



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

**DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA
POR INJEÇÃO DIRETA DA AMOSTRA EM
CROMATOGRÁFIA IÔNICA CAPILAR E LC-MS/MS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fábio da Silva de Matos

**Santa Maria - RS, Brasil
2014**

**DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA POR
INJEÇÃO DIRETA DA AMOSTRA EM CROMATOGRÁFIA
IÔNICA CAPILAR E LC-MS/MS**

Fábio da Silva de Matos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química,
Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal
de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do
grau de

MESTRE EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria - RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA POR
INJEÇÃO DIRETA DA AMOSTRA EM CROMATOGRÁFIA
IÔNICA CAPILAR E LC-MS/MS**

elaborada por

Fábio da Silva de Matos

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Renato Zanella (Orientador, UFSM)

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UFSM)

Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)

Santa Maria, 29 de agosto de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais,
que me apoiam em todos os momentos da minha vida,
aos meus irmãos que sempre estão na
torcida pela minha felicidade, à minha querida avó
e a minha companheira de todos os momentos, Carla.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir mais uma grande vitória na vida.

Ao Prof. Dr. Renato Zanella meu expressivo agradecimento pela orientação, pelo aprendizado, pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), por ter acreditado em mim e contribuído para o meu crescimento profissional e também na execução desse projeto. A você, minha eterna gratidão e admiração.

À Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime pela co-orientação, pelo aprendizado, participação e sugestões na defesa deste trabalho. Obrigado pela amizade e carinho desde quando comecei a fazer parte do acreditado grupo do LARP. A você, minha gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes pela participação na defesa da dissertação, pelas excelentes sugestões e contribuições, engrandecendo este trabalho. Obrigado pela amizade, pelos ensinamentos e atenção que me foram dedicados.

Ao Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins direcionamento, sugestões e desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pela amizade, incentivo e ensinamentos nesses anos, colocando-se sempre à disposição.

Ao Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves por fazer parte da banca examinadora e também contribuindo para o melhoramento desse estudo.

À Carla, o meu muito obrigado por estar sempre ao meu lado me ajudando, me incentivando e me dando forças para a elaboração deste trabalho abdicando seu tempo para ajudar-me. Agradeço pela paciência e compreensão nos momentos de minha ausência.

Ao meu pai Lauro (vulgo “Baiano”) e a minha mãe Vera, pela força, carinho, torcida em todos os momentos da minha vida. Minha eterna gratidão.

Aos meus, irmão Leandro e Eduardo, pelo respeito, torcida, força e amizade. Obrigado por tudo.

Aos meus sogros Abel e Clara, agradeço pela torcida, apoio e carinho recebidos nesses anos de convivência, a vocês muito obrigado!

A todos os meus colegas do LARP que me apoiaram e se dispuseram a me ajudar no desenvolvimento desse trabalho. Em especial aos meus colegas Wagner, Filipe e Nelson, pela amizade, dedicação e ajuda em todos os momentos, às colegas Tiele, Débora, Giovana, Marília e Maiara que me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho, espero poder retribuir esse auxílio. A todos um muito obrigado!

Aos meus colegas e amigos de graduação, não tenho como citar o nome de todos, pois são muitos então, deixo aqui o desejo e a torcida pelo sucesso de todos

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSM pela contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Ademir e Valéria, funcionários da coordenação do PPGQ, pela gentileza e atenção e competência no atendimento e realização de suas tarefas.

À CAPES e FINEP/SIBRATEC/RENALI pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM ÁGUA POR INJEÇÃO DIRETA DA AMOSTRA EM CROMATOGRAFIA IÔNICA CAPILAR E LC-MS/MS

AUTOR: FÁBIO DA SILVA DE MATOS

ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA

Data e Local da Defesa: 29 de agosto de 2014, Santa Maria - RS.

O glifosato [N-(fosfonometil)glicina] é o agrotóxico mais utilizado na agricultura mundial no controle de plantas daninhas. Altas quantidades desse herbicida e seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), vem sendo encontrados em água devido ao uso intensivo. A portaria do Ministério da Saúde nº 2914 estabelece o valor máximo permitido para a soma de glifosato e AMPA em 0,5 mg L⁻¹. O método amplamente utilizado para a determinação desses compostos é a HPLC sendo imprescindível uma etapa de derivatização para a detecção por fluorescência. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver métodos simples e rápidos para a determinação direta de glifosato e AMPA em água para consumo humano, sem etapa de tratamento de amostra ou derivatização, empregando a cromatografia iônica capilar (CIC) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS). O método por cromatografia iônica capilar empregou coluna capilar IonPac AS19 (250 x 0,4 mm; 7,5 µm), gradiente de eluição com gerador de KOH e detector de condutividade. Para LC-MS/MS utilizou-se coluna Pursuit XRs C18 (150 x 2 mm d.i.; 5 µm), solução aquosa de hidróxido de amônio 0,01% (v/v) como fase móvel e detector triplo quadrupolo (TQ) operando no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM). A validação dos métodos foi realizada através de ensaios de recuperação, avaliando exatidão, precisão, linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). As curvas analíticas para glifosato e AMPA obtidas para os níveis 25; 50; 100; 250 e 500 µg L⁻¹ por CIC e LC-MS/MS apresentaram coeficiente de determinação (r²) >0,99 para ambos os compostos. Para as fortificações nos níveis de 25, 50, 250 e 500 µg L⁻¹ os compostos apresentaram recuperações de 70 a 113%, com RSD <10% por CIC e recuperações foram de 79 a 105%, com RSD <14% por LC-MS/MS. Os limites de detecção do método para AMPA e glifosato foi 8 µg L⁻¹ e o de quantificação foi de 25 µg L⁻¹, em ambas as técnicas cromatográficas. Ambos

os métodos apresentaram boa seletividade e sensibilidade. A determinação, através da injeção direta da amostra, de glifosato e AMPA utilizando cromatografia iônica capilar ou LC-MS/MS demonstrou ser uma ferramenta eficiente, simples e economicamente viável para análise, permitindo o monitoramento em níveis abaixo do valor máximo permitido em água potável.

Palavras-chave: Agrotóxicos, água, glifosato, AMPA, LC-MS/MS e CIC.

ABSTRACT

Master Dissertation
Chemistry Post-Graduate Program
Federal University of Santa Maria

DETERMINATION OF GLYPHOSATE AND AMPA IN WATER SAMPLES BY DIRECT INJECTION IN CAPILLARY ION CHROMATOGRAPHY AND LC-MS/MS

AUTHOR: FÁBIO DA SILVA DE MATOS

ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA

Date and Place of Defense: Santa Maria, August 29th, 2014.

Glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine] is the most widely used pesticide in the world for controlling weeds in agriculture. High amounts of this herbicide and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid (AMPA), have been found in water due to intensive use. The Ministry of Health 2914 establishes a maximum value allowed for the sum of glyphosate and AMPA at 0.5 mg L⁻¹. The most common method to determine these compounds requires a derivatization step for fluorescence detection. Thus, this study aimed to develop two simple and rapid methods for the direct determination of glyphosate and AMPA in water without treatment or sample derivatization steps, by capillary ion chromatography (Capillary IC) and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The Capillary IC method employed a capillary IonPac AS19 column (250 x 0.4 mm, 7.5 µm), a gradient elution with KOH a conductivity detector. The LC-MS/MS method used a Pursuit XRS C18 column (150 x 2 mm ID, 5 µm), an aqueous solution of ammonium hydroxide 0.01% (v/v) as mobile phase and a triple-quadrupole MS detector, operating in a selected reaction monitoring (SRM) mode. The method validation was performed by recovery experiments, evaluating accuracy, precision, linearity, limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ). The analytical curves for glyphosate and AMPA obtained for the concentration levels 25, 50, 100, 250 and 500 µg L⁻¹ by Capillary IC and LC-MS/MS showed r² >0.99 for both compounds. For spiked levels of 25, 50, 250 and 500 µg L⁻¹ recoveries were between 70 -113%, with RSD <10% for Capillary IC and 79-105%, with RSD <14% for LC-MS/MS. The method limits of detection for both glyphosate and AMPA was 8 µg L⁻¹ and of quantification was 25 µg L⁻¹, in both chromatographic techniques. Both methods showed good selectivity and sensitivity. Determination by direct injection of the sample, using capillary IC or LC-MS/MS proved to be

efficient, simple and cost-effective tools for analysis, making it possible to monitor at levels below the maximum allowed limits for drinking water.

Keywords: Pesticides, water, glyphosate. AMPA, LC-MS/MS, Capillary IC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos compostos em estudo.....	26
Figura 2. Dissociações do glifosato.....	27
Figura 3. Dissociações do AMPA.....	28
Figura 4. Esquema dos mecanismos envolvidos na sorção do glifosato em solos....	36
Figura 5. Rotas de decomposição microbiológica do glifosato.....	37
Figura 6. Esquema mostrando o processo de troca iônica em I.C.....	44
Figura 7. Construção de uma célula de condutividade.....	45
Figura 8. Sistema supressor para análise de ânions (A) e de cátions (B).....	46
Figura 9. Sistema de cromatografia iônica.....	47
Figura 10. Esquema prático da fonte de ionização ESI.....	50
Figura 11. Derivatização do glifosato com TFAA e TEE	53
Figura 12. Estruturas do reagente <i>p</i> -DAC e o produto cátion imínio da reação de glifosato com <i>p</i> -DAC. Cromatograma dos compostos determinado por cromatografia iônica capilar em água superficial.....	53
Figura 13. Cromatograma dos compostos determinado por cromatografia iônica capilar em água ultrapura.....	72
Figura 14. Cromatograma dos analitos na presença dos ânions inorgânicos do padrão de 7 ânions (F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ e PO ₄ ³⁻).....	74
Figura 15. Cromatograma LC-MS/MS do íon total (A) da amostra "branco" da matriz de água de abastecimento público e (B) da solução analítica contendo glifosato e AMPA no extrato da matriz na concentração de 500 ug L ⁻¹ , obtidos nas condições descritas no item 3.6.2.1.....	76
Figura 16. Cromatograma obtido por LC-MS/MS no modo SRM, de uma solução analítica (500 µg L ⁻¹), preparada no extrato da matriz e seus respectivos íons de quantificação e confirmação: A) AMPA e B) Glifosato.....	77
Figura 17. Resultados dos testes de efeito matriz em CIC.....	85
Figura 18. Resultados dos testes de efeito matriz em LC-MS/MS.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do glifosato	26
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do AMPA.....	27
Tabela 3. Agrotóxicos listados na Portaria 2914.....	30
Tabela 4. Classificação quanto a classe toxicológica.....	32
Tabela 5. Classificação de alguns herbicidas quanto ao potencial de contaminação de águas subterrâneas (EPA e GUSS) e superficiais (GOSS)	38
Tabela 6. Agrotóxicos quantificados por LC-MS/MS, tempo de retenção(t_R), modo de ionização ESI(+/-), íons precursores e produtos e energias de colisão.....	77
Tabela 7. Equações da curva analítica e o coeficiente de determinação (r^2) preparados no extrato da matriz para os compostos juntamente com os ânions inorgânicos determinados por CIC.....	79
Tabela 8. Equações da curva analítica e o coeficiente de determinação (r^2) preparados no extrato da matriz para os compostos sem a presença dos ânions inorgânicos determinados por CIC.....	79
Tabela 9. Equações da curva analítica e o coeficiente de determinação (r^2) preparada no extrato da matriz para os compostos determinados por LC-MS/MS.....	80
Tabela 10. Percentuais de recuperação e RSD nos níveis de concentração de 25, 50, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ no LC-MS/MS.....	81
Tabela 11. Percentuais de recuperação e RSD nos níveis de concentração de 25, 50, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos sem a presença dos ânions inorgânicos determinados por CIC.....	81
Tabela 12. Percentuais de recuperação e RSD nos níveis de concentração de 25, 50, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos com a presença dos ânions inorgânicos determinados por CIC.....	82
Tabela 13. Efeito matriz dos compostos avaliados por LC-MS/MS.....	83
Tabela 14. Efeito matriz dos compostos avaliados por CIC.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a	– Coeficiente angular
ABNT	– Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACES	– Supressora Eletrolítica Capilar Aniônica, do inglês <i>Anion Capillary Electrolytic Suppressor</i>
AMPA	– Ácido Aminometilfosfônico, do inglês <i>Aminomethylphosphonic Acid</i>
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	– Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
APCDA	– Alto Potencial de Contaminação Dissolvido em Água
APCAS	– Alto Potencial de Contaminação Associado ao Sedimento
API	– Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
APPI	– Fotoionização a Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric pressure Photoionization</i>
b	– Coeficiente linear
BPCDA	– Baixo Potencial de Contaminação Dissolvido em Água
BPCAS	– Baixo Potencial de Contaminação Associado ao Sedimento
C ₁₈	– Sílica modificada com hidrocarboneto linear C ₁₈ , octadecilsilano
CI	– Ionização Química, do inglês <i>Chemical Ionization</i>
CIC	– Cromatografia Iônica Capilar do inglês <i>Capillary Ion Chromatography</i>
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CP	– Contaminante Potencial
CRD	– Dispositivo Removedor de Carbonato, do inglês <i>Carbonate Removal Device</i>

CONAMA	– Conselho Nacional de Meio Ambiente
CV	– Coeficiente de Variação
d.i	– Diâmetro interno
DL 50	– Dose Letal para 50% dos organismos testes
DQ	– Departamento de Química
DTPMP	– Ácido Fosfônico Dietilenotriamino Pentametileno
EDTMP	– Etilenodiamino Tetrametileno Fosfonato
EGC	– Cartucho Gerador de Eluente, do inglês <i>Eluent Generator Cartridges</i>
EI	– Ionização por Elétrons, do inglês <i>Electron Ionization</i>
EMBRAPA	– Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	– Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>
EPI's	– Equipamento de Proteção Individuais
ESI	– Ionização por Eletronebulização, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
ESI(+)	– Ionização por Eletronebulização no modo positivo, do inglês <i>Electrospray Ionization Positive Mode</i>
ESI(-)	– Ionização por Eletronebulização no modo negativo, do inglês <i>Electrospray Ionization Negative Mode</i>
eV	– Elétrons volt
FAO	– Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FT	– Faixa de Transição
GUS	– Gustafson
HPLC	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>

HPIC	– Cromatografia Iônica de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Ion Chromatography</i>
IC	– Cromatografia Iônica do inglês <i>Ion Chromatography</i>
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	– Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	– União Internacional de Química Pura e Aplicada
KOH	– Hidróxido de Potássio
K_{oc}	– Coeficiente de adsorção a matéria orgânica do solo
K_{ow}	– Coeficiente de partição octanol água
LARP	– Laboratório de Análise 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 to Tandem Mass Spectrometry</i>
LMR	– Limite Máximo Permitido
LOD	– Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOD_i	– Limite de Detecção do instrumento, do inglês <i>Limit of Detection of the Instrument</i>
LOD_m	– Limite de Detecção do método, do inglês <i>Limit of Detection of the method</i>
LOQ	– Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
LOQ_i	– Limite de Quantificação do instrumento, do inglês <i>Limit of Quantification of the Instrument</i>
LOQ_m	– Limite de Detecção do método, do inglês <i>Limit of Quantification of the method</i>
M.M	– Massa molar

m/z	– Razão massa carga
MAPA	– Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MPCDA	– Médio Potencial de Contaminação Dissolvido em Água
MPCAS	– Médio Potencial de Contaminação Associado ao Sedimento
MS	– Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	– Espectrometria de Massas em série, do inglês <i>Mass Spectrometry in tandem</i>
n	– Número de replicatas
NC	– Não Contaminante
N ₂	– Nitrogênio
PE	– Ponto de ebulição
PF	– Ponto de Fusão
pH	– Potencial hidrogeniônico
pKa	– Constante de dissociação ácida
pKb	– Constante de dissociação básica
PL	– Provável Lixiviação
PP	– Polipropileno
PTFE	– Politetrafluoretileno
PV	– Pressão de Vapor
r	– Coeficiente de correlação
r ²	– coeficiente de determinação
rec	– Recuperação
RSD	– Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SANCO	– Saúde e Proteção do Consumidor, do francês <i>Santé et protection des consommateurs</i>

SRM	– Monitoramento de reações selecionadas , do inglês <i>Selected Reaction Monitoring</i>
S/R	– Relação sinal ruído
SIM	– Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i>
SINDAG	– Sindicato Nacional da Indústria de defensivos Agrícolas
SPE	– Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
TQ	– Triplo quadrupolo
t_R	– tempo de retenção
UFMS	– Universidade Federal de Santa Maria
v/v	– Volume por volume
VMP	– Valor Máximo Permitido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1. O HERBICIDA GLIFOSATO E SEU PRINCIPAL PRODUTO DE DEGRADAÇÃO.....	23
2.1.1. Herbicidas e plantas daninhas.....	23
2.1.2. Aplicação de glifosato.....	24
2.1.3. Propriedades físico-químicas do glifosato e seu produto de degradação.....	26
2.1.4. Legislação relacionada a qualidade da água para consumo humano.....	29
2.1.5. Toxicologia do glifosato e do AMPA.....	31
2.1.5.1. Toxicidade aguda.....	33
2.1.5.2. Toxicidade crônica.....	33
2.1.6. Ocorrência de glifosato e AMPA no meio ambiente.....	34
2.2. CROMATOGRAFIA.....	42
2.2.1. Cromatografia Iônica.....	42
2.2.2. Cromatografia Iônica Capilar.....	47
2.2.3. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas.....	48
2.3. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO.....	51
2.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS.....	54
2.4.1. Seletividade.....	55
2.4.2. Exatidão.....	55
2.4.3. Precisão.....	55
2.4.4. Limites de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	57
2.4.5. Linearidade e curva analítica.....	58
2.4.6. Efeito matriz.....	59
2.4.6.1. Efeito matriz em cromatografia líquida.....	59
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
3.1. INSTRUMENTAÇÃO.....	61
3.2. REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS.....	62
3.3. AMOSTRAS BRANCO.....	62
3.4. PADRÕES ANALÍTICOS.....	63
3.5. PREPARO DE AMOSTRA.....	63
3.6. DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA.....	64

3.6.1. Cromatografia Iônica Capilar.....	64
3.6.1.1. Otimização do sistema cromatográfico CIC para a determinação de glifosato e AMPA sem a presença de ânions inorgânicos do padrão de 7 ânions (F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ e PO ₄ ³⁻).....	64
3.6.1.2. Otimização do sistema cromatográfico CIC para a determinação de glifosato e AMPA com a presença de ânions inorgânicos do padrão de 7 ânions (F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ e PO ₄ ³⁻).....	65
3.6.2. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.....	65
3.6.2.1. Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para a determinação de glifosato e AMPA	65
3.6.2.1.1. Ionização dos analitos.....	66
3.6.2.1.2. Escolha do eluente.....	66
3.7. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS PARA ANÁLISE DE GLIFOSATO E AMPA.....	67
3.7.1. Seletividade.....	67
3.7.2. Linearidade e curvas analíticas.....	68
3.7.3. Limites de detecção (LOD) e limite de Quantificação (LOQ).....	68
3.7.4. Ensaios de recuperação para avaliação da exatidão.....	68
3.7.5. Precisão (repetitividade).....	69
3.7.6. Avaliação do efeito matriz.....	69
3.8. APLICAÇÕES DOS MÉTODOS.....	70
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	71
4.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS OTIMIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA POR CROMATOGRAFIA IÔNICA CAPILAR.....	71
4.1.1. Determinação de glifosato e AMPA sem a presença dos ânions inorgânicos do padrão de 7ânions (F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ e PO ₄ ³⁻).....	71
4.1.2. Determinação de glifosato e AMPA com a presença dos ânions inorgânicos do padrão de 7 ânions (F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ e PO ₄ ³⁻).....	73
4.2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS OTIMIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA POR LC-MS/MS.....	75
4.3. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS.....	78
4.3.1. Seletividade dos métodos.....	78
4.3.2. Curva analítica e linearidade.....	79

4.3.3. Exatidão (Ensaio de recuperação) e Precisão (Repetitividade).....	80
4.3.4. Determinação dos valores de LOD e LOQ.....	82
4.3.5. Efeito matriz.....	83
4.3.6. Aplicação do método.....	86
5. CONCLUSÕES.....	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
7. ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	105
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105

1. INTRODUÇÃO

As projeções do MAPA mostram um cenário promissor e crescente do setor agropecuário e florestal no período 2012/13 – 2022/23, o que poderá abastecer anualmente um total de 200 milhões de brasileiros e gerar excedentes exportáveis para cerca de 200 países conforme o potencial das atividades produtivas prósperas e rentáveis. Como consequência teremos um mercado agrícola e pecuário interno forte e uma balança comercial gerando mais de 100 bilhões de dólares a cada ano e ocupando um posicionamento internacional como um dos principais fornecedores de alimentos e matérias primas para o mundo.

