

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Karine Reinke

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO E ÁCIDO
AMINOMETILFOSFÔNICO EM ÁGUA EMPREGANDO
DERIVATIZAÇÃO COM FMOC-CI E LC-MS/MS**

Santa Maria, RS
2020

Karine Reinke

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO E ÁCIDO
AMINOMETILFOSFÔNICO EM ÁGUA EMPREGANDO DERIVATIZAÇÃO COM
FMOC-CI E LC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Martha Bohrer Adaime

Santa Maria, RS
2020

Reinke, Karine

Determinação de Resíduos de Glifosato e Ácido
Aminometilfosfônico em Água Empregando Derivatização com
FMOC-Cl e LC-MS/MS / Karine Reinke.- 2020.
82 f.; 30 cm

Orientadora: Martha Bohrer Adaime

Coorientadora: Renato Zanella

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2020

1. Preparo de amostra de água 2. Derivatização de
Glifosato e AMPA 3. LC-MS/MS I. Bohrer Adaime, Martha
II. Zanella, Renato III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, KARINE REINKE, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Karine Reinke

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO E ÁCIDO
AMINOMETILFOSFÔNICO EM ÁGUA EMPREGANDO DERIVATIZAÇÃO COM
FMOC-CI E LC-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química.**

Aprovado em 21 de fevereiro de 2020:



Martha Bohrer Adaime, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Fábio Ferreira Gonçalves, Dr. (FURG)



Osmar Damian Prestes, Dr. (UFSM)

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho ocorreu, principalmente, pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste estudo e, de uma maneira especial, agradeço:

A **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ)** e ao **Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP)** pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo incentivo à pesquisa e pelo auxílio financeiro.

A Prof^a Dr^a. **Martha Bohrer Adaime**, pela orientação, pelos ensinamentos e pelo exemplo profissional, além do acompanhamento das atividades desempenhadas na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Osmar Damian Prestes** e ao Prof. Dr. **Fábio Ferreira Gonçalves**, pela participação na banca examinadora desta dissertação e pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Renato Zanella** por todas sugestões e contribuições durante a execução deste trabalho.

Aos **professores** e **funcionários** do PPGQ por contribuírem diretamente na conquista deste título.

Aos **colegas** do **LARP**, pelo convívio, amizade e contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu namorado e colega **Gabriel**, pela dedicação, carinho, paciência, companheirismo e incentivo diário que necessitei em todos os momentos nessa caminhada, além de sua contribuição para concretização deste trabalho.

Aos meus pais **Hugo** e **Karin** por todo o amor, incentivo e apoio em todos os momentos, porque sempre acreditaram na minha capacidade e tudo que conquistei na minha vida foi graças a eles. Aos meus irmãos **Andreas**, **Cassiano**, **Martha** e **Mathias** por todo o convívio e carinho.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO EM ÁGUA EMPREGANDO DERIVATIZAÇÃO COM FMOC-Cl E LC-MS/MS

AUTORA: Karine Reinke

ORIENTADORA: Martha Bohrer Adaime

Um método simples e fácil baseado na derivatização para determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em água e subsequente determinação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) foi avaliado. Parâmetros intrínsecos da técnica de derivatização, como tempo de derivatização, volume de solução derivatizante, volume e composição da solução de limpeza foram investigados para garantir o melhor desempenho do método proposto. Além disso, foram avaliados dois modos de preparação da curva analítica: 1) preparar os pontos da curva individualmente (curva derivatizada) e 2) derivatizar um ponto de alta concentração e preparar a curva a partir de suas diluições em água (curva diluída). A estabilidade do glifosato e AMPA nas soluções derivatizadas foram avaliadas em temperatura ambiente (15-25 °C) e sob refrigeração (<10 °C) durante 28 dias. A condição experimental ideal consistiu em 30 min de derivatização de 2 mL de água com 3 mL de clorofornato de 9-fluorenilmetil (FMOC-Cl). Foram utilizados 6 mL de acetato de etila como solvente de limpeza por ser mais eficiente na remoção de interferentes, além de ser um solvente ambientalmente amigável quando comparado ao diclorometano. As curvas analíticas foram preparadas a partir de diluições de uma solução padrão derivatizada de 100 µg L⁻¹ e apresentaram linearidade de 0,5 a 20 µg L⁻¹. A precisão e a precisão intermediária foram de 79 a 119% e RSD <20% em água potável e superficial, não apresentando efeito matriz (<±20%). O limite de quantificação (LOQ) para glifosato e AMPA foi de 0,5 µg L⁻¹. Após a validação, o método foi aplicado em 38 amostras de água de cidades dos estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso (Brasil), apresentando quatro amostras positivas para glifosato e uma para AMPA. O método proposto provou ser uma ferramenta adequada para o monitoramento de glifosato e AMPA em amostras de água.

Palavras-chave: Água. Preparo de amostra. Derivatização. Glifosato. AMPA. LC-MS/MS.

ABSTRACT

DETERMINATION OF GLYPHOSATE AND AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID WASTE IN WATER USING DERIVATIZATION WITH FMOC-Cl AND LC-MS/MS

AUTHOR: Karine Reinke
ADVISOR: Martha Bohrer Adaime

A simple and easy method based on the derivatization for determinação of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in water and subsequent determination by liquid chromatography coupled with mass spectrometry in series (LC-MS/MS) was evaluated. Intrinsic parameters of the derivatization technique, such as derivatization time, derivatizer volume, cleaning solution volume and composition were investigated in order to ensure the best performance of the proposed method. In addition, two methods of preparing the analytical curve were evaluated: 1) prepare the points of the curve individually (derivatized curve) and 2) derivatize a point of high concentration and prepare the curve from its dilutions in water (diluted curve). The stability of glyphosate and AMPA in derivatized solutions were evaluated at room temperature (15-25 °C) and under refrigeration (<10 ° C) for 28 days. The ideal experimental condition consisted of 30 min of privatization of 2 ml of water with 3 ml of 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl). 6 mL of ethyl acetate was used as a cleaning solvent because it is more efficient at removing interferents, in addition to being an environmentally friendly solvent when compared to dichloromethane. The analytical curves were prepared from dilutions of a derivatized standard solution of 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ and presented linearity of 0.5 to 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. The accuracy and intermediate precision were 79 to 119% and RSD < 20%, in water of tap and river, with no matrix effect (< $\pm 20\%$). The qualification limits (LOQ) for glyphosate and AMPA were 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$. After validation, the method was applied to 38 samples from cities in states of Rio Grande do Sul and Mato Grosso (Brazil), with four positive samples for glyphosate and one for AMPA. The proposed method proved to be an adequate tool for monitoring glyphosate and AMPA in water samples.

Keywords: Water. Sample preparation. Derivatization. Glyphosate. AMPA. LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Vendas de agrotóxicos e afins no Brasil no período de 2000 a 2018 ..	20
Figura 2 -	Rotas de degradação biológica do glifosato e seus metabólitos	24
Figura 3 -	Dissociação do glifosato em água com diferentes pKas	26
Figura 4 -	Dissociação do AMPA em água com diferentes pKas	27
Figura 5 -	Esquema dos mecanismos de sorção do glifosato no solo	29
Figura 6 -	Reação de derivatização do glifosato e do AMPA usando FMOC-Cl como agente derivatizante	33
Figura 7 -	Representação do planejamento fatorial 2^2 , denominado planejamento do tipo estrela.....	40
Figura 8 -	Avaliação da resposta para GLI-FMOC e AMPA-FMOC em função do tempo de derivatização (n=3).....	55
Figura 9 -	Curvas analíticas para a) GLI-FMOC e b) AMPA-FMOC, derivatizando os pontos individualmente e derivatizando um padrão de 100 µg L ⁻¹ para diluição em água da torneira	57
Figura 10 -	Varredura de espectro de massa (modo negativo de varredura completa, 100 até 350 m/z, fragmentador fixado em 50 V, volume de injeção 10 µL) para extratos sem limpeza (■), limpeza com diclorometano (■) e limpeza com acetato de etila (■).....	58
Figura 11 -	Comparação visual do resíduo sólido remanescente da limpeza com a) diclorometano e b) acetato de etila (n=3).....	59
Figura 12 -	Respostas percentuais obtidas para solução padrão derivatizada de 5 µg L ⁻¹ de a) GLI-FMOC e b) AMPA-FMOC (n=3), mantidas à temperatura ambiente (15-25 °C) e refrigerada (< 10 °C)	62
Figura 13 -	Cromatogramas do branco e do branco fortificado na concentração de 10 µg L ⁻¹ para o GLI-FMOC e AMPA-FMOC obtidos no modo SRM por LC-MS/MS em a) água potável e b) água superficial.....	63
Figura 14 -	Fluxograma do procedimento de derivatização de glifosato e AMPA com FMOC-Cl em água validado neste trabalho	68
Figura 15 -	Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS de a) GLI-FMOC e b) AMPA-FMOC a partir de uma amostra positiva de água (A1) com o correspondente LOQ e uma matriz em branco da água superficial	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação toxicológica de agrotóxicos no Brasil	19
Tabela 2 -	Propriedades físico-químicas do glifosato.....	25
Tabela 3 -	Propriedades físico-químicas do AMPA.....	26
Tabela 4 -	Trabalhos de determinação de glifosato e AMPA em água publicados entre os anos de 2016 e 2020.....	37
Tabela 5 -	Critérios de validação de métodos analíticos	42
Tabela 6 -	Pureza, fórmula molecular, massa molecular, ponto de ebulição e ponto de degradação, pKa e solubilidade em água dos compostos analisados	46
Tabela 7 -	Matriz do planejamento experimental codificada	49
Tabela 8 -	Matriz do planejamento experimental decodificada	49
Tabela 9 -	Condições experimentais avaliadas pelo planejamento fatorial 2 ²	50
Tabela 10 -	Parâmetros de validação utilizados para o método analítico proposto neste estudo.....	52
Tabela 11 -	Condições instrumentais do sistema LC-MS/MS empregadas durante o estudo	53
Tabela 12 -	Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de resíduos de glifosato e AMPA em água no sistema LC-MS/MS	54
Tabela 13 -	Transições de monitoramento de reação selecionada (SRM) usadas para os analitos derivatizados e padrão interno	54
Tabela 14 -	Resultados do planejando fatorial 2 ² com pontos centrais e axiais, com triplicata no ponto central e duplicata nos outros testes.....	60
Tabela 15 -	Resultados dos testes de exatidão (recuperação) e precisão (RSD) usando amostras branco de água potável e superficial fortificadas	66
Tabela 16 -	Concentrações dos compostos avaliados encontradas em amostras..	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AQC	6-aminoquinolil-n-hidroxisuccinimidil carbamato, do inglês <i>6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRM	Materiais de referência certificados, do inglês <i>certified reference materials</i>
CV	Voltametria cíclica, do inglês <i>cyclic voltametry</i>
DCM	Diclorometano
DDT	Diclorodifeniltricloreto
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DPV	Voltametria de pulso diferencial, do inglês <i>differential pulse voltammetry</i>
DQ-UFSM	Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>
EPSPS	Enzima <i>5-Enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase</i>
EU	União Europeia, do inglês <i>European Union</i>
FD	Detector por fluorescência, do inglês <i>detector fluorescence</i>
FMOC-Cl	Cloroformato de 9-fluorenilmetil
GC	Cromatografia gasosa, do inglês <i>gas chromatography</i>
GHS	Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, do inglês <i>Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i>
GLI	Glifosato
HCl	Ácido clorídrico
IARC	Agência Internacional do Câncer, do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IC	Cromatografia iônica, do inglês <i>ion chromatography</i>

ICP	Plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma</i>
IMS	Espectrometria de mobilidade iônica, do inglês <i>ion mobility spectrometry</i>
FRET	Transferência de energia por ressonância de fluorescência, do inglês <i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GC/rGO-CuNPs	Óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de cobre, do inglês <i>reduced graphene oxide and copper nanoparticles</i>
LARP	Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas
LC	Cromatografia líquida, do inglês <i>liquid chromatography</i>
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês <i>liquid chromatography coupled with mass spectrometry in series</i>
LMR	Limite máximo de resíduos
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>
MIPPy	Polipirrol molecularmente impresso, do inglês <i>molecularly imprinted polypyrrole</i>
MS	Espectrometria de massas, do inglês <i>mass spectrometry</i>
NOEL	Nível sem efeito observável, do inglês <i>no observed effect level</i>
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PC	Padrão de controle
PI	Padrão interno
PNDA	Programa Nacional dos Defensivos Agrícolas
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i>
SRM	Monitoramento de reações selecionadas, do inglês <i>selection reaction monitoring</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>solid phase extraction</i>
TA-IL-DLLME	Microextração dispersivo-líquido-líquido à base de líquido iônico assistido por temperatura, do inglês <i>temperature-assisted ionic liquid-based dispersive-liquid-liquid microextraction</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVO	13
1.1.1	Objetivos específicos	13
2	REVISÃO	15
2.1	OS AGROTÓXICOS	15
2.1.1	Os agrotóxicos no Brasil	16
2.2	A AGRICULTURA E OS AGROTÓXICOS	17
2.3	OS HERBICIDAS.....	20
2.4	O GLIFOSATO E O AMPA.....	22
2.4.1	Propriedades físico-químicas do glifosato e do AMPA	24
2.4.2	Toxicidade do glifosato e do AMPA	27
2.4.3	Concentração máxima permitida para glifosato e AMPA em águas	28
2.4.4	O glifosato e o AMPA no meio ambiente	29
2.5	MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA DE ÁGUA.....	31
2.5.1	Métodos de preparo de amostra de água para determinação de glifosato e AMPA	31
2.5.1.1	<i>Derivatização</i>	32
2.5.1.2	<i>Extração líquido-líquido</i>	33
2.6	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA	34
2.6.1	Cromatografia líquida	35
2.6.2	Espectrometria de massas	35
2.7	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	39
2.8	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	43
3.2	REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS	44
3.2.1	Materiais	44
3.2.2	Amostras de água	45
3.3	ESCOLHA DA AMOSTRA BRANCO DE ÁGUA.....	45
3.4	PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS	45
3.4.1	Utilização do padrão interno (PI)	46
3.5	CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA	46

3.6	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA POR LC-MS/MS.....	47
3.6.1	Avaliação do tempo de derivatização	47
3.6.2	Avaliação do preparo da curva analítica	48
3.6.3	Avaliação do efeito do solvente de limpeza	48
3.6.4	Avaliação de planejamento fatorial 2² para derivatização de glifosato e AMPA em água e posterior determinação por LC-MS/MS	48
3.6.5	Avaliação da estabilidade dos analitos	50
3.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA EMPREGANDO REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA POR LC-MS/MS.....	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
4.1	CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA.....	53
4.2	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA POR LC-MS/MS.....	55
4.2.1	Avaliação do tempo de derivatização	55
4.2.2	Avaliação do preparo da curva analítica	56
4.2.3	Avaliação do efeito do solvente de limpeza	57
4.2.4	Avaliação de planejamento fatorial 2² para derivatização de glifosato e AMPA em água e posterior determinação por LC-MS/MS	60
4.2.5	Avaliação da estabilidade dos analitos	61
4.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA EMPREGANDO A DERIVATIZAÇÃO PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA.....	62
4.3.1	Seletividade	63
4.3.2	Linearidade e curva analítica	63
4.3.3	Limites de quantificação (LOQ) e de detecção (LOD)	64
4.3.4	Exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária)	64
4.3.5	Efeito matriz	65
4.3.6	Método de derivatização validado neste estudo	67
4.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS.....	69
5	CONCLUSÃO	71
5.1	DIREÇÕES FUTURAS.....	71
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

O comércio mundial de agrotóxicos cresce a cada ano. O uso de herbicidas é destacado devido à sua ação contra as ervas daninhas no campo. O glifosato (GLI) é utilizado desde 1971 como herbicida, sendo considerado o herbicida mais comercializado no mundo. É um organofosforado, sistemático, de amplo espectro, não seletivo e pós-emergente. A degradação no ambiente ocorre principalmente devido a condições biológicas, formando o ácido amonometilfosfônico (AMPA) como principal metabólito. Uma vez usado, o glifosato e seu metabólito AMPA podem contaminar o solo e a água, causando danos ambientais (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997; AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

O limite máximo de resíduos (LMR) do glifosato juntamente com o seu metabólito AMPA para a água potável no Brasil é de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2017), enquanto na União Europeia o limite é de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos isolados e $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para a soma total de agrotóxicos (96/23/EC, 2002). Nos Estados Unidos, o LMR aceito para resíduos de glifosato na água potável é de $700 \mu\text{g L}^{-1}$ (EPA, 2017).

A determinação desses compostos em baixos níveis de concentração é considerada desafiadora devido às suas propriedades físico-químicas: altamente polar, caráter anfotérico, tamanho da molécula, dentre outras (AMARANTE JUNIOR et al., 2002), havendo poucos métodos descritos na literatura para determinação de glifosato e AMPA. Devido às tais propriedades, a mobilidade do glifosato no solo é baixa e sua presença nas águas subterrâneas é inesperada. Entretanto, a contaminação das águas superficiais pode ocorrer pela erosão e escoamento do solo, ou mesmo pelo uso do herbicida em lavouras e áreas próximas a ambientes aquáticos (APARICIO et al., 2013). Portanto, há uma necessidade notável de desenvolver métodos analíticos apropriados para monitorar a presença de glifosato e AMPA em amostras ambientais.

Geralmente, duas abordagens analíticas podem ser usadas para a determinação de glifosato e AMPA em amostras de água: a análise direta ou a análise indireta (derivatização). A análise direta é geralmente mais rápida, pois elimina a etapa de derivatização. Entretanto, para viabilizar sua execução, é necessário o uso de colunas específicas com alto valor agregado, como colunas de cromatografia iônica (IC, do inglês *ion chromatography*) (GUO; CAI; YANG, 2007; MATOS, 2014), interação hidrofílica (JENSEN et al., 2016) ou interação hidrofílica mista (troca aniônica fraca)

(CHEN et al., 2012). Por outro lado, a derivatização (análise indireta) oferece a possibilidade de melhorar o comportamento cromatográfico desses compostos, permitindo o uso de colunas convencionais, como as colunas de C18 (RONCO et al., 2016).

A reação com cloroformato de 9-fluorenilmetil (FMOC-Cl) é usada em combinação com as técnicas de espectrofotometria de absorção molecular (CATRINCK et al., 2014), detecção de fluorescência (BOHN et al., 2014; DE LLASERA, 2005) e espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) (GREY; NGUYEN; YANG, 2001). Atualmente, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography coupled with mass spectrometry*) é a técnica mais utilizada para determinação de glifosato e AMPA devido à sua alta seletividade e sensibilidade. No entanto, a derivatização com FMOC-Cl apresenta alguns desafios quando a análise é realizada em sistemas de MS, como a necessidade de usar tampões não voláteis para ajustar o pH das amostras (EHLING; REDDY, 2015; GOSCINNY et al., 2012; POIGER et al., 2017). Além disso, há necessidade do uso de solventes na etapa de limpeza para remover o excesso de FMOC-Cl e seus subprodutos, sendo o principal o FMOC-OH. Catrink e colaboradores (2014) descreveram o uso de éter dietílico e acetato de etila, enquanto Ronco e colaboradores (2016) usaram diclorometano na etapa de limpeza. Portanto, o uso de uma técnica de derivatização que assegure a conversão completa de glifosato e AMPA seguido de uma etapa de limpeza eficiente, melhora o método analítico quando associado à técnica de LC-MS/MS.

