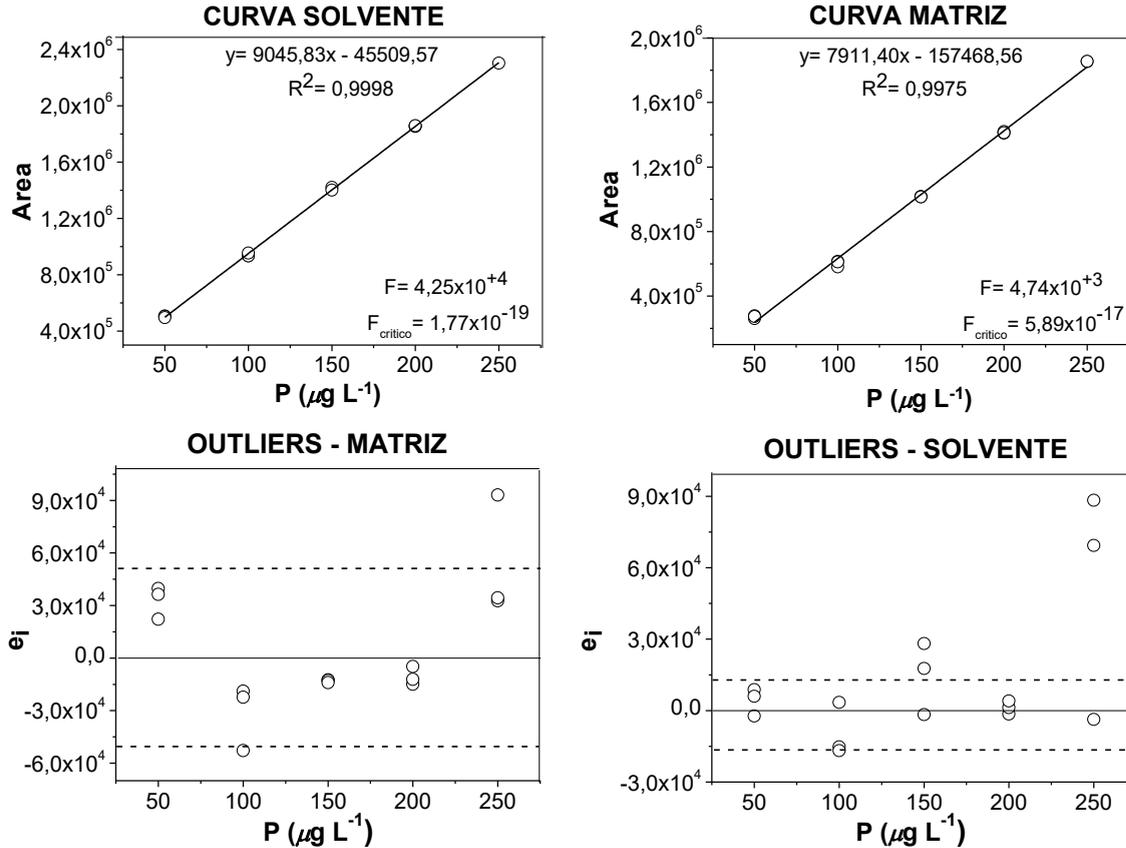
mg kg⁻¹. Isso indica que o método está adequado para detectar e quantificar o herbicida em baixos níveis de concentração.

Ainda não há legislação vigente no país que estabeleça limite máximo de resíduo (LMR) para o glifosato em eucalipto, pois essa matriz é uma cultura de uso não alimentar. Apesar disso, o LQ obtido foi inferior ao LMR estabelecido para importantes culturas, como soja (10 mg kg⁻¹) e algodão (3 mg kg⁻¹).

3.3.4.3. Linearidade e efeito de matriz

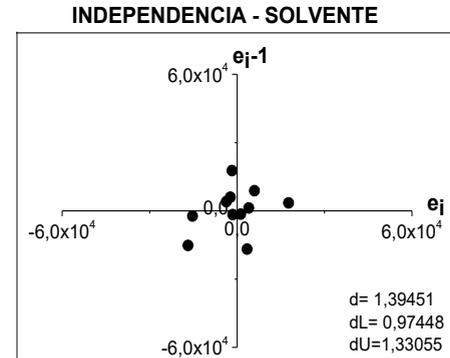
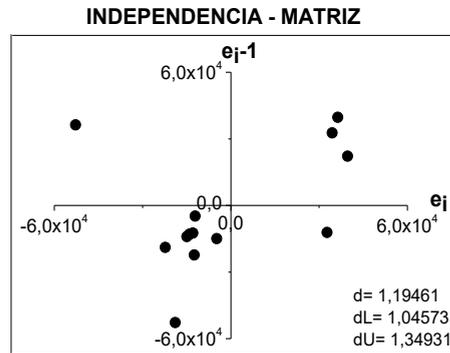
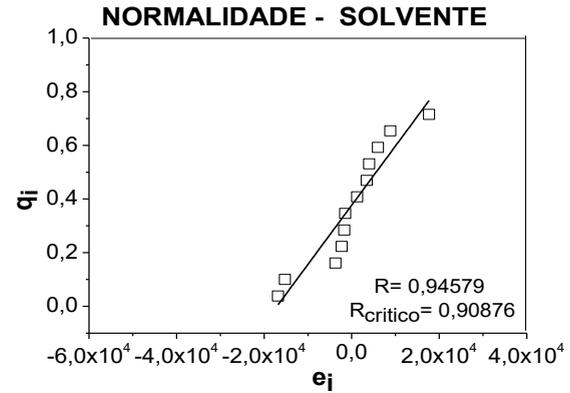
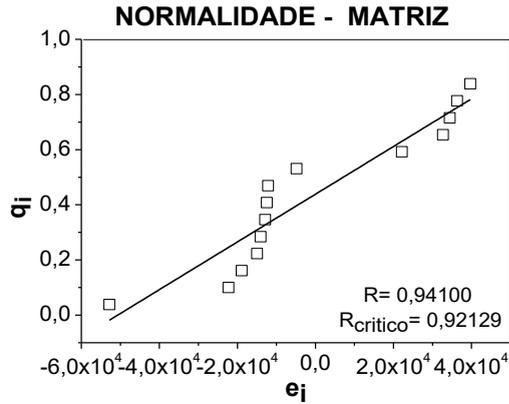
A linearidade para a quantificação do glifosato foi avaliada pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Os valores dispersos foram confirmados pelo teste de resíduos de Jackknife, com número máximo de valores extremos removidos de 22,2% das 15 replicatas (FIGURA 11). Verificou-se uma distribuição normal dos resíduos de regressão pelo teste de Ryan-Joiner com coeficientes de correlação calculados superiores aos valores críticos (FIGURA 11). A homocedasticidade dos resíduos foi confirmada pelo estatística t de Levene. A estatística de Levene t_L de -3155,06 e -8433,15 foi inferior ao t crítico= 2,14, respectivamente para o glifosato em solvente e na matriz, demonstrando a distribuição homogênea dos resíduos. A independência dos resíduos de regressão com distribuição dos pontos sem tendência positiva ou negativa foi confirmada pelo teste de Durbin-Watson (FIGURA 11). Alta significância de regressão foi observada para as curvas, indicando ajuste ao modelo linear nos níveis de concentração estudados (FIGURA 11).