Os parâmetros que fazem do país uma potência no agronegócio são a grande disponibilidade de área para a produção de grãos, carnes, plantações de florestas comerciais, a grande disponibilidade de água doce, clima favorável na maioria das regiões e avanços tecnológicos. Esses fatores associados dão sustentação para o desenvolvimento das cadeias produtivas. Nesse contexto, o Brasil acaba tornando-se dependente do agronegócio, com especial atenção à produção e ao desenvolvimento da agricultura de grãos, principalmente a soja, e a sua alta produtividade movimentam um outro grande mercado destinado ao emprego de agrotóxicos.

Dentre os agrotóxicos aplicados na agricultura do país e do mundo, o herbicida glifosato se destaca, sendo o mais utilizado mundialmente pela sua eficiência e amplo espectro de aplicação no combate às plantas daninhas. Embora tenha vantagens na utilização do glifosato, aplicando-o no preparo do solo e como pós emergente das plantas daninhas, esse composto não pode ter aplicação após o aparecimento das plantas das culturas de interesse econômico pois pelo fato do glifosato ser um herbicida não seletivo conseqüentemente ele terá ação contra a própria cultura. No caso da soja transgênica, a modificação genética das sementes confere à cultura uma resistência a esse herbicida.

Com essa maneira, baixa-se o custo de produção cultura geneticamente modificada mas aumenta a utilização de maiores quantidades desse herbicida. Embora os dados toxicológicos sobre o glifosato sejam seguros para a segurança alimentar, existe uma grande preocupação com o monitoramento e controle dos resíduos de glifosato e do seu produto de degradação o AMPA.

A grande dificuldade no monitoramento desses resíduos é a falta de metodologias analíticas confiáveis, rápidas, simples e de baixo custo, pois esses dois compostos são geralmente determinados por cromatografia de troca iônica com detecção por fluorescência e uma etapa exaustiva e complexa de preparo de amostra.

É de fundamental importância o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de monitorar e quantificar essas substâncias com eficiência, rapidez e economicamente viáveis, pois a demanda por análises de resíduos de glifosato e AMPA aumentam proporcionalmente com o grande avanço na agropecuária. Outro fator importante é a necessidade de se controlar e monitorar esses compostos no meio ambiente, pois devido às suas características peculiares, seus resíduos acabam chegando aos corpos hídricos e influenciando na qualidade da água destinada para o consumo humano.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico rápido, simples, confiável e economicamente viável para a determinação de resíduos de glifosato e AMPA em água para consumo humano, utilizando injeção direta da amostra no sistema de cromatografia iônica capilar (CIC) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (LC-MS/MS), e aplicá-lo em amostras reais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O HERBICIDA GLIFOSATO E SEU PRINCIPAL PRODUTO DE DEGRAÇÃO

2.1.1. Herbicidas e plantas daninhas

Os herbicidas são produtos fitossanitários utilizados para prevenir o aparecimento, reduzir ou destruir plantas daninhas, sejam essas aquáticas ou terrestres (SANTOS *et al.*, 2013).

As plantas daninhas surgiram com a agricultura através de um processo evolutivo, acumulando características as quais permitem sua coexistência em culturas ou ocupando nichos ecológicos não explorados pela planta cultivada. Devido a esse processo evolutivo as plantas daninhas adquiriram características biológicas de grande agressividade, principalmente relacionadas com alta capacidade competitiva por água, luz e nutrientes (GALLI e MONTEZUMA, 2005).

O controle das plantas daninhas torna-se importante em função dos prejuízos que causam e conforme a demanda sempre crescente, de alimentos, fibras e energia por parte da população que aumenta continuamente (AMARANTE JÚNIOR *et al.*, 2002a). Em relação a métodos de controle como técnicas culturais, diferentes formas de controle físico ou mecânico, o uso de herbicidas apresenta inúmeras vantagens devido ao seu modo de ação (SANTOS *et al.*, 2013).

Os herbicidas, principalmente o glifosato, que representa 60% do mercado mundial dessa classe segundo AMARANTE JUNIOR e colaboradores (2002b), tornaram-se essenciais não só para o controle de plantas daninhas mas também para o desenvolvimento e estabilidade do agronegócio e para a economia do país.

O glifosato é um herbicida que vem sendo utilizado intensamente desde 1971, quando a formulação Round-up® (patente da empresa Monsanto) iniciou a sua comercialização (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002b).

Segundo a ANVISA (2014), denominamos o ingrediente ativo ou nome comum como glifosato e/ou pelo nome químico N-(fosfonometil)glicina, cuja fórmula bruta identificamos como $C_3H_8NO_5P$. Possui como seu principal produto de degradação o ácido aminometilfosfônico (AMPA). Classifica-se como agrotóxico organofosforado pois apresenta em sua estrutura átomos de carbono e fósforo geralmente derivados dos ácidos fosfóricos e tiosfosfóricos (SANCHES, 2003). É um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, classificado como

não-seletivo e de ação sistêmica, apresentando um largo espectro de ação (GALLI e MONTEZUMA, 2005).

As formas de comercialização do glifosato no Brasil são na forma de sal de potássio, sal de amônio e o sal de isopropilamina, sendo esse último empregado na maioria das formulações (NETO, 2009).

2.1.2. Aplicação do glifosato

O uso agrícola, domissanitário e não agrícola, bem como o modo de emprego dos herbicidas devem seguir as normas da ANVISA (2014), onde define-se critérios como modo de aplicação, limites máximos de resíduos (LMR) e intervalos de segurança para cada cultura onde esse intervalo pode chegar até 30 dias para algumas culturas. A importância de uma correta aplicação para o desenvolvimento e produção dessas culturas se dá justamente por esse herbicida ter ação não-seletiva, com uma elevada eficiência, se aplicado incorretamente podendo ocasionar fitotoxicidade ou morte das plantas de interesse econômico (GALLI e MONTEZUMA, 2005).

O glifosato tem seu uso não agrícola em aplicações como em margens de rodovias e ferrovias, áreas sob a rede de transmissão elétrica, pátios industriais, oleodutos e aceiros

As principais aplicações desse herbicida em uso agrícola são em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, coco, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagem, pêra, pêssego, seringueira, soja, trigo e uva. Como maturador de cana-de-açúcar e eliminação da soqueira no cultivo de arroz e cana-de-açúcar. Emprega-se também como dessecante nas culturas de aveia preta, azevém e soja.

Conforme o cenário promissor e crescente do setor agropecuário no Brasil, o que aumenta a demanda pela aplicação desse herbicida, principalmente o setor do agronegócio com especial atenção à agricultura de grãos, e ao desenvolvimento das culturas transgênicas, como a soja, outro promissor setor que vem se destacando é o setor florestal o qual ganha o destaque no agronegócio não só brasileiro mas mundial da cultura de florestas plantadas, contribuindo com a demanda pela aplicação de glifosato como pós-emergente das plantas infestantes em florestas de eucalipto e pinus e também no controle da rebrota do eucalipto.

Com o crescimento de ambos os setores e juntamente com a ampliação das áreas para a produção de grãos, carnes e plantações de florestas comerciais, torna-se necessário o desenvolvimento tecnológico e otimização de mão-de-obra para suprir a demanda da aplicação desse herbicida, com isso o uso da aviação está em expansão, pois a pulverização aérea de agrotóxicos maximiza as aplicações desses produtos aumentando assim a eficiência do tratamento fitossanitário possibilitando uma uniformidade de distribuição desses ingredientes ativos sobre a superfície-alvo.

SCHORODER e colaboradores (2011) avaliaram o efeito da aplicação aérea de glifosato com diferentes equipamentos e volumes de calda sobre plantas daninhas de arroz e verificou que o controle das plantas daninhas *Cyperus* sp., *Fimbristilis* sp., *Paspalum dilatatum* e *Paspalum modestum* pelo herbicida foi igualmente eficaz, com pulverizações por via aérea, tanto com bicos leque de impacto e volumes de calda de 20 e 30 L ha⁻¹, quanto com atomizadores rotativos de disco e volumes de calda de 10 e 15 L ha⁻¹.

RICORDI e colaboradores (2007), cita em seu trabalho que a aplicação aérea de glifosato como maturador pode afetar o desenvolvimento de áreas vizinhas devido ao efeito deriva, tanto em canaviais em formação como nas demais culturas. Esse efeito é um dos principais motivos de perdas de agrotóxicos e conseqüentemente contaminação ambiental durante a pulverização agrícola aérea onde parte do produto pulverizado não atinge o alvo durante a aplicação e é carregado pela ação do vento para fora da área-alvo (SALVADOR, 2011).

Outra consequência bastante discutida sobre a aplicação aérea de glifosato é sobre o Plano Colômbia criado pelo governo dos Estados Unidos em 2000 com o propósito ajudar oficialmente, tanto financeiramente quanto militarmente, o governo colombiano no combate à produção e o tráfico de drogas na Colômbia.

Com o apoio norte-americano o governo colombiano implementou uma política para a fumigação aérea de glifosato atingindo principalmente parques naturais, áreas protegidas por sua biodiversidade, afirmando ter evidências de que existe cultivos ilícitos dentro dessas zonas (FERRER, 2004).

A aplicação aérea desse poderoso herbicida, sendo no uso agrícola, domissanitário ou não agrícola pode gerar riscos não só ao meio ambiente mas também para as comunidades próximas às áreas de aplicação sendo necessário esforços na avaliação dos perigos que essa prática representa.

2.1.3. Propriedades físico-químicas do glifosato e seu produto de degradação

A Figura 1 apresenta as estruturas do glifosato e seu principal produto de degradação o ácido aminometilfosfônico (AMPA). Ambos são substâncias hidrofílicas altamente solúveis em água (11.600 mg L^{-1} para o glifosato e 14.665 mg L^{-1} para o AMPA, à $20 \text{ }^\circ\text{C}$) (IUPAC, 2014) e praticamente insolúveis em solventes orgânicos, como acetona e etanol (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002b).

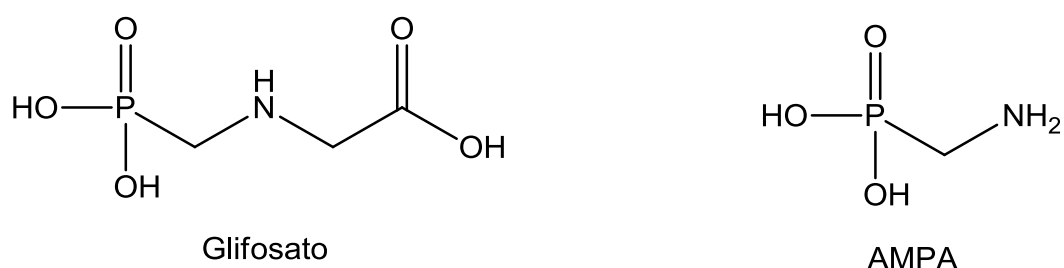


Figura 1. Estruturas dos compostos em estudo.

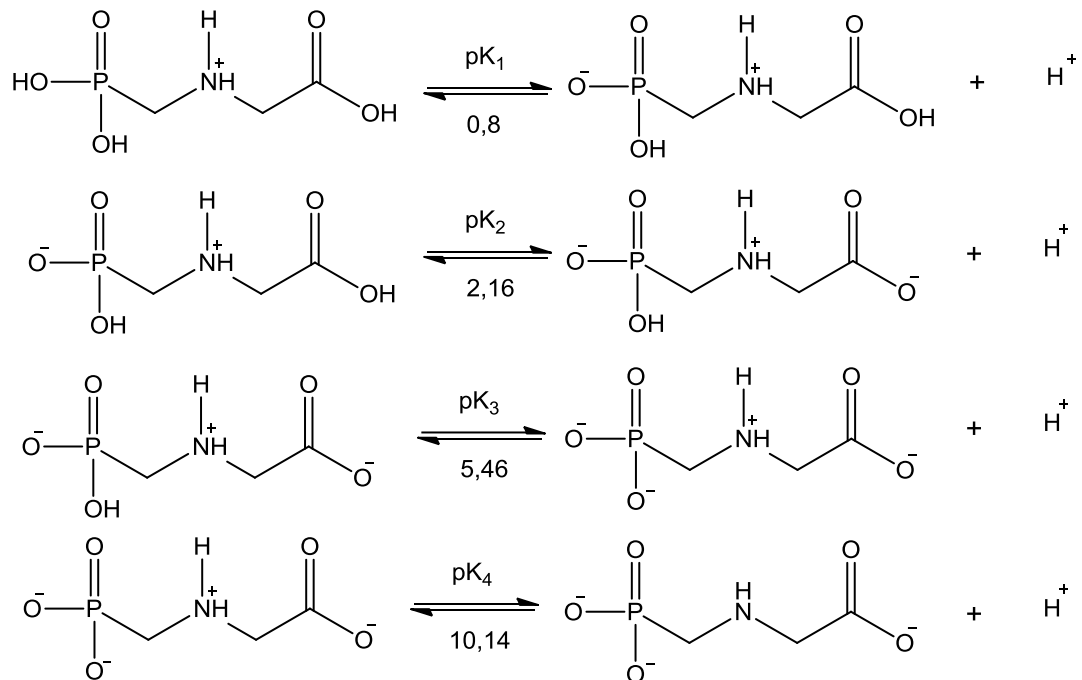
Tabela 1. Propriedades físico-químicas do glifosato. Adaptado de RIBEIRO, (2011); MARQUES (2008), IUPAC 2013.

Propriedades	Características
Aparência em condições ambientais	Sólido branco
Nomenclatura IUPAC	N-(fosfonometil)-glicina
Massa molecular	$169,1 \text{ g mol}^{-1}$
Solubilidade em água	11.600 mg L^{-1}
Solubilidade em solventes orgânicos	Insolúvel
Ponto de fusão	$189,5 \text{ }^\circ\text{C}$
Coeficiente de partição em octanol-água ($\log k_{ow}$)	-3,2
Constante de Henry ($25 \text{ }^\circ\text{C}$)	$2,1 \times 10^{-7} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$
Categoria iônica	Anfótero

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do AMPA. Adaptado de IUPAC 2013.

Propriedades	Características
Aparência em condições ambientais	Sólido branco
Nomenclatura IUPAC	ácido aminometilfosfônico
Massa molecular	111,0 g mol ⁻¹
Solubilidade em água	14.665 mg L ⁻¹
Solubilidade em solventes orgânicos	Insolúvel
Coefficiente de partição em octanol-água (log <i>k_{ow}</i>)	1,63
Constante de Henry (25 °C)	0,16 Pa m ³ mol ⁻¹
Categoria iônica	Anfótero

Conforme AMARANTES JUNIOR e colaboradores (2002b), o glifosato apresenta boa estabilidade em presença de luz, mesmo sob temperaturas superiores a 60 °C. Esta molécula apresenta quatro constantes de dissociação ácida (*K_a*) as quais indicam o grau de dissociação desse herbicida em função do pH: *pK*₁= 0,8; *pK*₂= 2,16; *pK*₃=5,46 e *pK*₄= 10,14; conforme Figura 2.

**Figura 2.** Dissociações do glifosato (adaptada de AMARANTE JUNIOR et al., 2002b).

Pode-se considerar conforme o observado que em pH superior a 11,0, a molécula de glifosato encontra-se completamente dissociada. Isso também ocorre com o AMPA, com a diferença que ele possui três constantes de dissociação ácida: $pK_1= 1,8$; $pK_2= 5,4$ e $pK_3= 10,0$, conforme Figura 3.

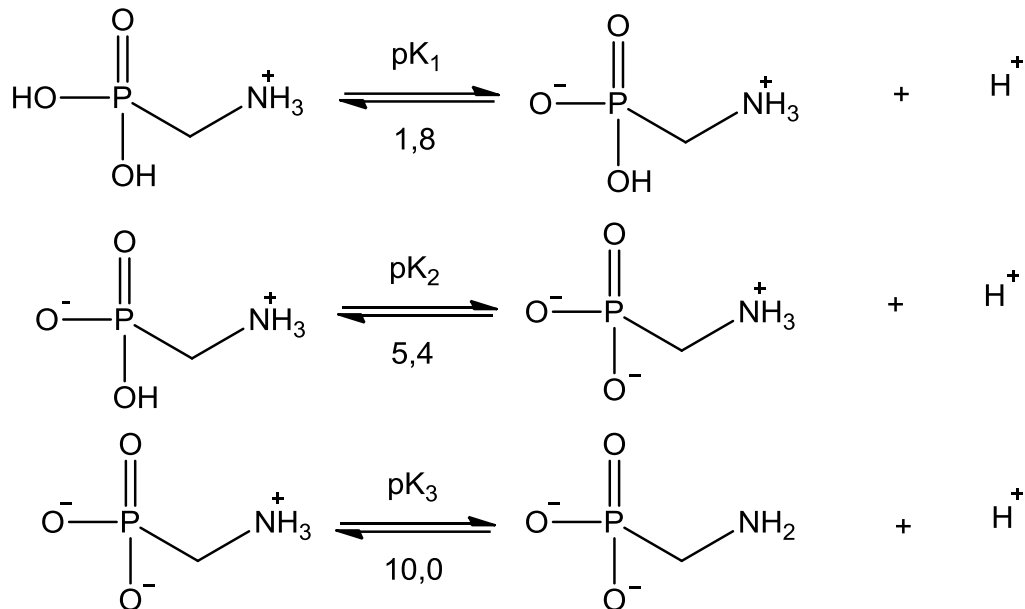


Figura 3. Dissociações do AMPA (adaptada de CHEM *et al.*, 2009).

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 amina e uma negativa no grupo fosfonato e carboxílicos (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002b; REMIÃO, 2007).

Devido às características e propriedades de ambos os compostos, algumas apresentadas nas Tabelas 1 e 2, os mesmos podem ser separados e/ou fortemente retidos em coluna de troca iônica.

2.1.4. Legislação relacionada a qualidade da água para consumo humano

A Lei 9.433, de 8 de janeiro de 1997, instituiu a Política Nacional de Recursos Hídricos e criou o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, baseada nos fundamentos de que a água é um bem de domínio público, é um recurso natural limitado dotado de valor econômico e cujo uso prioritário, em situações de escassez, deve ser o consumo humano e dessedentação de animais, e a gestão dos recursos hídricos visa proporcionar o uso múltiplo das águas (BRASIL, 1997).

As águas são classificadas, segundo seus usos preponderantes, em nove classes, divididas em águas doces, salobras e salinas, conforme Resolução CONAMA Nº 20, de 18 de junho de 1986. Em 2005, o CONAMA dispõe além da classificação dos corpos de água, também sobre diretrizes ambientais para seu enquadramento através da Resolução Nº 357, dividindo em treze classes de qualidade as águas para uso preponderante. Essa resolução estabelece em $65 \mu\text{g L}^{-1}$ o valor máximo de resíduo de glifosato em águas doces de classe 1 (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) e $280 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas doces de classe 3 (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).

Seis anos depois o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011, a qual dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade. Essa nova portaria resultou de uma ampla revisão da Portaria MS nº 518/2004, realizada no período de 2009 a 2011. Teve como uma das modificações, a retirada de substâncias químicas que faziam parte do padrão de potabilidade e definiu-se os valores máximos permitidos (VMP) de cada substância na água com base em uma avaliação quantitativa de risco químico. Estimativa esta, feita com largas margens de segurança (BRASIL, 2011), conforme Tabela 3.

Tabela 3. Agrotóxicos e VMP listados na Portaria 2914.

Agrotóxicos	Valor Máximo Permitido (VMP), $\mu\text{g L}^{-1}$
2,4 D + 2,4,5 T	30
Alaclor	20
Aldicarbe + Aldicarbe sulfona + Aldicarbe sulfóxido	10
Aldrin + Dieldrin	0,03
Atrazina	2
Carbendazim + benomil	120
Carbofurano	7
Clordano	0,2
Clorpirifós + clorpirifós-oxon	30
DDT + DDD + DDE	1
Diuron	90
Endossulfan (α , β e sais)	20
Endrin	0,6
Glifosato + AMPA	500
Lindano (gama HCH)	2
Mancozebe	180
Metamidofós	12
Metolacoloro	10
Molinato	6
Parationa metílica	9
Pendimetalina	20
Permetrina	20
Profenofós	60
Simazina	2
Tebuconazol	180
Terbufós	1,2
Trifluralina	20

Fonte: MS, Portaria 2.914 (2011).