1.1 OBJETIVO

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi aplicar um método simples e rápido baseado na derivatização de glifosato e AMPA com FMOC-Cl em água superficial e potável e subsequente determinação por LC-MS/MS.

1.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar o tempo necessário para a conversão quantitativa de glifosato e AMPA nas suas formas derivatizadas GLI-FMOC e AMPA-FMOC, respectivamente;

- Avaliar dois modos de preparo da curva analítica: 1) curva derivatizada e 2) curva diluída;
- Avaliar o uso de diclorometano e acetato de etila na etapa de limpeza;
- Aplicar planejamento fatorial 2^2 para avaliar parâmetros relacionados ao preparo de amostra;
- Avaliar a estabilidade do GLI-FMOC e AMPA-FMOC nas soluções derivatizadas mantidas em: 1) temperatura ambiente (15 a 25 °C) e 2) refrigerada (<10 °C);
- Validar o método otimizado; e
- Aplicar o método em amostras de água superficial e potável.

2 REVISÃO

2.1 OS AGROTÓXICOS

O uso de substâncias químicas na agricultura é conhecido desde a antiguidade, principalmente para o combate de insetos. Há registros da utilização de arsênio e enxofre para o controle de insetos em escrituras romanas e gregas. Já na Idade Média, destacou-se o uso do arsênio branco e, a partir do século XVI, o emprego de substâncias orgânicas como a nicotina e o piretro (extraído do crisântemo) na Europa e nos Estados Unidos (GASPARIN, 2005; GONÇALVES, 2004).

No início do século XIX, compostos inorgânicos à base de metais, como cobre, enxofre e mercúrio, eram utilizados na Europa para combater doenças parasitárias e fungos em hortaliças. Somente a partir do início do século XX, estudos demonstraram a utilização de substâncias com a finalidade de proteger as plantas. Desse modo, produtos à base de cobre, chumbo, mercúrio e cádmio, entre outros, foram desenvolvidos comercialmente e utilizados para combater uma grande variedade de pragas (ALVES FILHO, 2002; GASPARIN, 2005).

Com o desenvolvimento da indústria química, iniciado na Segunda Revolução Industrial, ao fim do século XIX, e acentuado durante e após a Segunda Guerra Mundial, a indústria de agrotóxicos teve um intenso crescimento. Nesse período, foram descobertos, grande parte por empresas americanas e europeias, novos compostos que impactaram a agricultura e a saúde pública mundial (SILVA; COSTA, 2012).

A agricultura é praticada pela humanidade há mais de 10.000 mil anos, porém a utilização intensiva de agrotóxicos na agricultura teve início após a Segunda Guerra Mundial, nos Estados Unidos, durante a chamada Revolução Verde, a qual teve o intuito de modernizar a agricultura e aumentar a sua produtividade. A Segunda Guerra Mundial foi um marco para o avanço técnico-científico no setor. Os dois principais fatores para esse desenvolvimento foram: i) o aproveitamento da pesquisa bélica, feita pelas indústrias químicas e incentivada pelos governos; e ii) o padrão tecnológico e o conhecimento disponível na época, os quais permitiam a execução de sucessivas sínteses químicas para a busca de novas moléculas (VELASCO; CAPANEMA, 2006).

As indústrias químicas fabricantes de agrotóxicos usados como armas químicas durante a guerra ganharam espaço ao encontrar na agricultura um novo

mercado para a utilização de seus produtos químicos, agora voltados ao controle de pragas e doenças nas culturas. Destaca-se, nesse período, a descoberta do grande poder inseticida do organoclorado diclorodifeniltricloreto (DDT) reconhecido como inseticida universal e rapidamente se tornou o mais utilizado dos novos agrotóxicos sintéticos, antes que seus efeitos ambientais fossem estudados e conhecidos. A partir daí, deu-se início à grande disseminação dessas substâncias na agricultura (GASPARIN 2005; GONÇALVES, 2004; MATA; FERREIRA, 2013).

Na agricultura, o sucesso foi imediato para o controle de insetos, doenças e predadores que ameaçavam diversas culturas. Os herbicidas, em especial, eram utilizados para mitigar plantas daninhas, eliminando tarefas que antes eram realizadas pelo homem. Além disso, reduzir operações mecânicas, como arar e gradear. Sendo assim, os agroquímicos se apresentaram como solução para diversos problemas, dentre eles o controle eficaz de doenças e predadores de diversas culturas, a redução da necessidade de trabalho humano e da erosão do solo. No entanto, no fim da década de 1950, percebeu-se que os efeitos dos agrotóxicos eram danosos em vários aspectos e apresentavam dificuldades para serem controlados. Além disso, se não resolvidos, poderiam inviabilizar a própria atividade. A rápida evolução da resistência dos insetos, a persistência por um longo período de tempo dos resíduos no meio ambiente, a presença a longa distância de onde eram originalmente aplicados e o acúmulo dos resíduos em plantas, animais e tecidos humanos são alguns dos principais problemas (MARTINS, 2000).

2.1.1 Os agrotóxicos no Brasil

Os agrotóxicos foram introduzidos no Brasil durante o período da chamada modernização da agricultura nacional, entre 1945 e 1985, com o apoio oficial do Estado e sob a justificativa de aumentar a produção e facilitar as atividades do campo. A Revolução Verde chegou ao Brasil na década de 1960. Em 1965, foi criado o Sistema Nacional de Crédito Rural que vinculava a concessão de crédito agrícola à obrigatoriedade da compra pelos agricultores de agrotóxicos (VALENTIM; MARI; BERNSTEIN, 2013; BURIGO, 2016). Já no início dos anos 1970, o Banco do Brasil tornou obrigatório o direcionamento de 15% do valor dos empréstimos de custeio para a aquisição de agrotóxicos. Com a implantação do Programa Nacional dos Defensivos Agrícolas (PNDA), em 1975, foi efetivada a instalação da indústria de agrotóxicos no

país, integrada pelas principais empresas fabricantes destes produtos em nível mundial (VALENTIM; MARI; BERNSTEIN, 2013; BURIGO, 2016).

O termo agrotóxico passou a ser adotado no Brasil a partir da Lei Federal nº 7.802, de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 2002, e traz o seguinte conceito para os termos agrotóxicos e afins: “produtos e 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 plantadas, e de outros ecossistemas e 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, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002).

Atualmente, o Brasil permanece com políticas públicas que fomentam o uso e o comércio de agrotóxicos mantidas pela influência da bancada ruralista no Congresso Nacional. Contudo, essa tecnologia agrícola, ao mesmo tempo que gera crescimento econômico, provoca riscos ao meio ambiente e à saúde humana. A agricultura no Brasil avança a cada ano, e, atualmente, o país é um dos principais produtores agrícolas do mundo (AGRICULTURA, 2019; TAVARES, 2018).

2.2 A AGRICULTURA E OS AGROTÓXICOS

A agricultura compreende o cultivo de plantas e outras formas biológicas destinadas à produção de insumos necessários para a vida, incluindo a produção de alimentos. Sua história e evolução caracterizam-se por constantes desafios relacionados à oferta e demanda (SILVA; COSTA, 2012).

Até o início do século XIX era relativamente fácil aumentar a produção de alimentos com o uso de terras agriculturáveis, até então, abundantes no mundo. Porém, a partir do século XX, para atender o crescimento da demanda global de alimentos, foi necessário o aumento das taxas de produtividade. Isto ocorreu por meio da mecanização da irrigação, dos avanços em relação à educação e às habilidades dos trabalhadores, do melhoramento das plantas e do combate às pragas com o uso de agrotóxicos (JAMES, 2011).

Diversas variáveis contribuem para a ocorrência de pestes na atividade agrícola, entre elas: a introdução de espécies de sementes em locais sem inimigos

naturais, métodos de armazenagem, mudanças genéticas em plantas, redução no processo de rotação de lavouras, desequilíbrios ecológicos e até mesmo a expansão do comércio internacional de produtos agrícolas (YUDELMAN; RATTA; NYGAARD, 1998).

As perdas na agricultura em razão das pestes, na ausência de mecanismos para seu controle, são variáveis em função das flutuações de condições agroclimáticas, ecológicas, socioeconômicas e de estocagem. Há diversos mecanismos destinados a controlar as pestes, entre eles: i) rotação de culturas, com o planejamento de cultivos e colheitas distintas; ii) utilização de predadores naturais, parasitas e micróbios; iii) adoção de variedades de plantas com resistência genética ou tolerância a pestes; e iv) emprego de produtos químicos, como os agrotóxicos (YUDELMAN; RATTA; NYGAARD, 1998).

Os agrotóxicos são insumos importantes para a agricultura, destinados ao uso nos diferentes setores envolvidos na produção e proteção de produtos agrícolas e de outros ecossistemas. Sua finalidade é alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Segundo o seu uso, os agrotóxicos são divididos, de maneira geral, em acaricidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas e raticidas (BRASIL, 2002; VELASCO; CAPANEMA, 2006).

Além disso, os agrotóxicos também são classificados de acordo com seu poder tóxico, podendo ser expressa por meio da dose letal (DL_{50}), ou seja, a dose necessária para matar 50% de uma população, sob determinadas condições. No Brasil, a classificação toxicológica dos agrotóxicos é de responsabilidade do Ministério da Saúde e está definida na Lei nº 7.802/89 de 11 de julho de 1989 (VELASCO; CAPANEMA, 2006).

No ano de 2019, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reclassificou toxicologicamente os agrotóxicos já registrados no país. O Brasil passou a adotar os parâmetros de classificação toxicológica com base nos padrões do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS, do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*). As novas regras trazem mais segurança para o mercado consumidor porque facilitam a identificação do perigo de uso. Para isso, foram ampliadas de quatro para cinco as categorias da classificação toxicológica, além da inclusão do item “não classificado”, válido para produtos de baixíssimo potencial de dano (GASPARIN, 2005; ANVISA, 2019). A nova classificação está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação toxicológica de agrotóxicos no Brasil

Categoria	Toxicidade	Cor da faixa
Categoria 1	Produto extremamente tóxico	Faixa vermelha
Categoria 2	Produto altamente tóxico	Faixa vermelha
Categoria 3	Produto moderadamente tóxico	Faixa amarela
Categoria 4	Produto pouco tóxico	Faixa azul
Categoria 5	Produto improvável de causar dano agudo	Faixa azul
Não classificado*	Produto não classificado	Faixa verde

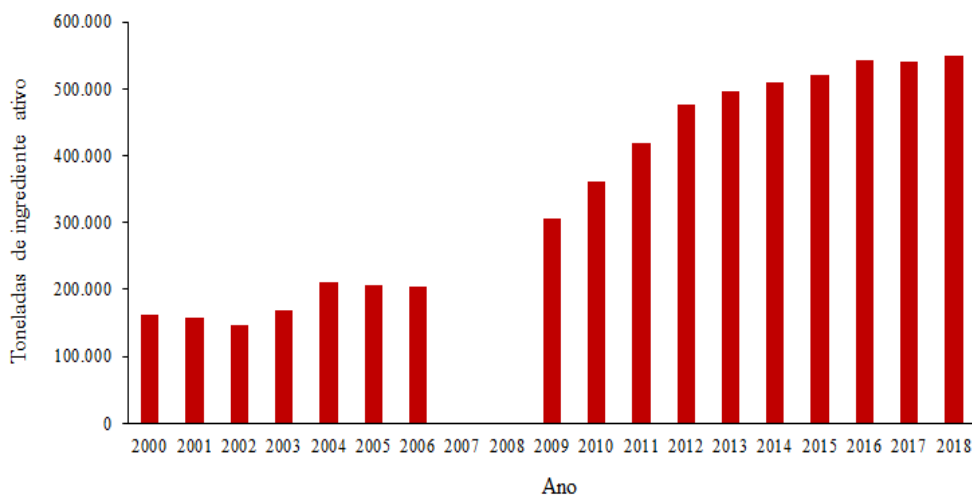
Fonte: ANVISA, 2019.

*Válido para produtos de baixíssimo potencial de dano.

Ressalta-se que o consumo de agrotóxicos sofre influência de fatores naturais como, por exemplo, variações climáticas, tipo e intensidade da infestação de pragas e qualidade do solo. Além destes, os fatores não-naturais também exercem efeito, como o comportamento da área plantada frente a rotação de culturas, a disponibilidade de maior ou menor volume de crédito agrícola ao produtor e o grau de conhecimento tecnológico do agricultor (VELASCO; CAPANAMA, 2006). O aumento do consumo de agrotóxicos e afins no Brasil entre os anos de 2000 e 2018 pode ser observado na Figura 1.

De acordo com o levantamento de vendas por classes de uso dos produtos formulados realizados no ano de 2018, os herbicidas estiveram em primeira colocação, com 338.838,14 toneladas de ingrediente ativo vendido, ou seja, 61,69% dos produtos formulados (IBAMA, 2019).

Figura 1 - Vendas de agrotóxicos e afins no Brasil no período de 2000 a 2018



Fonte: IBAMA, 2019. Dados atualizados em: 03/10/2019.

Nota: Os dados informados pelas empresas referentes aos anos de 2007 e 2008 não foram sistematizados pelo IBAMA.

2.3 OS HERBICIDAS

Os herbicidas são agentes biológicos ou substâncias químicas com capacidade de suprimir ou inibir o crescimento de plantas daninhas que competem com as culturas comerciais por espaço, nutrientes e água. Sendo assim, são compostos importantes para a produção de alimentos (ROMAN et al., 2005; STEPHENSON et al., 2006). Na década de 1940, haviam poucos herbicidas, porém, na década de 1970, o seu desenvolvimento teve um grande aumento e atualmente há diversas classes de herbicidas disponíveis no mercado (LEIN et al., 2004; MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008).

Os herbicidas afetam sítios específicos nas plantas e existem duas propriedades principais que influenciam a eficácia desses compostos: a sua solubilidade em água e suas propriedades ácidas (ácido fraco ou forte) (ROMAN et al., 2005).

A solubilidade é a medida da quantidade de herbicida que se dissolve em água ou em solventes orgânicos. A medida de solubilidade é definida pelo K_{ow} , coeficiente de partição octanol/água, que é determinado pela relação entre a concentração de herbicida que se dissolve em octanol, C_o ; e a concentração que se dissolve em água, C_w , conforme a Equação 1. Os herbicidas com baixo K_{ow} são solúveis em água,

ao passo que aqueles com alto K_{ow} são solúveis em solventes orgânicos (ROMAN et al., 2005).

$$K_{ow} = C_o / C_w \quad (1)$$

Os herbicidas também são divididos em ácidos fortes ou fracos. O termo ácido fraco ou forte relaciona-se com a facilidade do produto em perder íons hidrogênio (H^+), também chamado de próton, quando dissolvido em água. A solubilidade dos ácidos fracos depende do pH da solução. O grau de ionização dos ácidos é dado pelo pKa, ou seja, o pH no qual 50% das moléculas estão ionizadas (ROMAN et al., 2005).

Os herbicidas podem ser classificados de acordo com a sua ação, sendo alguns herbicidas não seletivos, afetando todas as plantas “naturais” ou não transgênicas, e outros seletivos. Há também a classificação por grupos químicos de acordo com o seu mecanismo de ação, o qual é relacionado ao primeiro passo bioquímico ou biofísico no interior celular a ser inibido pela atividade herbicida. Esse processo inicial pode ser suficiente para matar as espécies sensíveis (ROMAN et al., 2005; MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008).

A morte das plantas tratadas com inibidores da fotossíntese ocorre pelo bloqueio do transporte de elétrons, sendo produzidas substâncias ricas em energia e altamente tóxicas, que destroem as membranas das células e levam, assim, a planta à morte. É possível também que, inibindo a ação de uma enzima, um determinado herbicida ocasione o acúmulo de substâncias tóxicas, causando danos que podem ser irreversíveis à planta. Em outros casos, a morte pode ocorrer devido à desregulação de processos de crescimento celular e, em outros casos, não é conhecida a relação entre o sítio de ação e a morte da planta (ROMAN et al., 2005).

De forma geral, os herbicidas podem ser divididos em duas classes com respeito à forma de aplicação: ao solo e às folhas. Os herbicidas aplicados às folhas podem ser divididos, ainda, em herbicidas de contato e herbicidas sistêmicos (GWYNNE; MURRAY, 1985):

- i) Aplicados ao solo – se movem das raízes para as folhas (translocados via xilema);
- ii) Aplicados às folhas (contato) – reagem rapidamente no ponto de contato e não se movem nos sistemas internos das plantas (não translocados); e
- iii) Aplicados às folhas (sistêmicos) – movimentam-se das folhas para os pontos de crescimento, de reprodução ou de armazenamento das plantas

(translocados via floema e xilema) (MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008).

As plantas possuem dois sistemas de transporte de nutrientes, o floema e o xilema, por meio dos quais os herbicidas se movimentam na planta. O sistema floema (simplasto), composto por células vivas, transporta as soluções nas plantas tanto no sentido ascendente como no descendente. Os herbicidas movem-se passivamente no floema. Para que isso seja possível, eles precisam entrar nas células vivas, necessitando ter solubilidade intermediária e/ou ter a natureza de ácidos fracos (ROMAN et al., 2005).

O outro sistema de transporte é o xilema (apoplasto), composto por células mortas, é uma corrente com sentido ascendente na planta que transporta a água e os nutrientes nela dissolvidos, absorvidos do solo, via raízes, até a parte aérea. O controle desse movimento por parte das plantas é limitado. As condições de ambiente, como a temperatura, a umidade relativa do ar e a disponibilidade de umidade no solo, exercem as maiores influências no movimento de água no xilema. Para se mover no xilema e atingir a parte aérea, o herbicida deve ser solúvel em água (ROMAN et al., 2005).

Plantas daninhas dificultam a colheita e reduzem a produtividade. Dos mais variados tipos de herbicidas disponíveis no mercado, os mais utilizados são à base de glifosato. A utilização de herbicidas gera economia de tempo com a eliminação de ervas daninhas, reduzindo a mão-de-obra necessária ao cultivo e diminuindo seu custo. Porém, o uso contínuo de herbicidas com o mesmo modo de ação pode aumentar a resistência desenvolvida pela erva daninha (MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008).

2.4 O GLIFOSATO E O AMPA

O glifosato (N-(fosfonometil)glicina) é um herbicida altamente solúvel em água, de amplo espectro, pertencente ao grupo das glicinas substituídas, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. A primeira síntese da molécula de glifosato foi feita por Henri Martin, farmacêutico de uma pequena empresa na Suíça, mas não foi testada ou pelo menos patenteada para seu uso como herbicida. John E. Franz, da empresa Monsanto, foi o primeiro a testar o glifosato como herbicida em 1970,

patenteando a molécula como herbicida alguns anos depois (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997).