Figura 11 – Representação gráfica dos testes de valores extremos (Jackknife), normalidade (Ryan-Joiner) e independência (Durbin-Watson). Curvas de calibração em matriz e solvente com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2)



(Continua)

(Conclusão)

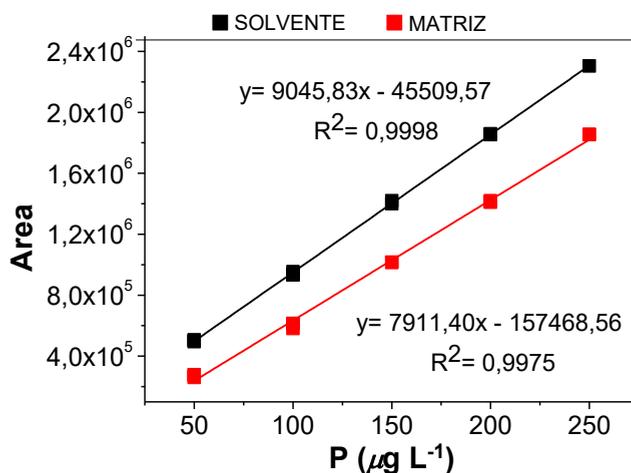


P= fósforo; e_i = resíduo da regressão; q_i = valor normal esperado; R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; R_{critico} = valor crítico estabelecido; d = estatística de Durbin-Watson; dL = limite inferior crítico estabelecido; dU = limite superior crítico estabelecido; F= significância da regressão; F_{critico} = valor crítico estabelecido

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Para o efeito de matriz, foi obtido valor de 87%, ao ser calculada a razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas (padrão na matriz e em solvente puro) e multiplicado por 100 (FIGURA 12). Esse resultado inferior a 100% indica efeito de matriz negativo, ou seja, há uma redução de 13% na área do analito, provocada por componentes químicos presentes na matriz.

Figura 12 – Curvas analíticas obtidas das soluções de 50 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo presente na molécula do glifosato (GLI) em solvente e na matriz. Respectivas equações da reta e coeficientes de determinação (R^2)



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Efeito de matriz já foi observado em análises de glifosato em matrizes complexas. Estudo realizado por Kruve *et al.* (2011) evidenciou esse efeito em análises de glifosato em amostras de cereais e foi verificado que, quanto menor a granulometria da amostra e menor a concentração do analito de interesse, maior a quantidade de coextrativos extraídos, contribuindo com o aumento do efeito de matriz. Ding *et al.* (2016) também perceberam efeito de matriz na análise de glifosato em matrizes vegetais alimentares e conseguiram minimizá-lo com uma etapa de *clean up* adicionada ao processo

de preparo das amostras. Esse efeito também foi percebido de modo considerável em amostras de solo (IBÁÑEZ *et al.*, 2005), em soja e milho (CHAMKASEM; HARMON, 2016), em fígado (SZTERNFELD *et al.*, 2016), em sangue e urina (TSAO *et al.*, 2016).

Nesta pesquisa, os dois métodos de *clean up* (itens 3.2.6.1 e 3.2.6.2) avaliados não possibilitaram a minimização do efeito de matriz e remoção do interferente com mesmo tempo de retenção do AMPA, pois também prejudicaram a detecção e a quantificação dos compostos de interesse. Portanto, é necessário que sejam realizados estudos futuros para a otimização desses processos.

3.3.4.4. Precisão e exatidão

Na condição otimizada (fase extratora com pH 11), o método proposto apresentou porcentagem de recuperação média de 72% e DPR de $\pm 4,08\%$ para o glifosato (FIGURA 6, pg. 85). Esses resultados são considerados satisfatórios para a determinação de resíduos de herbicidas (THOMPSON *et al.*, 2002). Porém os ensaios feitos nas concentrações de 1xLQ, 2xLQ e 5xLQ indicaram baixa precisão e exatidão do método, pois as recuperações foram inferiores a 21% (TABELA 2).

Tabela 2 – Precisão e exatidão para determinação de glifosato e AMPA

	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	50	100	250
Recuperação (%) (média\pmDPR)	15 \pm 6,3	16 \pm 2,5	21 \pm 9,8

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Isso pode ter ocorrido devido à complexidade da matriz e à presença de coextrativos, que não foram removidos pelos métodos de *clean up* propostos neste estudo. A análise de glifosato em matrizes muito complexas torna-se difícil devido à sua elevada polaridade e consideráveis efeitos de

matriz. Esses dois fatores podem afetar a sensibilidade e a precisão na determinação do composto (DING *et al.*, 2016). Entre os métodos propostos para minimizar o efeito de matriz, está o uso de soluções-padrão preparadas no próprio extrato da matriz e o uso de padrão interno (PINHO *et al.* 2010). Porém, Ibáñez *et al.*, (2006) mostraram que, apesar da utilização de um padrão interno, a precisão do método foi prejudicada, pois foi obtida 15 % de recuperação para o glifosato em amostras de água subterrânea, que é uma matriz relativamente simples. A explicação é que pode ter ocorrido uma lenta interação cinética entre o glifosato e alguns componentes da matriz, os quais podem formar complexos com o glifosato, tornando-o indisponível para as análises. Já foi relatada na literatura a formação de complexos entre o herbicida glifosato com alguns metais como cobre (SHEALS; PERSSON; BRITT HEDMAN, 2001; UNDABEYTIA; MORILLO; MAQUEDA, 2002), ferro (BARJA; HERSZAGE; SANTOS AFONSO, 2001), alumínio (BORGGAARD *et al.*, 2005) e com matéria orgânica (DION; HARSH; HILL Jr, 2001; GIMSING; BORGGAARD; BANG, 2004).

3.4. CONCLUSÃO

O método desenvolvido para extração e análise de glifosato e AMPA em lenho de eucalipto por HPLC-ICP-MS/MS apresenta grande potencial, pois foi obtida recuperação média de 72% ($\pm 4,08\%$) para o glifosato em fase aquosa com pH ajustado para 11. O procedimento proposto para o preparo da amostra foi simples e rápido, pois envolveu apenas extração sólido-líquido, homogeneização em vórtex, com centrifugação e concentração das amostras, sendo necessários cerca de 50 minutos para o preparo das amostras e menos de 5 minutos de análise.

O método de extração otimizado apresentou linearidade e seletividade para o glifosato e valores de $0,82 \text{ mg kg}^{-1}$ e $2,72 \text{ mg kg}^{-1}$ para LD e LQ, respectivamente, os quais estão abaixo dos limites máximos de resíduos estabelecidos para culturas importantes como soja (10 mg kg^{-1}) e algodão (3 mg kg^{-1}). A exatidão e precisão do método foram pouco afetadas pelo efeito de matriz negativo e consideravelmente pela presença de interferentes que prejudicaram a quantificação do AMPA e do glifosato. Para minimizar essas interferências, foram avaliados métodos de limpeza dos extratos. No entanto os compostos de interesse também foram removidos. Dessa forma, estudos futuros são necessários para a limpeza dos extratos e minimização do efeito de matriz.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. B. G.; MATTA, M. H. R.; MONTAGNER, E. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**, v. 31, p. 5-9, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública nº 50, de 9 de junho de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 jun. 2003. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B19075-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 29 out. 2016.

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

_____. **Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS**: technology transformed: performance redefined. [S.l.]: Agilent Technologies, 2015.

ALFERNESS, P. L.; IWATA, Y. Determination of Glyphosate and (Aminomethyl) phosphonic Acid in soil, plant and animal matrices, and water by capillary gas chromatography with mass-selective detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2751-2759, 1994.

AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. **Química Nova**, v. 25, p. 420-428, 2002a.

_____. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, p. 589-593, 2002b.

AMELIN, V. G.; BOL'SHAKOV, D. S.; TRETIAKOV, A. V. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface water and vegetable oil by capillary zone electrophoresis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 67, p. 386-391, 2012.

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.