As discussões e revisões em leis e portarias mostram que a regulamentação dessas substâncias é de suma importância e tem atraído a atenção de órgãos governamentais no mundo todo. A Comunidade Europeia por meio da COUNCIL DIRECTIVE de 15 de julho de 1980 estabeleceu em $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ a concentração máxima admissível de qualquer agrotóxico e produtos, desde que a totalidade desses compostos não ultrapasse $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Por outro lado, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, do inglês Environmental Protection Agency), estabelece níveis máximos para agrotóxicos individuais em água destinada ao consumo humano, baseados em estudos toxicológicos e epidemiológicos (DORES, 2001), sendo o limite estabelecido de $700 \mu\text{g L}^{-1}$ para o glifosato em água potável, enquanto o Ministério da Saúde através da Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011, fixa em $500 \mu\text{g L}^{-1}$ para a soma de glifosato e AMPA em água para consumo humano conforme dados apresentados na Tabela 3.

Devido as propriedades herbicidas do glifosato e do seu principal metabólito, o AMPA, bem como a intensa utilização em várias culturas, é de grande importância a implementação de programas de monitoramento e estabelecimento de métodos analíticos validados, aplicáveis a esses compostos presentes no meio ambiente, sejam em baixos, moderados ou elevados níveis de concentração e às matrizes ambientais complexas.

2.1.5. Toxicologia do glifosato e do AMPA

A forma de classificação e avaliação do nível de periculosidade ambiental de um agrotóxico são baseadas em estudos sobre as propriedades físico-químicas, toxicológicas e ecotoxicológicas. Portanto, um agrotóxico pode ser classificado quanto a periculosidade ambiental conforme demonstrado na Tabela 4 (ANVISA, 2014). As classes dos agrotóxicos variam de I a IV e esta classificação permite a interpretação do grau de perigo dos agrotóxicos frente a saúde humana, facilitando a identificação e a dimensão do risco na manipulação destes produtos (LEVIGARD, 2001).

Tabela 4. Classificação dos agrotóxicos quanto à classe toxicológica. Fonte: ANVISA, 2005.

Classificação	Cor da faixa	DL 50 mg kg⁻¹	Dosagem capaz de matar um adulto
Classe I: extremamente tóxico	Vermelha	0 - 50	Algumas gotas
Classe II: altamente tóxico	Amarela	50 – 500	Algumas gotas/ 1 colher de chá
Classe III: mediamente tóxico	Azul	500 – 5000	1 colher de chá/ 2 colheres de sopa
Classe IV: pouco tóxico	Verde	> 5000	2 colheres de sopa/ 1 copo

DL 50: Dosagem letal para 50% dos organismos.

DL₅₀ expressa o valor da dose média letal, por via oral, representada por miligramas do produto tóxico por quilograma de peso vivo, necessários para matar 50% dos animais testados. Essa classificação trata apenas a toxicidade da formulação e refere-se a dose necessária para causar a morte a curto prazo mas não considera efeitos a longo prazo ou quanto ao modo de ação dessas substâncias, pois algumas podem causar danos específicos consideráveis (SCHIESARI, 2014).

A toxicidade do glifosato é considerada relativamente baixa aos mamíferos, pois pelos critérios de classificação citados na Tabela 4 esse composto, na forma de sal de isopropilamida (forma presente na maioria das formulações comercializadas no Brasil) ou sal de amônio, se enquadra na classe IV (pouco tóxico). Isso faz com que essa substância seja uma das mais aplicadas e utilizadas no mundo (RIOS *et al.*, 2002). Porém, seu uso indiscriminado faz com que aumente as concentrações de seus resíduos no solo, na água e em sedimentos, tornando-o de grande periculosidade ambiental sendo tóxico à fauna, à população microbológica e ao homem. Sua toxicidade passa a ser de classe III, ou seja, mediamente tóxico, na forma de sal de potássio.

Esses resíduos ao serem introduzidos no ambiente, podem causar dois tipos de efeitos na saúde humana: a toxicidade aguda, que são efeitos imediatos resultantes da exposição a curto prazo, e a toxicidade crônica, que são efeitos devido

a exposições a longo prazo, ou seja por um tempo mais prolongado (CARVALHO & PIVOTO, 2011).

2.1.5.1. Toxicidade aguda do glifosato e AMPA

O glifosato é considerado de baixa toxicidade aguda para diferentes espécies de animais, com uma dose oral LD₅₀ entre 0,7 e 11,0 mg kg⁻¹ de massa corporal (FAO, 1997).

A interação entre o glifosato e os ingredientes surfactantes ativos adicionados em sua formulação, revela um efeito antagonista da toxicidade do glifosato devido ao potencial tóxico dessas substâncias (BABA *et al.*, 1989 & BOLOGNESI *et al.*, 1997; AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002b).

O principal metabólito do glifosato, o AMPA, apresenta também baixa toxicidade aguda, com LD₅₀: 8,3 mg kg⁻¹ de massa corpórea para ratos, e é pouco irritante para os olhos. Contudo, estudos indicam que esse composto pode causar uma série de problemas toxicológicos em mamíferos pois testes subcrônicos em ratos mostraram que o AMPA foi o responsável por uma queda no peso das fêmeas, aumentou a acidez da urina em ambos os sexos, fez decair a massa do fígado dos machos em todas as doses testadas e excessiva divisão celular no revestimento da bexiga e em parte do rim em ambos os sexos (TEÓFILO, 2003).

2.1.5.2. Toxicidade crônica do glifosato e AMPA

Apesar da toxicidade do glifosato e do AMPA ser considerada relativamente baixa (FAO, 1997; TEÓFILO 2003; ANVISA, 2010), esse herbicida pode causar defeitos crônicos de nascimento em determinadas espécies de animais se administrado em doses elevadas e por um período prolongado. A dose diária aceitável (ADI) por massa corpórea deste composto é consideravelmente baixa (ADI = 0,05 mg kg⁻¹d⁻¹). Em seres humanos, estudos crônicos de alimentação não mostraram perda de peso, efeitos ao sangue e pâncreas ou, ainda, evidência de carcinogenicidade. No entanto, estudos feitos com ratos demonstraram perda de peso, descarga nasal e morte de matrizes grávidas, além de desordens digestivas (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002b). Segundo SUN e colaboradores (2010), um monitoramento avaliativo tem

sido feito em uma variedade de organismos incluindo mamíferos, pássaros, peixes, insetos e a microflora. Pesquisas *in vivo* e *in vitro* em animais sugerem que estas substâncias podem ser teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas.

Em plantas, o glifosato apresenta grande toxicidade, exceto em caules suberizados (aparência de cortiça, típico da vegetação do cerrado). Os efeitos agudo e crônico em seres humanos, são citados como sendo: dermatite de contato e síndrome tóxica após a ingestão de doses elevadas (epigastria, ulceração ou lesão de mucosa gástrica, hipertermia, anúria, oligúria, hipotensão, conjuntivite, edema orbital, choque cardiogênico, arritmias cardíacas, edema pulmonar não-carcinogênico, pneumonite, necrose tubular aguda, elevação de enzimas hepáticas (NORTOX S/A, 2014; AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002b).

A toxicidade do glifosato em mamíferos e pássaros é relativamente baixa, no entanto, por ser não seletivo e de largo espectro de atividade, esse produto fitossanitário conduz à destruição de ambientes naturais e de fontes de alimento de alguns pássaros e anfíbios, levando à redução das populações (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002b). Quanto a toxicocinética, o glifosato é metabolizado principalmente em AMPA o qual aparece no plasma sanguíneo cerca de 3,5 horas após a ingestão e ambos os compostos são excretados através da urina em até 7 dias. A toxicocinética relaciona os processos de absorção, distribuição, armazenamento, a biotransformação e eliminação do agente tóxico em função do tempo, e depende da quantidade desse atuando no organismo e da concentração dele no plasma (BRASIL, 2014).

Em ambientes aquáticos, a toxicidade do glifosato é acentuada com o aumento da temperatura e do pH (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002b), Os peixes e os invertebrados aquáticos são os mais sensíveis a este herbicida e aos outros componentes, como aditivos surfactantes, presentes nas formulações comerciais (SULLIVAN, 1979).

2.1.6. Ocorrência de glifosato e AMPA no meio ambiente

A demanda por uma maior produtividade agrícola sem o aumento da área plantada tem contribuído ao consumo descontrolado e inadequado de produtos químicos, como agrotóxicos e fertilizantes, implicando em sérios problemas ambientais e para a saúde humana (TELLES, 2002; MILHOME *et al.*, 2009). Essa introdução de produtos químicos no ambiente agrícola pode provocar efeitos

indesejáveis pelo fato de exercer uma pressão de seleção nos organismos, mudar a dinâmica bioquímica, acarretando alterações na função do ecossistema e na biomassa microbiana que é de atuação fundamental na transformação e liberação de nutrientes para as plantas podendo então alterar a disponibilidade desses nutrientes e comprometer a fertilidade do solo (SPADOTTO *et al.*, 2004; SPADOTTO, 2006).

O impacto ambiental causado pelo uso de produtos contaminantes, no caso agrotóxicos, pode ser considerado como qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do ambiente, causado por qualquer forma de matéria ou energia resultantes de atividades humanas que afetam de maneira direta ou indiretamente a saúde, a segurança e o bem estar da população; as atividades sociais e econômicas; a biota e a qualidade dos recursos naturais do meio (FRIGHETTO, 1997; SPADOTTO, 2002). Desses agrotóxicos, os herbicidas constituem na escala comercial no mundo industrializado, a principal parcela de vendas (TAROUCO, 2009), principalmente os formulados a base de glifosato tem ganho expressão e importância em virtude do crescimento das áreas semeadas com culturas geneticamente modificadas e também por se tratar de um herbicida sistêmico com amplo espectro de ação (MORAES, 2010).

Quando o glifosato é aplicado, parte desse produto é diretamente absorvida pelas plantas daninhas, e parte é encaminhada para o solo sendo biodegradado por organismos heterotróficos (ANDRÉA *et al.*, 2004). O quanto de herbicida ficará retido no solo e o quanto estará disponível na solução do solo, é determinado pelo processo de sorção, ou seja, interação herbicida-sedimento-água (KRAEMER *et al.*, 2009), e esta proporção afeta a sorção pelas plantas, a degradação microbiana, fotólise, lixiviação e transporte (LOCKE *et al.*, 2008).

A adsorção do glifosato ao solo é influenciada pela presença de cátions específicos e correlacionada com a capacidade do solo em adsorver íons fosfato e também com as concentrações de determinados cátions como Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} e Ca^{2+} , e por ser um composto dipolar, pode ser altamente adsorvido aos óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio e à matéria orgânica do solo (GALLI *et al.*, 2005). Sua molécula apresenta vários mecanismos de ligação aos solos, como mostra a Figura 4, podendo tanto ligar-se a fração oxídica do solo como ser adsorvida eletrostaticamente aos minerais da argila e a matéria orgânica, ou mesmo pela formação de pontes de hidrogênio com a própria matéria orgânica do solo (PRATA & LAVORENTI, 2002).

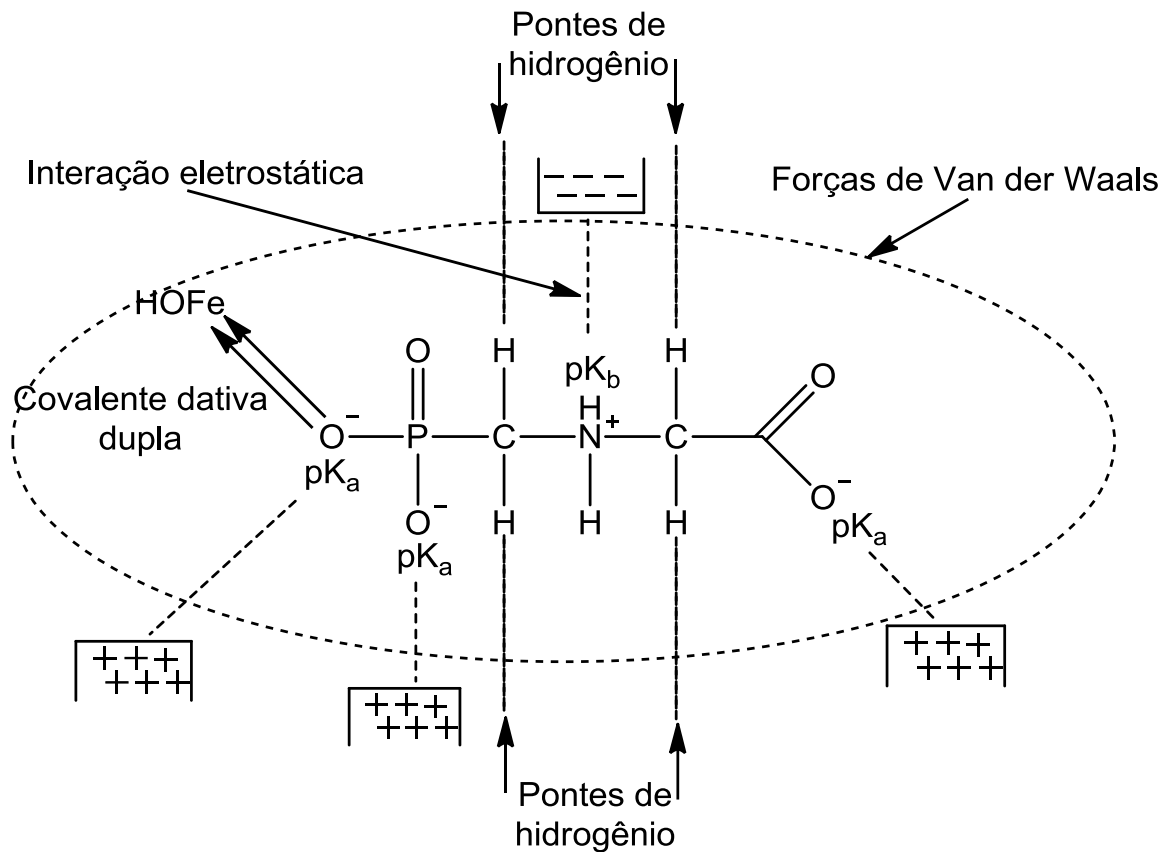


Figura 4. Esquema dos mecanismos envolvidos na sorção do glifosato em solo (adaptado de PRATA & LAVORENTI, 2002).

As principais rotas de degradação do glifosato no solo consistem em duas transformações. Na primeira ocorre a transformação do glifosato em sarcosina (metabólito intermediário) por ação da bactéria *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase): a sarcosina entra no metabolismo destes microrganismos e de outros, degradando-se. Esta rota é, no entanto, pouco citada na literatura. A segunda rota consiste na transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA), seu principal metabólito, conforme apresentado na Figura 5 (CHEN *et al.*, 2007; GALLI *et al.*, 2005; AMARANTE JUNIOR, 2002b; MENSINK *et al.*, 1994).

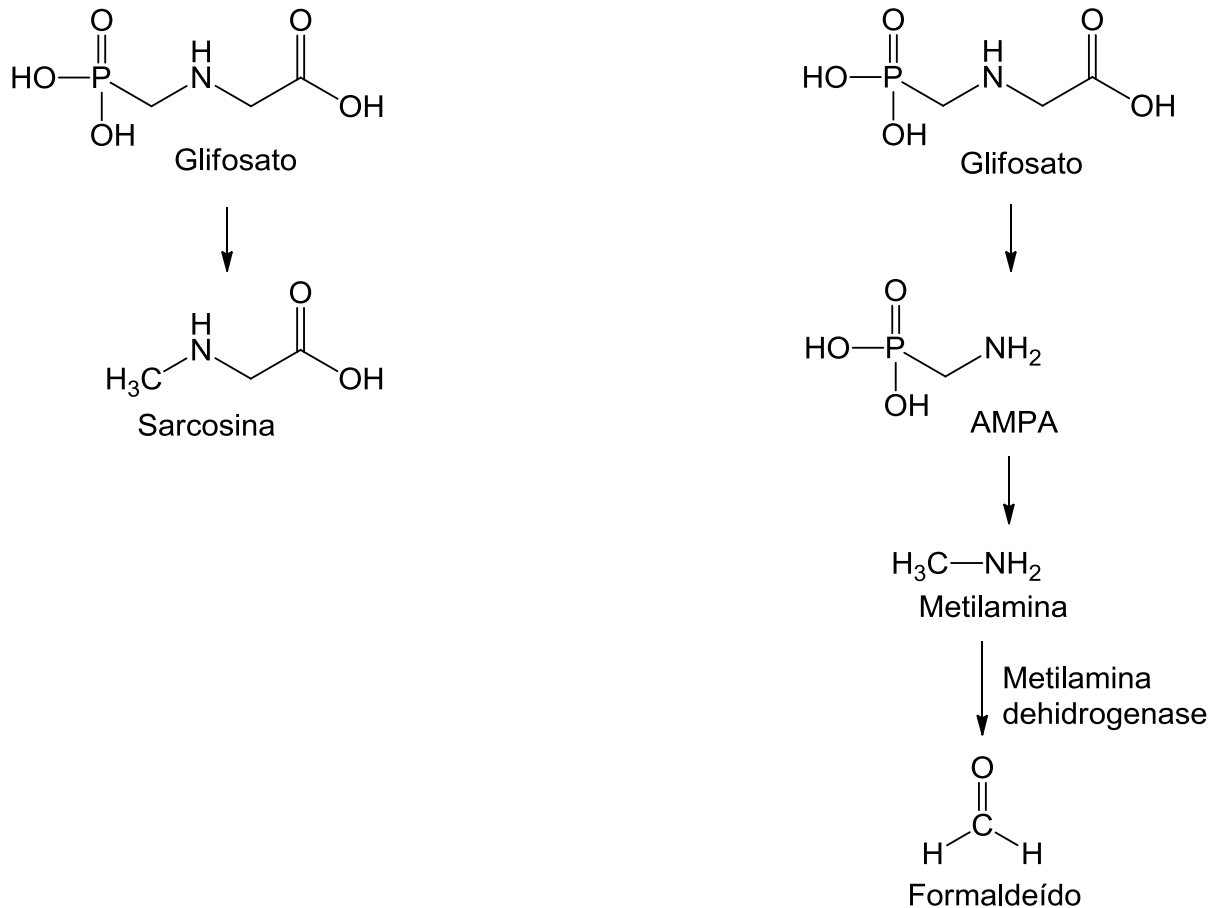


Figura 5. Rotas de decomposição microbiológica do glifosato (adaptado de AMARANTES JUNIOR *et al.*, 2002b).

No caso da presença em águas, existem registros mundias da contaminação por agrotóxicos utilizados na agricultura tanto em águas superficiais quanto subterrâneas. O herbicida glifosato, embora seja amplamente utilizado na agricultura, pode também ser utilizado no controle de plantas daninhas aquáticas emergentes em águas superficiais ou margens de corpos d'água (SOLOMON & THOMPSON, 2003). Os principais meios de dissipação na água são por interações com sedimentos e degradação microbiológica, sendo essa de maior velocidade na degradação, decompondo-se em AMPA e em algumas vezes em dióxido de carbono (GIESY *et al.*, 2000).

Devido à grande solubilidade do glifosato e seus sais na água, considera-se que esses compostos tenham uma elevada mobilidade em meio aquoso, por meio da forte e rápida interação com sedimentos, especialmente em águas pouco profundas e

turbulentas, ou aquelas que levam grandes cargas de partículas, removendo o glifosato da solução do solo (SOLOMON & THOMPSON, 2003).

A principal característica de um herbicida relacionada a sua capacidade de contaminação de águas subterrâneas, de acordo com critérios elaborados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2013) e pelo índice GUS (GUSTAFON, 1989) é o potencial de lixiviação. Nesse mesmo sentido, também classifica-se o herbicida em relação à sua capacidade de contaminar as águas segundo o método de GOSS (GOSS, 1992). Conforme esses critérios, a movimentação no solo, e consequente classificação, é governada por características físico-químicas do composto, conforme Tabela 5.

Tabela 5. Classificação do glifosato quanto ao potencial de contaminação de água subterrânea (EPA e GUS) e superficial (GOSS), (SANTOS, 2013).