Este herbicida apresenta alta eficácia, baixa toxicidade aos humanos (com ingestão diária aceitável (IDA) de $0,042 \text{ mg kg}^{-1}$) (PARA, 2019), qualidade e preço acessível, quando comparado a outros agrotóxicos. Estes fatores somados justificam sua ampla aplicação para diferentes cultivos. De acordo com o levantamento de 2018 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) sobre os 10 ingredientes ativos mais vendidos, o glifosato e seus sais está em primeiro lugar no ranking com venda de 195.056,02 ton de ingrediente ativo. O segundo é o 2,4-D com 48.921,25 ton vendidas (DUKE; POWLES, 2008; IBAMA, 2019).

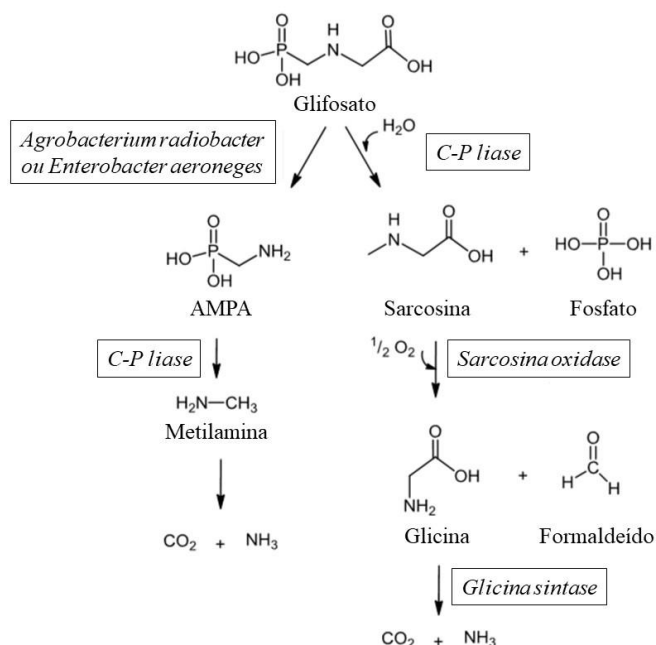
Com o advento das plantas transgênicas, o glifosato tornou-se uma opção para o controle seletivo das plantas daninhas nas culturas transformadas geneticamente. No entanto, seu maior uso é de forma não-seletiva, sendo altamente eficiente quando devidamente aplicado (GALLI; MONTEZUMA, 2005; MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008; ROMAN et al., 2005).

Esse herbicida é absorvido lentamente pelas plantas daninhas, sendo necessário um período de 6 horas sem chuva após a aplicação para o controle adequado. A absorção de glifosato pela planta se dá principalmente pela região clorofilada (tecidos e vegetais), sendo translocado preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos. O uso deste herbicida é dirigido ao controle de ervas daninhas, atuando como um potente inibidor da enzima *5-Enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase* (EPSPS), que é catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. A inibição da enzima leva à desregulação do fluxo de carbono na planta e a um acúmulo de compostos intermediários tóxicos, o shikimato ou shikimato-3-fosfato. Além disso, pode ocorrer a inibição da síntese de clorofila, estímulo da síntese de etileno, dentre outros processos (GALLI; MONTEZUMA, 2005; ROMAN et al., 2005; STEINRÜCKEN et al., 1980).

Duas rotas de degradação são conhecidas para o glifosato: a primeira consiste na transformação do glifosato em sarcosina por ação da bactéria *Enterobacter aeroneges* (enzima *C-P liase*), esta rota é, no entanto, pouco citada na literatura. A segunda rota consiste na transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA), pela bactéria *Agrobacterium radiobacter*, que por sua vez é degradado em dióxido de carbono e amônia. O AMPA é o principal metabólito do glifosato

(AMARANTE JUNIOR et al., 2002; RUEPPEL et al., 1977). Ambas as rotas de degradação do glifosato estão representadas na Figura 2.

Figura 2 - Rotas de degradação biológica do glifosato e seus metabólitos



Fonte: AMARANTE JUNIOR et al., 2002.

2.4.1 Propriedades físico-químicas do glifosato e do AMPA

Algumas das propriedades físico-químicas do glifosato e do AMPA são apresentadas na Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente.

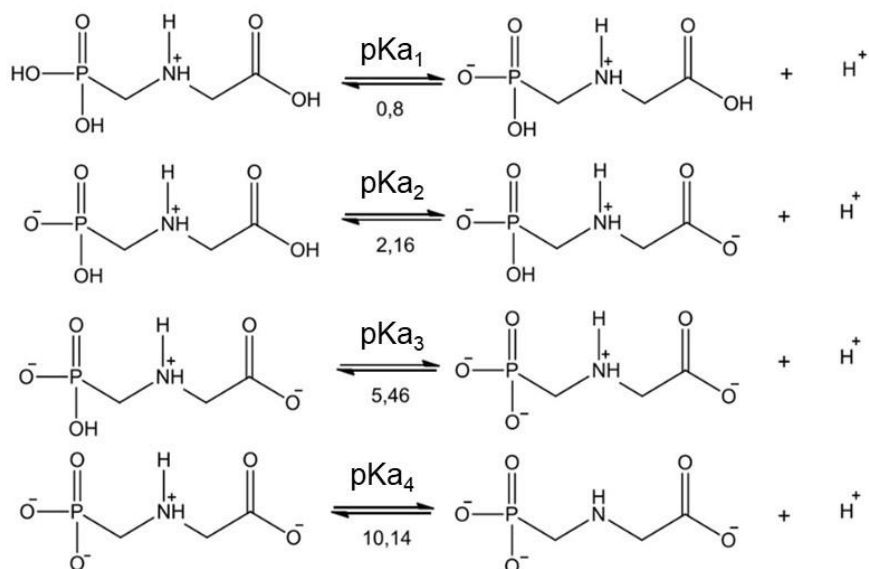
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do glifosato

Propriedades	Características
Nomenclatura IUPAC	N-(fosfonometil)-glicina
Fórmula molecular	C ₃ H ₈ NO ₅ P
Massa molecular	169,1 g mol ⁻¹
Solubilidade em água	10,5 g L ⁻¹ , a 20 °C
Solubilidade em solvente orgânico	Baixa solubilidade
Coeficiente de partição octanol/água (log K _{ow})	-3,2, em pH 3-5 e 25 °C
Ponto de fusão	189,5 °C (com decomposição)
Pressão de vapor	1,31.10 ⁻⁵ Pa, em meio ácido e 25 °C
Densidade	1,705 g mL ⁻¹ , a 20 °C
Fotodegradação	Estável na presença de luz
Dissociação em água (pKa)	pKa ₁ 0,8; pKa ₂ 2,2; pKa ₃ 5,5 e pKa ₄ 10,1
Aparência em condições ambientais	Sólido branco
Constante de Henry	2,1.10 ⁻⁷ Pa m ³ mol ⁻¹ , a 25 °C
Categoria iônica	Anfótero

Fonte: RIBEIRO, 2011; MARQUES, 2008; IUPAC, 2019.

O glifosato pertence ao grupo químico dos aminoácidos fosfonados e tal como o seu precursor, a glicina, apresenta um comportamento zwitteriônico, com separação de duas cargas em pH neutro, uma positiva no grupo amino e uma negativa nos grupos fosfonato e carboxílico (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Esta molécula apresenta quatro constantes de dissociação ácida (Ka) as quais indicam o grau de dissociação desse herbicida em função do pH. Pode-se observar que em pH superior a 11,0, a molécula de glifosato encontra-se completamente dissociada, conforme a Figura 3.

Figura 3 - Dissociação do glifosato em água com diferentes pKas



Fonte: AMARANTE JUNIOR et al., 2002.

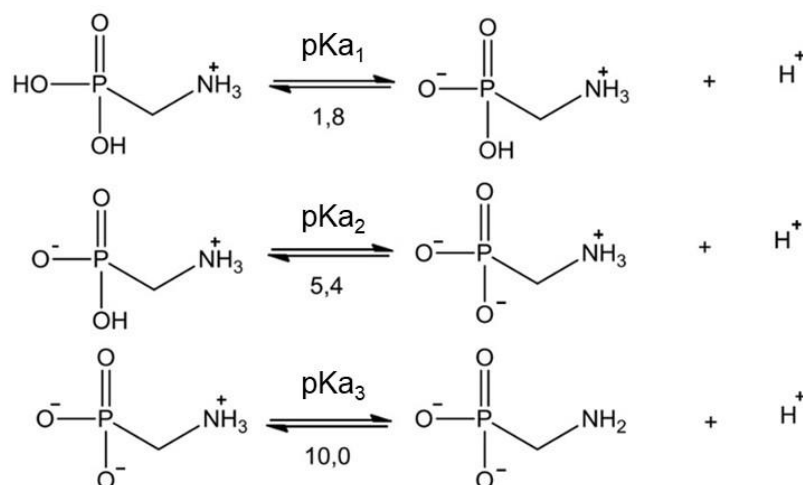
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas do AMPA

Propriedades	Características
Nomenclatura IUPAC	Ácido aminometilfosfônico
Fórmula molecular	CH_6NO_3P
Massa molecular	$111,0 \text{ g mol}^{-1}$
Solubilidade em água	$1466,6 \text{ g L}^{-1}$, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$
Solubilidade em solvente orgânico	Baixa solubilidade
Coefficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$)	-1,63, em pH 7 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$
Dissociação em água (pKa)	$pK_{a1} 1,8$; $pK_{a2} 5,4$ e $pK_{a3} 10,0$
Aparência em condições ambientais	Sólido branco
Constante de Henry	$0,16 \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$
Categoria iônica	Anfótero

Fonte: NEDELKOSKA; LOW, 2004; IUPAC 2019.

O AMPA possui três constantes de dissociação ácida, e assim como o glifosato, a molécula de AMPA encontra-se completamente dissociada em pH superior a 11,0, conforme a Figura 4.

Figura 4 - Dissociação do AMPA em água com diferentes pKas



Fonte: CHEN et al., 2009.

2.4.2 Toxicidade do glifosato e do AMPA

O uso do herbicida glifosato tem trazido uma série de preocupações relacionadas ao meio ambiente e à saúde humana. Diversos estudos sobre o efeito do glifosato à saúde foram feitos por agências governamentais, por acadêmicos independentes ou por cientistas em nome de grandes empresas comercializadoras de glifosato. No entanto, esses estudos apresentam resultados conflitantes (IARC, 2015; EPA, 2016).

Em 2015, a Agência Internacional do Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) publicou um relatório evidenciando efeitos carcinogênicos em animais e provável efeito carcinogênico em humanos pelo glifosato (IARC, 2015). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) realizou uma grande revisão bibliográfica na tentativa de avaliar o potencial carcinogênico do glifosato. Foram avaliados 23 estudos epidemiológicos, 15 estudos de carcinogenicidade animal e quase 90 estudos de genotoxicidade para o glifosato. A revisão indicou que os dados disponíveis até o

momento não permitem classificar o glifosato como potencial carcinogênico em animais e em humanos (EPA, 2016).

As propriedades toxicológicas agudas do glifosato incluem: via oral $DL_{50,rato}$ 5600 mg kg^{-1} , via dermal $DL_{50,coelho}$ acima de 5000 mg kg^{-1} . Apresenta as seguintes propriedades toxicológicas crônicas: para ratos com uma dieta de 24 meses, o nível sem efeito observável (NOEL, do inglês *no observed effect level*) oncogênico é de 4500 mg $kg^{-1} d^{-1}$ e carcinogênico de 400 mg $kg^{-1} d^{-1}$ (MESNAGE et al., 2015). As propriedades físico-químicas e toxicológicas do AMPA ainda não estão bem estabelecidas na literatura.

De acordo com a classificação toxicológica no Brasil estabelecida pela ANVISA, o glifosato está contido na categoria 4, correspondente a produtos pouco tóxicos (faixa azul). Devido à baixa toxicidade do glifosato, os níveis máximos de resíduos estabelecidos no mundo são geralmente maiores do que os limites estabelecidos para outros agrotóxicos (ANVISA, 2019).

2.4.3 Concentração máxima permitida para glifosato e AMPA em águas

No Brasil, duas normativas estabelecem concentrações máximas permitidas para glifosato e AMPA em amostras de água: para águas doces superficiais a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 357 de 17/03/2005 estabelece valores máximos de glifosato para águas das classes 1 e 3, sendo 65 e 280 $\mu g L^{-1}$, respectivamente (CONAMA, 2005).

As águas da classe 1 podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas. Por outro lado, as águas da classe 3 podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário; e à dessedentação de animais.

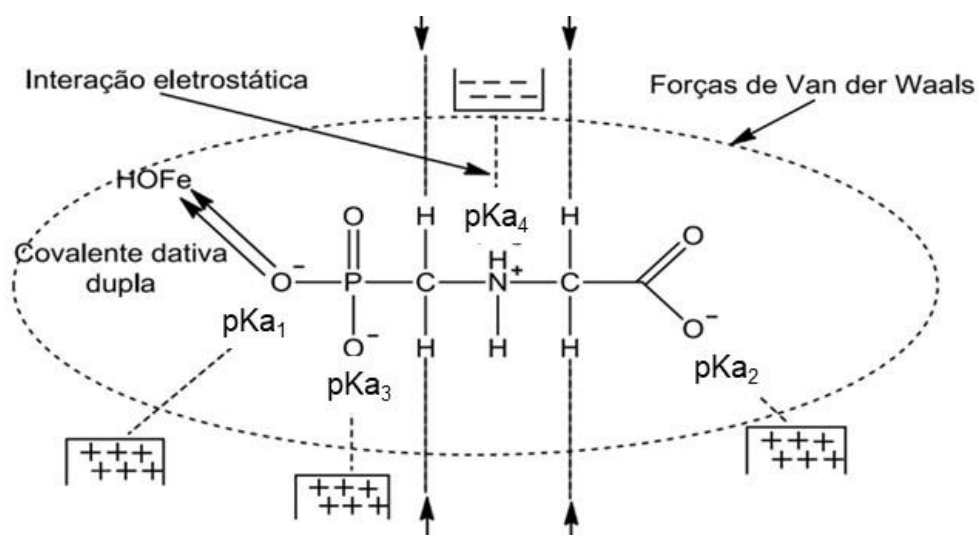
A outra normativa brasileira é redigida pelo Anexo XX da Portaria de consolidação nº 5 do Ministério da Saúde de 2017, a qual determina que o valor máximo de glifosato e AMPA em águas usadas para abastecimento não deve

ultrapassar $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2017). A EPA em seu regulamento para a qualidade da água potável, determina que a concentração máxima permitida é de $700 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas para consumo (EPA, 2017). Valores menores são encontrados nas diretrizes da União Europeia (EU, do inglês *European Union*), com limites de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para o glifosato em água potável, não podendo a soma das concentrações de agrotóxicos ultrapassar $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (96/23/EC, 2002).

2.4.4 O glifosato e o AMPA no meio ambiente

Os grupamentos fosfonato, amino e carboxilato presentes na estrutura do glifosato dão a ele a característica de ligante tridentado, permitindo uma posição privilegiada entre os herbicidas. Após a aplicação do glifosato, parte do herbicida não atinge o alvo, sendo sorvido em sedimentos ou partículas suspensas no solo e na água, formando complexos em água com íons metálicos de Ca^{2+} e Mg^{2+} (MORAES; ROSSI, 2010), e complexos no solo com os ácidos húmicos, íons Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , além da complexação com diversos outros metais (COUTINHO; MAZO, 2005). Os mecanismos envolvidos na sorção do glifosato no solo estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Esquema dos mecanismos de sorção do glifosato no solo



Fonte: PRATA; LAVORENTI, 2002.

Outro fator importante que determina a presença deste herbicida no solo é a atividade microbiana. As taxas de metabolismo do glifosato podem variar consideravelmente entre diferentes solos, que podem ser relacionados com o nível de atividade microbiológica (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997). A meia-vida do glifosato e do AMPA no solo varia conforme os teores de argila e matéria orgânica e do nível de atividade microbiana (TONI; SANTANA; ZAIA, 2006). A meia-vida do glifosato e do AMPA no solo é apresentada com diferentes tempos por diversos autores, sendo estimada de 2 a 194 dias para o glifosato e 76 a 240 dias para o AMPA (TONI; SANTANA; ZAIA, 2006; WAUCHOPE et al., 1992; BURSIA; DOBSON; SOLOMON, 2000; VEIGA et al., 2001). O glifosato se liga mais fortemente aos constituintes do solo do que o AMPA (DUKE; POWLES, 2008), sendo na maioria dos solos imóvel, mas a mobilidade pode variar conforme o pH do solo. O AMPA se decompõe rapidamente, e resulta na lixiviação de quantidades mínimas no solo (WAUCHOPE et al., 1992).

O transporte de glifosato e AMPA do ambiente terrestre para o ambiente aquático pode ocorrer na forma de solutos ou co-transportados ligados a coloides do solo. Ambas as formas, dissolvidas e particuladas, podem ser movidas por lixiviação através do solo para águas subterrâneas e pelo fluxo terrestre para águas superficiais (BORGGAARD; GIMSING, 2008). O tempo de meia-vida do glifosato em água é mais curto que sua persistência em solo, com valores médios de 7 a 21 dias (BURSIA; DOBSON; SOLOMON, 2000; PATERSON, 2004).

Em âmbito nacional, Calheiros e colaboradores detectaram glifosato em amostras de água da Bacia do Alto Paraguai, a qual abrange o Pantanal Mato-grossense (CALHEIROS, 2010). Em 2016, Ronco e colaboradores constataram a contaminação da água da Bacia do Rio Paraná em alto nível de glifosato e AMPA, a qual variou de acordo com a prática intensiva da agricultura da região avaliada (RONCO et al., 2016). O glifosato foi monitorado pela primeira vez no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) no ciclo de 2017/2018. Neste ciclo, foram selecionados três alimentos para serem monitorados, tendo em vista a exigência de metodologia *single* para análise de resíduos de glifosato e seu metabólito AMPA. No total, foram analisadas 998 amostras, sendo que em 32 foram detectados resíduos de glifosato (18 amostras de arroz e 7 amostras de uva, ambas \leq LMR 0,02 mg kg⁻¹). Das 32 amostras, 7 amostras de manga foram consideradas insatisfatórias, tendo em vista o uso não autorizado para a cultura. Ressalta-se que

estão em andamento no ciclo de 2018/2019 a análise de glifosato para os alimentos trigo, soja e milho (PARA, 2019).

2.5 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA DE ÁGUA

Para a maior parte dos casos, o emprego das técnicas analíticas está vinculado a uma etapa prévia de preparo da amostra, a partir de métodos de extração, visando a remoção de interferentes da matriz e, conseqüentemente, melhora na sensibilidade, seletividade da resposta analítica e aumento do tempo de vida útil da instrumentação utilizada (HARRIS, 2017).

O preparo da amostra envolve uma série de etapas necessárias para transformar uma amostra, de tal modo que ela se torne apropriada para análise. O preparo de uma amostra pode incluir a sua dissolução, a extração do analito de uma matriz complexa, a concentração de um analito diluído a um nível dentro dos limites de determinação, a conversão química do analito a uma forma que seja detectável e a remoção ou mascaramento de espécies interferentes (HARRIS, 2017).