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

ARREGUI, M. C.; LENARDÓN, A.; SANCHEZ, D.; MAITRE, M. I.; SCOTTA, R.; ENRIQUE, S. Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. **Pest Management Science**, v. 60, p. 163-166, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário Estatístico ABRAF 2013**: ano base 2012. Brasília: ABRAF, 2013.

BARJA, B. C.; HERSZAGE, J.; AFONSO, M. S. Iron(III)–phosphonate complexes. **Polyhedron**, v. 20, p. 1821-1830, 2001.

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.

BELLATO, C. R. *et al.* **Laboratório de Química Analítica**. Viçosa: Ed. UFV, 2005.

BERGSTRÖM, L.; BÖRJESSON, E.; STENSTRÖM, J. Laboratory and lysimeter studies of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a sand and a clay soil. **Journal of Environmental Quality**, v. 40, p. 98-108, 2011.

BERNAL, J.; BERNAL, J. L.; MARTIN, M. T.; NOZAL, M. J.; ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A. Development and validation of a liquid chromatography fluorescence-mass spectrometry method to measure glyphosate and aminomethylphosphonic acid in rat plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 3290-3296, 2010.

_____; MARTIN, M. T.; SOTO, M. E.; NOZAL, M. J.; MAROTTI, I.; DINELLI, G.; BERNAL, J. L. 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**, v. 60, p. 4017-4025, 2012.

BOLEA-FERNANDEZ, E.; BALCAEN, L.; RESANO, M.; VANHAECKE, F. Interference-free determination of ultra-trace concentrations of arsenic and selenium using methyl fluoride as a reaction gas in ICP MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 919-929, 2015.

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

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

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

BRASIL. **Agrotóxicos**. Brasília, [Site] [20--]. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 20 maio 2015.

_____. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 jul. 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm>. Acesso em: 27 abr. 2015.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2015.

_____. Resolução n. 396, de 03 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 abr. 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legislacao/CONAMA_RES_CONS_2008_396.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2015.

BRIGHENTI, A. M.; MULLER, M. D.; OLIVEIRA JÚNIOR, A.; CASTRO, C. Weed control and boron nutrition on eucalyptus in silvopastoral system. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 18, p. 39-46, 2015.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G. 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**, v. 34, p. 1604-1617, 2011.

CATRINCK, T. C. P. G.; AGUIAR, M. C. S.; DIAS, A.; SILVÉRIO, F. O.; FIDÊNCIO, P. H.; PINHO, G. P. Study of the reaction derivatization glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) with N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 4, p. 647-652, 2013.

CATRINCK, T. C. P. G.; DIAS, A.; AGUIAR, M. C. S.; SILVÉRIO, F. O.; FIDÊNCIO, P. H.; PINHO, G. P. A Simple and efficient method for derivatization of glyphosate and AMPA using 9-fluorenylmethyl chloroformate and spectrophotometric analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1194-1199, 2014.

CESSNA, A.; CAIN, N. P. Residues of glyphosate and its metabolite AMPA in strawberry fruit following spot and wiper applications. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 72, p. 1359-1365, 1992.

CHAMKASEM, N.; HARMON, T. Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 4995-5004, 2016.

CHANG, S. Y.; WEI, M-Y. Simultaneous determination of glyphosate, glufosinate, and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis after 9 fluorenylmethyl chloroformate derivatization. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 52, p. 785-792, 2005.

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

CHEN, Z.; HE, W.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Speciation of glyphosate, phosphate and aminomethylphosphonic acid in soil extracts by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction system. **Talanta**, v. 78, p. 852-856, 2009.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido e alta eficiência: HPLC**. São Paulo: Edgard Blücher, 2003.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, 2011.

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

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. **Química Nova**, v. 28, p. 1038-1045, 2005.

COWELL, J. E.; KUNSTMAN, J. L.; NORD, P. J.; STEINMETZ, J. R.; WILSON, G. R. Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite: an interlaboratory study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 955-960, 1986.

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.

DIMITRAKOPOULOS, I. K.; THOMAIDIS, N. S.; MEGOULAS, N. C.; KOUPPARIS, M. A. Effect of suppressor current intensity on the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by suppressed conductivity ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3619-3627, 2010.

DING, J.; JIN, G.; JIN, G.; SHEN, A.; GUO, Z.; YU, B.; JIAO, Y.; YAN, J.; LIANG, X. Determination of underivatized glyphosate residues in plant-derived food with low matrix effect by solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 2856-2863, 2016.

DION, H. M.; HARSH, J. B.; HILL JR.; H. H. Competitive sorption between glyphosate and inorganic phosphate on clay minerals and low organic matter soils. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 249, p. 385-390, 2001.

DRUART, C.; DELHOMME, O.; VAUFLEURY, A.; NTCCHO, E.; MILLET, M. Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 1725-1732, 2011.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Glifosato**: Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. [Santo André]: ACADCOM, 2005.

GHAFOOR, A.; JARVIS, N. J.; THIERFELDER, T.; STENSTRÖM, J. Measurements and modeling of pesticide persistence in soil at the catchment scale. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 1900-1908, 2011.

GIMSING, A. L.; BORGGAARD, O. K.; BANG, M. Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils. **European Journal of Soil Science**, v. 55, p. 183-191, 2004.

GOMES, M. A. F.; BARIZON, R. R. M. **Panorama da contaminação ambiental por agrotóxicos e nitrato de origem agrícola no Brasil: cenário 1992/2011**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2014. (Documentos, n. 98)

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.

GUO, Z. X.; CAI, Q.; YANG, Z. Ion chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry for simultaneous determination of glyphosate, glufosinate, fosamine and ethephon at nanogram levels in water. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1606-1612, 2007.

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

HAO, C.; MORSE, D.; MORRA, F.; ZHAO, X.; YANG, P.; NUNN, B. Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion exchange mixed-mode column. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5638-5643, 2011.

HE, L.; LUO, X.; JIANG, X.; QU, L. A new 1,3-dibutylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction to determine organophosphorus pesticides in water and fruit samples by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5013-5020, 2010.

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

HU, J.-Y.; CHEN, C.-L.; LI, J.-Z. A simple method for the determination of glyphosate residues in soil by capillary gas chromatography with nitrogen phosphorus. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 63, p. 371-375, 2008.

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

_____. 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.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Portaria Normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996.** Disponível em: <https://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2015.

KAZUI, Y.; SETO, Y.; INOUE, H. Phosphorus-specific determination of glyphosate, glufosinate, and their hydrolysis products in biological samples by liquid chromatography–inductively coupled plasma–mass spectrometry. **Forensic Toxicology**, v. 32, p. 317-322, 2014.

KHROLENKO, M. V.; WIECZOREK, P. P. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, p. 111-117, 2005.

KLENCSÁR, B.; BOLEA-FERNANDEZ, E.; FLÓREZ, M. R.; BALCAEN, L.; CUYCKENS, F.; LYNEN, F.; VANHAECKE, F. Determination of the total drug-related chlorine and bromine contents in human blood plasma using high performance liquid chromatography–tandem ICP-mass spectrometry (HPLC–ICP MS/MS). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 124, p. 112-119, 2016.

KONAR, S. K.; ROY, D. N. Method for the determination of residues of the herbicide glyphosate and its principal metabolite, aminomethylphosphonic acid, in plant materials by nitrogen-selective gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 229, p. 277-280, 1990.

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

KRUVE, A.; AULING, R.; HERODES, K.; LEITO, I. Study of liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry matrix effect on the example of glyphosate analysis from cereals. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, p. 3252-3258, 2011.

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

KYLIN, H. Time-integrated sampling of glyphosate in natural waters. **Chemosphere**, v. 90, p. 1821-1828, 2013.