Método	Características	Classes
USEPA ¹	Solubilidade em água, coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo, constante da Lei de Henry, meia vida em solo e água e especiação.	Contaminante Potencial – CP Não contaminante - NC
GUS ²	Meia vida no solo, coeficiente de adsorção à matéria orgânica.	Não Lixiviável – NL (GUS < 1,8) Faixa de Transição – FT (1,8 < GUS < 2,8) Provável Lixiviação – PL (GUS > 2,8)
GOSS ³	Meia vida no solo, coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo e solubilidade em água.	Alto, médio e baixo Potencial de Contaminação de águas superficiais. Dissolvido em água ou Associado ao Sedimento (APCDA ou APCAS, MPCDA ou MPCAS, BPCDA ou BPCAS)

¹Método *screening* – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, (USEPA, 2013). Também são considerados tipo de solo, posição do aquífero e precipitações. ²*Groundwater Ubiquity Score* – GUS (Gustafson, 1989). ³Método de GOSS (GOSS, 1992).

Nesse sentido classifica-se o glifosato como CP segundo o método USEPA, NL pelo método de GUS e de MPCDA e MPCAS por GOSS conforme parâmetros descritos na Tabela 5 (SANTOS, 2013).

A persistência do glifosato em água é mais curta do que em solo, pois o glifosato é muito solúvel em água, dispersando-se rapidamente sem se acumular em altas concentrações no perfil hídrico (MORAES, 2010).

Estudos para avaliar a estabilidade do glifosato indicaram que o mesmo mostrou-se estável em água com pH 3, 5, 6 e 9, a uma temperatura de 35 °C. Evidenciou-se também a estabilidade à fotodegradação em pH 5, 7 e 9, em solução tampão sob luz natural, e a meia-vida por hidrólise foi maior que 35 dias (KOLLMAN & SEGAWA, 1995), indicando que o glifosato tem uma pequena propensão à decomposição por hidrólise (BRONSTAD & FRIESTAD, 1985).

Para monitorar a presença de glifosato e do metabólito AMPA em águas dos canais de irrigação e drenagem no litoral sul do Rio Grande do Sul, um estudo foi realizado por Mattos e colaboradores (2002), onde foi verificado que em até 120 dias após aplicação (DAA), havia a presença do herbicida, concluindo que determinado nível de segurança só será alcançado 120 dias após a aplicação (DAA) da formulação de glifosato.

STEMPVOORT e colaboradores (2014) analisaram a presença de resíduos de glifosato e a fonte de AMPA em córregos de captação de águas subterrâneas provenientes de áreas urbanas do Canadá e evidenciaram que os resíduos de AMPA eram produtos da degradação do glifosato aplicado em zonas comerciais e industriais, e não dos resíduos de produtos farmacêuticos, detergentes e adoçantes capazes de se correlacionarem com o AMPA nos resíduos domésticos lançados nas redes de esgoto. Fatores como o uso da terra e aplicações do formulado de glifosato em regiões próximas a amostragem em estudo, também são citadas como fontes de resíduos de ambos os compostos.

BOTTA (2009), estudaram a dinâmica de transferência de glifosato e AMPA dos sistemas de esgoto urbano, das galerias de águas pluviais e dos efluentes da estação de tratamento de águas residuais (WWTP, do inglês Wastewater Treatment Plant) para a bacia hidrográfica do Rio Orge na França, e concluíram que a fonte dos resíduos de AMPA e glifosato são diferentes.

A contaminação por glifosato das águas superficiais se dá principalmente em períodos de chuva através das galerias de águas pluviais do escoamento urbano conforme aplicações do formulado em rodovias e ferrovias, já a contaminação por AMPA é resultado pelo escoamento através dos sistemas de esgoto, dos efluentes da estação de tratamento de águas residuais (WWTP), e também das galerias pluviais em épocas de chuva, mas a diferença é que o composto AMPA é originado nas águas residuais domésticas pela degradação de detergentes a base de ácidos fosfóricos,

etilenodiamina tetrametileno fosfonato (EDTMP) ou ácido fosfórico dietilenotriamina-penta-metileno (DTPMP) os quais também podem ser degradados em AMPA.

SKARK e colaboradores (2004), sugeriram que a contaminação por resíduos de glifosato em águas superficiais na Europa, deu-se pela aplicação desse herbicida nas vias férreas, esse estudo acabou recebendo apoio de pesquisas envolvendo a dissipação dos herbicidas aplicados nas vias férreas e nas estradas (RAMWELL *et al.*, 2004).

Em se tratando de extensivo uso urbano de glifosato nos Estados Unidos, verificou-se que amostras de água coletadas em diferentes locais, continham resíduos de glifosato e AMPA, e apresentavam-se na frequência de 17,5 e 67,5% respectivamente (KOLPIN *et al.*, 2006). Essa pesquisa foi realizada em virtude de outra que mostrou os baixos níveis de glifosato detectados em urina de trabalhadores rurais após a aplicação desse herbicida (ACQUAVELLA *et al.*, 2004).

Quanto aos efeitos causados em organismos aquáticos, pode-se citar o estudo realizado por TATE e colaboradores (2000) no qual verificou-se que caramujos aquáticos (*Pseudosuccinae columella*) ao serem expostos ao herbicida tiveram um incremento na postura de ovos e no teor de aminoácidos em seus tecidos, tendo então o glifosato proporcionado um efeito estimulante na reprodução ao invés de prejudicial. Em espécie de crustáceo aquático como *Daphnia pulex* e em algas *Scenedesmus* spp., a exposição ao glifosato demonstrou que esse não apresentou nenhum efeito adverso, e ainda estimulou o crescimento das algas, fato esses pode ser explicado pela liberação de nitrogênio e fósforo do metabolismo de glifosato pela *Daphnia pulex* (BENGTSSON *et al.*, 2004).

TSUI e CHU (2003), verificaram resultados contrários, onde algas fotossintéticas, por possuírem rota metabólica similar as plantas superiores, são mais sensíveis ao efeito do herbicida na forma de sal de isopropilamina do que organismos não fotossintéticos.

Para verificar o efeito da aplicação direta de glifosato sobre anfíbios aquáticos e terrestres, RELYEA (2005) realizou um estudo sob condições de campo e observou que após três semanas da aplicação do produto houve morte de 96-100% das larvas dos anfíbios. RELYEA (2005) também realizou a aplicação em período pós metamorfose (juvenil), onde foi verificado morte de 68-86% dos anfíbios juvenis um dia após tratamento, e concluiu que o produto acarreta elevadas taxas de mortalidade de anfíbios.

Quanto a presença do herbicida no ar é pouco provável, visto que, os diferentes sais de glifosato não têm pressão de vapor significativa e perdas da superfície tratada para atmosfera são pequenas (BATTAGLIN *et al.*, 2005). Entretanto, gotículas podem estar presentes no ar através da interação com outros agrotóxicos provocando assim a detecção de glifosato, na água da chuva, conforme ocorrido na União Européia (QUAGHEBEUR *et al.*, 2004). Esses autores também observaram que, durante o período compreendido entre 1997 e 2001 detectou-se glifosato unicamente na água da chuva na Bélgica em 2001, com uma frequência de 10% e uma concentração máxima de 6,2 µg L⁻¹.

Nos Estados Unidos, foram coletadas amostras de água da chuva em diferentes regiões entre os anos 2001-2006, e foi possível verificar que glifosato e AMPA estavam presentes na água da chuva em uma das regiões avaliadas (SCRIBNER *et al.*, 2007).

Em um outro estudo, MAJEWSKI (2014), relata a detecção do herbicida glifosato, bem como de seu produto de degradação o AMPA, em 86% das amostras de ar e 77% das amostras de água de chuva no estado do Mississippi, nos EUA.

Portanto, as propriedades que determinam o comportamento do glifosato e seu metabólito e que caracterizam ambos os compostos quanto ao baixo impacto ambiental necessitam de estudos, apesar da amplitude das aplicações desse ingrediente ativo. O produto fitossanitário é degradado por microrganismos tanto no solo quanto na água, sendo que no solo é fortemente retido na forma resíduo ligado e na água é altamente solúvel, podendo ter efeitos estimulante ou não a organismos aquáticos, apesar da volatilidade e evaporação serem insignificantes, algumas gotículas desses compostos interagem com outros agrotóxicos e com isso foram detectadas no ar conforme já citado. Logo, é de grande importância o desenvolvimento de estudos para compreender a ocorrência desses compostos no meio ambiente.

2.2. CROMATOGRAFIA

2.2.1. Cromatografia iônica

A cromatografia de troca iônica ou cromatografia iônica (IC, do inglês ion chromatography) é uma variante da cromatografia líquida de alta eficiência -CLAE (HPLC, do inglês high performance liquid chromatography), e é diferenciada devido aos mecanismos de separação, no caso, troca iônica e pelos tipos de fases estacionárias (WEISS, 2004). Os primeiros estudos envolvendo troca iônica, registrados na literatura, foram feitos por WAY & THOMPSON em 1850, onde foi descoberta a capacidade dos solos em removerem íons NH_4^+ de soluções que os percolavam, substituindo por uma quantidade equivalente de íons Ca^{2+} . A partir dessas observações desenvolveu-se posteriormente o processo de troca iônica para o tratamento de água.

Por volta de 1935 começaram a ser produzidas as primeiras resinas de troca iônica, como meio químico importante em processos analíticos. Posteriormente, trabalhos pioneiros como o de MOORE e STEIN (1958), permitiram avanços e incentivaram a outros pesquisadores a desenvolverem trabalhos com esta nova técnica (WEISS, 2004).

Em 1975, SMALL, STEVENS e BAUMANN introduziram a cromatografia de íons através do desenvolvimento de uma célula de condutividade como detector combinado com um método químico de redução da condutividade, resolvendo assim o problema da alta condutância dos eluentes.

Na década de 1980 desenvolveu-se colunas de alta eficiência com partículas de diâmetro de 5 a 8 μm e com isso, foi possível reduzir o tempo de análise. Já no início da década de 1990 o aumento nos tipos de colunas cromatográficas teve como objetivo fornecer fases estacionárias com especial seletividade (PAULL, 2005).

Atualmente os trocadores de íons em cromatografia consistem de partículas esféricas de polímero com um diâmetro de aproximadamente 5 a 15 μm . Usam-se métodos para ligar os chamados grupos âncoras na superfície desse polímero que são usados como espaçadores entre o polímero básico e os grupos funcionais efetivos. Esses grupos funcionais consistem de íons amônio quaternário, os quais são quimicamente ligados aos grupos âncoras (EITH *et al.*, 2007).

As aplicações das resinas trocadoras de íons em separações analíticas são bastante úteis como fases estacionárias que são empregadas para separações de

espécies carregadas onde os solutos com cargas de sinais contrários a esta fase são seletivamente adsorvidos. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos, por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária (SPADARO, 2006).

Existem dois tipos de cromatografia iônica em uso, uma com base em supressores e outra de coluna única (sem supressor). Na técnica baseada em supressores, a coluna do trocador iônico é seguida por uma coluna supressora ou por um sistema com membrana supressora que converte o eluente iônico em espécies não-iônicas que não interferem na detecção condutométrica dos íons dos analitos.

Na cromatografia por troca iônica em coluna única (sem supressor), os íons dos analitos são separados em um trocador iônico de baixa capacidade por meio de um eluente de baixa força iônica, ou seja de baixa condutividade, que não interfere com a detecção condutométrica dos analitos (SKOOG, 2006).

Os métodos cromatográficos são distinguidos pelo mecanismo de separação utilizado, os quais são:

- Troca iônica
- Formação de par iônico
- Exclusão iônica

Atualmente o principal mecanismo utilizado para separações é o de troca iônica, conhecido como cromatografia iônica (IC). A cromatografia de par iônico e a cromatografia por exclusão iônica são consideradas como sendo aplicações mais específicas (EITH *et al.*, 2007).

Para este trabalho foram empregados dois métodos analíticos: a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) e a cromatografia iônica de alta performance (HPIC). Tendo em vista os métodos utilizados, parte do enfoque desta revisão bibliográfica será voltado para a cromatografia de troca iônica.

O princípio na cromatografia de troca iônica baseia-se em uma reação química entre os íons de uma solução e um trocador contendo os grupos funcionais, onde ocorre a fixação dos íons através de forças eletrostáticas. A separação de cátions pode ser através de grupos ácido sulfônico, e a de ânions através de grupos de amônio quaternário.

O processo de troca iônica pode levar a uma condição de equilíbrio, o qual depende da afinidade dos íons participantes em relação aos grupos funcionais da fase

estacionária. Teoricamente, íons com mesma carga podem ser completa e reversivelmente trocados entre as duas fases. A Figura 6 é um esquema dos processos de troca para cátions e ânions. Os íons do analito são chamados **A**, os íons do eluente competindo com os íons do analito para a troca são identificados com **E** (EITH et al., 2007).

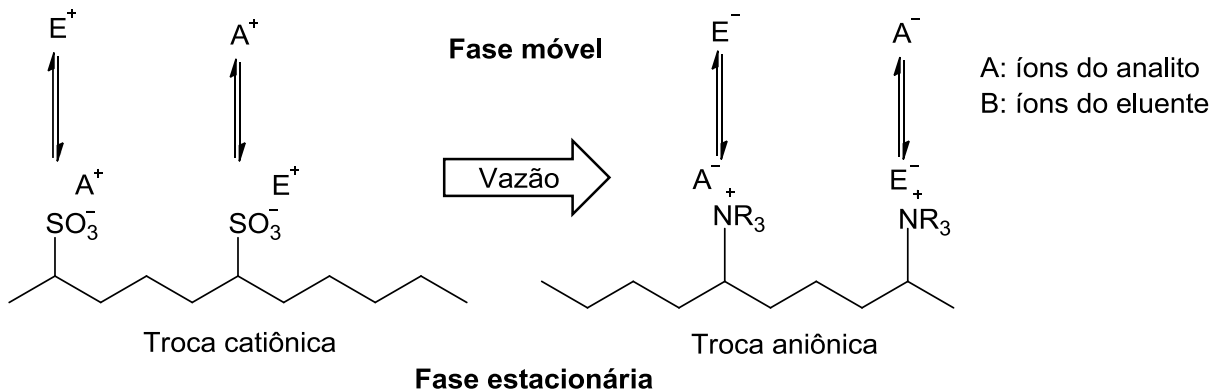
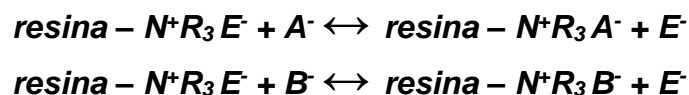


Figura 6. Esquema mostrando o processo de troca iônica em I.C. (Adaptado de EITH et al., 2007).

Normalmente os trocadores iônicos consistem de fases sólidas onde são fixados os grupos iônicos em sua superfície. Devido a condição de eletroneutralidade existe sempre um contra-íon de carga oposta nas proximidades do grupo funcional. Esse contra-íon geralmente tem origem na fase móvel e, por isso, também é conhecido como íon do eluente. Se uma amostra for adicionada contendo dois íons A^- e B^- , esses vão então brevemente substituir os íons do eluente E^- e são retidos na carga fixa do trocador antes que sejam de volta trocados pelo íon do eluente E^- . Para a cromatografia de ânions, objeto desse estudo, isso resulta nos seguintes equilíbrios reversíveis:



As técnicas de detecção podem ser subdivididas em (PAPADOYANNIS, 2004; EITH et al., 2007):

- detecção eletroquímica, usando condutividade, amperometria ou potenciometria;
- detecção espectroscópica, utilizando ultravioleta/visível (UV/vis), índice de refração, fluorescência, absorção atômica ou emissão atômica;

- técnicas de acoplamento, geralmente acoplam-se detectores de espectrometria atômica;
- técnicas baseadas em reações pós-coluna.

O sistema eletroquímico frequentemente usado em CI é o detector de condutividade ou detecção condutométrica, esquematizado na Figura 7, que tem uma participação de mercado de aproximadamente 55% no setor de cromatografia de íons. Eletrólitos aquosos são frequentemente usados como fase móvel em cromatografia de íons, o detector deve ser capaz de responder às mudanças relativamente pequenas na condutividade total do eluente causada pelos íons analisados. Pelo uso das chamadas técnicas de supressão de condutividade, a condutividade de fundo (background) de alguns eluentes pode ser drasticamente reduzida; no caso de ânions de ácidos fortes, é possível melhorar consideravelmente a sensibilidade.

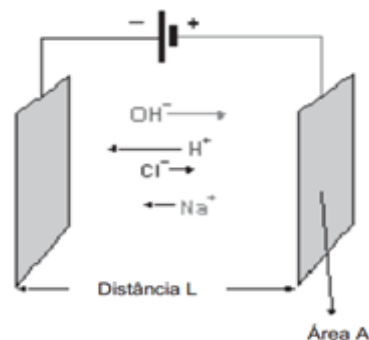


Figura 7. Construção de uma célula de condutividade. Adaptado de EITH et al., 2007.

O sistema de supressão, como mostra as Figuras 8A e 8B, é empregado na melhora da sensibilidade de detecção de íons por detecção condutométrica. Nesse sistema é possível reduzir a condutividade do eletrólito empregado como eluente na cromatografia iônica. Contudo o processo de supressão pode ser considerado como parte do sistema de detecção. Pode-se definir a supressão como sendo a neutralização por troca iônica do sal de um ácido fraco ou base fraca. Os principais efeitos da supressão são (EITH *et al.*, 2007):

- Redução da condutância de fundo causada pelo eletrólito do eluente
- Redução do ruído
- Aumento da sensibilidade
- Ampliação da faixa linear de trabalho
- Aumento do sinal analítico do detector.

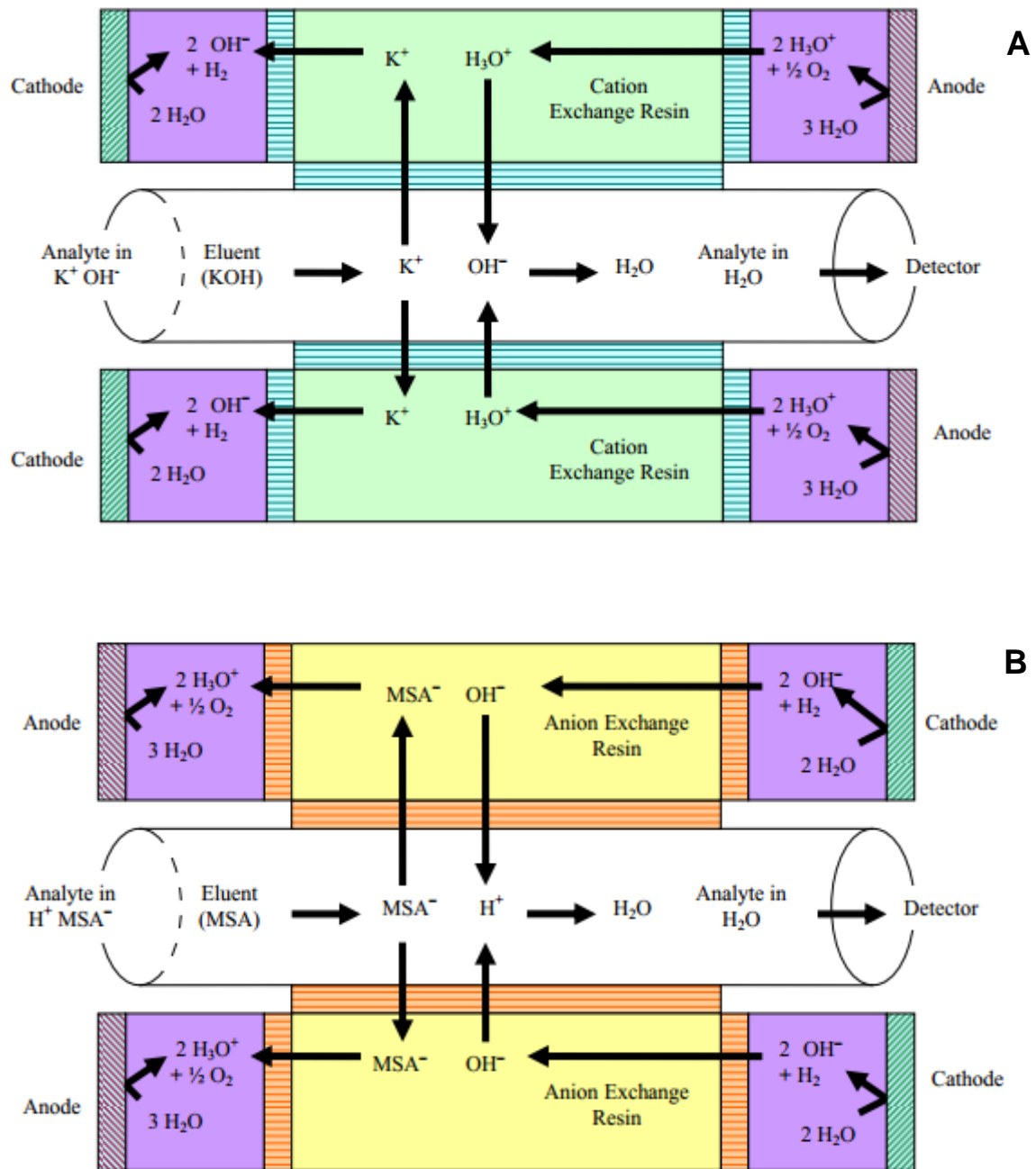


Figura 8. Sistema supressor para análise de ânions (A). KOH= hidróxido de potássio e de cátions (B). MSA=ácido metassulfônico. Fonte: www.dionex.com/en-us/webdocs/87169-Man-Suppressor-CES-300-065386-02-Aug12.pdf.