2.5.1 Métodos de preparo de amostra de água para determinação de glifosato e AMPA

Para uma análise confiável, métodos analíticos seletivos e sensíveis são necessários para a determinação de glifosato e AMPA. Contudo, a determinação destes compostos ainda é considerada um desafio, tendo em vista a elevada polaridade, caráter zwitteriônico e baixa volatilidade (BOTERO-COY et al., 2013). Dentre os métodos de preparo de amostra reportados na literatura, pode-se citar, para a determinação de glifosato e AMPA em água, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*) (PINTO; SOARES; FERREIRA, 2018), a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) (TIAGO et al, 2020) e a derivatização (DEMONTE et al., 2018), além da análise direta, envolvendo normalmente apenas a diluição e filtração da amostra (OKADA et al., 2018).

De modo geral, duas abordagens analíticas podem ser usadas para a determinação de glifosato e AMPA: a análise direta e a análise indireta (derivatização). A análise direta é geralmente mais rápida, pois elimina a etapa de derivatização.

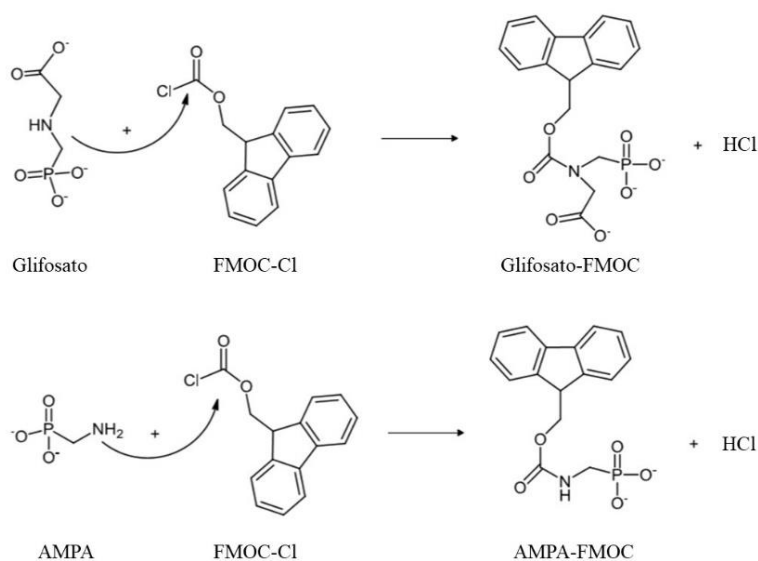
Entretanto, para viabilizar sua execução, é necessário o uso de colunas específicas com alto valor agregado, como colunas de IC (GUO; CAI; YANG, 2007; MATOS, 2014), interação hidrofílica (JENSEN et al., 2016) ou interação hidrofílica mista (troca aniônica fraca) (CHEN et al., 2012). Por outro lado, a derivatização (análise indireta) oferece a possibilidade de melhorar o comportamento cromatográfico desses compostos, permitindo o uso de colunas convencionais, como as colunas de C18 (RONCO et al., 2016).

2.5.1.1 Derivatização

A derivatização é um processo no qual um analito é quimicamente modificado com o auxílio de um reagente, de modo a proporcionar uma melhor determinação cromatográfica e sua detecção (HARRIS, 2017). Para determinações por cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*), o objetivo é melhorar a estabilidade térmica do(s) analito(s) e aumentar sua volatilidade. Isso envolve mascarar os grupos funcionais polares, como OH e COOH, com um substituinte menos polar, comumente o grupo trimetilsilil ((CH₃)₃Si), para melhorar a estabilidade térmica dos compostos e melhorar a volatilidade dos mesmos (KNAPP, 1979; BLAU; HALKET, 1993). Para as determinações por cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*), o objetivo da derivatização é introduzir grupos funcionais para aumentar a sensibilidade e a seletividade da técnica de detecção. A reação de derivatização mais comum para LC é realizada através da adição da funcionalidade de fluorescência ou ultravioleta (UV), adicionando um composto que contém um grupo aromático (KNAPP, 1979; BLAU; HALKET, 1993).

A reação de derivatização para determinações por LC pode ser realizada nos modos pré-coluna ou pós-coluna utilizando reagentes como o 6-aminoquinolil-n-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC). Para a derivatização pré-coluna, o reagente mais comumente usado é o FMOC-Cl. A reação pode ser observada na Figura 6. Nesse processo, ocorre a substituição de cloro na estrutura do FMOC-Cl pelo glifosato e AMPA (PATSIAS; PAPADOPOULOU; PAPADOPOULOU, 2001; BERNAL et al., 2012; CARRETTA et al., 2019).

Figura 6 - Reação de derivatização do glifosato e do AMPA usando FMOC-Cl como agente derivatizante



Fonte: CATRINCK et al., 2014.

Quando se trata da utilização do FMOC-Cl para derivatização de glifosato e AMPA em água, é reportado na literatura a necessidade de um longo tempo para homogeneização, variando de 4 a 12 horas (PERUZZO; PORTA; RONCO, 2008; NEDELKOSKA; LOW, 2004). Além disso, a derivatização com FMOC-Cl apresenta alguns desafios quando a análise é realizada em sistemas de MS, como a necessidade de utilizar tampões não voláteis para o ajuste do pH da amostra (EHLING; REDDY, 2015; GOSCINNY et al., 2012; POIGER et al., 2017), adição de excesso de FMOC-Cl e formação de subprodutos de derivatização, como o FMOC-OH, ambos comumente removidos com uma etapa de extração líquido-líquido utilizando solventes orgânicos (CATRINCK et al., 2014).

2.5.1.2 Extração Líquido-Líquido

A etapa de extração se trata da transferência de um soluto, presente em uma fase, para outra fase. Normalmente, as extrações feitas em química analítica têm como objetivo isolar ou concentrar o analito desejado, ou, então, separá-lo das espécies que interferem em sua análise. O caso mais comum é a extração de uma solução aquosa com um solvente orgânico. Em uma mistura com duas fases, uma das

fases é predominantemente aquosa e a outra é predominantemente orgânica (HARRIS, 2017).

A distribuição dos solutos é baseada na expressão “semelhante dissolve semelhante”, que significa que o soluto é mais solúvel em uma fase cuja polaridade é semelhante àquela do soluto. O coeficiente de distribuição, K_d , é o coeficiente de distribuição para a reação de equilíbrio expressa pela afinidade relativa do analito com as duas fases (concentração do analito no solvente orgânico, C_e , e concentração do analito na fase aquosa, C_a) (FIGUEIREDO; BORGES; QUEIROZ, 2015), conforme a Equação 2:

$$K_d = C_a / C_e \quad (2)$$

O coeficiente de distribuição depende de variáveis como temperatura e pressão, composição da matriz da amostra (pH e componentes orgânicos presentes na amostra), bem como fatores cinéticos definem a natureza do K_d (HARRIS, 2017). Estes fatores devem ser otimizados a fim de se obter uma máxima eficiência de extração.

Se tratando da remoção dos interferentes quando realizada a derivatização com FMOC-Cl (FMOC-Cl residual e FMOC-OH), comumente é empregada a técnica de extração líquido-líquido após a derivatização. Os solventes orgânicos mais utilizados na etapa de limpeza são o diclorometano (RONCO et al., 2016; STEINBORN et al., 2016), acetato de etila e dietil éter (CATRINCK et al., 2014), ambos com diferença de polaridade e densidade acentuada quando comparada com a água.

2.6 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA

Para análise direta e indireta de glifosato e AMPA, a cromatografia é a técnica mais utilizada, tanto a cromatografia a gás quanto a cromatografia à líquido. No entanto, a determinação por LC é preferida devido ao caráter iônico dos compostos (QIAN et al., 2009).

2.6.1 Cromatografia líquida

Na cromatografia, o tipo de interação entre a fase estacionária, a fase móvel e as substâncias contidas em uma mistura é o componente básico da separação entre as moléculas. A fase estacionária na cromatografia líquida é composta por uma fase sólida ou uma fase líquida revestida na superfície de uma fase sólida. Por sua vez, a fase móvel que flui sobre a fase estacionária é líquida (COSKUN, 2016).

Com o avanço da técnica nos últimos anos, o uso de fases estacionárias com partículas de diâmetro pequeno ($< 2 \mu\text{m}$), associado a aplicação de alta pressão para o bombeamento da fase móvel aumentam o poder de separação nos sistemas cromatográficos. Como consequência, é possível a execução de análises em um tempo reduzido. Desde então, a LC é considerada uma técnica bem estabelecida, empregada nas mais diversas áreas para solucionar inúmeros problemas analíticos (COSKUN, 2016; MALDANER; JARDIM, 2012).

Com relação a análise indireta de glifosato e AMPA, a cromatográfica a líquido pode ser associada à diferentes detectores, dentre eles, detector de UV (CATRINCK et al., 2014) e de fluorescência (BERNAL et al., 2012). Adicionalmente, a espectrometria de massas acoplada a cromatografia a líquido vêm sendo utilizada visando o aumento da sensibilidade e seletividade, especialmente quando utilizado sistema de espectrometria de massas em série (STEINBORN, A. et al., 2016).

2.6.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é definida como o estudo da matéria a partir da formação de íons em fase gasosa, sendo posteriormente identificadas por um espectrômetro de massas de acordo com a sua massa, carga, estrutura e propriedades físico-químicas. O espectrômetro de massas é composto basicamente por uma fonte de íons, um analisador de massas, responsável pela separação de acordo com a relação massa/carga dos compostos, e um detector (GROSS, 2004; RAINA, 2011).

A espectrometria de massas em série é um sistema composto de quadrupolos combinados, caracterizado por sua alta eficiência de separação. De modo geral, os íons precursores produzidos pela fonte são separados no primeiro analisador (MS1),

fragmentados na cela de colisão e os íons produtos gerados são analisados no segundo quadrupolo (MS2) (STACHNIUK; FORNAL, 2016).

A seletividade e a sensibilidade são consideravelmente melhoradas empregando a espectrometria de massas em série. Dentre os modos de aquisição de sinal, o monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selection reaction monitoring*) é preferível para fins quantitativos, uma vez que permite a redução de ruído de fundo e a detecção de múltiplas transições (WANG, WANG, CAI, 2013; STACHNIUK; FORNAL, 2016).

Um compilado de trabalhos publicados entre os anos de 2016 e 2020 relacionados à determinação de glifosato e AMPA em água é apresentado na Tabela 4, relacionando, principalmente, o método de preparo de amostra empregado, a técnica analítica e o limite de quantificação obtido por cada autor.

Tabela 4 - Trabalhos de determinação de glifosato e AMPA em água publicados entre os anos de 2016 e 2020

Método de preparo	Volume de amostra de água	Solução derivatizante/pH	Tempo de reação	Limpeza	Compostos	Técnica analítica	Limite de quantificação	Referência
Derivatização	2,0 mL de água superficial	2 mL de FMOC-Cl (1 mg mL ⁻¹ em ACN)/pH 9	Overnight	5 mL de DCM	Glifosato e AMPA	HPLC-MS	-	RONCO et al., 2016
Análise direta	150 µL de água + 100 µL de água 0,1% de ácido fórmico	-	-	-	Glifosato e AMPA	HPLC-MS/MS	0,1 µg L ⁻¹	GUO et al., 2016
Derivatização	500 mL de água de mar	100 µL de FMOC-Cl (1,5 mg mL ⁻¹ em ACN)/pH 9	30 min	-	Glifosato e AMPA	HPLC-FD	0,8 e 0,2 µg L ⁻¹	WANG et al., 2016
Derivatização	5 mL de água superficial	0,75 mL de FMOC-Cl (0,5 mg mL ⁻¹ em ACN)/pH 9	Overnight	2 mL de DCM	Glifosato e AMPA	LC-MS/MS	0,005 µg L ⁻¹	POIGER et al., 2016
TA-IL-DLLME	800 µL de água	100 µL de FMOC-Cl (1 mg mL ⁻¹ em ACN)/pH 9,5	60 min	500 µL de DCM	Glifosato e AMPA	LC-FD	8,6 e 9,6 µg L ⁻¹	PADILLA-ALONSO et al., 2017
FRET (carbon dots)	10 mL de água de torneira	-	-	-	Glifosato	FD	100 µg L ⁻¹	YUAN et al., 2017
-	-	-	-	-	Glifosato	CV (MIPPy)	0,0009 µg L ⁻¹	ZHANG et al., 2017
Derivatização	3 mL de água para laticínios	0,5 mL de FMOC-Cl (6 mg mL ⁻¹ em ACN)/pH 6-7	2 h	4,5 mL de DCM	Glifosato e AMPA	UHPLC-MSMS	0,6 e 0,2 µg L ⁻¹	DEMONTE et al., 2018
Derivatização + DLLME	2,5 mL de água de irrigação	650 µL de FMOC-Cl (5,5 mg mL ⁻¹ em acetona)/pH 9	10 min	-	Glifosato e AMPA	UPLC-MS/MS	1,0 µg L ⁻¹	PINTO; SOARES; FERREIRA, 2018
-	-	-	-	-	Glifosato	Amperometria	100 µg L ⁻¹	NOORI et al., 2018
Análise direta	2 mL de água ambiental	-	-	-	Glifosato e AMPA	LC-MS/MS	0,83 µg L ⁻¹	OKADA et al., 2018
Derivatização	200 µL de água	25 µL de AQC (AccQ.Tag™ em ACN)	15 min	-	Glifosato e AMPA	UHPLC-MS/MS	0,5 µg L ⁻¹	CARRETTA et al., 2019
Análise direta	1 mL de água superficial	-	-	-	Glifosato e AMPA	LC-MS/MS	0,5 e 0,33 µg L ⁻¹	GUO et al., 2019
Análise direta	2 µL de água de mesa	-	-	-	Glifosato	IMS	33 µg L ⁻¹	KHADEMI et al., 2019
-	-	-	-	-	Glifosato	DPV (GC/rGO-CuNPs)	10 µg L ⁻¹	SETZNAGL; CESARINO, 2020
SPE	100 mL de água de cultura hidropônica/eluição com 10 mL de água com HCl 10%	-	-	-	Glifosato e AMPA	HPLC-ICP-MS/MS	1,09 e 0,29 µg L ⁻¹	TIAGO et al., 2020

Fonte: O autor, 2020.

ACN: acetonitrila, DCM: diclorometano, FD: detector por fluorescência, TA-IL-DLLME: microextração dispersivo-líquido-líquido à base de líquido iônico assistido por temperatura, FRET (carbono dots): transferência de energia por ressonância de fluorescência (pontos de carbono), CV: voltametria cíclica, MIPPy: polipirrol molecularmente impresso, AQC: 6-aminoquinolil-n-hidroxisuccinimidil carbamato, IMS: espectrometria de mobilidade iônica, DPV: voltametria de pulso diferencial, GC/rGO-CuNPs: óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de cobre, HCl: ácido clorídrico, ICP: plasma indutivamente acoplado.

2.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Na análise cromatográfica, frequentemente as etapas de preparo de amostras e de separação dos compostos são otimizadas com o emprego de técnicas estatísticas multivariadas. Variar todos os fatores ao mesmo tempo é vantajoso em razão de que as variáveis podem influenciar umas às outras mutuamente, e o valor ideal para uma delas pode depender do valor da outra. Esse comportamento é chamado de interação entre os fatores (FERREIRA et al., 2007; NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

Usando planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, é possível extrair do sistema em estudo o máximo de informações úteis, fazendo um número mínimo de experimentos. A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

Em resumo, a utilização de planejamentos experimentais busca obter um modelo matemático apropriado para descrever um certo fenômeno, utilizando o mínimo possível de experimentos. O planejamento experimental fornece eficiência e economia no processo experimental e o uso de métodos estatísticos na análise dos dados obtidos resulta em objetividade científica nas conclusões (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

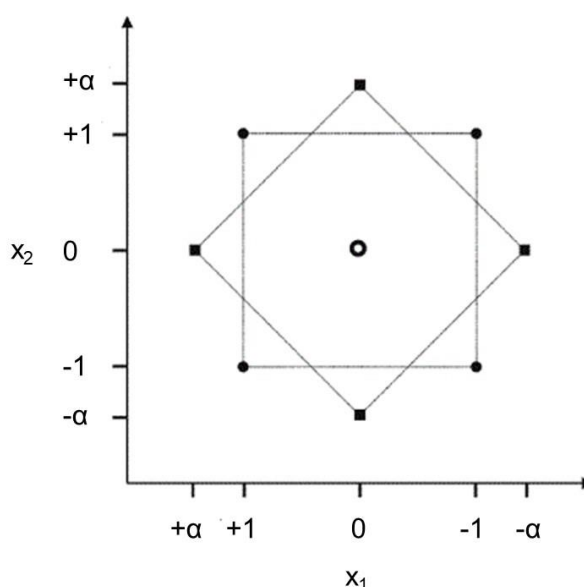
Todo planejamento experimental começa com uma série inicial de experimentos, com o objetivo de definir as variáveis e os níveis importantes. São feitas alterações propositalmente nas variáveis de entrada de um processo ou sistema, de modo que se possa avaliar as possíveis alterações sofridas pela variável resposta, como também as razões de sua alteração (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

Um experimento fatorial completo inclui todas as possíveis combinações entre os níveis dos fatores do experimento. Já os experimentos fatoriais 2^k têm k fatores, com dois níveis cada. Os experimentos 2^k ; como por exemplo o planejamento fatorial 2^2 , também conhecido como planejamento experimental do tipo estrela; constituem uma importante classe de planejamento pois o número de ensaios envolvidos na realização desses experimentos é relativamente pequeno. Apesar da região experimental nestes experimentos ser restrita, é possível indicar tendências e determinar uma melhor, ou mais adequada, direção para novos experimentos (FERREIRA et al., 2007; NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

Para o planejamento fatorial 2^2 , como representado na Figura 7, são realizados experimentos na condição central, em condições +1 e -1, sendo os valores de acréscimo e diminuição iguais e definidos pelo analista. Além disso, os experimentos são aplicados em condições de $+\alpha$ e $-\alpha$, sendo o valor de α para um planejamento fatorial 2^2 definido pela Equação 3 (FERREIRA et al., 2007):

$$\alpha = \pm \sqrt[4]{2^2} \quad (3)$$

Figura 7 – Representação do planejamento fatorial 2^2 , denominado planejamento do tipo estrela.



Fonte: O autor, 2020.

A medida que o número de fatores em um experimento fatorial 2^k aumenta, o número de experimentos também aumenta. Nesta aplicação, considera-se um grande número de variáveis ou fatores que podem influenciar no sistema ou processo. Neste caso, o experimento fatorial é fracionado a fim de identificar quais variáveis ou fatores influenciam no processo e, posteriormente, realizar um experimento mais detalhado, somente com os fatores que influenciam (FERREIRA et al., 2007; NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

Para evitar a ocorrência de distorção estatística nos resultados, isto é, para impedir que desvios atípicos sejam obrigatoriamente associados a determinadas combinações de níveis, deve-se realizar os ensaios em ordem aleatória. Outro ponto importante é que a realização das réplicas, quando houver, deve refletir a variabilidade

do processo em toda a faixa de estudo, não apenas numa determinada combinação de níveis (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2010).