LAITINEN, P.; RÄMÖ, S.; NIKUNEN, U.; JAUHAINEN, L.; SIIMES, K.; TURTOLO, E. Glyphosate and phosphorus leaching and residues in boreal sandy soil. **Plant and Soil**, v. 323, p. 267-283, 2009.

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

MAREK, L. J.; KOSKINEN, W. C. Simplified analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, vegetation and soil by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Pest Management Science**, v. 70, p.1158-1164, 2014.

MARTINS-JÚNIOR, H. A.; LEBRE, D. T.; WANG, A. Y.; PIRES, M. A. F.; BUSTILLOS, O. V. An alternative and fast method for determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in soybean using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 1029-1034, 2009.

MCCONNELL, J. S.; HOSSNER, L. R. pH-Dependent Adsorption Isotherms of Glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 1075-1078, 1985.

MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. 5. th. [S.I.]: Wiley, 2010.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, v. 29, p. 461-470, 2005.

MOTOJYUKU, M.; SAITO, T.; AKIEDA, K.; OTSUKA, H.; YAMAMOTO, I.; INOKUCHI, S. Determination of glyphosate, glyphosate metabolites, and glufosinate in human serum by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 875, p. 509-514, 2008.

MOYE, H. A.; MILES, C. J.; SCHERER, S. J. A simplified high-performance liquid chromatographic residue procedure for the determination of glyphosate herbicide and (Aminomethyl) phosphonic acid in fruits and vegetables employing postcolumn fluorogenic labeling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, p. 9-72, 1983.

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.

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

NELSON, J.; HOPFER, H.; SILVA, F.; WILBUR, S.; CHEN, J.; OZAWA, K. S.; WYLIE, P. L. Evaluation of GC-ICP-MS/MS as a new strategy for specific heteroatom detection of phosphorus, sulfur, and chlorine determination in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 4478-4483, 2015.

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.

PEDREIRA FILHO, W. R. **Determinação de impurezas metálicas em óxidos de terras raras de alta pureza pela espectrometria de massa (setor magnético) com fonte de plasma induzida por argônio (HR ICP-MS) e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)**. 2000. 196 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2000.

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**, v. 156, p. 61-66, 2008.

PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; STARLING, M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, p. 909-913, 2010.

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 post-column 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.

PUÉRTOLAS, L.; DAMÁSIO, J.; BARATA, C.; SOARES, A. M. V. M.; PRAT, N. 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**, v. 110, p. 556-564, 2010.

QIAN, K.; TANG, T.; SHI, T.; LI, P.; LI, J.; CAO, Y. Solid-phase extraction and residue determination of glyphosate in apple by ion-pairing reverse-phase liquid chromatography with pre-column derivatization. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 2394-2400, 2009b.

_____ ; 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.

RAJI, M.; SHARKHUU, A.; AMAD, M.; MERZABAN, J.; GEHRING, C. Determination of inter-leaf translocated free glyphosate in arabidopsis thaliana using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LCMS/MS) after derivatization with fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOCCl). **Journal Analytical and Bioanalytical Techniques**, S. I. 2, 2014.

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**, 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, p. 1823-1830, 2014.

REBELO, R. M. *et al.* **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. Brasília, DF: IBAMA, 2009.

ROY, D. N.; KONAR, S. K.; BANERJEE, S.; CHARLES, D. A.; THOMPSON, D. G.; PRASAD, R. Persistence, Movement, and degradation of glyphosate in selected Canadian Boreal Forest Soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 437-440, 1989.

ROYER, A.; BEGUIN, S.; TABEL, J. C.; HULOT, S.; REDING, M. A.; COMMUNAL, P. Y. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in water by gas chromatography with tandem mass spectrometry after exchange ion resin purification and derivatization. application on vegetable matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 3826-3832, 2000.

SADI, B. B. M.; VONDERHEIDE, A. P.; CARUSO, J. A. Analysis of phosphorus herbicides by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octapole reaction cell. **Journal of Chromatography A**, v. 1050, p. 95-101, 2004.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; HYNEB, R. V.; DESSEILLE, K. L. An amperometric method for the detection of amitrole, glyphosate and its aminomethylphosphonic acid metabolite in environmental waters using passive samplers. **Analytica Chimica Acta**, v. 675, p. 125-131, 2010.

SANTOS, F. F. **Determinação de fósforo por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado em matrizes contendo metais alcalinos e alcalinos terrosos**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

SANTOS, L. D. T.; IAREMA, L.; THADEO, M.; FERREIRA, F. A.; MEIRA, R. M. S. A. Características da epiderme foliar de eucalipto e seu envolvimento com a tolerância ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 24, p. 513-520, 2006b.

SANTOS, L. D. T.; MEIRA, R. M. S. A.; FERREIRA, F. A.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; FERREIRA, L. R. Morphological responses of different eucalypt clones submitted to glyphosate drift. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 11-20, 2007.

SANTOS, L. D. T.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; MEIRA, R. M. S. A.; TIBURCIO, R. A. S. FERREIRA, F. A.; MELO, C. A. D.; SILVA, E. F. S. Danos visuais e anatômicos causados pelo glyphosate em folhas de *Eucalyptus grandis*. **Planta Daninha**, v. 26, p. 9-16, 2008.

SANTOS, L. D. T.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. A.; DUARTE, W. M.; TIBURCIO, R. A. S.; MACHADO, A. F. L. Intoxicação de eucalipto submetido à deriva simulada de diferentes herbicidas. **Planta Daninha**, v. 24, p. 521-526, 2006a.

SCHRÜBBERS, L. C.; MASÍS-MORA, M.; ROJAS, E. C.; VALVERDE, B. E.; CHRISTENSEN, J. H.; CEDERGREEN, N. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in leaves from *Coffea arabica* using high performance liquid chromatography with quadrupole mass spectrometry detection. **Talanta**, v. 14, p. 6609-6620, 2016.

SEIBER, J. N.; MCCHESENEY, M. M.; KON, R.; LEAVITT, R. A. Analysis of glyphosate residues in kiwi fruit and asparagus using high-performance liquid chromatography of derivatized glyphosate as a cleanup step. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 678-681, 1984.

SHEALS, J.; PERSSON, P.; HEDMAN, B. IR and EXAFS spectroscopic studies of glyphosate protonation and copper(II) complexes of glyphosate in aqueous solution. **Inorganic Chemistry**, v. 40, p. 4302-4309, 2001.

SILVA, F. F. **Avaliação da mobilidade de arsênio, cádmio, cromo, cobre, níquel, chumbo e zinco nos sedimentos da Bacia do Rio Ribeira de Iguape**. 2014. 253 f. Tese (Doutorado em Ciências Químicas) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SOUZA, T. A. DE; MATTA, M. H. R. DA; MONTAGNER, É.; ABREU, A. B. G. Estudo de recuperação de glifosato e ampa derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. **Química Nova**, v. 29, p. 1372-1376, 2006.

SUN, R. C.; TOMKINSON, J. Comparative study of organic solvent and water-soluble lipophilic extractives from wheat straw I: yield and chemical composition. **Journal of Wood Science**, v. 49, p. 47-52, 2003.

SZTERNFELD, P.; MALYSHEVA, S. V.; HANOT, V.; JOLY, L. A robust transferable method for the determination of glyphosate residue in liver after derivatization by ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 1173-1179, 2016.

TAROUCO, C. P.; AGOSTINETTO, D.; PANOZZO, L. E.; SANTOS, L. S. DOS; VIGNOLO, G. K.; RAMOS, L. O. O. Períodos de interferência de plantas daninhas na fase inicial de crescimento do eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p.1131-1137, 2009.