A abaixo, destaca-se os componentes de um sistema de cromatografia iônica.

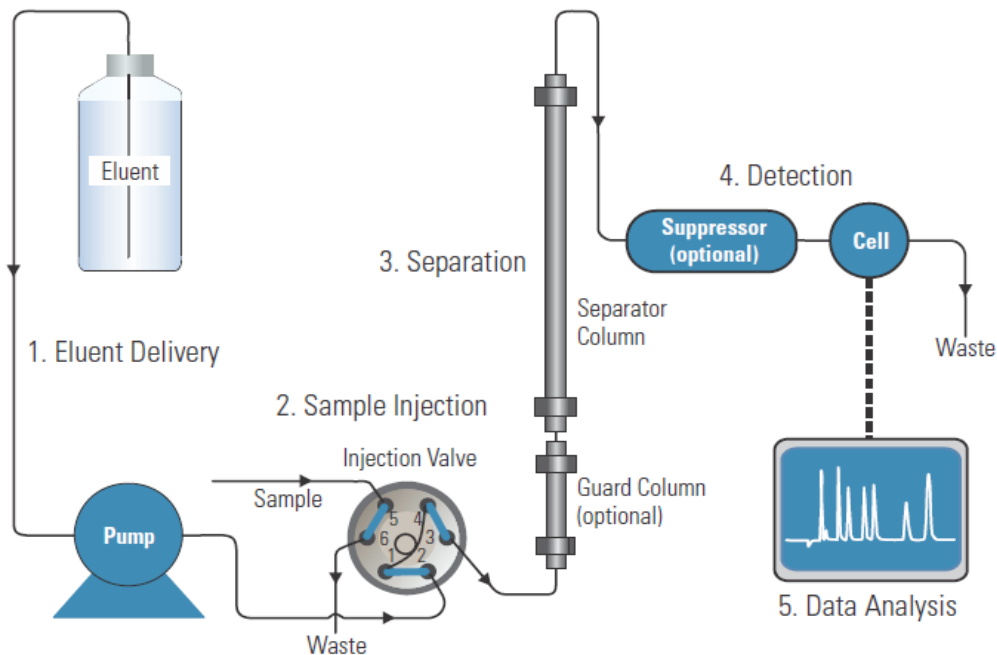


Figura 9. Sistema de cromatografia iônica. Fonte: www.dionex.com/en-us/webdocs/114345-Man-IC-ICS-4000-Ops-Dec2012-DOC065468-01.pdf.

2.2.2. Cromatografia Iônica Capilar

A principal área onde o desenvolvimento e perspectivas são mais forte em cromatografia é a miniaturização desses sistemas, pois com isso, torna-se possível a redução no consumo de solventes e reagentes, e há também uma melhora considerável no desempenho. Essa crescente tendência, pode envolver a etapa separação, na coluna cromatográfica, através do seu encurtamento, dos formatos capilares, do tamanho de partículas da fase estacionária; diminuição nos canais de separação em microchips, e também através da redução do sistema em si, isto é, do instrumento cromatográfico (HADDAD *et al.*, 2008).

A introdução das primeiras colunas capilares ocorreu através do trabalho revolucionário de GOLAY em 1958 nas análises por cromatografia gasosa (GC, do inglês gas chromatography). Em cromatografia líquida pressurizada os primeiros trabalhos diminuindo o diâmetro interno das colunas tiveram início em 1967 quando HORVÁTH e colaboradores, estudaram a dispersão de um pico, em iguais condições, em duas colunas: uma com 0,3 e outra com 1 mm de diâmetro interno (d.i.).

Em 1978, ISHII e colaboradores, relataram trabalhos com colunas recheadas, usando colunas de politetrafluoretileno (PTFE) com 0,5 mm de d.i. recheadas com partículas de 30 μm . Ainda em 1978, TSUDA e NOVOTNY reduziram o diâmetro das colunas para valores entre 30 a 200 μm , recheadas com partículas de alumina de 10 a 100 μm , e concluíram que as colunas com diâmetro de 70 μm recheadas com partículas de 30 μm apresentaram boa relação entre eficiência e pressão. Em 1979, SCOTT e KUCERA separaram n-alkilbenzenos utilizando cromatografia líquida e colunas com 1 mm de diâmetro interno.

Em cromatografia iônica capilar (CIC) o primeiro trabalho envolvendo esse novo tipo de separação foi publicado em 1983 por ROKUSHIKA e colaboradores.

O progresso na CIC foi ligado principalmente com a introdução de colunas monolíticas e a utilização de detectores de condutividade adequados.

A eficiência da coluna com fase estacionária monolítica polimérica é menor do que colunas monolíticas a base de sílica, isso se deve às diferentes morfologias das duas classes de monólitos e ao fato de que os analitos típicos em estudo são de baixo peso molecular e como resultado, taxas relativamente altas de difusão pode diminuir as vantagens do transporte convectivo característico dos monólitos (HADDAD, 2008).

Para a detecção em CIC existe a necessidade de sistemas de micro-supressores robustos que podem melhorar a sensibilidade na detecção condutométrica. Por outro lado, existem oportunidades para os métodos de detecção indireta com base em diodos emissores de luz de baixo custo (O'TOOLE *et al.*, 2006) ou de detecção fluorescente (JONG e LUCY, 2006; HADDAD, 2008).

2.2.3. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A combinação da cromatografia líquida com a espectrometria de massas pode ser vista como a combinação ideal entre separação e detecção permitindo análises rápidas com seletividade e sensibilidade. Uma das mais importantes funções do sistema é desempenhada pela interface empregada no acoplamento LC-MS/MS que permite a remoção de toda ou, pelo menos, uma parte significativa da fase móvel. O emprego de colunas curtas e com diâmetro interno menor, associado ao uso de fase estacionária com tamanho de partícula de cerca de 2 μm permite trabalhar com vazão da fase móvel abaixo de 0,5 mL min^{-1} melhorando a eficiência de separação e o desempenho da interface.

Os compostos separados por HPLC são substâncias polares e de baixa volatilidade e/ou sensíveis à temperatura, de maneira que não é possível ionizá-los utilizando as técnicas de ionização mais comumente utilizadas inicialmente na espectrometria de massas. Com isso, para o acoplamento LC-MS/MS foi necessário o desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização alternativas (ARDREY, 2003; CHIARADIA, 2008). Com o desenvolvimento de novas interfaces essas incompatibilidades foram superadas, e com isso, cada vez mais a LC-MS vem sendo utilizada, pois o acoplamento dessas técnicas permite um aumento de seletividade e sensibilidade proporcionando o monitoramento de centenas de agrotóxicos em uma única análise (PRESTES *et al.*, 2009).

A principal interface empregada na análise de agrotóxicos polares é baseada na Ionização a Pressão Atmosférica (API, do inglês atmospheric pressure ionization) que engloba a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês atmospheric pressure chemical ionization) e a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês electrospray ionization). A fonte ESI é a mais empregada na análise de agrotóxicos e funciona conforme descrito a seguir:

Ionização por Eletronebulização (ESI): Eluato da coluna contendo o analito de interesse passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída desse capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (spray) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. Essa dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂), e à medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares torna-se maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Nesse momento ocorre a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram, são então produzidos os íons do analito após serem submetidos a uma série dessas explosões, os mesmos são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização, como apresentado na Figura 10 (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Através dessa fonte de ionização é possível ionizar compostos sensíveis à temperatura sem que esses sofram degradação, uma vez que, a ionização ocorre diretamente em solução (CHIARADIA *et al.*, 2008). O emprego de LC-MS/MS

utilizando ESI como fonte de ionização torna-se ideal para análise de moléculas polares e com massas molares relativamente grandes como proteínas, aminoácidos, e substâncias de interesse na área da bioanalítica, alimentos e farmacêutica (LANÇAS, 2009).

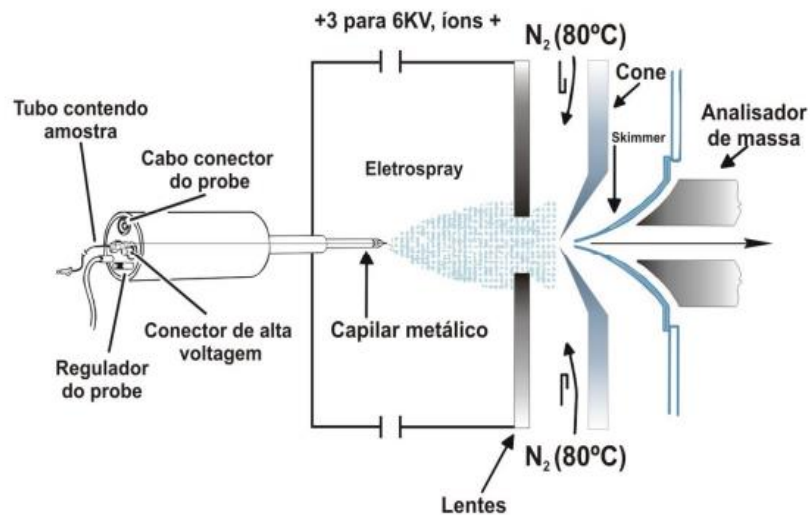


Figura 10. Esquema prático da fonte de ionização ESI. Fonte: <http://www.ioc.fiocruz.br>

Neste trabalho foi utilizado LC-MS/MS com fonte de ionização por eletronebulização, operando no modo de monitoramento seletivo de íons (SRM, do inglês Selected Reaction Monitoring).

2.3. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO

Tendo em vista a ampla utilização do herbicida à base de glifosato em todo o mundo e o grande interesse em determinações de resíduos desse composto e seu produto de degradação o AMPA, torna-se importante o desenvolvimento de métodos analíticos para a extração e determinação desses compostos em amostras naturais.

Os métodos de extração de ambos os compostos em amostras de água mais utilizados empregam a técnica de Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês Solid Phase Extraction) com resinas de troca iônica, tornando possível realizar a análise por simples filtração e evaporação da amostra. Outra metodologia bastante utilizada envolve a derivação para a obtenção de compostos apolares que podem ser extraídos com solventes orgânicos (AMARANTE JUNIOR, 2002a).

O principal problema na análise desses compostos está na natureza peculiar de ambos, pois são substâncias altamente polares de alta solubilidade em água tornando-os assim de difícil extração e análise em meio a outros agrotóxicos impossibilitando o desenvolvimento de metodologias multiresíduo com esses compostos.

Quanto às metodologias para determinação do glifosato e AMPA, o método mais utilizado atualmente para a separação cromatográfica é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) conforme KIM e colaboradores, (2007). Os métodos de detecção do glifosato são bastante discutidos na literatura, visto que esse composto absorve radiação eletromagnética em comprimentos de onda próximos a 200 nm, dificultando o uso direto de detectores ultravioleta ou colorimétricos. Nessa faixa de comprimento de onda ocorre absorção dos gases que compõem o ar atmosférico, tornando o cromatograma ilegível se não utilizado um sistema de vácuo. A alternativa para o problema foi a derivatização, tendo como objetivo o acoplamento de grupos cromóforos ao analito e assim tornando-o detectável em comprimentos de onda maiores que 215 nm.

Nas determinações de glifosato por cromatografia líquida, o pH da fase móvel é importante para a adequação do grau de dissociação desse composto e com isso possibilitando o controle da carga total do íon glifosato. Essa quantidade de cargas é responsável pela maior ou menor afinidade do glifosato em forma aniônica com a coluna de troca iônica, influenciando parâmetros da cromatografia, como o tempo de retenção do analito, resolução e simetria do sinal.

DIMITRAKOPOULOS e colaboradores, (2010) apresentam a aplicação de cromatografia de íons com a geração de eluente eletrolítica e supressão de fase móvel para a detecção condutimétrica direta de glifosato e seu ácido aminometilfosfônico produto de degradação (AMPA). Os compostos foram separados numa coluna de troca aniônica AS18 Dionex com gradiente de KOH 12-40 mmol L⁻¹ de 9-9,5 min.

O efeito de intensidade da corrente supressora sobre a interação eletrostática desses compostos anfotéricos com as membranas de troca catiônica foi avaliada. A técnica de supressão foi proposta para a limitação de alargamento do pico e do ruído de linha de base, a fim de melhorar a sensibilidade do método e detectabilidade. Observou-se que os carbonatos presentes na amostra co-eluída com AMPA em águas naturais. O método foi aplicado para a análise de água para consumo humano e em amostras de laranja, alcançando um limite de detecção apenas para o glifosato de 0,24 mg L⁻¹ já que o AMPA co-eluiu com o carbonato.

HAO e colaboradores (2011) desenvolveram um método de determinação de resíduos de glifosato e AMPA em água que utiliza a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série e injeção direta da amostra no sistema cromatográfico com coluna cromatográfica de fase reversa com fraca troca iônica, não sendo necessárias pré-concentração e derivatização do analito, os autores utilizaram como fase móvel com gradiente (A) 1:1 de metanol e água e (B) 300 mM de acetato de amônio em 1:1 de metanol e água e vazão de 0,4 mL min⁻¹. O método proposto apresentou baixos limites de detecção de 1,2 e 0,9 µg L⁻¹ para glifosato e AMPA respectivamente.

Apesar do glifosato não poder ser determinado por cromatografia gasosa devido a sua temperatura de decomposição, ABREU e colaboradores (2008) desenvolveram um método de determinação de glifosato em grãos de soja utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) precedida por uma etapa de derivatização, a qual foi feita com a adição de anidrido trifluoroacético (TFAA) e trifluoroetanol (TFE), sob aquecimento a 100 °C por 1 hora (Figura 11). O limite de detecção obtido foi de 60 µg L⁻¹.

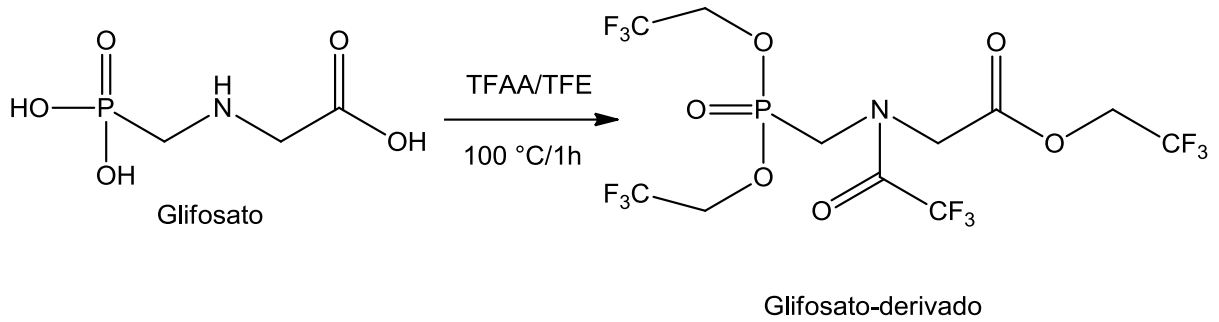


Figura 11. Derivatização do glifosato com TFAA e TFE. Adaptado de ABREU, 2008.

SILVA e colaboradores (2011) desenvolveram um método de determinação de glifosato em produtos formulados e em água por espectroscopia de refletância difusa. A derivatização foi efetuada com *p*-DAC, transformando o analito em um sal, como mostra a Figura 12, para que a interação do analito com a onda eletromagnética incidida se desse em comprimento de onda maior que 220 nm, a fim de não haver interferência com o ar atmosférico. O limite de detecção foi de $7,23 \mu\text{g mL}^{-1}$ em comprimento de onda 495 nm.

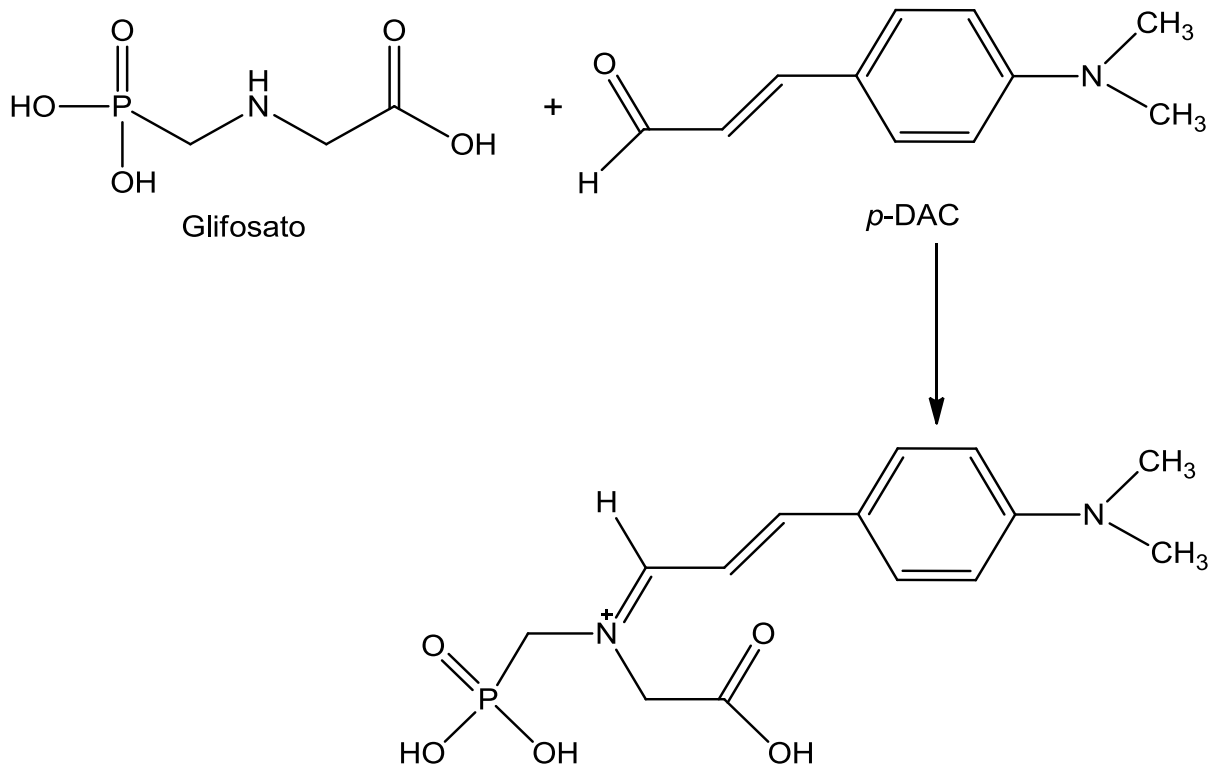


Figura 12. Estruturas do reagente *p*-DAC e o produto cátion imínio da reação de glifosato com *p*-DAC. Adaptado de SILVA, 2011.

2.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Afim de assegurar a qualidade dos resultados analíticos que fazem uso de técnicas cromatográficas, valida-se os métodos de análise com o objetivo de garantir a confiabilidade do procedimento definido, ou seja, um novo método analítico para gerar informações confiáveis e legíveis sobre a amostra, deve sofrer uma avaliação denominada validação.

Conforme RIBANI e colaboradores (2004) a validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Já para LANÇAS 2004, validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. A validação do método analítico envolve um procedimento o qual prova que o método fornece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequadas (LANÇAS, 2004).

No Brasil, há guias de validação tais como o da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), com a Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, bem como do INMETRO com o DOQ-CGCRE-008 (revisão 04) de 2011 (INMETRO, 2011). Os órgãos internacionais também dispõem de guias como a Conferência Internacional em Harmonização (ICH, 2005), União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) e SANCO (2012).

O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) sugere que seja feito planejamento da validação levando em consideração os seguintes itens: definição da aplicação, objetivo e escopo do método; definição dos parâmetros de validação e critérios de aceitação; verificação das características de desempenho do equipamento, se as mesmas estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo; qualificação dos materiais (por exemplo, reagentes); planejamento dos experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico, e execução dos experimentos de validação (INMETRO, 2011).

Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos são: curva analítica e linearidade, seletividade, exatidão, precisão (repetitividade e precisão intermediária), limite de detecção e de quantificação.