2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação é definida como o ato de verificar e confirmar que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos, fazendo-se uso de exame e fornecendo evidência objetiva para a comprovação (ABNT, 2017). É necessária a validação de todos os procedimentos (etapas) realizados no método (EUROPEAN COMMISSION, 2019).

Os parâmetros de desempenho considerados para ensaios quantitativos são: seletividade, linearidade/faixa de trabalho/faixa linear de trabalho/sensibilidade, limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*), limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*), tendência/recuperação, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e, opcionalmente, robustez (INMETRO, 2018). A avaliação da precisão deve, sempre que possível, envolver a análise de materiais de referência certificados, participação em testes de proficiência ou outras comparações interlaboratoriais. Além dos aspectos quantitativos da validação, também os parâmetros de identificação devem ser avaliados, como proporção de íons e tempo de retenção (EUROPEAN COMMISSION, 2019).

A Tabela 5 apresenta um resumo dos parâmetros e as especificações necessárias para a validação de um método analítico de acordo com o INMETRO e a EUROPEAN COMMISSION.

Tabela 5 - Critérios de validação de métodos analíticos

Parâmetro	Definição	Aplicação
Seletividade ^a	Distinção entre as respostas dos analitos	Resposta de amostras de controle em branco e fortificadas
Linearidade ^{a,b}	Correlação entre resposta analítica e concentração	Verificação da linearidade de no mínimo 5 níveis (n=3), com RSD≤20%
Limite de quantificação (LOQ) ^{a,b}	Menor nível em que o analito pode ser quantificado com exatidão e precisão aceitável em um método validado	n=6, sendo ≤LMR
Limite de quantificação (LOD) ^a	A menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não quantificada	LOD 3,33 vezes menor que o valor de LOQ
Exatidão ^{a,b}	Grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro	Ensaio de fortificação em amostra branco, mínimo de 3 níveis (baixo, médio, alto), recuperação 70-120%
Precisão e Precisão intermediária ^{a,b}	Dispersão dos resultados entre ensaios diferentes, repetidos de uma mesma amostra	Em termos de repetitividade: RSD para cada nível testado Em termos de reprodutibilidade: derivada da validação/verificação contínua do método RSD≤20%
Efeito matriz ^{a,b}	Alterações na resposta analítica em função dos componentes da matriz	Comparação da resposta de padrões em solvente e padrões na matriz Abordar o efeito matriz quando a supressão ou aprimoramento de sinal for >20%
Razão de íons ^b	Resolução em unidade de massa	No mínimo 2 íons produtos (S/N≥3d). Sobreposição completa dos picos do analito no cromatograma. A razão de íons dos extratos da amostra deve estar dentro de ±30% da média dos padrões de calibração

Fonte: INMETRO, 2018; EUROPEAN COMMISSION, 2019.

a) INMETRO, 2018 e b) EUROPEAN COMMISSION, 2019.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho consistiu na otimização e validação de um método de preparo de amostra utilizando reação de derivatização de glifosato e AMPA com FMOC-Cl para posterior determinação por LC-MS/MS. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (DQ-UFSM), laboratório que atua com sistema de gestão ISO 17025:2005 implementado.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para os ensaios deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Agitador rotativo – (Heidolph, Alemanha);
- Agitador vórtex – Genie 2 (Scientific Industries, USA);
- Balança analítica UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica de precisão APX-200 (Denver Instruments, Brasil);
- Banho ultrassônico USC-1400 (Unique, Brasil);
- Centrífuga Centrío (Equipar LTDA, Brasil);
- Cronômetro (Pró-Análise, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3R (Millipore, EUA);
- Sistema LC-MS/MS modelo Agilent 6470 LC/TQ (Agilent Technologies, EUA) equipado com:
 - Cromatógrafo a líquido modelo Agilent 1290, contendo sistema controlador de solventes, bomba binária Infinity II Agilent G7120A (Agilent Technologies, EUA);
 - Amostrador automático modelo Agilent G7167B com controle de temperatura (Agilent Technologies, EUA);
 - Coluna analítica: coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (50 mm x 3.0 mm x 1.8 µm) (Agilent Technologies, EUA);
 - Interface/fonte de ionização por eletronebulização (ESI) Agilent Jet Stream (Agilent Technologies, EUA);

- Detector: analisador de massas tipo triplo quadrupolo (QqQ) modelo Agilent G6470A (Agilent Technologies, EUA);
- Sistema de aquisição de dados através do Software MassHunter Workstation 10.0 (Agilent Technologies, EUA);

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E DEMAIS MATERIAIS

- Acetato de etila (Scharlab, Espanha);
- Acetona, grau HPLC (Merck, Brasil);
- Acetonitrila, grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct 3UV® resistividade de 18,2 MΩ cm (Millipore, França);
- Cloroformato de 9-fluorenilmetil, FMOC-Cl (Merck, Alemanha);
- Diclorometano (Honeywell, EUA);
- Extran® neutro (Merck, Alemanha);
- Formiato de amônio (Merck, Alemanha);
- Hexano (95% n-hexano) (Honeywell, EUA);
- Metanol (Merck, Alemanha);
- Nitrogênio grau de pureza 5.0 (analítico) (Air Liquide, Brasil);
- Tetraborato de sódio, Na₂B₄O₇ (Merck, Alemanha);

3.2.1 Materiais

- Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- Fitas para medida de pH (0-14) (Merck, Alemanha);
- Filtros de nylon (PTFE) com porosidade de 0,22 μm e 0,45 μm (Allcrom, Brasil; Agilent, EUA);
- Microtubos tipo eppendorf, capacidade de 2 mL (Labcon, EUA);
- Papel alumínio;
- Ponteiras com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 15 mL e suporte de isopor para tubos (Sarstedt, Alemanha);
- Vidraria comum de laboratório;

3.2.2 Amostras de água

As 38 amostras de água (29 amostras de água superficial e 9 amostras de água potável) avaliadas neste trabalho são provenientes de zonas agrícolas dos estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso. As amostras foram armazenadas em frascos de polipropileno e mantidas sob refrigeração em temperatura entre 4 e 10 °C.

3.3 ESCOLHA DA AMOSTRA BRANCO DE ÁGUA

A amostra utilizada como branco foi escolhida a partir das amostras coletadas. Nesta amostra avaliou-se por LC-MS/MS a presença de sinal analítico no tempo de retenção (t_R) dos compostos em estudo. A amostra “branco” foi acondicionada em frascos de polipropileno e armazenada em geladeira em temperatura entre 4 e 10 °C.

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

A Tabela 6 informa a pureza, fórmula molecular, massa molecular (g mol^{-1}), ponto de ebulição (°C) e ponto de degradação (°C), pKa e solubilidade em água (mg L^{-1}) do glifosato e do AMPA.

As soluções analíticas de glifosato, AMPA e trifenilfosfato utilizadas nesse estudo foram preparadas a partir de padrões sólidos. A pureza foi corrigida para cada um dos compostos avaliados durante a etapa de preparo da solução estoque de concentração 1000 mg L^{-1} em água ultrapura para o glifosato e o AMPA e em acetonitrila para o trifenilfosfato. As soluções foram armazenadas em tubos de polipropileno (4 a 10 °C, para solução aquosa e $< -10 \text{ °C}$, para solvente orgânico). A partir das soluções individuais, preparou-se uma mistura de trabalho contendo o glifosato e o AMPA em uma concentração de 10 mg L^{-1} em água ultrapura, e uma solução de trabalho de trifenilfosfato em uma concentração de 10 mg L^{-1} em acetonitrila. Estas foram utilizadas para o preparo de soluções padrão diluídas, as quais foram utilizadas para os ensaios de fortificação da amostra branco. As curvas analíticas foram preparadas em água potável e superficial, em concentrações de 0,5; 1; 2,5; 5; 10 e $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 6 - Pureza, fórmula molecular, massa molecular, ponto de ebulição e ponto de degradação, pKa e solubilidade em água dos compostos analisados

Composto	Pureza (%)	Fórmula molecular	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Ponto de ebulição (°C)	Ponto de degradação (°C)	pKa	Solubilidade em água (g L ⁻¹)
AMPA (-)	99,0	CH ₆ NO ₃ P	111,0	-	-	pKa ₁ 1,8; pKa ₂ 5,4 e pKa ₃ 10,0	1466,6
Glifosato (-)	98,0	C ₃ H ₈ NO ₅ P	169,1	Decompõe antes da ebulição	200	pKa ₁ 0,8; pKa ₂ 2,2; pKa ₃ 5,5 e pKa ₄ 10,1	10,5
Trifenilfosfato (PI) (+)	99,0	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P	326,28	-	-	-	-

Fonte: IUPAC, 2019

PI: padrão interno

3.4.1 Utilização do padrão interno (PI)

Para uma determinação confiável a partir de técnicas cromatográficas, a adição de padrão interno (PI) é indispensável. Esta substância não deve estar presente na amostra e deve, idealmente, apresentar propriedades físico-químicas semelhantes às dos analitos, sendo utilizada para monitorar as condições do equipamento, devendo estar presente em todas as soluções injetadas no sistema cromatográfico (96/23/EC, 2002). O trifenilfosfato (5 µg L⁻¹) foi utilizado como padrão interno para monitorar a performance instrumental do método.

3.5 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA

As condições cromatográficas do sistema LC-MS/MS foram otimizadas avaliando de modo univariado parâmetros como: composição da fase móvel, volume de injeção de amostra, temperatura da coluna e vazão de bombeamento da fase móvel. Adicionalmente, parâmetros relacionados ao separador de massas e a fonte de ionização foram otimizados utilizando os softwares Optimizer 10.0 e Source

Optimizer 10.0 (Agilent Technologies, EUA), respectivamente. As transições no modo SRM para as etapas de quantificação (transição de maior intensidade) e identificação (transição de segunda maior intensidade) para cada um dos compostos foi avaliada.

3.6 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA POR LC-MS/MS

O método de preparo de amostra proposto neste trabalho foi desenvolvido a partir de pesquisas da literatura para determinação de glifosato e AMPA em amostras de água (potável e superficial), baseando-se na reação de derivatização com FMOC-Cl utilizada por Ronco e colaboradores (2016).

Testes iniciais foram realizados com a finalidade de avaliar as melhores condições de extração do glifosato e AMPA em amostras de água. Para as avaliações descritas nos itens (3.6.1, 3.6.2, 3.6.3 e 3.6.5) os procedimentos foram realizados em triplicata (n=3). Para as avaliações descritas nos itens (3.6.1 e 3.6.2) foram adicionados 2 mL de amostra de água em tubos de polipropileno de 15 mL e ajustado o pH a 9 com solução de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 40 mmol L⁻¹, juntamente com a amostra foram adicionados 2 mL de uma solução de FMOC-Cl (1 g L⁻¹ em acetonitrila). Posteriormente, a mistura foi mantida sob agitação em *overnight* e sob proteção da luz em uma mesa rotatória (54 rotações/min). Para a limpeza do extrato, foram adicionados 5 mL de diclorometano e a mistura foi agitada durante 3 min, em seguida, realizou-se a etapa de centrifugação (8 min, 3500 rpm). Por fim, o extrato foi filtrado e acondicionado em vials de vidro para análise cromatográfica. Os testes foram feitos em diferentes concentrações de fortificação de acordo com o propósito de cada teste.

3.6.1 Avaliação do tempo de derivatização

A avaliação do tempo de derivatização foi feita (sob agitação mecânica) em períodos de tempo de 0, 1, 15, 30, 60, 120, 300, 600, 720 e 900 min (n=3). A fortificação das alíquotas foi feita na concentração de 100 µg L⁻¹ e posteriormente diluídas 10 vezes, a fim de obter extratos em concentração contida na curva de calibração (10 µg L⁻¹). Os sinais obtidos para GLI-FMOC e AMPA-FMOC foram monitorados para os diferentes tempos de derivatização.

3.6.2 Avaliação do preparo da curva analítica

Dois modos de preparo da curva analítica foram avaliados: 1) preparar os pontos da curva individualmente (curva derivatizada) e 2) derivatizar um padrão de alta concentração e preparar a curva a partir de suas diluições em água potável (curva diluída) (MARTINS et al., 2016). Para ambos os testes foram feitas curvas analíticas de 0,5 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=3).

3.6.3 Avaliação do efeito do solvente de limpeza

No presente trabalho, diclorometano e acetato de etila foram avaliados como solventes de limpeza. Foram utilizados 2 mL de FMOC-Cl e 5 mL dos solventes de limpeza (n=3). A eficiência da remoção dos co-extrativos foi avaliada comparando a varredura do espectro de massa (modo de varredura completa) para os extratos limpos com os solventes e o extrato sem limpeza. Adicionalmente, foi realizada a determinação da massa de resíduo restante nos solventes de limpeza para escolher o solvente de limpeza mais eficaz. Assim, após a limpeza, 4 mL dos solventes de limpeza foram transferidos para frascos de vidro e evaporados sob uma corrente de nitrogênio, sendo estimada a massa de resíduos sólidos.

3.6.4 Avaliação de planejamento fatorial 2² para derivatização de glifosato e AMPA em água e posterior determinação por LC-MS/MS

A fim de obter a condição ideal para o método proposto, foram avaliados parâmetros relacionados às etapas de derivatização e limpeza. Para isso, foi utilizado um planejamento fatorial do tipo estrela contendo duas variáveis, o volume de FMOC-Cl (0,59; 1; 2; 3 e 3,41 mL) e de acetato de etila (3,59; 4; 5; 6 e 6,41 mL). No total, dezenove experimentos foram realizados com diferentes combinações de volume de FMOC-Cl e acetato de etila, sendo realizados em duplicata, com exceção do ponto central, que foi realizado em triplicata (Tabela 7, Tabela 8 e Tabela 9). Além disso, todos os experimentos foram feitos de forma aleatória, fortificados na concentração de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos.

Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental codificada

Experimento	X₁	X₂
1	-1	-1
2	-1	-1
3	1	-1
4	1	-1
5	-1	1
6	-1	1
7	1	1
8	1	1
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	-1,414	0
13	-1,414	0
14	1,414	0
15	1,414	0
16	0	-1,414
17	0	-1,414
18	0	1,414
19	0	1,414

Fonte: FERREIRA et al., 2007.

Tabela 8 - Matriz do planejamento experimental decodificada

Código	Volume de FMOC-Cl (mL)	Volume de acetato de etila (mL)
-1,414	0,59	3,59
-1	1,00	4,00
0	2,00	5,00
1	3,00	6,00
1,414	3,41	6,41

Fonte: O autor, 2020.

Tabela 9 - Condições experimentais avaliadas pelo planejamento fatorial 2²

Experimento	Volume de FMOC-Cl (mL)	Volume de acetato de etila (mL)
1	1,00	4,00
2	1,00	4,00
3	3,00	4,00
4	3,00	4,00
5	1,00	6,00
6	1,00	6,00
7	3,00	6,00
8	3,00	6,00
9	2,00	5,00
10	2,00	5,00
11	2,00	5,00
12	0,59	5,00
13	0,59	5,00
14	3,41	5,00
15	3,41	5,00
16	2,00	3,59
17	2,00	3,59
18	2,00	6,41
19	2,00	6,41

Fonte: O autor, 2020.

3.6.5 Avaliação da estabilidade dos analitos

As estabilidades do glifosato e AMPA nas soluções derivatizadas foram avaliadas. Para tal, diferentes alíquotas foram fortificadas com volumes equivalentes a 5 µg L⁻¹ (n=3), sendo mantidas em temperatura ambiente (15 a 25 °C) e sob refrigeração (<10 °C) durante 28 dias. GLI-FMOC e AMPA-FMOC foram determinados nestas alíquotas em períodos de tempo de 0, 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias.

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA EMPREGANDO REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA POR LC-MS/MS

O método de derivatização otimizado neste trabalho para posterior determinação de resíduos de glifosato e AMPA em água por LC-MS/MS foi validado para água potável e água superficial. Os parâmetros avaliados e validados foram a seletividade, a linearidade, os limites de detecção e de quantificação, a exatidão e a

precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e o efeito matriz (INMETRO, 2018; EUROPEAN COMMISSION, 2019). Os parâmetros de validação avaliados do desenvolvimento do método analítico proposto estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros de validação utilizados para o método analítico proposto neste estudo

Parâmetro	Definição	Aplicação
Seletividade	Distinção entre as respostas do analito	Extração da matriz isenta dos analitos (matriz branco)
Linearidade	Correlação entre resposta analítica e concentração	Curva analítica ($y = ax + b$) Faixa linear para 6 níveis, de 0,5 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ $n=3$, $\text{RSD} \leq 20\%$
LOQ	Menor nível em que o analito pode ser quantificado com exatidão e precisão aceitável em um método validado	Relação sinal ruído $S/N > 10$ calculado pelo software do equipamento. Ensaio de fortificação no nível pretendido, $n=6$
LOD	A menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não quantificada	$\text{LOD} = \frac{\text{LOQ}}{3,33}$
Exatidão	Grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro	Ensaio de fortificação em extrato branco em 4 níveis de concentração (0,5; 1; 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) $n=6$, $\text{RSD} \leq 20\%$
Precisão e Precisão intermediária	Dispersão dos resultados entre ensaios diferentes, repetidos de uma mesma amostra	Em termos de repetitividade: RSD para as 6 replicatas Em termos de reprodutibilidade: execução em dias diferentes
Efeito matriz	Alterações na resposta analítica em função dos componentes da matriz	Comparação entre as inclinações das curvas preparadas em água potável (curva no solvente) e em água superficial (curva na matriz) $\text{EM}\% = \frac{a_{\text{matriz}} - a_{\text{solvente}}}{a_{\text{matriz}}} * 100$

Fonte: INMETRO, 2018; EUROPEAN COMMISSION, 2019.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA

Anteriormente a determinação de glifosato e AMPA em amostras de água, parâmetros cromatográficos como volume de injeção, composição e vazão de fase móvel foram otimizados. Além disso, parâmetros relacionados ao espectrômetro de massas em série, como condições operacionais da fonte de íons, íons precursores e íons produto, além da tensão aplicada ao fragmentador, energia de colisão adequada para a formação dos íons produto também foram otimizados. Assim, as condições ótimas para a determinação de glifosato e AMPA a partir do sistema LC-MS/MS foram fixadas para os estudos desenvolvidos ao longo deste trabalho e estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Condições instrumentais do sistema LC-MS/MS empregadas durante o estudo

Parâmetro	Condição
Temperatura da coluna	35 (°C)
Temperatura do amostrador	4 (°C)
Voltagem do capilar	4,5 (kV)
Temperatura de dessolvatação	225 (°C)
Vazão do gás de dessolvatação (N ₂)	8 (L min ⁻¹)
Temperatura do <i>sheath gas</i>	350 (°C)
Vazão do <i>sheath gas</i> (N ₂)	11 (L min ⁻¹)
Pressão do gás nebulizador	45 (psi)
Tensão do <i>nozzle</i>	1000 (V)
Volume de injeção	3 (µL)
Tempo de permanência	200 (ms)
Tempo de aquisição	1,301 (ms/ciclo)

Fonte: O autor, 2020.