TECNOLOGIA em primeiro lugar: o Brasil a caminho de se tornar o maior produtor mundial de grãos. **Revista Defesa Vegetal**, maio 2009.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TSAO, Y.-C.; LAI, Y.-C.; LIU, H.-C.; LIU, R.-H.; LIN, D.-L. Simultaneous determination and quantitation of paraquat, diquat, glufosinate and glyphosate in postmortem blood and urine by LC–MS–MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 40, p. 427-436, 2016.

TUINSTRA, L. G. M. TH.; KIENHUIS, P. G. M. Automated two-dimensional HPLC residue procedure for glyphosate on cereals and vegetables with postcolumn fluoregenic labelling. **Chromatographia**, v. 24, p. 696-700, 1987.

UNDABEYTIA, T.; MORILLO, E.; MAQUEDA, C. FTIR study of glyphosate copper complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1918-1921, 2002.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 365.3**: phosphorus, all form (colorimetric, ascorbic acid, two reagents). Washington, DC, 1978. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_365-3_1978.pdf>. Acesso em: 15 set. 2016.

VEIGA, F.; ZAPATA, J. M.; FERNANDEZ MARCOS, M. L.; ALVAREZ, E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. **The Science of the Total Environment**, v. 271, p. 135-144, 2001.

VEIGA, M.A.M.S. **Determinação de Elementos traço por AAS e ICP-MS após extração no ponto nuvem, usando dietil-ditiofosfato como agente quelante**. 2000. 109 f. Tese (Doutorado) – Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

WAUCHOPE, D. Acid dissociation constants of arsenic acid, methylarsonic acid (MAA), dimethylarsinic acid (Cacodylic Acid), and N-(Phosphonomethyl) glycine (Glyphosate). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, p. 717-721, 1978.

WOODBURN, A. T. Glyphosate: production, pricing and use Worldwide. **Pest Management Science**, v. 56, p. 309-312, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. **IARC Monography Volumes 112**: evaluation of organophosphate insecticides and herbicides. Lyon, France: WHO, 2015.

WUILLOUD, R. G.; SHAH, M.; KANNAMKUMARATH, S. S.; ALTAMIRANO, J. C. The potential of inductively coupled plasma-mass spectrometric detection for capillary electrophoretic analysis of pesticides. **Electrophoresis**, v. 26, p.1598-1605, 2005.

YANG, G. D.; XU, X. Q.; SHEN, M. C.; WANG, W. W.; XU, L. J.; CHEN, G. N.; FU, F. F. Determination of organophosphorus pesticides by capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry with collective sample introduction technique. **Electrophoresis**, v. 30, p. 1718-1723, 2009.

YOKOI, H.; NAKASE, T.; GOTO, K.; ISHIDA, Y.; OHTANI, H.; TSUGE, S.; SONODA, T.; ONA, T. Rapid characterization of wood extractives in wood by thermal desorption-gas chromatography in the presence of tetramethylammonium acetate. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 67, p. 191-200, 2003.

YOU, J.; KOROPCHAK, J. A. Condensation nucleation light scattering detection with ion chromatography for direct determination of glyphosate and its metabolite in water. **Journal of Chromatography A**, v. 989, p. 231-238, 2003.

APÊNDICE A – AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE: GRÁFICOS DOS TESTES DAS PREMISSAS PARA USO APROPRIADO DO MMQO

Figura 1 – Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas do glifosato obtidas por HPLC-DAD, GC-NPD e GC-MS (TIC e SIM), com indicação dos respectivos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. (e_i = resíduo da regressão)

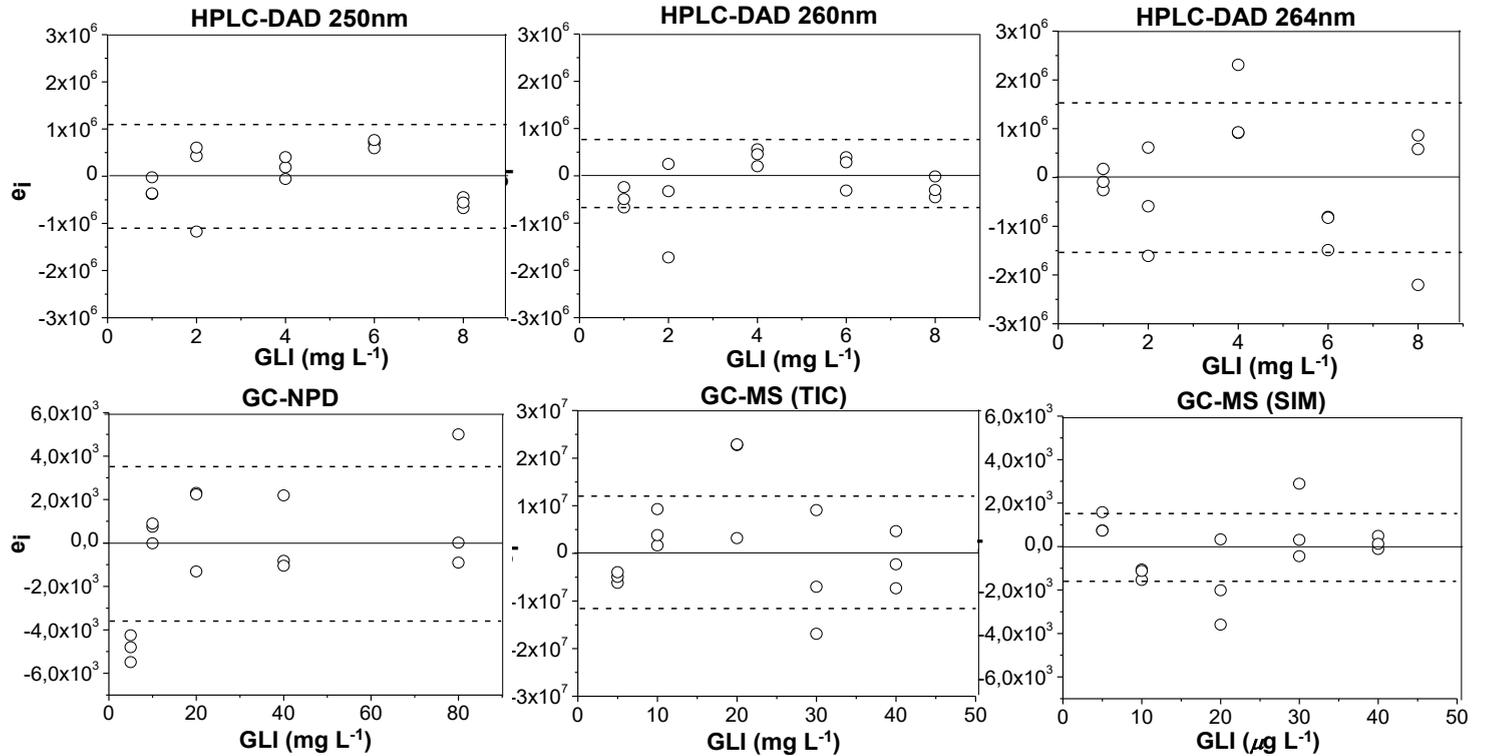


Figura 2 – Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas do AMPA obtidas por HPLC-DAD, GC-NPD e GC-MS (TIC e SIM), com indicação dos respectivos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. (e_i = resíduo da regressão)