2.4.1. Seletividade

A seletividade de um método, também denominada especificidade é a capacidade que o mesmo possui em determinar ou medir, com exatidão, o composto de interesse, na presença de interferentes do tipo impurezas produtos de degradação e componentes da matriz existentes na amostra (LANÇAS, 2004). Pode-se também dizer que é a habilidade dos métodos de extração, de purificação, de derivação, do sistema de separação e detecção, em realizar a discriminação entre o analito de interesse e outros compostos (SANCO, 2012).

Nos métodos cromatográficos a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito seja exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra (PASCHOAL *et al.*, 2008). Não assegurando a seletividade, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004).

2.4.2. Exatidão

A exatidão demonstra o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2012). Os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

Valores aceitos de recuperação para a análise de substâncias a nível de traços é entre a faixa de 70 a 120% (SANCO, 2012). Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al.*, 2004).

2.4.3. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma determinada amostra, amostras semelhantes ou padrões, obtidos sob condições definidas (THOMPSON *et al.*, 2002; RIBANI *et al.*, 2004). É expressa através da estimativa do desvio padrão (s) ou estimativa do desvio padrão relativo

(RSD do inglês relative standard deviation) ou coeficiente de variação (CV) (THOMPSON *et al.*, 2002).

Geralmente determina-se para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de se expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e RSD (INMETRO, 2011).

Segundo LANÇAS (2004) a precisão expressa o grau de dispersão entre uma série de medidas obtidas a partir de múltiplos ensaios para uma mesma amostra, podendo ser estabelecida através da repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária, ou seja, nas mesmas condições operacionais e mudando um ou mais fatores, respectivamente.

A precisão pode ser numericamente expressa em termos de estimativa do RSD (Equação 1):

$$RSD\% = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais; x_m = média das medidas em replicatas;

N = número de medidas.

A repetitividade, também denominada de repetibilidade, representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, ou seja, mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo equipamento utilizado sob as mesmas condições de análise, mesmo local e repetições do ensaio em curto espaço de tempo. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo utilizado pelo INMETRO. Por outro lado, a ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade (RIBANI *et al.*, 2004).

A reprodutibilidade é o grau de aceitação entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas de análise (mudança de operador, local, equipamentos) visando averiguar o desempenho do método em

relação ao de outros laboratórios. Geralmente é obtida através de estudo de colaboração entre laboratórios (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), como por exemplo: diferentes analistas, diferentes equipamentos, e diferentes dias de análise (INMETRO, 2011).

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo de se avaliar a precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. Esta medida de precisão pode ser expressa através da estimativa do RSD (RIBANI *et al.*, 2004). Para métodos empregados em determinações ao nível de traços, valores de RSD% de até 20% são aceitáveis, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

2.4.4. Limites de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

Em condições de análises onde realiza-se determinações na faixa de concentração de traços e ultra-traços de analitos é imprescindível que, medidas sejam feitas na região do limite de detecção (LOD, do inglês limit of detection) e do limite de quantificação (LOQ, do inglês limit of quantification) (RIBANI *et al.*, 2004). O LOD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não quantificada, empregando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2011). O LOQ é o menor valor de concentração em que o analito pode ser quantificado com certo limite de confiança, ou seja, abaixo deste valor medições não apresentam confiança suficiente para quantificação (THOMPSON *et al.*, 2002). Para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LOQ como a menor concentração da curva analítica (INMETRO, 2011).

Ambos os limites são estabelecidos por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito. O LOD e o LOQ geralmente expressos em unidades de concentração, e podem ser calculados de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em

parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). O LOD e o LOQ foram estabelecidos de forma que o LOD corresponda a 3 vezes o ruído da linha de base e o LOQ corresponda à concentração que produz uma relação sinal/ruído superior a 10.

2.4.5. Linearidade e curva analítica

A resposta para um procedimento analítico corresponde à relação, dentro de um intervalo específico, entre a resposta medida (sinal, área, altura do pico, absorção) e a concentração (quantidade) do analito na amostra (ROZET *et al.*, 2007). Neste trabalho a resposta adotada será área do pico.

A linearidade refere-se à relação entre a quantidade introduzida no instrumento e a quantidade calculada a partir da curva de analítica, a qual relaciona a resposta instrumental e a concentração (ROZET *et al.*, 2007). A equação de regressão linear (Equação 2) que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad \text{Equação (2)}$$

sendo:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

a = coeficiente angular ; inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = coeficiente linear ; interseção com o eixo y , quando $x = 0$.

O método mais sensível será aquele que onde pequenas variações de concentração, resultam em uma maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (a). O número mínimo de pontos geralmente aceitos em gráficos de calibração varia entre 5 e 6 pontos, (ANVISA, 2003) ou mais que 6 (INMETRO, 2011). Além dos coeficientes a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r), parâmetro que fornece uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida e quanto mais próximo de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (CHUI *et al.*, 2001).

A fim de verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa, podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI *et al.*, 2004). Conforme a ANVISA é aceito um coeficiente de correlação (r) de 0,99 (ANVISA, 2003). Pode-se também utilizar do coeficiente de determinação (r^2) que é a porcentagem da variação da variável dependente (y) explicada pela variável independente (x), por exemplo, quando $r^2=0,99$ indica que as variáveis dependentes explicam 99% da variação da variável independente.

Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (MUNARETTO, 2011). Dentro da faixa de trabalho existe uma faixa de resposta linear, desse modo, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho (INMETRO, 2011).

2.4.6. Efeito Matriz

O efeito matriz é observado como um aumento ou diminuição na resposta do detector na presença do analito no extrato da matriz comparado com o mesmo analito presente em solvente orgânico. Para que o efeito matriz seja considerado desprezível, a relação entre essas curvas deve ser menor ou igual a 20% (CARDOZO, NÓBREGA & ABRANTES, 2008).

2.4.6.1. Efeito matriz em Cromatografia Líquida.

A interferência da matriz representa uma desvantagem de praticamente todas as técnicas instrumentais, inclusive quando utiliza-se Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas. Na espectrometria de massas os efeitos de interferência ocorrem em maior frequência, como os fenômenos de supressão de íons, induzidos pela presença na matriz de compostos voláteis ou capazes de mudar a eficiência de

formação de gotículas do analito. Ou ainda, a quantidade de íons formados na fase gasosa que atingem o detector (GOSETTI *et al.*, 2010).

Diferentes espécies podem ser capazes de provocar a supressão iônica, tais como espécies presentes como componentes da amostra (e ainda presentes, mesmo com etapas de purificação), por exemplo: espécies iônicas, compostos polares e moléculas orgânicas. Co-extrativos podem também afetar a intensidade do sinal do analito quando formam adutos ou reagem com o analito na interface do LC-MS/MS. Outro fator são os reagentes adicionados na fase móvel, a fim de melhorar o formato do pico cromatográfico, tais como sais, pares iônicos, tampões e ácidos orgânicos. Nesse caso, cabe ressaltar que a introdução contínua desses aditivos, através da fase móvel, para dentro da interface resulta na supressão do sinal durante toda a corrida cromatográfica (GOSETTI *et al.*, 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), o qual possui acreditação segundo os requisitos estabelecidos na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005.

3.1. Instrumentação

Foram empregados os seguintes equipamentos para o desenvolvimento deste estudo:

- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3[®] (Millipore, EUA);
- ✓ Agitador Vórtex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Balança analítica de precisão AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ✓ Sonificador – UNIQUE Modelo USC-1400^a;
- ✓ Micropepitadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ✓ Sistema de Cromatografia Iônica modelo ICS-4000 da Dionex (Sunnyvale, Califórnia) equipado com:
 - Amostrador automático AS-DV;
 - Coluna capilar IonPac[™]AS19 (250 x 0,4 mm; 7,5 µm) de troca aniônica e coluna guarda IonPac[™] AG19 (50 x 0,4 mm; 11 µm);
 - Cartucho gerador de eluente EGC-KOH capilar;
 - Purificador de eluente CR-ATC (coluna de retenção de ânions regenerada continuamente, do inglês: continuously regenerated aniontrap column);
 - Dispositivo removedor de carbonato (CRD 200 capillary);
 - Ânion Capillary Electrolytic Supressor (ACES 300) no modo reciclar;
 - Detector de condutividade;
 - Software para aquisição de dados Chromeleon 6.8;
- ✓ Sistema LC-MS/MS: Cromatógrafo a Líquido Varian 320-MS, equipado com:
 - Espectrometro de Massas modelo, 320-MS triplo quadrupolo (TQ) com fonte API, utilizando o modo de ionização por eletronebulização (Varian, EUA);
 - Amostrador automático ProStar 410, bomba quaternária 212-LC, forno para coluna e sistema de desgaseificação (Varian, EUA);

- Coluna Pursuit XRs C₁₈ (150 x 2 mm d.i.; 5 µm) (Varian, EUA);
- Sistema de aquisição de dados através do software MS Workstation Version 6.9.2 (Varian, EUA);
- Sistema gerador de nitrogênio LC/MS 12/2 (Domnick Hunter, Inglaterra).

3.2. Reagentes, solventes e materiais utilizados

- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3®, (resistividade de 18,2 MΩ, Millipore, EUA);
- ✓ Hidróxido de Amônio 25%, p.a.;
- ✓ Padrão analítico dos 7 ânions (F⁻, Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻ e NO₂⁻) nas concentrações de 20, 100, 100, 100, 100, 100 e 200 mg L⁻¹ respectivamente, da Dionex (Sunnyvale, Califórnia), EUA.
- ✓ Frascos de polipropileno (vial), capacidade de 1 mL, usados do IC;
- ✓ Frascos de vidro (vial), capacidade de 1 mL, usados no LC;
- ✓ Extran® neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- ✓ Tubos de polipropileno de fundo cônico, com tampas de rosquear, capacidade de 50 e 15 mL;
- ✓ Vidraria comum de laboratório analítico.

3.3. Amostras branco

Denominam-se amostras “branco”, as amostras isentas dos compostos que serão avaliados, utilizadas para a validação da metodologia uma vez que isto pode interferir nas análises, levando a uma quantificação errônea dos compostos de interesse (INMETRO, 2012; FRIGGI, 2012).

Validou-se a metodologia utilizando água de torneira de abastecimento público (tratada) e água ultrapura, previamente analisada e isenta de concentrações acima do LD para os compostos AMPA e glifosato.

3.4. Padrões analíticos

Os padrões analíticos sólidos de glifosato CAS nº 1071-83-6 e Ácido Amino Metil Fosfônico, (do inglês: Aminomethylphosphonic Acid) CAS nº 1066-51-9, foram adquiridos da empresa Dr. Ehresntorfer GmbH (Ausburg, Alemanha) com grau de pureza purzas certificadas e rastreáveis de 97,0% e 98,0%.

Para o preparo das soluções de glifosato e AMPA utilizou-se micropipetas de volume variável; tubos de polipropileno (TPP), vidraria aferida como balões volumétricos, balança analítica com precisão.

Inicialmente preparou-se 10,0 mL de soluções estoque na concentração de 1000,0 mg L⁻¹ de cada um dos compostos em estudo, levando em consideração o grau de pureza dos padroes sólidos (RIBANI *et al.*, 2004). Dissolveu-se uma massa de aproximadamente 10 mg dos padrões sólidos em água ultrapura e sonificou-se por 20 min para desgaseificação. respectivamente. As soluções padrões estoque após preparadas foram acondicionadas em frascos de polipropileno e armazenadas na temperatura < 5 °C.

A partir das soluções estoque de 1000,0 mg L⁻¹, preparou-se 10 mL de uma mistura contendo ambos os compostos na concentracao de 10 mg L⁻¹, em água ultrapura. Essa solução foi utilizada para os ensaios de fortificação e preparo das soluções analíticas das curvas de calibração.

3.5. Preparo de amostras

Com o objetivo de apresentar uma metodologia simples descartou-se a etapa de preparo de amostra e validou-se o método apenas com uma etapa de filtração com filtro seringa de 0,2 µm e posteriormente injetou-se nos sistemas cromatográficos. Com isso não foram necessárias etapas exaustivas de derivatização da amostra ou pré-concentração e extração.

3.6. DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA

3.6.1. Cromatografia Iônica Capilar (CIC)

A separação cromatográfica de compostos por cromatografia iônica é geralmente obtida através de experimentos que envolvem diferentes concentrações do eluente, muitos ensaios utilizam gradientes na forma de rampas de concentração por um período dentro de uma corrida cromatográfica. Para esse estudo podemos dividi-lo em duas etapas distintas.

Inicialmente desenvolveu-se uma metodologia para a determinação simultânea de glifosato e seu principal produto de degradação o AMPA em águas, sem a presença de ânions inorgânicos comuns nesse tipo de matriz, como fluoreto, cloreto, brometo, nitrito, nitrato, sulfato e fosfato. Em uma segunda etapa, avaliou-se uma metodologia para a determinação de ambos os compostos em estudo, com a presença dos ânions comuns já citados.

3.6.1.1. Otimização do sistema cromatográfico CIC para a determinação de glifosato e AMPA sem a presença de ânions inorgânicos do padrão de 7 ânions (F^- , Cl^- , Br^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} e PO_4^{3-}).

A etapa inicial para o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação de glifosato e AMPA, em águas, sem a interferência dos ânions inorgânicos comuns nesse tipo de matriz, consistiu na otimização de parâmetros cromatográficos como gradiente de eluição de KOH de 10 a 80 mM e vazão de 0,01 mL min⁻¹. Separação cromatográfica em coluna capilar IonPacTMAS19 (250 x 0,4 mm; 7,5 µm) de troca aniônica e coluna guarda IonPacTM AG19 (50 x 0,4 mm; 11 µm) seguida de supressão eletrolítica capilar em um sistema modelo ACES 300 no modo reciclar, volume de injeção de 0,4 µL.

3.6.1.2. Otimização do sistema cromatográfico CIC para a determinação de glifosato e AMPA com a presença de ânions inorgânicos do padrão de 7 ânions (F⁻, Cl⁻, Br⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻ e PO₄³⁻).

Em um segundo momento, avaliou-se uma metodologia para a determinação simultânea de ambos os compostos em estudo, na presença dos ânions inorgânicos, fluoreto, cloreto, brometo, nitrito, nitrato, sulfato e fosfato, ambos comuns nesse tipo de matriz.

Os parâmetros cromatográficos otimizados na determinação anterior, ou seja, sem os ânions comuns, foram utilizados com uma alteração no gradiente de eluição de KOH de 10 para 90 mM, resultando na separação de todos os íons em estudo como os ânions inorgânicos e os íons de glifosato e do AMPA.

3.6.2. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Com a finalidade de confirmar a presença dos compostos em estudo na metodologia proposta, utilizou-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa devido a capacidade desta técnica de se identificar as moléculas dos analitos. O modo de ionização empregado foi ionização por eletronebulização (ESI).

As condições cromatográficas otimizadas foram: A fase móvel solução aquosa de NH₄OH 0,01%(v/v) e vazão de 150 µL min⁻¹ utilizando coluna Pursuit XRs C₁₈ (150 x 2 mm d.i.; 5 µm), em tempo total de análise de 3 minutos.

3.6.2.1. Otimização do sistema cromatográfico LC-MS/MS para a determinação de glifosato e AMPA

A LC-MS/MS proporciona maior detectabilidade e seletividade comparando-se com detectores clássicos, essa técnica possibilita também a identificação e quantificação dos compostos de forma inequívoca. O sistema hifenado LC-MS/MS possibilita eliminar interferências espectrais e minimiza problemas de co-eluição entre as substâncias em análise, sendo esse detector uma ferramenta analítica de grande importância para a análise, confirmação e quantificação dos analitos de interesse mesmo que em concentrações mínimas no modo SRM. Na sequência, serão descritos os principais parâmetros otimizados para o método em estudo utilizando a LC-MS/MS.

3.6.2.1.1. Ionização dos analitos

Soluções dos compostos foram introduzidas por infusão direta (sem coluna) no sistema ESI/MS/MS a fim de se estabelecer os melhores parâmetros para a ionização dessas substâncias para avaliar os melhores solventes para obter uma melhor eficiência na ionização. Soluções aquosa na concentração 0,05 e 0,01% de NH_4OH (v/v) foram testadas.

Foram comparados os sinais obtidos no modo positivo considerando a protonação, ou seja a molécula recebe um próton $\text{M}+\text{H}^+$ e no modo negativo a molécula é desprotonada, $\text{M}-\text{H}^-$. Em ambos os casos variou-se a energia do capilar, que conduz os íons para o interior do espectrômetro de massas, até a obtenção do maior sinal analítico em termos de área do pico cromatográfico obtido. Os parâmetros que permitiram a obtenção do sinal mais intenso, foram empregados para etapa seguinte.

De modo a otimizar as condições do espectrômetro de massas após a realização das infusões, que são injeções diretas nesse tipo de detector, com solução analítica padrão $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada composto individualmente. A partir das infusões foi selecionado o modo de ionização da fonte (eletronebulização positiva ou negativa), voltagem do capilar, energias de colisão para que ocorra a fragmentação do íon precursor e sejam gerados íons produtos, temperatura da fonte, temperatura e pressão do gás de dessolvatação para a secagem do solvente.

Após a escolha destas condições, foram selecionadas as transições (íon precursor/íon produto) para o glifosato e para o AMPA. Uma transição para quantificação e outra transição para confirmação ou qualificação.

3.6.2.1.2. Escolha do eluente

A escolha da solução de NH_4OH teve como base trabalhos como MARTINS JÚNIOR (2011) e o EPA Method 539 pela relação direta com os mecanismos de dissociação dos analitos e com isso uma melhor ionização no modo negativo. Empregou-se então como fase móvel a solução aquosa de NH_4OH (v/v) na concentração de 0,01% a uma vazão de $150 \mu\text{L min}^{-1}$, em um tempo total de análise de 3 min.

3.7. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS PARA ANÁLISE DE GLIFOSATO E AMPA

Definiu-se as melhores condições para os sistemas cromatográficos e realizou-se a validação da metodologia analítica proposta para a determinação de resíduos de glifosato e seu metabolito o AMPA em água ultrapura e água de abastecimento público (tratada).

Os seguintes parâmetros foram avaliados para a validação do método desenvolvido:

- Seletividade
- Linearidade e curva analítica
- Limites de detecção e quantificação
- Exatidão através de ensaios de recuperação
- Precisão
- Efeito matriz.

3.7.1. Seletividade

No estudo da seletividade do método, em ambos os sistemas cromatográficos, comparou-se as injeções de uma amostra “branco” de água ultrapura e de água de abastecimento público (torneira), ou seja, sem a presença dos compostos em estudos e uma amostra fortificada na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$. A seletividade do método por CIC foi assegurada comparando-se os cromatogramas de uma amostra “branco” com o cromatograma do padrão dos compostos de interesse, comprovando a não influência dos ânions inorgânicos presentes na matriz no mesmo tempo de retenção dos compostos glifosato e AMPA. Por LC-MS/MS a seletividade foi assegurada pela ausência dos íons de quantificação e qualificação no tempo de retenção dos analitos da amostra “branco”.

3.7.2. Linearidade e Curvas Analíticas

A linearidade de um método analítico é a sua capacidade em fornecer resultados de medições que sejam diretamente proporcionais a concentração do composto de interesse, dentro de uma faixa de aplicação do método (INMETRO, 2010). Desse modo, com o intuito de avaliar a linearidade foram preparadas curvas analíticas nas matrizes em estudo, ou seja, água ultrapura e água de abastecimento público (tratada) testadas em ambos os sistemas.

Para o preparo das curvas analíticas, a partir do mix de 10 mg L⁻¹ descrito conforme item 4.5, preparou-se uma solução de trabalho na concentração de 1 mg L⁻¹ para o preparo dos pontos da curva nas concentrações de 25, 50, 100, 250, 500 µg L⁻¹ para as duas técnicas em água ultrapura e também preparou-se no extrato da matriz água de abastecimento público.

3.7.3. Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Os LOD e LOQ foram estabelecidos com base no sinal do analito pelo ruído analítico, conforme descrito na revisão bibliográfica. O LOD é definido como a concentração do analito que resulta um sinal (S) três vezes maior que o ruído (R) da linha base, nas proximidades do sinal do analito ($LOD = 3 S/R$). O LOQ é determinado como a concentração do analito que resulta um sinal dez vezes maior que o ruído ($LOQ = 10 S/R$).

Os parâmetros são referentes aos instrumentos e o LOD_i e LOQ_i instrumentais, são expressos em µg L⁻¹ (RIBANI, 2004).