A composição da fase móvel utilizada foi adaptada de Ronco et al., (2016). A fase móvel empregada consistiu em: A) solução aquosa contendo formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ e B) metanol contendo formiato de amônio 5 mmol L⁻¹, conforme gradiente descrito na Tabela 12. O tempo total de corrida foi de 8,3 min.

Tabela 12 - Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de resíduos de glifosato e AMPA em água no sistema LC-MS/MS

Tempo (min)	%A	%B
Inicial	95	5
5	0	100
5,5	0	100
7,1	95	5

Fonte: O autor, 2020.

*Vazão constante de 0,5 mL min⁻¹.

As condições instrumentais de aquisição de sinal para os derivados de FMOC são mostradas na Tabela 13.

Tabela 13 - Transições de monitoramento de reação selecionada (SRM) usadas para os analitos derivatizados e padrão interno

Compostos	t _R (min)	Transições SRM, m/z (CE, eV)		Fragmentador (V)	Tempo de permanência (s)	Razão de íons (%)
		Quantificação	Identificação			
FMOC-glifosato	3,800	390 > 168 (9)	390 > 150 (21)	110	0,2	28
FMOC-AMPA	5,031	332 > 110 (13)	332 > 136 (17)	80	0,2	47
Trifenilfosfato (PI)	6,091	327 > 152 (29)	327 > 215 (21)	80	0,2	29

Fonte: O autor, 2020.

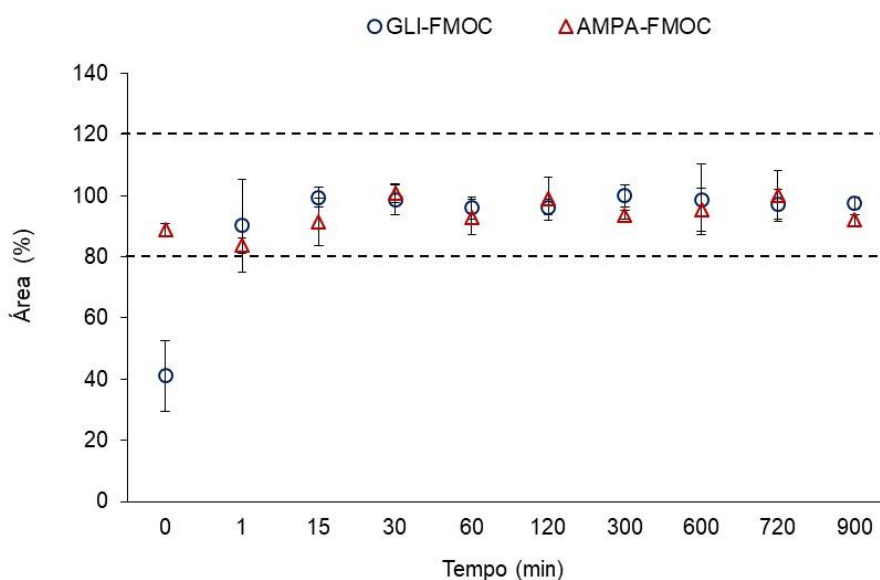
CE: energia de colisão, PI: padrão interno

4.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA POR LC-MS/MS

4.2.1 Avaliação do tempo de derivatização

A análise apropriada do glifosato e AMPA, empregando a técnica de derivatização com FMOC-Cl, depende substancialmente do tempo necessário para a conversão completa de glifosato e AMPA em suas formas derivatizadas (GLI-FMOC e AMPA-FMOC), ou seja, é necessário garantir a completa substituição de cloro na estrutura do FMOC-Cl pelo glifosato e AMPA (BERNAL et al., 2012). Em geral, estudos na literatura relatam tempos de derivatização entre 4-24h, não havendo tempo considerado padrão para a derivatização de glifosato e AMPA usando o FMOC-Cl (PERUZZO; PORTA; RONCO, 2008; NEDELKOSKA; LOW, 2004). Sendo assim, o tempo necessário para a derivatização de glifosato e AMPA em água foi avaliado monitorando a resposta percentual dos analitos para cada condição empregada (0 a 900 min). Os resultados são mostrados na Figura 8.

Figura 8 - Avaliação da resposta para GLI-FMOC e AMPA-FMOC em função do tempo de derivatização (n=3)



Fonte: O autor, 2020.

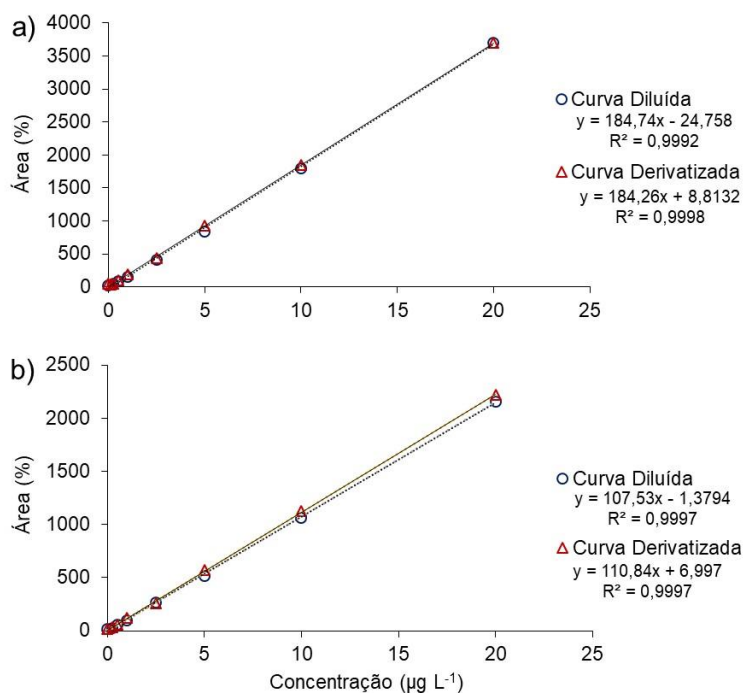
Com base nos resultados obtidos, é possível observar que, para tempos de 1 a 900 min de derivatização, a variação percentual na área não foi significativa para os dois analitos. No entanto, com a derivatização dos analitos por 1 min, não houve separação completa das fases durante a etapa de limpeza. Além disso, o desvio padrão para os tempos de 1 e 15 min foi alto quando comparado aos demais. Assim, o tempo de 30 min foi adotado como a condição ideal e utilizado para os demais estudos.

4.2.2 Avaliação do preparo da curva analítica

Dois modos de preparação da curva analítica foram avaliados: 1) preparar os pontos da curva individualmente (curva derivatizada) e 2) derivatizar um padrão de alta concentração e preparar a curva a partir de suas diluições em água potável (curva diluída). A curva diluída a partir de um ponto de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ derivatizado, procedimento 2, foi proposta com o objetivo de minimizar as etapas de preparo de amostra, evitando a derivatização de todos os pontos da curva para cada conjunto de amostras analisadas, viabilizando sua aplicação para análises de rotina. As duas curvas foram feitas em concentrações de 0,5 a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$), e comparadas com base em suas inclinações. Este procedimento foi realizado para observar possíveis influências na resposta do sinal para GLI-FMOC e AMPA-FMOC, pois é esperado que a concentração de co-extratos para o modo de preparação número 1 seja significativamente maior. Os resultados são mostrados na Figura 9.

Para os dois analitos, a diferença de inclinação entre os dois modos de preparo da curva analítica foi inferior a 5% (teste t-Student nível de confiança de 95%), indicando que não há supressão ou aumento do sinal para o modo de preparo 1 (inclinação igual a 184,26 para GLI-FMOC e 110,84 para AMPA-FMOC) em relação ao modo 2 (inclinação igual a 184,74 para GLI-FMOC e 107,53 para AMPA-FMOC). Assim, para os demais estudos, as curvas analíticas foram preparadas diluindo um ponto derivatizado de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (procedimento 2).

Figura 9 - Curvas analíticas para a) GLI-FMOC e b) AMPA-FMOC, derivatizando os pontos individualmente e derivatizando um padrão de 100 µg L⁻¹ para diluição em água da torneira

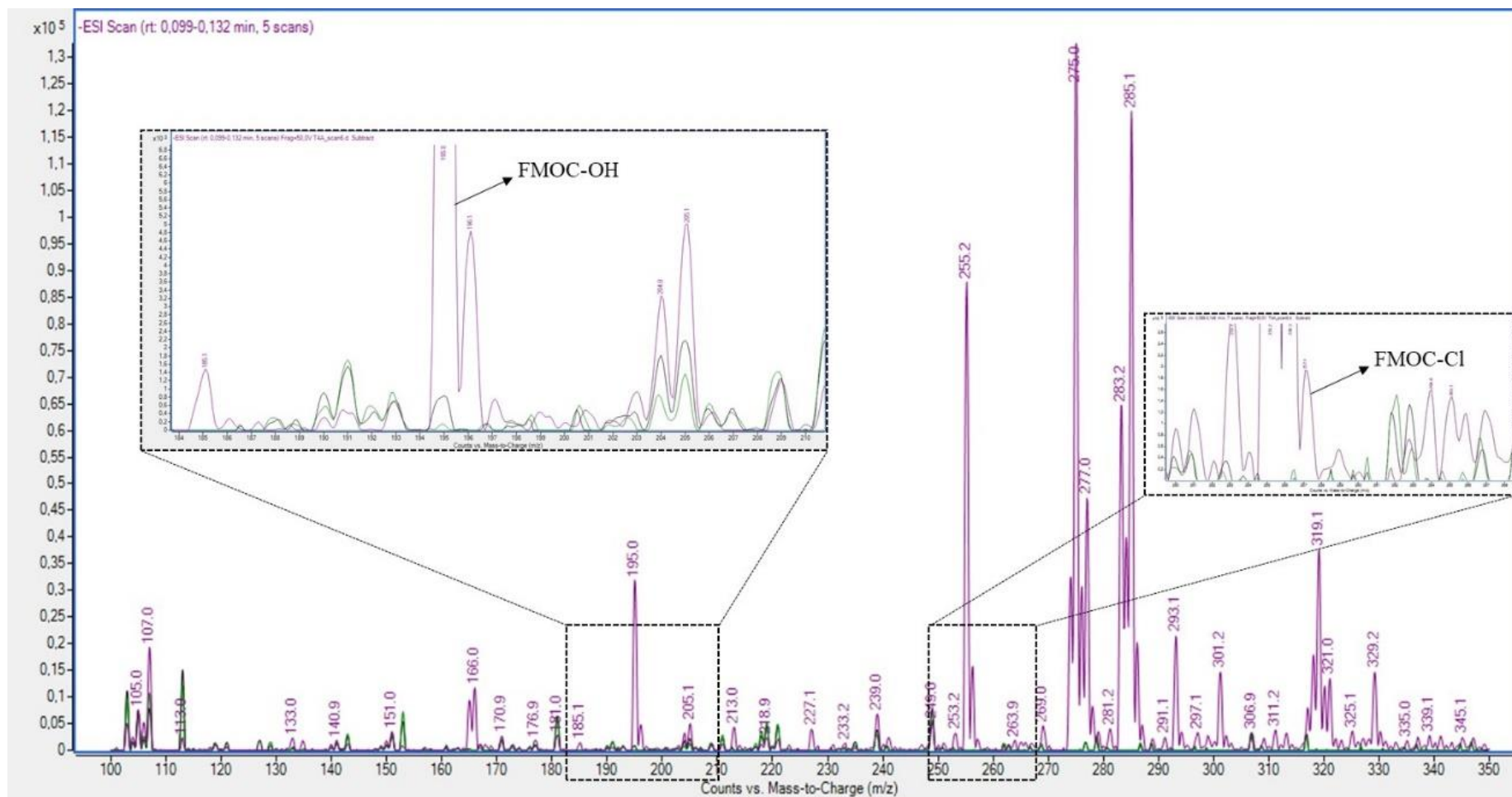


Fonte: O autor, 2020.

4.2.3 Avaliação do efeito do solvente de limpeza

Para garantir o melhor desempenho instrumental é necessário remover os interferentes provenientes da derivatização com FMOC-Cl (FMOC-Cl residual e FMOC-OH), sendo comumente empregada para este fim, a técnica de extração líquido-líquido após a derivatização. Os solventes orgânicos mais utilizados na etapa de limpeza são o diclorometano (RONCO et al., 2016; STEINBORN et al., 2016) e o acetato de etila (CATRINCK et al., 2014). A eficiência de remoção dos co-extrativos foi avaliada comparando a varredura do espectro de massas (modo de varredura completa) para os extratos limpos com os solventes e o extrato sem limpeza, conforme mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Varredura de espectro de massa (modo negativo de varredura completa, 100 até 350 m/z, fragmentador fixado em 50 V, volume de injeção 10 μ L) para extratos sem limpeza (■), limpeza com diclorometano (■) e limpeza com acetato de etila (■)

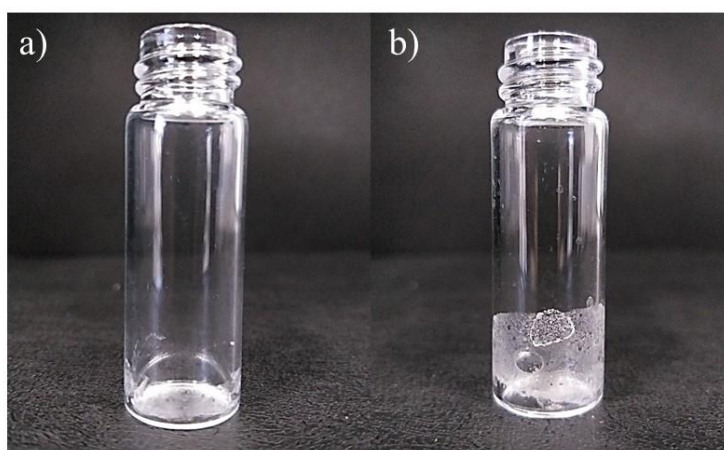


Fonte: O autor, 2020.

É possível observar uma diferença significativa entre a intensidade do espectro de varredura do extrato sem e com a limpeza. Quando a etapa de limpeza é usada, a ampliação da imagem de varredura completa mostra uma diminuição no sinal para os íons 195 e 257,1 (de FMOC-OH e FMOC-Cl, respectivamente). Esse fato indica uma remoção eficiente do FMOC-Cl e de seu produto hidrolisado (FMOC-OH) com o uso de ambos os solventes na etapa de limpeza.

Como nenhuma diferença significativa entre os solventes de limpeza foi observada para os resultados de varredura completa, foi realizada a determinação da massa residual nos solventes de limpeza (n=3) para escolher o mais eficaz. As massas de resíduos sólidos obtidas para limpeza com diclorometano e acetato de etila foram de 0,25 e 1,3 mg, respectivamente. O maior valor para a massa de resíduos sólidos empregando limpeza com o acetato de etila indica uma maior remoção de coextrativos em comparação ao uso de diclorometano. Além disso, o aspecto visual desses resíduos sólidos corrobora com os resultados gravimétricos obtidos, como visto na Figura 11. Assim, os demais experimentos foram realizados usando acetato de etila como solvente de limpeza.

Figura 11 - Comparação visual do resíduo sólido remanescente da limpeza com a) diclorometano e b) acetato de etila (n=3)



Fonte: O autor, 2020.

A eficiência da etapa de limpeza impacta diretamente na etapa de determinação quando utilizado o sistema de espectrometria de massas, uma vez que a presença de coextrativos diminui a sensibilidade instrumental, acarretando na necessidade de maior frequência de limpeza do equipamento, e consequente

aumentando nas despesas relacionadas a análise, impactando negativamente no desenvolvimento do trabalho (SARGENT, 2013).

4.2.4 Avaliação de planejamento fatorial 2² para derivatização de glifosato e AMPA em água e posterior determinação por LC-MS/MS

A razão estequiométrica entre o analito e o reagente derivatizante afeta a formação do produto derivatizado. Estudos anteriores indicam que uma proporção de 1:1 é ineficaz para a reação, sendo necessário um excesso significativo de FMOC-Cl para garantir a completa conversão dos produtos (GHANEM et al., 2007). A fim de obter a condição ideal para o método proposto, foram avaliados parâmetros relacionados às etapas de derivatização e limpeza utilizando o planejamento fatorial 2². A Tabela 14 apresenta as variáveis codificadas e decodificadas, juntamente com a resposta dos analitos para as diferentes condições experimentais realizadas.

Tabela 14 – Resultados do planejamento fatorial 2² com pontos centrais e axiais, com triplicata no ponto central e duplicata nos outros testes

Experimento	Variáveis codificadas		Variáveis decodificadas		Área GLI-FMOC	Área AMPA-FMOC
	x ₁	x ₂	Volume de FMOC-Cl (mL)	Volume de acetato de etila (mL)	Média±RSD (%)	Média±RSD (%)
1 e 2	-1	-1	1,00	4,00	873±5	708±1
3 e 4	1	-1	3,00	4,00	852±22	677±10
5 e 6	-1	1	1,00	6,00	769±6	717±3
7 e 8	1	1	3,00	6,00	955±15	810±8
9, 10 e 11	0	0	2,00	5,00	746±19	695±17
12 e 13	-1,414	0	0,59	5,00	711±15	673±3
14 e 15	1,414	0	3,41	5,00	943±8	747±5
16 e 17	0	-1,414	2,00	3,59	729±17	703±4
18 e 19	0	1,414	2,00	6,41	703±16	678±9

Fonte: O autor, 2020.

Os resultados da área integrada para GLI-FMOC e AMPA-FMOC foram compilados e aplicados no *software* STATISTICA 7.0. Os valores de p (significância estatística da regressão do modelo) para GLI-FMOC e AMPA-FMOC foram 0,1699 e 0,3212 usando o modelo linear. Utilizando o modelo quadrático, os valores de p para

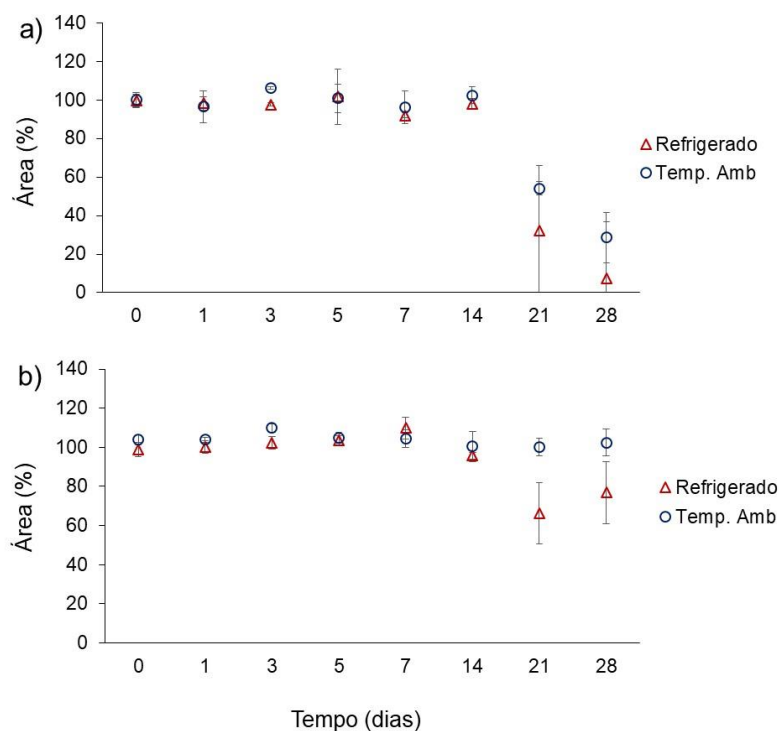
GLI-FMOC e AMPA-FMOC também foram maiores que 0,05, sendo 0,2066 e 0,5089, respectivamente. Assim, os modelos propostos para o presente trabalho não apresentaram ajuste. Apesar disso, é possível observar um comportamento padrão para os resultados obtidos. A resposta da área para ambos os analitos foi significativamente dependente do volume de FMOC-Cl usado, enquanto o volume de acetato de etila influenciou em menor proporção. Os experimentos 7 e 8 mostraram a resposta mais alta e RSDs $\leq 15\%$ para ambos os analitos. Assim, o método proposto no presente trabalho utilizou 3 mL de FMOC-Cl e 6 mL de acetato de etila.