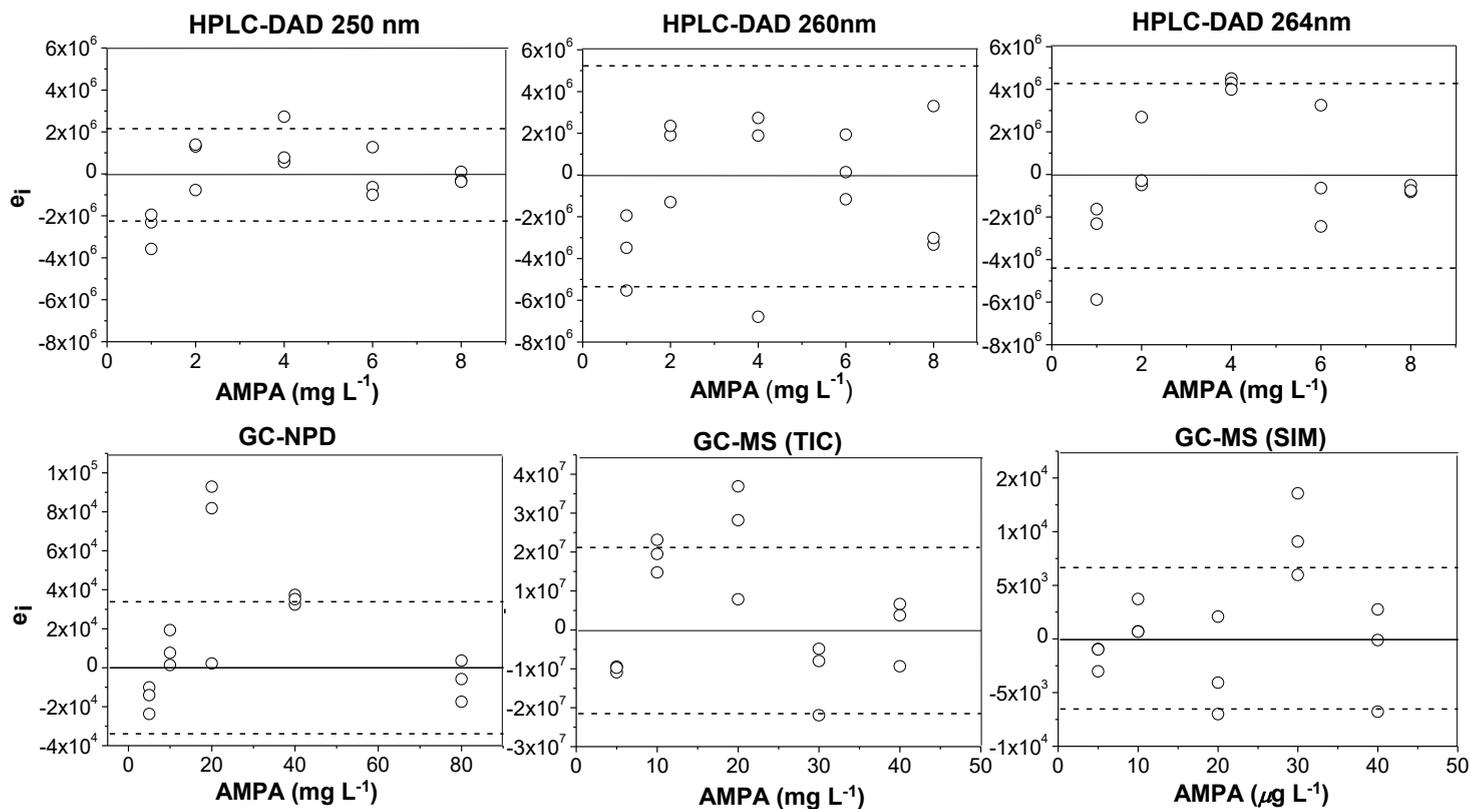


Figura 3 – Gráficos de probabilidade normal dos resíduos das curvas do glifosato obtidas por HPLC-DAD, GC-NPD e GC-MS (TIC e SIM)

e_i = resíduo da regressão; q_i = valor norma esperado; R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; $R_{critico}$ = valor crítico estabelecido

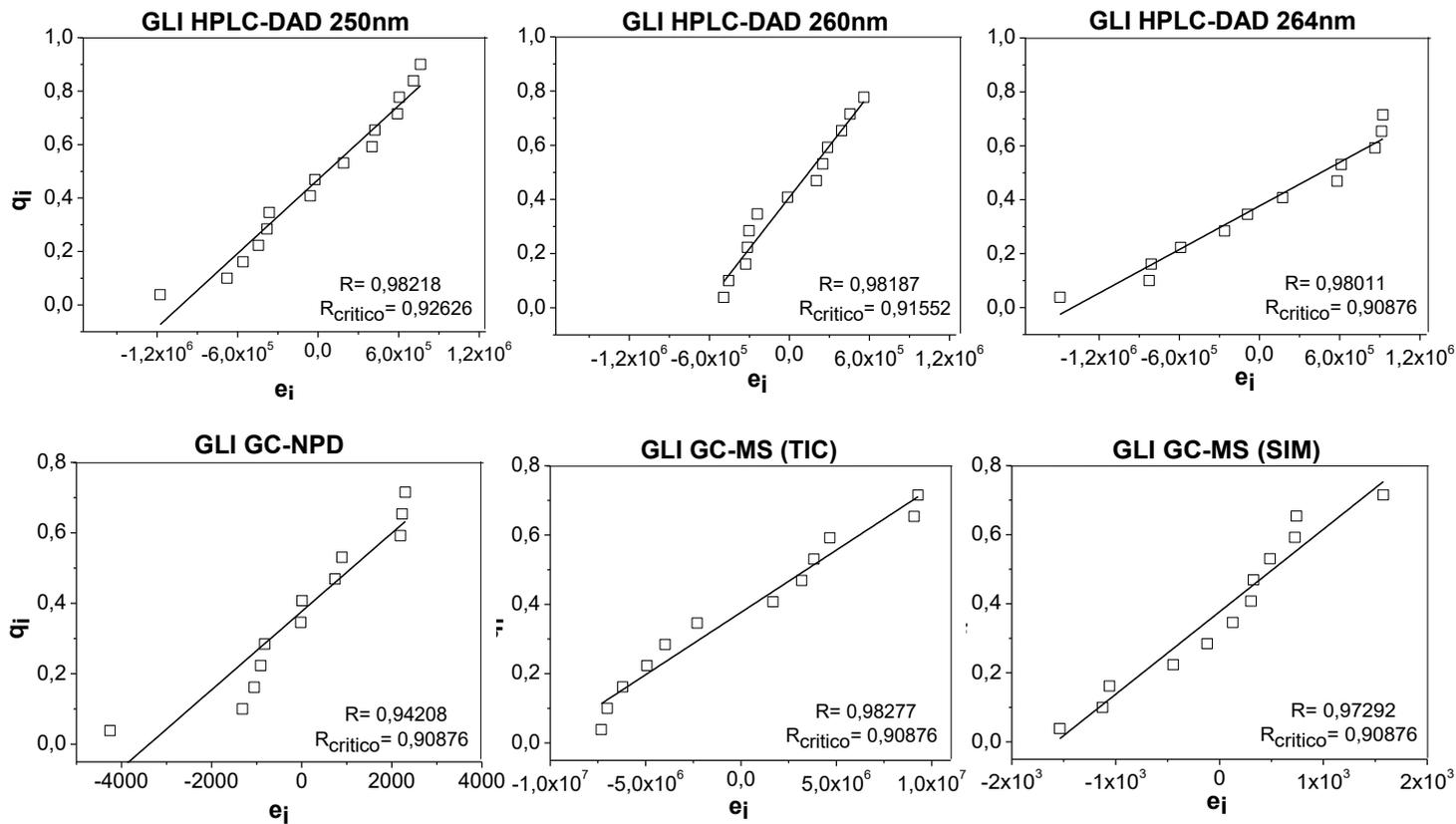


Figura 4 – Gráficos de probabilidade normal dos resíduos das curvas do AMPA obtidas por HPLC-DAD, GC-NPD e GC-MS (TIC e SIM)

e_i = resíduo da regressão; q_i = valor norma esperado; R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; $R_{critico}$ = valor crítico estabelecido