3.7.4. Ensaios de Recuperação para avaliação da Exatidão

A determinação da exatidão do método foi resultante das medidas de ensaios de fortificação e de recuperação. As amostras “branco” foram fortificadas em 4 níveis de fortificação para análise em ambas as técnicas cromatográficas, compreendendo as faixas de concentrações de baixa, média e alta, da faixa de uso dos métodos propostos. A exatidão do método foi estudada através da realização de 6 replicatas (n = 6) preparadas independentemente para cada um dos 4 níveis de fortificação para

a metodologia proposta, também preparadas independentemente, e a recuperação foi calculada conforme a equação (3), de acordo com o guia de validação do INMETRO (2011).

$$\text{recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

3.7.5. Precisão (repetibilidade)

Para determinar a repetibilidade do instrumento (precisão ou desvio padrão relativo) realizou-se a injeção de 6 réplicas de cada nível de concentração ($n = 6$), onde cada réplica foi injetada individualmente em uma única etapa em ambos os sistemas cromatográficos. Calculou-se a precisão de acordo com a equação (1) do desvio padrão relativo (RSD).

3.7.6. Avaliação do Efeito Matriz

Para a avaliação do efeito matriz, realizou-se a comparação entre as inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente e aquelas preparadas no extrato “branco” da matriz. O solvente usado para a confecção da curva foi água ultrapura nos dois equipamentos. O cálculo foi efetuado através da equação (4) e também preparou-se curvas em matrizes de água ultrapura (como solvente), água superficial (de açude) e em água de abastecimento público buscando verificar o comportamento de cada matriz.

$$\text{Efeito matriz} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

X_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas na matriz (água);

X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente.

3.8. Aplicação dos métodos

Aplicou-se os métodos desenvolvidos para determinação de Glifosato e AMPA em águas de abastecimento público das cidades de Santa Maria e Sertão e em água dos rios Jacuí e Vacacaí Mirim no Rio Grande do Sul.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a determinação dos resíduos do herbicida Glifosato e de seu principal metabólito o AMPA em águas utilizou-se neste estudo a Cromatografia Iônica Capilar e a confirmação avaliada por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série, empregando analisador triplo quadrupolo. As condições cromatográficas estabelecidas para este trabalho foram estabelecidas com base em estudos desenvolvidos por AMARANTE JUNIOR (2002), RIBEIRO (2011), MARC e DIMITRAKOPOULOS (2010), utilizados para o auxílio no desenvolvimento de metodologia em cromatografia iônica e na cromatografia líquida baseou-se no EPA Method 539 e nas pesquisas desenvolvidas por MARTINS JÚNIOR (2011) e DONATO (2012).

4.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS OTIMIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA POR CROMATOGRAFIA IÔNICA CAPILAR

4.1.1. Determinação de glifosato e AMPA sem a presença dos ânions inorgânicos do padrão de 7ânions (F^- , Cl^- , Br^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} e PO_4^{3-}).

Os parâmetros cromatográficos otimizados para essa técnica foram descritos no item 3.6.1.1. Determinação de glifosato e AMPA sem a presença de ânions comuns.

Conforme a Figura 13 compara-se os cromatogramas obtidos para uma amostra “branco” (cromatograma em cor azul) de uma matriz de água ultrapura e sobreposto a esse um cromatograma (em cor preta) do padrão dos compostos na concentração de $500 \mu g L^{-1}$ onde verifica-se que não influência dos ânions inorgânicos presentes na matriz durante a análise de glifosato e principalmente o AMPA que em alguns testes e dependendo do gradiente utilizado, co-eluiu com ânions como brometo, nitrito ou nitrato.

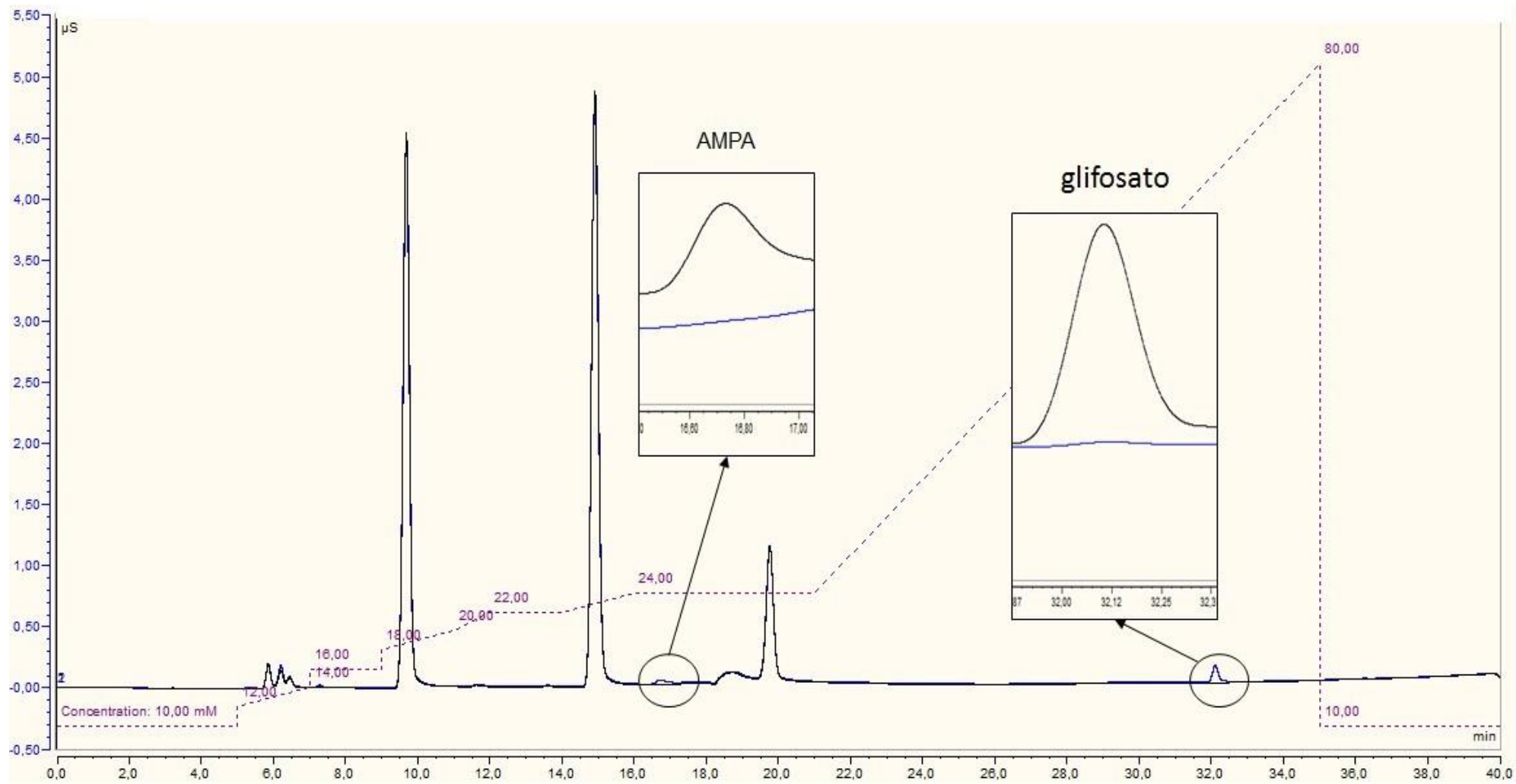


Figura 13. Cromatograma dos compostos determinado por cromatografia iônica capilar em água de abastecimento público.

4.1.2. Determinação de glifosato e AMPA com a presença dos ânions inorgânicos do padrão de 7 ânions (F⁻, Cl⁻, Br⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻ e PO₄³⁻).

Para este estudo utilizou-se o mesmo sistema de cromatografia iônica descrito no item 3.1 os parâmetros cromatográficos otimizados para essa técnica foram descritos no item 3.6.1.2. Determinação de glifosato e AMPA com a presença de ânions comuns.

Conforme a Figura 14 compara-se os cromatogramas obtidos para uma amostra “branco” (cor azul) de uma matriz de água ultrapura e sobreposto a esse um cromatograma (cor preta) do padrão dos compostos na concentração de 500 µg L⁻¹ onde verifica-se a separação dos compostos em meio a matriz contendo o padrão de 7 ânions inorgânicos.

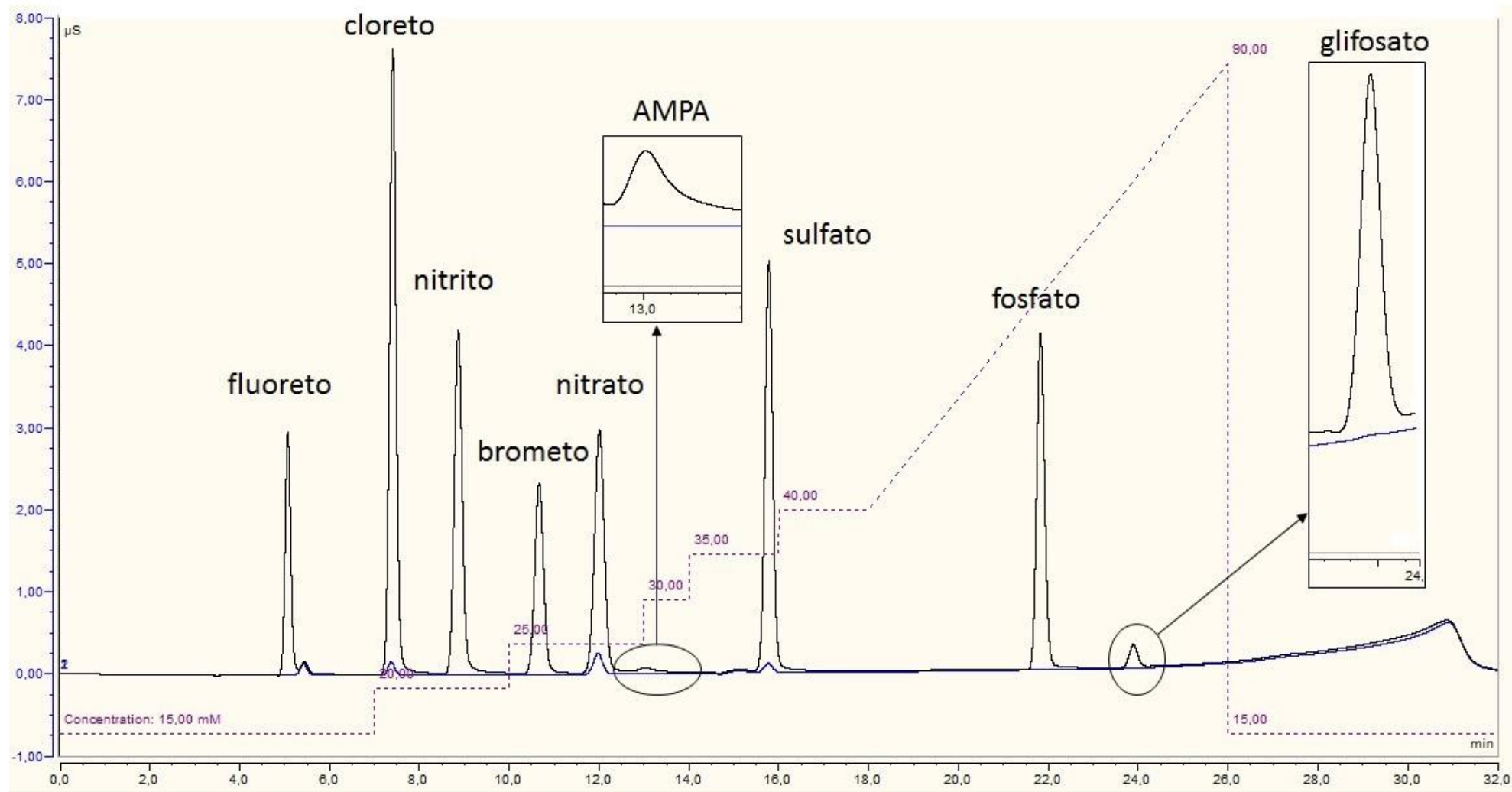


Figura 14. Cromatograma dos analitos na presença dos ânions inorgânicos do padrão de 7ânions (F^- , Cl^- , Br^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} e PO_4^{3-}).

4.2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS OTIMIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA POR LC-MS/MS

O estudo foi desenvolvido em sistema de Cromatografia Líquida utilizando uma coluna Pursuit XR_s C₁₈ (150 x 2,0 mm; 5 µm). A fase estacionária desta coluna, o C₁₈, não retém os analitos Glifosato e AMPA, mas aumenta o caminho físico percorrido, permitindo que o sinal dos mesmos seja detectado após tempo suficiente para estabelecer e estabilizar o spray na interface do MS. Adicionalmente a coluna retém outros compostos orgânicos e interferentes da matriz, permitindo uma purificação do eluato para o MS. Periodicamente, após cada sequência de 20 a 30 amostras, foram feitos ciclos de limpeza da coluna, com soluções de 50% da fase móvel + metanol e posteriormente somente metanol.

A fase móvel utilizada foi uma solução aquosa de hidróxido de amônio 0,01% (v/v) a uma vazão de 150 µL min⁻¹, com tempo total de análise de 3 min, conforme condições descritas no item 3.6.2.1. Na Figura 15 estão apresentados os cromatogramas da amostra “branco” da matriz e da solução analítica no extrato da matriz de água tratada na concentração de 500 µg L⁻¹, não sendo possível visualizar os picos cromatográficos dos compostos pois no modo de íon total os picos são sobrepostos.

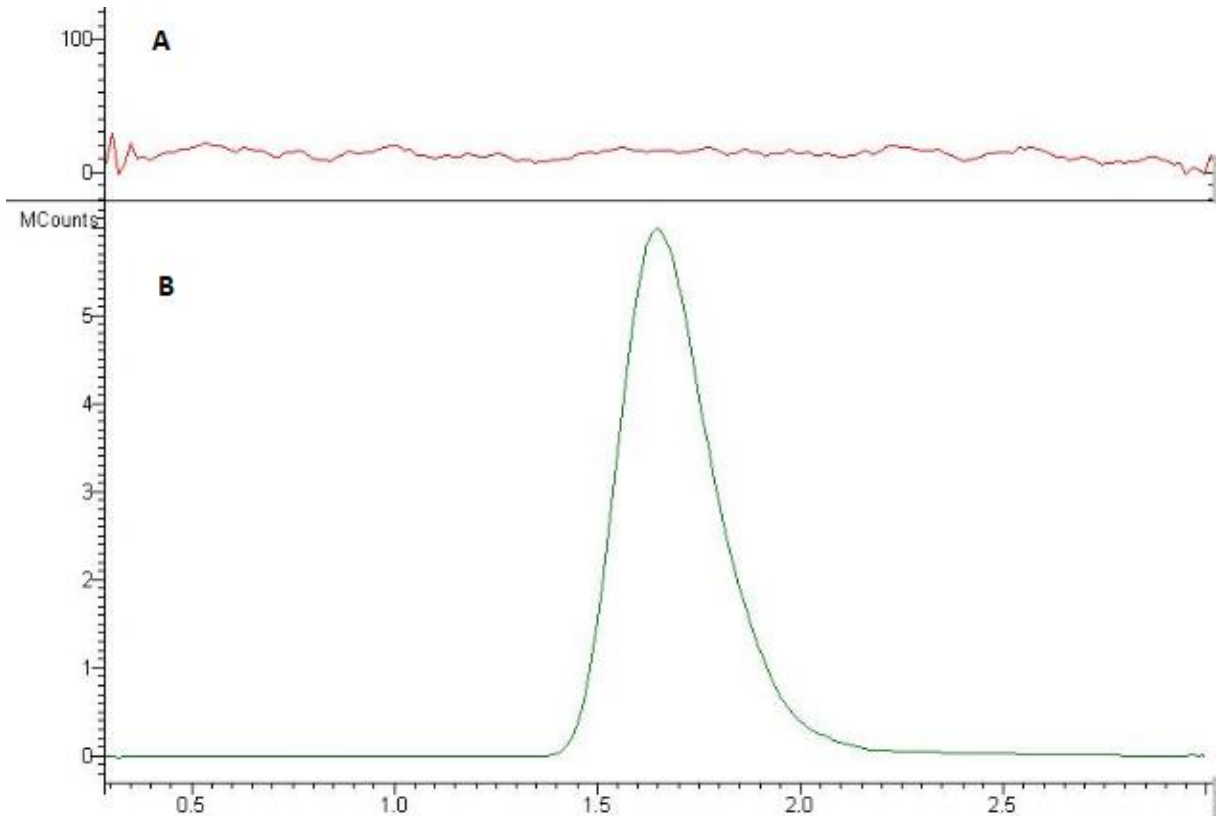


Figura 15. Cromatograma LC-MS/MS do íon total (A) da amostra "branco" da matriz de água de abastecimento público e (B) da solução analítica contendo glifosato e AMPA no extrato da matriz na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, obtidos nas condições descritas no item 3.6.2.1.

As condições de análise foram: temperatura da fonte: 50 °C, temperatura do gás de dessolvatação (N_2): 250 °C, a pressão do gás de dessolvatação: 40 psi e a pressão do gás de secagem: 20 psi. Argônio foi utilizado como gás de colisão à pressão de 1,8 mTorr. As voltagens do shield e da agulha foram 600 e 3000 V, respectivamente.

Pode-se visualizar na Tabela 6 os agrotóxicos determinados por LC-MS/MS, o tempo de retenção, o modo de ionização ESI (+/-), a energia de colisão das transições monitoradas, juntamente com os íons precursores e produtos. Foram selecionadas duas transições características para cada analito, sendo que, a transição mais intensa foi utilizada para a quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para a confirmação dos mesmos.

Na Figura 16 está apresentado o cromatograma obtido por LC-MS/MS no modo SRM, de uma solução analítica na concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, preparada no extrato da matriz, juntamente com seus íons de quantificação e confirmação.

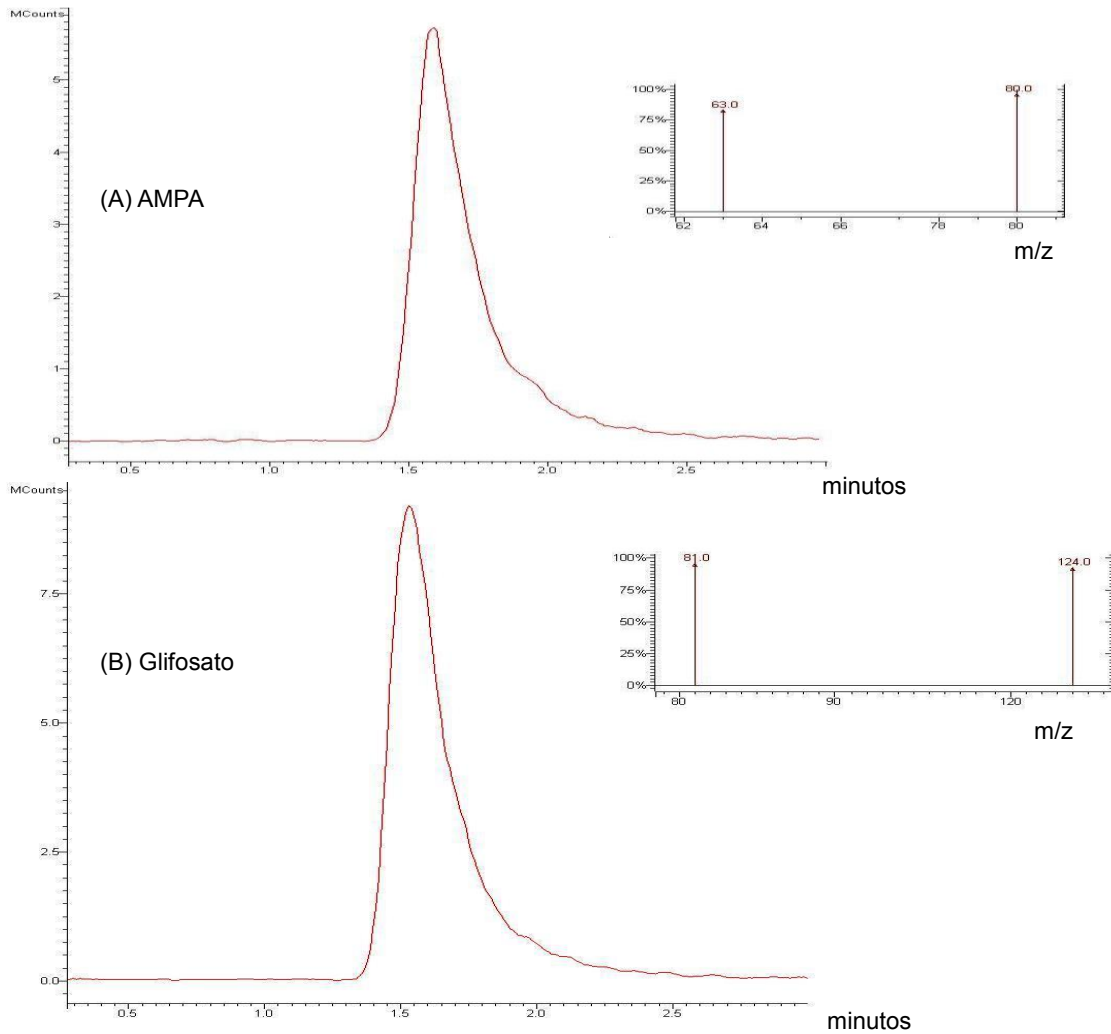


Figura 16. Cromatograma obtido por LC-MS/MS no modo SRM, de uma solução analítica ($500 \mu\text{g L}^{-1}$), preparada no extrato da matriz de água tratada e seus respectivos íons de quantificação e confirmação: A) AMPA e B) Glifosato.