4.2.5 Avaliação da estabilidade dos analitos

Conhecer a estabilidade química dos analitos é fundamental para garantir a exatidão na determinação dos compostos. Uma vez derivatizados, o glifosato e o AMPA podem ter influência do pH, temperatura, dentre outros fatores na sua estabilidade (COUTINHO; MAZO, 2005). Sendo assim, a estabilidade do glifosato e AMPA nas soluções derivatizadas foram avaliadas em períodos de tempo de 0, 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 28 dias nas soluções mantidas em temperatura ambiente e sob refrigeração ($< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$). Os resultados obtidos são mostrados na Figura 12.

Com base nos resultados obtidos, é possível observar que o GLI-FMOC permaneceu estável em solução por até 14 dias, quando mantido em temperatura ambiente e refrigerado. No 21^o dia de monitoramento, foi observada uma diminuição de cerca de 40% para os extratos mantidos à temperatura ambiente e 60% para os extratos mantidos sob refrigeração. O sinal do AMPA-FMOC permaneceu constante durante os 28 dias para os extratos mantidos em temperatura ambiente; no entanto, no 21^o dia, houve uma diminuição de cerca de 30% do sinal quando mantido sob refrigeração. Assim, pode-se dizer que os analitos permaneceram estáveis em ambas as formas de armazenamento por até 14 dias. Esta informação é relevante, pois é possível armazenar padrões derivatizados sem a necessidade de refrigeração e utilizá-los por até duas semanas.

Figura 12 - Respostas percentuais obtidas para solução padrão derivatizada de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de a) GLI-FMOC e b) AMPA-FMOC (n=3), mantidas à temperatura ambiente (15-25 °C) e refrigerada (< 10 °C)



Fonte: O autor, 2020.

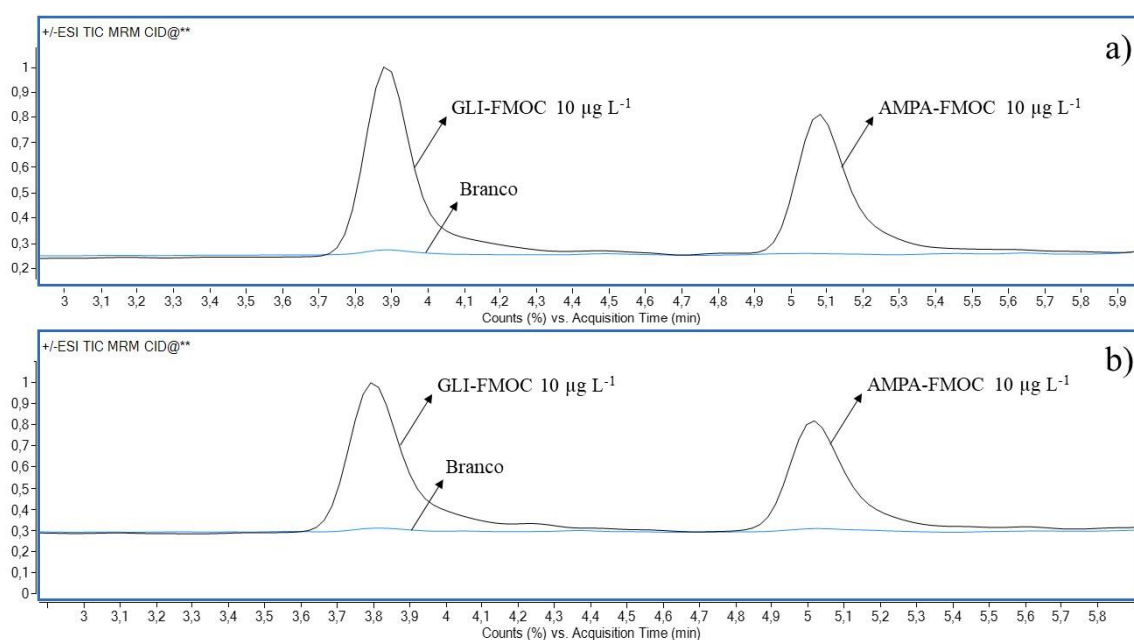
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA EMPREGANDO A DERIVATIZAÇÃO PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA

A validação do método de derivatização proposto neste estudo foi feita com água potável e água superficial. A análise cromatográfica foi feita por sistema LC-MS/MS. As soluções utilizadas para avaliar a linearidade foram preparadas de maneira independente em água potável e água superficial. Foram avaliados e validados parâmetros como seletividade, linearidade, os limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e efeito matriz. O extrato de água em branco foi analisado e confirmou que não foram encontrados glifosato e AMPA.

4.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi assegurada pela análise no sistema LC-MS/MS e comparação cromatográfica da matriz em branco e da matriz em branco fortificada na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Como apresentado na Figura 13, não foram observados picos de interferência nas janelas de retenção para os íons analisados derivatizados, mesmo para a água superficial, que possui material orgânico em sua composição. Além do tempo de retenção, a seletividade do método também foi garantida com base no monitoramento dos íons de quantificação e identificação selecionados para os analitos.

Figura 13 - Cromatogramas do branco e do branco fortificado na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para o GLI-FMOC e AMPA-FMOC obtidos no modo SRM por LC-MS/MS em a) água potável e b) água superficial



Fonte: O autor, 2020.

4.3.2 Linearidade e curva analítica

Assegurou-se a linearidade do método proposto pela utilização da regressão linear para seis níveis de concentração ($0,5$; 1 ; $2,5$; 5 ; 10 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$) das curvas preparadas em água potável e água superficial ($n=3$), além da obtenção do coeficiente

de determinação (r^2). Foi possível obter uma faixa linear de 0,5 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ com $r^2 \geq 0,99$ para GLI-FMOC e AMPA-FMOC por LC-MS/MS para os dois tipos de água. Os resíduos se apresentaram abaixo de 20% para todos os níveis de concentração.

4.3.3 Limites de quantificação (LOQ) e de detecção (LOD)

Neste trabalho, o limite de quantificação foi considerado como sendo o menor nível de fortificação que pôde ser validado com precisão e exatidão aceitáveis (recuperações entre 70-120% e $\text{RSD} \leq 20\%$) e com relação sinal/ruído (S/N) maior que 10 (ICH, 2005; EUROPEAN COMMISSION, 2019). O LOQ do método por LC-MS/MS para o glifosato e o AMPA foi de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. O limite de detecção foi calculado pela divisão do valor do LOQ por 3,33, resultando em um LOD de 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os dois analitos.

4.3.4 Exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

A exatidão e precisão do método foram avaliadas pela realização de ensaios de recuperação em amostras branco em 4 níveis de fortificação (0,5; 1; 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$), cada nível com 6 réplicas. Os critérios de aceitação foram baseados na recuperação entre 70 e 120% com $\text{RSD} \leq 20\%$ (EUROPEAN COMMISSION, 2019). Os ensaios de validação foram repetidos em dias diferentes para avaliar a precisão intermediária do método para água potável e água superficial. O uso do padrão interno trifenilfosfato foi feito apenas com a finalidade de verificação do sinal analítico proveniente do instrumento, não sendo necessário o seu uso para fins de correção na etapa de quantificação. A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos para os testes de exatidão (recuperação) e precisão (RSD).

Os testes de exatidão e precisão proporcionaram resultados satisfatórios para os compostos avaliados, uma vez que as recuperações variaram de 104 a 119%, com $\text{RSD} \leq 11\%$ para água superficial e 87 a 114%, com $\text{RSD} \leq 17\%$ para água potável. Os resultados da precisão intermediária foram satisfatórios, pois os valores de recuperação permaneceram entre 79 e 119% com $\text{RSD} \leq 19\%$ para os dois compostos nos dois tipos de água.

4.3.5 Efeito matriz

O efeito matriz (EM%) foi calculado a partir das inclinações das curvas de calibração da água potável e água superficial (n=3). O efeito matriz para LC-MS/MS apresentou aumento e supressão do sinal analítico $< \pm 20\%$ para glifosato e AMPA, sendo obtidos valores menores que 8% para o GLY-FMOC e 10% para o AMPA-FMOC. Sendo assim, as curvas analíticas em água potável e água superficial se apresentaram adequadas para a determinação de glifosato e AMPA em amostras de água. Novamente, o padrão interno trifenilfosfato foi usado apenas para a verificação do sinal analítico instrumental, não sendo necessário o seu uso para fins de correção na etapa de quantificação.

Tabela 15 - Resultados dos testes de exatidão (recuperação) e precisão (RSD) usando amostras branco de água potável e superficial fortificadas

Compostos	EM (%)	LODm ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQm ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2 torneira	r^2 rio	Água potável				Água superficial			
						Níveis de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
						0,5	1	5	10	0,5	1	5	10
Rec \pm RSD (%), Repetibilidade*						Rec \pm RSD (%), Repetibilidade*							
Glifosato	7	0,15	0,5	0,9979	0,9979	105 \pm 17	97 \pm 14	99 \pm 7	106 \pm 5	118 \pm 10	110 \pm 7	112 \pm 6	104 \pm 8
AMPA	10	0,15	0,5	0,9997	0,9995	96 \pm 12	98 \pm 14	114 \pm 8	87 \pm 3	117 \pm 3	115 \pm 4	119 \pm 6	119 \pm 11
						Precisão intermediária*				Precisão intermediária*			
Glifosato	8	0,15	0,5	0,9971	0,9981	79 \pm 17	107 \pm 10	84 \pm 9	86 \pm 12	96 \pm 13	115 \pm 8	116 \pm 14	110 \pm 7
AMPA	-6	0,15	0,5	0,9994	0,9986	112 \pm 19	93 \pm 14	106 \pm 16	105 \pm 10	118 \pm 11	115 \pm 7	119 \pm 14	116 \pm 7

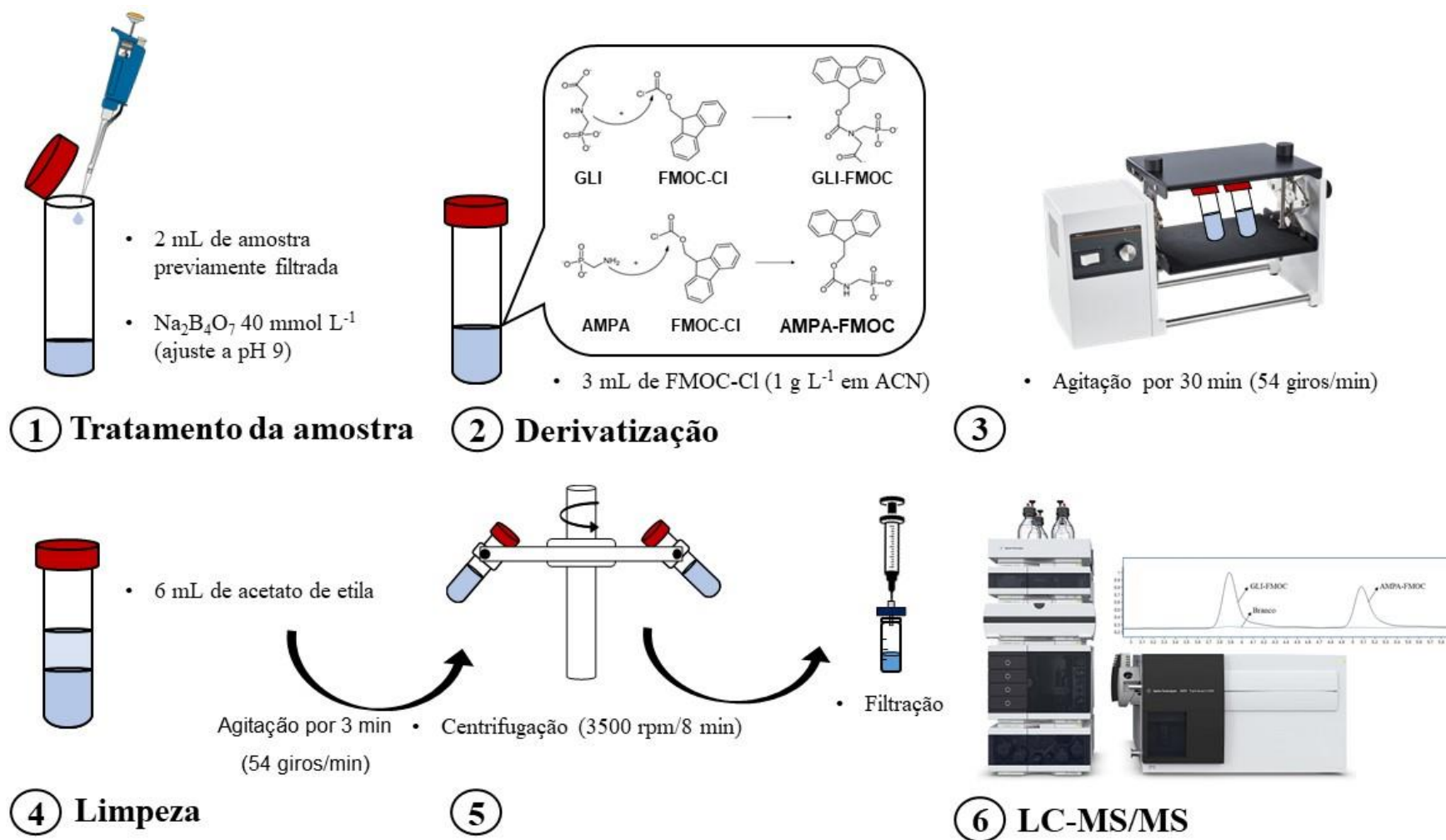
Fonte: O autor, 2020.

*n=6, EM: efeito matriz, LODm: limite de detecção do método, LOQm: limite de quantificação do método, Rec: recuperação, RSD: desvio padrão relativo

4.3.6 Método de derivatização validado neste estudo

O procedimento de derivatização validado consistiu na adição de 2 mL de amostra de água filtrada com filtro de seringa de nylon (porosidade de 0,45 μm) em tubo de polipropileno de 15 mL e ajustado o pH a 9 com solução de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (40 mmol L^{-1} em água ultrapura). 3 mL de FMOC-Cl (1 g L^{-1} em ACN) foi adicionado e a mistura foi mantida sob agitação por 30 min e sob proteção da luz em uma mesa rotatória (54 rotações/min). Os extratos foram limpos adicionando 6 mL de acetato de etila e a mistura foi agitada durante 3 min, em seguida, realizou-se a etapa de centrifugação (8 min, 3500 rpm). Por fim, os extratos foram filtrados com um filtro de seringa de nylon (porosidade de 0,22 μm) e acondicionados em vials de vidro para análise cromatográfica. O procedimento é apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Fluxograma do procedimento de derivatização de glifosato e AMPA com FMOC-Cl em água validado neste trabalho



4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS

O método proposto foi aplicado em 38 amostras de água superficial coletadas em diferentes cidades dos estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso (Brasil). As amostras foram coletadas e armazenadas em tubos de polipropileno, sendo mantidas sob refrigeração (entre 4 e 10 °C). O pH das amostras foi ajustado para 9, com solução de 40 mmol L⁻¹ de Na₂B₄O₇ para o método de derivatização. Quatro amostras apresentaram resíduos de glifosato (A1, A4, A5 e A6; 0,547 – 0,646 µg L⁻¹). A amostra A1 também apresentou resíduos de AMPA (0,679 µg L⁻¹). A Tabela 16 mostra os valores de concentração encontrados para as amostras analisadas.

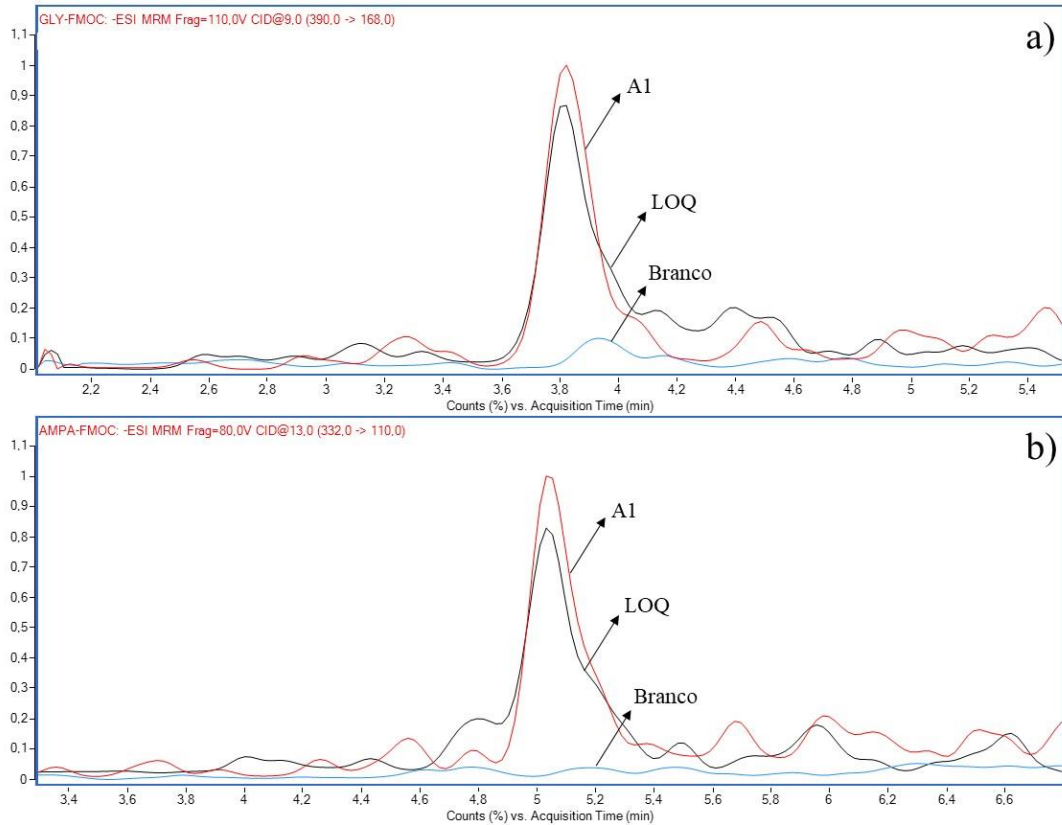
Tabela 16 - Concentrações dos compostos avaliados encontradas em amostras

Compostos	Identificação das amostras			
	A1	A4	A5	A6
Glifosato	0,588 µg L ⁻¹	0,547 µg L ⁻¹	0,575 µg L ⁻¹	0,646 µg L ⁻¹
AMPA	0,679 µg L ⁻¹	<LOQ	<LOQ	n.d.