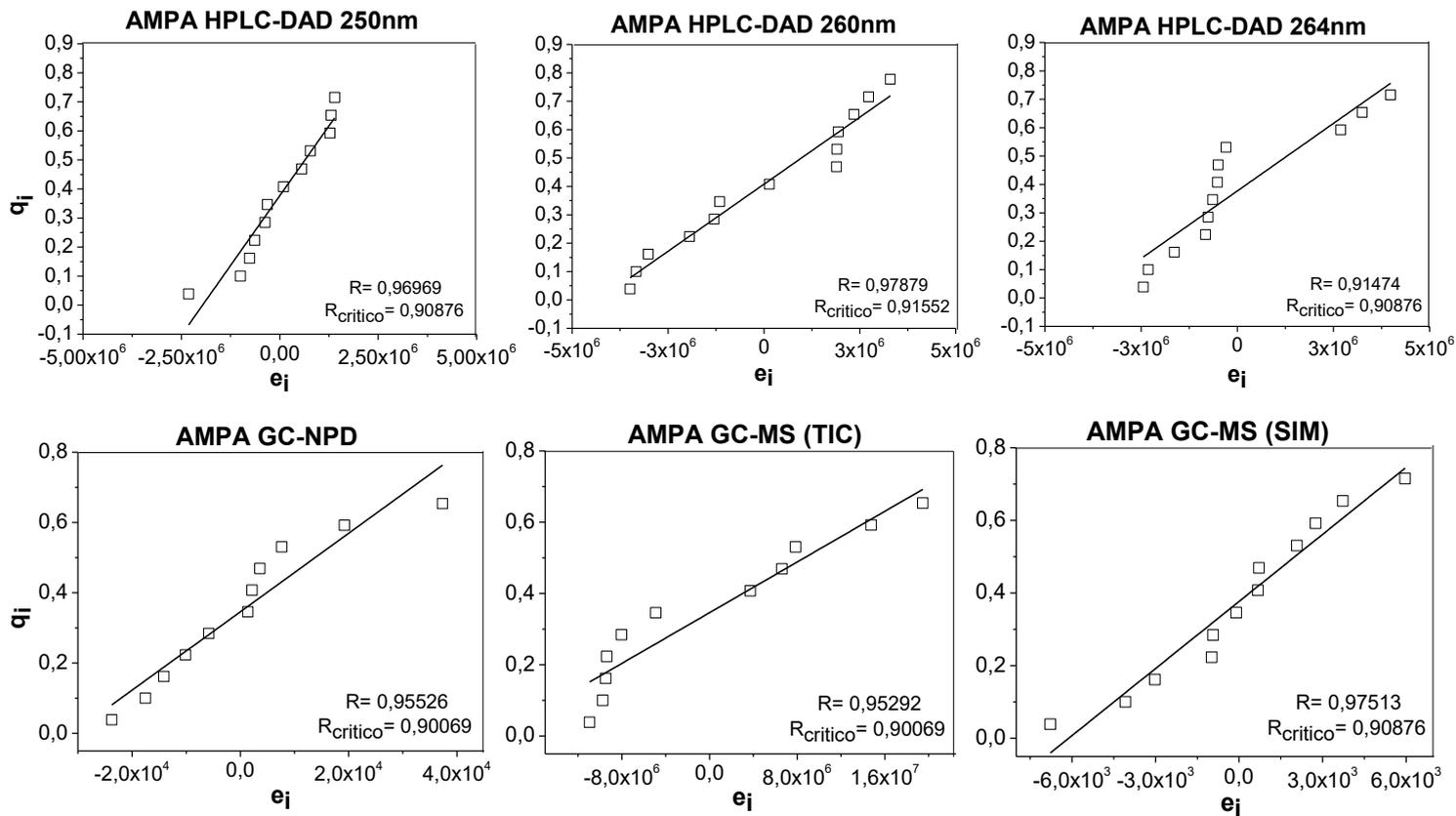


Figura 5 – Gráficos de Durbin-Watson das curvas do glifosato obtidas por HPLC-DAD, GC-NPD e GC-MS (TIC e SIM)

e_i = resíduo da regressão ; d = estatística de Durbin-Watson; dL = limite inferior crítico estabelecido; dU = limite superior crítico estabelecido

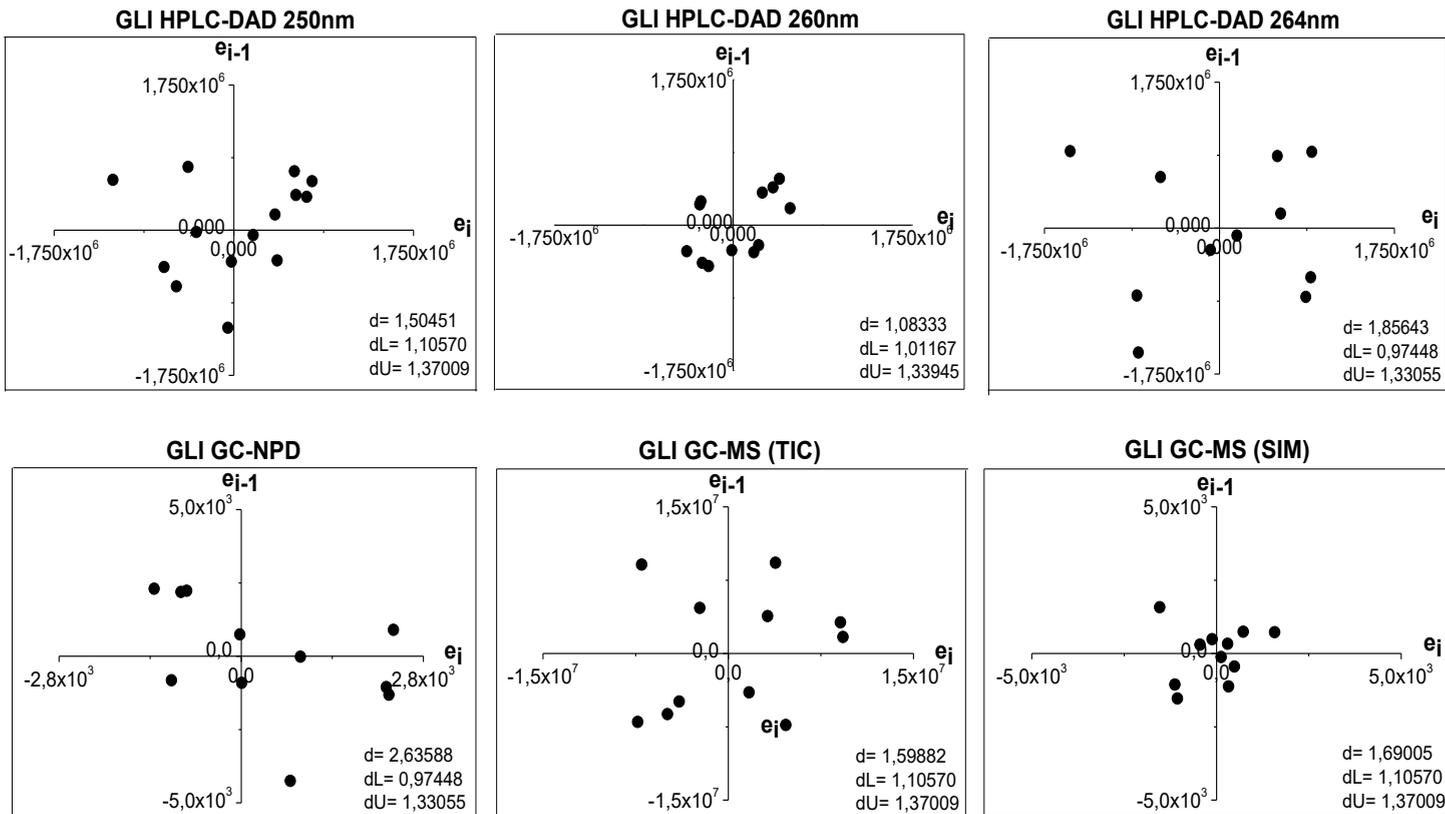


Figura 6 – Gráficos de Durbin-Watson das curvas do AMPA obtidas por HPLC-DAD, GC-NPD e GC-MS (TIC e SIM)

e_i = resíduo da regressão ; d = estatística de Durbin-Watson; dL = limite inferior crítico estabelecido; dU = limite superior crítico estabelecido