Fonte: O autor, 2020.
n.d.: não detectado.

Os valores de glifosato e AMPA encontrados nas amostras estão cerca de 750 vezes abaixo da concentração máxima permitida no Brasil (BRASIL, 2017), contudo, tais concentrações expõem o problema da contaminação ambiental de glifosato e AMPA em águas superficiais. A Figura 14 apresenta os cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para GLI-FMOC e AMPA-FMOC obtidos para a amostra A1, LOQ (0,5 µg L⁻¹) e da amostra branco para água superficial. O glifosato já foi detectado anteriormente em amostras de água brasileira (CALHEIROS, 2010), e na Argentina em águas próximas a localidades de atividade agrícola intensa (RONCO et al., 2016).

Figura 15 - Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS de a) GLI-FMOC e b) AMPA-FMOC a partir de uma amostra positiva de água (A1) com o correspondente LOQ e uma matriz em branco da água superficial



Fonte: O autor, 2020.

Todas as amostras quantificáveis são provenientes do Mato Grosso, o que pode estar relacionado ao maior território utilizado para a agricultura e, conseqüentemente, maior consumo de glifosato pelo estado do Mato Grosso (33.638,86 ton), quando comparado ao Rio Grande do Sul (26.229,47 ton) (IBAMA, 2019).

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve a otimização e aplicação de um método para a determinação de glifosato e AMPA por LC-MS/MS em diferentes classes de água a partir de sua derivação com FMOC-Cl. Este estudo investigou parâmetros essenciais para a obtenção de resultados analíticos confiáveis, como tempo necessário para a derivatização de glifosato e AMPA e composição do solvente de limpeza. Ainda, foi aplicado um planejamento fatorial 2^2 para a otimização do volume da solução FMOC-Cl 1 g L^{-1} e volume do solvente de limpeza. As condições ótimas foram 30 min de derivatização (sob agitação), utilizando 3 ml de solução derivatizante FMOC-Cl e 6 ml de acetato de etila na etapa de limpeza.

Além disso, foi possível construir as curvas de calibração a partir de um ponto derivatizado de uma concentração de $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e diluído, o qual se mantém estável e pode ser usado com segurança por duas semanas. Tais características levam a diminuição do erro na construção da curva analítica, além de minimizar as etapas do procedimento, permitindo a análise de um grande número de amostras em um curto período de tempo. A análise por LC-MS/MS mostrou alta sensibilidade e seletividade, o que permitiu a determinação simultânea de glifosato e AMPA em menos de 8 minutos.

Após otimizado, o método foi validado com relação a seletividade, linearidade, limites de quantificação e detecção, exatidão, precisão, precisão intermediária e efeito matriz. A recuperação para ambos os analitos foi aceitável, encontrando-se entre 70 e 120%, com $\text{RSD} \leq 20\%$, com valor de LOQ de $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para glifosato e AMPA. Por fim, o método validado foi aplicado em 38 amostras de água dos estados do Mato Grosso e do Rio Grande do Sul, sendo quatro amostras positivas para glifosato e uma para AMPA. Finalmente, o método mostrou-se adequado para a proposto do trabalho, apresentando-se simples, rápido e eficiente e pode ser aplicado para análises de rotina.

5.1 DIREÇÕES FUTURAS

A execução do presente trabalho possibilitou a percepção de algumas avaliações, as quais podem agregar em trabalhos futuros, como:

- Avaliação da formação de complexos de glifosato e AMPA com metais em amostras de água e o efeito na derivatização com solução de FMOC-Cl; e
- Avaliação da derivatização de glifosato e AMPA residual presente no solo e sedimento suspenso nas amostras de água e retidos na etapa de filtração, além de outras amostras vegetais e de alimentos.

REFERÊNCIAS

96/23/EC. Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 12 ago. 2002.

ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2017.

AGRICULTURA. **Brasil é grande potência na agricultura e no meio ambiente, afirma ministra**. Brasil, 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/brasil-e-grande-potencia-na-agricultura-e-no-meio-ambiente-afirma-ministra>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil**: controle social e interesses corporativos. 1. ed. São Paulo: Annablume, 2002, 188 p.

AMARANTE JUNIOR, O. P. de et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589 e 591, 2002.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Anvisa aprova novo marco regulatório para agrotóxicos**. Brasil: Regulamentação, 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 06 jan. 2020.

APARICIO, V. C. et al. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 1866-1873, 9 jul 2013.

BERNAL, J. et al. Development and application of a liquid chromatography-mass spectrometry method to evaluate the glyphosate and aminomethylphosphonic acid dissipation in maize plants after foliar treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 16, p. 4017, 13 abr. 2012.

BLAU, K.; HALKET, J. M. **Handbook of Derivatives for Chromatography**. 2. ed. New York: Wiley, 1993. 392 p.

BOHN, T. et al. Compositional differences in soybeans on the market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. **Food Chemistry**, v. 153, p. 207-215, 15 jun 2014.

BORGGAARD, O. K.; GIMSING, A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 450, 2008.

BOTERO-COY, A. M. et al. Direct liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 157-165, 2013.

BRASIL. Decreto n. 4074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989 (lei federal dos agrotóxicos). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 jan. 2002. Disponível em: <<http://presrepublica.jusbrasil.com.br/legislacao/100030/decreto-4074-02>>. Acesso em: 14 dez. 2019.

BRASIL. Anexo XX da Portaria de consolidação n. 5 do Ministério da Saúde de 2017. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017.

BURIGO, A. **Impacto dos agrotóxicos na alimentação, saúde e meio ambiente**: apostila. Rio de Janeiro: Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016. 30 p.

BURSIAN, S. J.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 167, n. 1, p. 35, 1 jan. 2000.

CALHEIROS, Debora Fernandes; FERRACINI, Vera Lucia; QUEIROZ, Sonia Claudia do N. de. Contaminação por agrotóxicos nas águas da bacia do Alto Paraguai. In: SEMINÁRIO DE AGROECOLOGIA DE MATO GROSSO DO SUL, 3; ENCONTRO DE PRODUTORES AGROECOLÓGICOS DE MS, 2010, Corumbá, MS. **Anais...** Corumbá/MS: Embrapa Pantanal, 2010.

CARRETTA, L. et al. A new rapid procedure for simultaneous determination of glyphosate and AMPA in water at sub $\mu\text{g/L}$ level. **Journal of Chromatography A**, v. 1600, p. 65-72, 18 abr. 2019.

CATRINCK, T. C. P. G. et al. A Simple and Efficient Method for Derivatization of Glyphosate and AMPA Using 9-Fluorenylmethyl Chloroformate and Spectrometric Analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 1194-1199, 2014.

CHEN, M. X. et al. 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, 3 dez 2012.

CHEN, Z. et al. 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, n. 3, p. 852-856, 15 jan. 2009.

CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO 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 União**, Brasília, DF, 17 mar. 2005.

COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. **Nothern Clinics of Istanbul**. v.3, n. 2, p. 156-160, 11 nov. 2016.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1038 e 1041, 2005.

DE LLASERA, M. P. G. et al. Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, n. 1-2, p. 139–146, 14 ago. 2005.

DEMONTÉ, L. D. et al. Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. **Science of the Total Environment**, v. 645, p. 34-43, 27 jun. 2018.

DUKE, S. O.; POWLES, S. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 319-325, 13 fev. 2008.

EHLING, S.; REDDY, T. M. Analysis of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Nutritional Ingredients and Milk by Derivatization with Fluorenyl-methyloxycarbonyl Chloride and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10562-10568, 16 nov. 2015.

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY OF UNITED STATES). **Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential**, p. 140. United States, 12 set. 2016.

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY OF UNITED STATES). **National Primary Drinking Water Regulations**, 2017. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations#three>>. Acesso em: 31 jan. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. **SANTE/12682: Method Validation & Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food & Feed**. Bruxelas, 2019.

FERREIRA et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2-14, 18 mar. 2007.

FIGUEIREDO, E.C.; BORGES, K. B.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2015. 263 p.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. **Glyphosate: A Unique and Global Herbicide**. Washington: American Chemical Society, 1997. 653 p.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. Santo André: ACADCOM Gráfica e Editora LTDA, 2005. 66 p.

GASPARIN, D. C. **Defensivos agrícolas e seus impactos sobre o meio ambiente**. 2005. 108 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação de Engenharia Ambiental)- Pontífica Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, 2005.

GHANEM, A. et al. Glyphosate and AMPA Analysis in Sewage Sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOX Derivatization on Strong Anion-Exchange Resin as Solid Support. *Journal Analytical Chemistry*, v. 79, n. 10, p. 3794, 6 abr. 2007

GONÇALVES, F. M. **Agrotóxicos: o controle da saúde dos trabalhadores expostos**. Goiânia: Congresso ANAMT, 2004. 192 slides, color.

GOSCINNY, S. et al. Determination of glyphosate and its metabolite AMPA (aminomethylphosphonic acid) in cereals after derivatization by isotope dilution and UPLC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, v. 5, n. 5, p. 1177-1185, 2012.

GREY, L.; NGUYEN, B.; YANG, P, Liquid chromatography/electrospray ionization/isotopic dilution mass spectrometry analysis of n-(phosphonomethyl) glycine and mass spectrometry analysis of aminomethyl phosphonic acid in environmental water and vegetation matrixes, *Journal of AOAC International*, v. 84, n. 6, p. 1770-1780, 2001.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry**. A textbook. 1 ed. Heidenberg: Editora Springer, 2004.

GUO, H. et al. Direct and Sensitive Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Environmental Water Samples by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1443, p. 93-100, 10 mar. 2016.

GUO, H. et al. Sensitive, rapid and non-derivatized determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos and metabolites in surface water by LC-MS/MS. *Research Article*, v. 1, p. 305, 27 fev. 2019.

GUO, Z. -X.; CAI, Q.; YANG, Z. Ion chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry for simultaneous determination of glyphosate, glufosinate and ethephon at nanogram levels. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, v. 21, p. 1606-1612, 18 abr. 2007.

GWYNNE, D. C.; MURRAY, R. B. **Weed biology and control in agriculture and horticulture**. London: Batsford Academic and Educational, 1985. 258 p.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2017. cap. 28. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521634522/cfi/6/2/1/4/2@0.00:0>>. Acesso em: 04 fev. 2020.

IARC. **Evaluation of Five Organophosphate Insecticides and Herbicides**, v. 112, p. 2. France, 20 mar. 2015.

IBAMA (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS). **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Brasil, out. 2019. Nota técnica. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 14 dez. 2019.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA). **DOQ-CGCRE-008 - REVISÃO 07**: Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. Rio de Janeiro, 2018.

IUPAC (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY). **Aminomethylphosphonic Acid (AMPA)**. 2019. Disponível em: <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/842.htm>>. Acesso em: 05 fev. 2020.

IUPAC (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY). **Glyphosate**. 2019. Disponível em: <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/373.htm>>. Acesso em: 05 fev. 2020.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. **International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications**, Ithaca, n. 42. 2011. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/executivesummary/default.asp>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

JENSEN, P. K. et al. Validation of reliable and selective methods for direct determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in milk and urine using LC-MS/MS. **Journal Environmental Science Health, Part B**, v. 51, n. 4, p. 254-259, 19 jan. 2016.

KHADEMI, S. M. S. et al. Direct detection of glyphosate in drinking water using corona-discharge ion mobility spectrometry: A theoretical and experimental study. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 442, p. 29-34, 6 maio 2019.

KNAPP, D. R. **Handbook of Analytical Derivatization Reactions**. New York: John Wiley and Sons, 1979. 768 p.

LEIN, W. et al. Target-based discovery of novel herbicides. **Current opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 2, 2004. 219-225 p.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 197-207, 2012.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas**: mecanismos de ação e uso. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 36 p.

MARQUES, A. R. F. **Estudos de Degradação do Glifosato**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Controle de Qualidade)–Universidade de Aveiro, Portugal, 2008.

MARTINS et al. Dilution standard addition calibration: A practical calibration strategy for multiresidue organic compounds determination. **Journal of chromatography A**, v. 1460, 2016, p. 84-91.

MARTINS, P. R. **Trajetórias tecnológicas e meio ambiente: a indústria de agroquímicos/transgênicos no Brasil**. 2000. 338 p. Tese (Doutorado em Ciências Sociais)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MATA, J. S. da; FERREIRA, R. L. Agrotóxico no Brasil – Uso e Impactos ao Meio Ambiente e a Saúde Pública. **Ecodebate**, 02 ago. 2013. Disponível em: <<https://www.ecodebate.com.br/2013/08/02/agrotoxico-no-brasil-uso-e-impactos-ao-meio-ambiente-e-a-saude-publica-por-joao-siqueira-da-mata-e-rafael-lobes-ferreira/>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

MATOS, F. S. de. **Determinação de glifosato e AMPA em água por injeção direta da amostra em cromatografia iônica capilar e LC-MS/MS**. 2014. 105 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

MESNAGE, R. et al. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 134, out. 2015.

MORAES, P. V. D.; ROSSI, P. Comportamento ambiental do glifosato. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 9, n. 3, p. 23, 2010.

NEDELKOSKA, T. V.; LOW, G. K. -C. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, n. 1, p. 145, 2004.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788577807130/cfi/1!/4/4@0.00:65.3>>. Acesso em: 11 fev. 2020.

NOORI, J. S. et al. Detection of Glyphosate in Drinking Water: A Fast and Direct Detection Method without Sample Pretreatment. **Sensors**, v. 18, p. 2961, 5 set. 2018.

OKADA, E. et al. A simple and rapid direct injection method for the determination of glyphosate and AMPA in environmental water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 3, p. 715-724, 10 dez. 2018.

PADILLA-ALONSO, D.J. et al. A New Temperature-Assisted Ionic LiquidBased Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Method for Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Water Samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 40, p. 147-155, 17 mar. 2017.

PARA (ANVISA). **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos - PARA**: Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. Brasília, 2019.

PATSIAS, J.; PAPADOPOULOU, A.; PAPADOPOULOU, E. –M. Automated trace level determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 932, n.1-2, p. 83-90, 12 out. 2001.

PATTERSON, M. Glyphosate Analysis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead. **Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs**, p. 1-117, 8 out. 2004.

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, n. 1, p. 61, 4 mar. 2008.

PINTO, E.; SOARES, A. G.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Quantitative analysis of glyphosate, glufosinate and AMPA in irrigation water by *in situ* derivatization – dispersive liquid-liquid microextraction combined with UPLC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 10, p. 554-561, 2 jan. 2018.

POIGER, T. et al. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. **Environmental Science Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1588-1596, jan. 2017.

PRATA, F.; LAVORENTI, A. **Retenção e mobilidade de defensivos agrícolas no solo**: apostila. Piracicaba: ESALQ, Universidade de São Paulo, 2002. p. 57-69.

QIAN, K. et al. 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, n. 14, p. 2394-2400, jul. 2009.

RAINA, R. Chemical Analysis of Pesticides Using GC/MS, GC/MS/MS, and LC/MS/MS. In: **Pesticides-Strategies for Pesticides Analysis**. IntechOpen, 2011.

RIBEIRO, A. L. C. **Implementação e validação de metodologia para determinação simultânea de glifosato e AMPA (ácido aminometilfosfônico) em águas naturais por IC/Condutometria**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde)–Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.

ROMAN, E. S. et al. **Como funcionam os herbicidas**: da biologia à aplicação. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2005. 152 p.

RONCO, A. E. et al. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 188, p. 458, 9 jul. 2016.

RUEPPEL, M. L. et al. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v. 25, n. 3, p. 517-528, 1 maio 1977.

SARGENT, M. **Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements**. RSC Analytical Methods Committee. Copyright LGC Limited, 2013. 68 p.

SETZNAGL, S.; CESARINO, I. Copper nanoparticles and reduced graphene oxide modified a glassy carbon electrode for the determination of glyphosate in water samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 3 fev. 2020.

SILVA, M. F. O.; COSTA, L. M. A indústria de defensivos agrícolas. **BNDES Setorial: biblioteca digital do BNDES**, Rio de Janeiro, n. 35, p. 233-276, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.bndes.gov.br/bibliotecadigital>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

STACHNIUK, A; FORNAL, E. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 1654-1665, 2016.

STEINBORN, A. et al. Determination of Glyphosate Levels in Breast Milk Samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 1414-1421, 25 jan. 2016.

STEINRÜCKEN, H. C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 94, n. 4, p. 1207-1212, 30 jun. 1980.

STEPHENSON, G. R. et al. **Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006)**. Pure and Applied Chemistry, v. 78, n. 11, 2006. 2075-2154 p.

TIAGO, J. P. F. et al. Simultaneous and direct determination of glyphosate and AMPA in water samples from the hydroponic cultivation of eucalyptus seedlings using HPLC-ICP-MS/MS. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 28 fev. 2020.

TAVARES, V. **A história da bancada ruralista: personagens e fatos que tornaram a Frente Parlamentar da Agropecuária protagonista do sucesso do agronegócio brasileiro**. Brasília, DF: Vincere Associados, 2018. 240 p.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H. de; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glyphosate sobre solos e minerais. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 829, 16 fev. 2006.

VALENTIM, E. B.; MARI, C.; BERNSTEIN, A. A desinformação sobre o uso de agrotóxicos – uma discussão multidisciplinar. **Revista Eletrônica: Educação Pública**, Rio de Janeiro, n. 41, p. 37-40, out. 2013. Disponível em: <<http://www.educacaopublica.rj.gov.br/biblioteca/quimica/0016.html>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

VEIGA, F. et al. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. **The Science of the Total Environment**, v. 271, n.1-3, p. 135, 31 mar. 2001.

VELASCO, L. O. M. de; CAPANEMA, L. X. L. O setor de agroquímicos. **BNDES Setorial**: biblioteca digital do BNDES, Rio de Janeiro, n. 24, p. 69-96, set. 2006. Disponível em: <<http://www.bndes.gov.br/bibliotecadigital>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

WANG, S. et al. A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Talanta**, v. 161, p. 700-706, 13 set. 2016.

WANG, X.; WANG, S.; CAI, Z. The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 170-185, 2013.

WAUCHOPE, R. D. et al. The SCS/ARS/CES pesticide properties database: select values for environmental decision making. **Reviews of Environmental Contamination & Toxicology**, New York, v. 123, n. 1, p. 164, 1992.

YUAN, Y. et al. Fluorescent carbon dots for glyphosate determination based on fluorescence resonance energy transfer and logic gate operation. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 242, p. 545-553, 2017.

YUDELMAN M.; RATTA, A.; NYGAARD, D. **Pest management and food production**: looking to the future. International Food Policy Research Institute. Washington, 1998. 59 p.

ZHANG, C. et al. A highly selective electrochemical sensor based on molecularly imprinted polypyrrole-modified gold electrode for the determination of glyphosate in cucumber and tap water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, p. 7133-7144, 10 out. 2017.