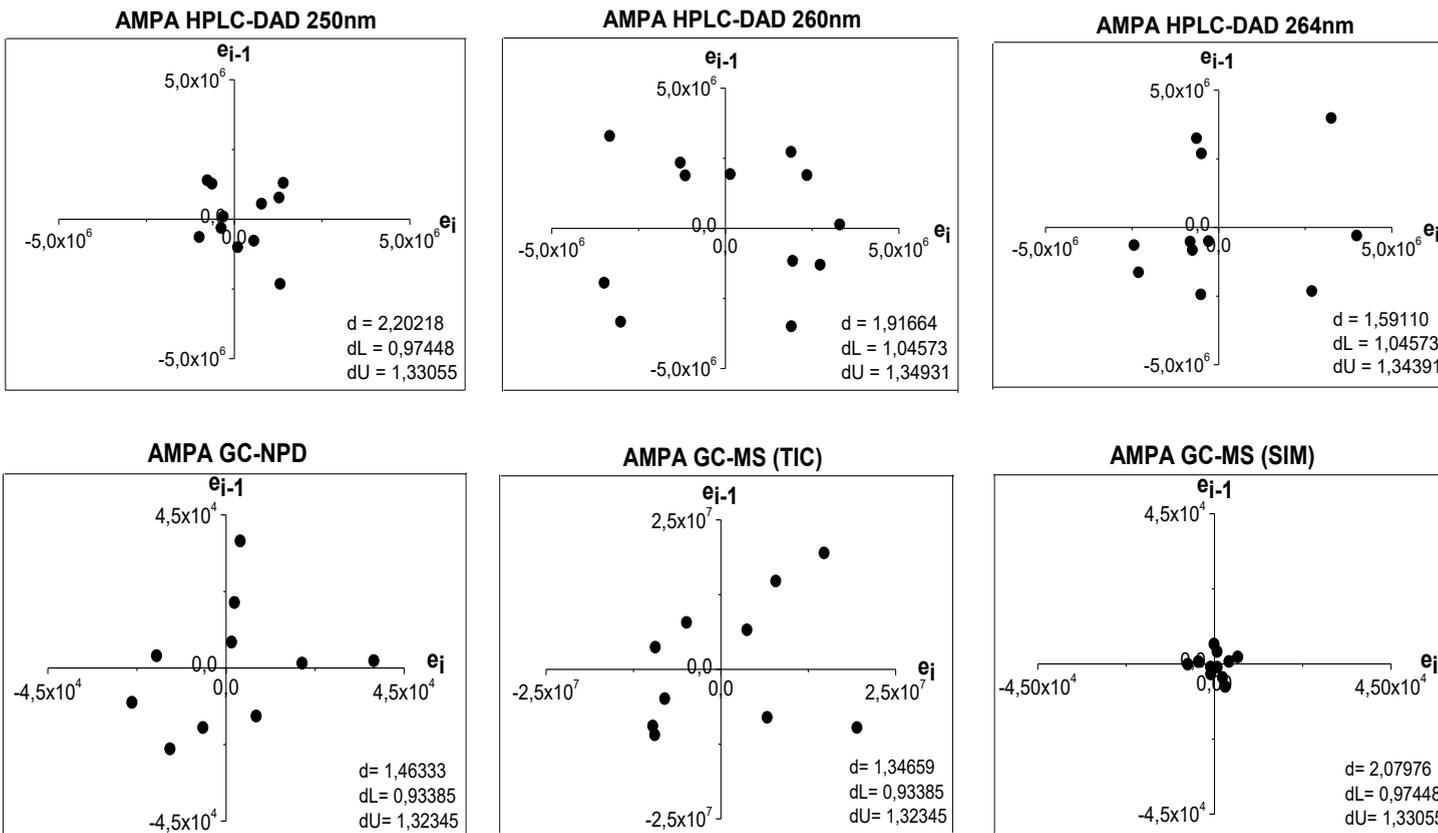


Figura 7 – Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas do glifosato e AMPA obtidas por HPLC-ICP-MS/MS, com indicação dos respectivos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. (e_i = resíduo da regressão)

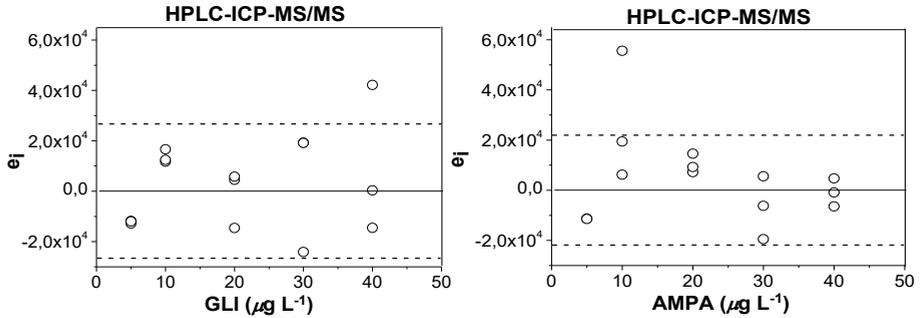


Figura 8 – Gráficos de probabilidade normal dos resíduos das curvas do glifosato e AMPA obtidas por HPLC-ICP-MS/MS
 e_i = resíduo da regressão; q_i = valor norma esperado; R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; $R_{\text{crítico}}$ = valor crítico estabelecido

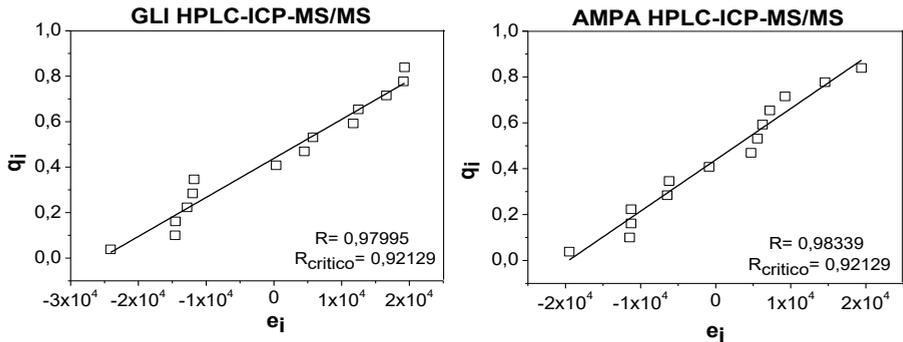


Figura 9 – Gráficos de Durbin-Watson das curvas do glifosato obtidas por HPLC-DAD, GC-NPD e GC-MS (TIC e SIM)
 e_i = resíduo da regressão ; d = estatística de Durbin-Watson; dL= limite inferior crítico estabelecido; dU= limite superior crítico estabelecido