Tabela 6. Agrotóxicos quantificados por LC-MS/MS, tempo de retenção (t_R), modo de ionização ESI (+/-), íons precursores e produtos e energias de colisão.

t_R (min)	Compostos	ESI (+/-)	Íon Precursor (m/z)	1 ^a Transição Quantificação		2 ^a Transição Confirmação	
				Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
1,6	glifosato	-	168	81	15,5	124	12,5
1,66	AMPA	-	110	63	17,5	80	15

4.3. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS

Para a validação do método utilizado neste trabalho utilizando injeção direta da amostra, ou seja, sem a etapa de preparo de amostras, procedendo-se apenas com uma etapa de filtração com filtro seringa de 0.2 μm , seguida pela determinação por IC e LC-MS/MS.

Foram utilizadas amostras “branco” de água ultrapura e água tratada (água da torneira) e realizadas fortificações em 4 níveis (25, 50; 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$), tanto para a determinação por IC quanto para LC foram preparadas duas curvas analíticas, uma em extrato da matriz “branco” de água da torneira e ultrapura. Dessa forma, utilizou-se as curvas analíticas para avaliar: LOD_i e LOQ_i e linearidade das curvas analíticas, sendo LOD_m e LOQ_m iguais a LOD_i e LOQ_i , respectivamente, pois a metodologia não envolve etapa de extração.

4.3.1. Seletividade dos métodos

A seletividade proposta foi assegurada em ambas as técnicas cromatográficas. Pode-se observar através das Figuras 13 e 14 que nos compostos determinados por IC não foi detectada a presença de qualquer pico nos tempos de retenção dos compostos em estudo. No LC apesar dos compostos apresentarem o mesmo tempo de retenção a seletividade pode ser assegurada através do detector de massas o qual possibilita a identificação e quantificação dos compostos de forma inequívoca eliminando interferências espectrais não prejudicando a determinação dos compostos. Neste mesmo sentido, nota-se na Figura 16 a caracterização dos compostos através de seus respectivos íons de quantificação e confirmação por LC-MS/MS. Nas condições de ionização da fonte durante a infusão de soluções de cada um dos analitos, observou-se que o glifosato não forma íons com m/z (razão massa carga) = 110, que corresponderia ao AMPA, com isso, durante o monitoramento das transições de glifosato, enquanto o primeiro quadrupolo (Q1) está programado para selecionar o precursor 168 no primeiro quadrupolo, qualquer ion 110 será excluído, permitindo a quebra do ion correspondente ao glifosato na câmara de colisão (Q2) e seleção dos ions produtos correspondente no segundo quadrupolo (Q3). De forma análoga, ao selecionar o íon com $m/z = 110$ do AMPA, os íons com $m/z = 168$ do

glifosato serão ejetados do Q1 e os íons formados na câmara de colisão e selecionados no Q3, corresponderão somente ao AMPA.

4.3.2. Curva analítica e linearidade

Segundo o INMETRO (2011), a curva analítica deve possuir no mínimo cinco pontos (não incluindo o ponto zero). Para este estudo foram utilizados cinco pontos para a confecção das curvas analíticas, tanto no IC quanto para o LC, sendo eles: 25, 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, preparadas no extrato da matriz de água da torneira e em água ultrapura. Todos os compostos apresentaram faixa linear entre 25 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. A Tabela 9 apresenta as equações da curva analítica e o coeficiente de determinação (r^2) preparados em ambas as matrizes dos agrotóxicos em estudo e determinados por LC e as Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados determinados por CIC.

Tabela 7. Equações da curva analítica e o coeficiente de determinação (r^2) preparados no extrato da matriz para os compostos juntamente com os ânions inorgânicos determinados por CIC.

Compostos	Matriz	Equação da curva analítica	r^2
Glifosato	H ₂ O ultrapura	$y = 0,00012x - 0,00042$	0,9998
AMPA	H ₂ O ultrapura	$y = 0,00004x - 0,00088$	0,9994

Tabela 8. Equações da curva analítica e o coeficiente de determinação (r^2) preparados no extrato da matriz para os compostos sem a presença dos ânions inorgânicos determinados por CIC.

Compostos	Matriz	Equação da curva analítica	r^2
Glifosato	H ₂ O da torneira	$y = 0,00011x - 0,00044$	0,9999
AMPA	H ₂ O da torneira	$y = 0,00005x - 0,00142$	0,9989
Glifosato	H ₂ O ultrapura	$y = 0,0001x - 0,0003$	0,9999
AMPA	H ₂ O ultrapura	$y = 0,00004x - 0,00032$	0,9988

Tabela 9. Equações da curva analítica e o coeficiente de determinação (r^2) preparados no extrato da matriz para os compostos determinados por LC-MS/MS.

Compostos	Matriz	Equação da curva analítica	r^2
Glifosato	H ₂ O da torneira	$y = 2634605,93x - 49568331,86$	0,9902
AMPA	H ₂ O da torneira	$y = 3318864,09x - 32819643,41$	0,9986
Glifosato	H ₂ O ultrapura	$y = 3054055,67x + 105307519,97$	0,9972
AMPA	H ₂ O ultrapura	$y = 6129602,39x + 101946213,43$	0,9989

Conforme os resultados obtidos, pode-se concluir que os modelos (CIC e LC-MS/MS) são lineares e adequados, visto que todos os agrotóxicos apresentam coeficiente de determinação (r^2) maior ou igual que 0,99, em ambas as técnicas, e assim de acordo com as orientações do INMETRO e da ANVISA.

4.3.3. Exatidão (ensaio de recuperação) e Precisão (repetitividade)

Os compostos foram estudados em amostras de água ultrapura e água do sistema de abastecimento público (tratada) nos níveis de fortificação de 25, 50, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, nos quais foram preparadas seis replicatas para cada nível de concentração ($n=6$), onde cada réplica foi injetada individualmente em uma única etapa para cada sistema cromatográfico.

A Tabela 10 apresenta os resultados das recuperações médias ($n=6$) percentuais e o RSD% para ambos os compostos em estudos determinados por LC e nas Tabelas 11 e 12 encontram-se os resultados obtidos por CIC. Estes foram fortificados em água ultrapura e em água da torneira, nos níveis de 25, 50, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, alcançando o limite estipulado pela portaria 2914 de 2011 do Ministério da Saúde.

Os valores de recuperação foram calculados utilizando-se as curvas analíticas preparadas no extrato da matriz. Neste trabalho seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, na qual os valores de recuperação devem estar entre 70 e 120%, com $\text{RSD} \leq 20\%$ (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2012).

A metodologia apresentou percentuais de recuperação ficando na faixa de 79 – 105% na técnica de LC-MS/MS e entre 70 – 113% na determinação por CIC, para ambos os compostos com valores dentro do recomendado.

Tabela 10. Percentuais de recuperação e RSD nos níveis de concentração de 25, 50, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ no LC-MS/MS.

Compostos	Matriz	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
		25		50		250		500	
		rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
Glifosato	H ₂ O da torneira	102,0	7,2	99,1	10,3	98,2	5,2	94,2	6,1
AMPA	H ₂ O da torneira	98,5	5,7	87,0	4,0	79,5	4,6	93,0	4,2
Glifosato	H ₂ O ultrapura	105,1	5,1	96,7	10,1	99,9	2,9	93,7	4,1
AMPA	H ₂ O ultrapura	97,8	14,0	84,1	13,3	90,3	4,1	80,2	7,4

Tabela 11. Percentuais de recuperação (rec) e RSD nos níveis de concentração de 25, 50, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos sem a presença dos ânions inorgânicos determinados por CIC.

Compostos	Matriz	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
		25		50		250		500	
		rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
Glifosato	H ₂ O da torneira	81,4	6,9	88,6	3,3	101,0	1,4	103,9	0,7
AMPA	H ₂ O da torneira	91,7	3,7	92,3	5,2	108,2	3,5	70,6	3,3
Glifosato	H ₂ O ultrapura	92,9	9,2	98,7	10,0	102,1	1,3	98,0	0,8
AMPA	H ₂ O ultrapura	85,3	6,7	81,0	7,8	98,7	1,0	103,5	0,7

Tabela 12. Percentuais de recuperação e RSD nos níveis de concentração de 25, 50, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos com a presença dos ânions inorgânicos determinados por CIC.

Compostos	Matriz	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
		25		50		250		500	
		rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)	rec (%)	RSD (%)
Glifosato	H ₂ O ultrapura	95,8	6,1	93,6	6,5	104,6	1,6	102,6	0,7
AMPA	H ₂ O ultrapura	113	4,8	79,0	4,7	101,4	0,9	92,8	6,6

Para determinar a repetitividade do instrumento (precisão ou desvio padrão relativo) avaliou-se a proximidade dos resultados obtidos nas injeções das réplicas de cada nível de concentração das fortificações. Expressou-se a precisão do método através do desvio padrão relativo (RSD%) da série de medidas.

Conforme SANCO (2012), a precisão depende da concentração do analito, da matriz avaliada e da técnica de análise, devendo os resultados ficarem <20%. De acordo com a tabelas citadas os valores de RSD% ficaram entre 2,85 – 14% para as medidas por LC e entre 1 – 10% para a determinação por IC de de ambos os compostos em água ultrapura e água tratada.

4.3.4. Determinação dos valores de LOD e do LOQ

Os valores alcançados para os limites de detecção e de quantificação foram obtidos através da relação sinal/ruído. Para a avaliação desses parâmetros foi injetado no IC e no LC uma mistura dos agrotóxicos nas concentrações 25, 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, preparadas no extrato da matriz de água ultrapura e água tratada. Posteriormente avaliou-se os cromatogramas obtidos, e verificou-se qual delas forneceu uma relação sinal ruído superior a 10 ($\text{LOQ} = 10\text{S/R}$) definido como Limite de Quantificação do instrumento (LOQ_i). O valor do LOQ_i foi de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o limite de Detecção do instrumento foi obtido dividindo o LOQ_i por 3,33, sendo assim, o LOD_i foi de 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos em estudo nos dois sistemas cromatográficos usados para a mediação.

Estes valores são considerados satisfatórios, pois com os limites de quantificação alcançados, consegue-se atingir aos valores máximos permitidos (VMP) permitidos para os agrotóxicos em água potável, estabelecidos pela portaria 2914, de 14 de dezembro de 2011, do ministério da saúde onde determinação um valor de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.3.5. Efeito Matriz

O efeito matriz é o efeito observado pelo aumento ou supressão significativo do sinal analítico, para um determinado composto, presente no extrato da matriz, comparado com o sinal analítico obtido para o mesmo analito em solvente orgânico avalia-se comparando-se a inclinação das curvas analíticas no solvente e na matriz a partir da equação 4 e considera-se efeito matriz os resultados obtidos com valores acima de 20%(CARDOSO, NÓBREGA & ABRANTES, 2008).

Na Tabela 13 são mostrados os resultados dos testes obtidos para se avaliar o efeito matriz em LC-MS/MS em água superficial (de açude) e água de abastecimento público (tratada), usando como solvente a água ultrapura e confirmados conforme Figura 18. Os cálculos para a avaliação foram feitos conforme a equação (4).

Tabela 13. Efeito matriz dos compostos avaliados por LC-MS/MS.

Compostos	Matriz	Efeito Matriz (%)
Glifosato	H ₂ O tratada	54,9
AMPA	H ₂ O tratada	6,1
Glifosato	H ₂ O superficial	21,0
AMPA	H ₂ O superficial	43,1

Comparando-se os valores obtidos por LC-MS/MS com os obtidos por CIC, nota-se que a água de abastecimento público apresentou influência da matriz para o glifosato conforme dados da Tabela 13. Esse efeito pode ter sido causado pelo fato de que esse tipo de matriz é retirada de corpo d'água, submetida a tratamento convencional e posteriormente clorada o que pode ocasionar a cloração do glifosato. Já a água superficial (de açude) apresentou valores acima do recomendado de efeito matriz que é 20% (CARDOSO, NÓBREGA & ABRANTES 2008).

Tabela 14. Efeito matriz dos compostos avaliados por CIC.

Compostos	Matriz	Efeito Matriz (%)
Glifosato	H ₂ O tratada	1,3
AMPA	H ₂ O tratada	1,9
Glifosato	H ₂ O superficial	4,1
AMPA	H ₂ O superficial	3,8

Avaliando-se os resultados obtidos por CIC pode-se notar que não houve interferência da matriz na determinação dos compostos conforme Figura 20 e Tabela 14. Esse efeito de matriz é mais significativo na análise de agrotóxicos quando estes se encontram em concentrações mais baixas ou quando a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta. Os componentes das matrizes aquosas que podem influenciar na análise são: matéria orgânica, ácidos húmicos, ácidos fúmicos, bem como os sais presentes nas amostras de água (PINHO *et al.*, 2009).

Grande parte da matéria orgânica contida em águas naturais encontra-se como substâncias húmicas. Essas substâncias são uma mistura complexas de moléculas com alto peso molecular, semelhantes entre si e formadas pela decomposição de plantas e organismos aquáticos (TOSCANO *et al.*, 2000).

As interações das substâncias húmicas com compostos orgânicos, como por exemplo, os agrotóxicos estão relacionados com efeitos de adsorção, efeitos solubilizantes, hidrólises e fotossensibilizantes. Processos estes, que quando presentes nas amostras aquosas, mesmo em baixas concentrações, acabam influenciando na detecção e ou na ionização do analito na análise cromatográfica (TOSCANO *et al.*, 2000).

Portanto, como os analitos apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99 demonstrando que não há problemas de variação da resposta linear dos compostos por estarem diluídos em brancos da matriz e também por apresentarem média de recuperação na faixa de 79 – 105% por LC-MS/MS e 70 – 113% por CIC com coeficiente de variação (RSD) entre 2,85 – 14% e 1 – 10%, respectivamente, pode-se assegurar que mesmo com a influência da matriz no sinal dos analitos, a linearidade da resposta, bons índices de recuperação e RSD também são mantidos e as quantificações das amostras podem ser realizadas por ambas as técnicas, mas mostrando a necessidade de realizar a quantificação dos compostos empregando curvas preparadas no extrato da matriz quando empregada a técnica LC-MS/MS. Isto explica a maior precisão e a não interferência da matriz na análise por CIC, pois não há uma etapa de ionização, diferentemente do que ocorre no sistema LC-MS/MS, onde a matriz afeta a eficiência de ionização.

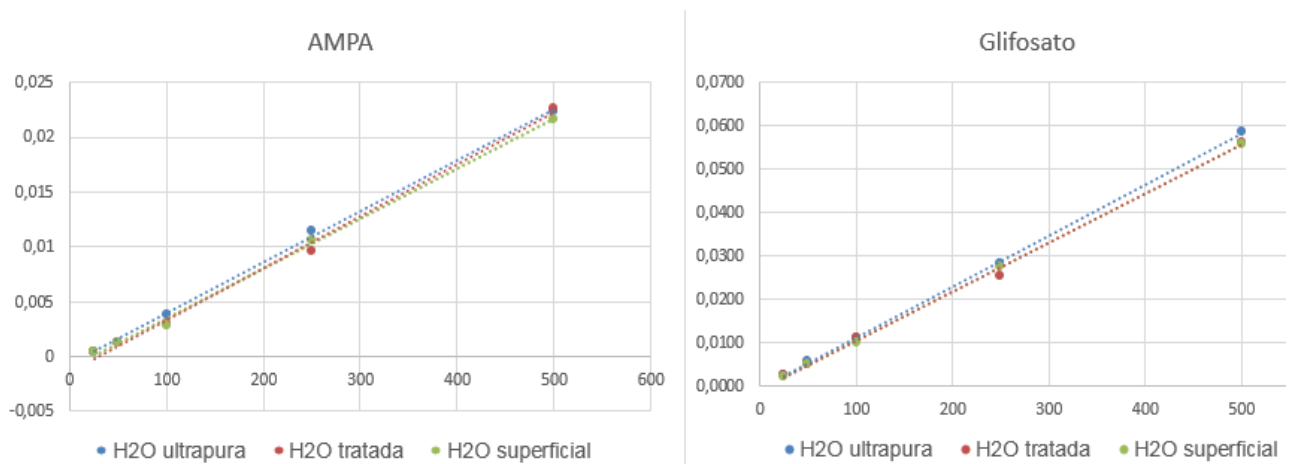


Figura 17. Resultados dos testes de efeito matriz em CIC.

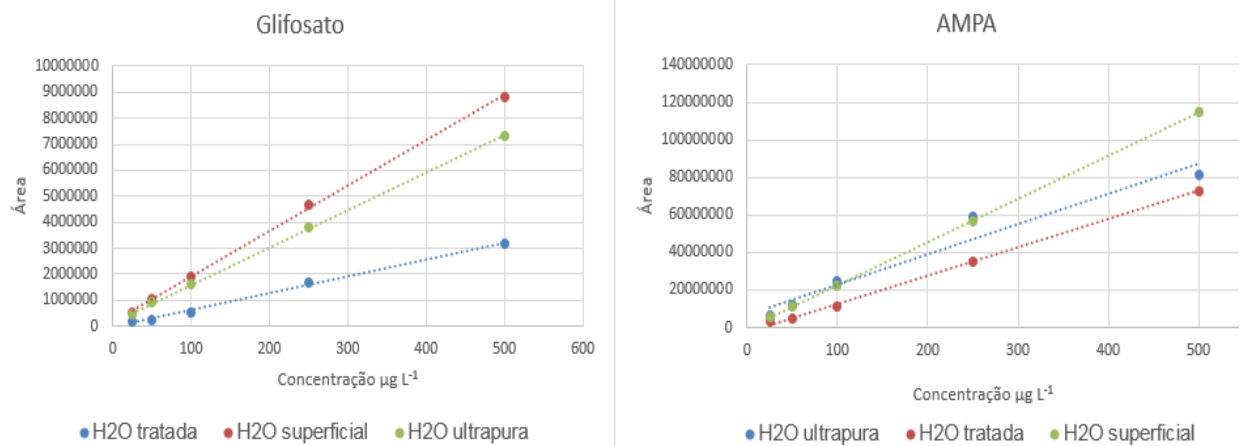


Figura 18. Resultados dos testes de efeito matriz em LC-MS/MS.

4.3.6. Aplicação do método

A aplicação do método desenvolvido em amostra real de água de abastecimento público e em água ultrapura mostrou bom desempenho, estando de acordo com os critérios de adequação de métodos cromatográficos.

O procedimento proposto foi aplicado a fim de determinar se as matrizes continham algum nível de concentração dos compostos analisados. Não houve detecção nas amostras de água de abastecimento público das cidades do Sertão e de Santa Maria, bem como nas amostras de água dos rios Jacuí e Vacacaí Mirim.

5. CONCLUSÕES

A produção agrícola no Brasil desempenha um importante papel na economia e desenvolvimento do país, sendo um investimento de grande rentabilidade e constante expansão. Associado a isto, está o consumo cada vez mais expressivo de agrotóxicos para garantia do aumento da produtividade. Em contrapartida, o uso abundante de agrotóxicos pode ocasionar a contaminação dos sistemas hídricos superficiais e subterrâneos potencialmente utilizados para o consumo humano. Sendo assim, este estudo concentrou-se no desenvolvimento e validação de um método analítico para monitorar resíduos do herbicida glifosato e seu metabólito o AMPA, aplicado intensamente desde 1971 em diferentes culturas para a prevenir, reduzir ou destruir plantas daninhas. Devido às suas rotas de degradação esse produto pode então contaminar recursos hídricos utilizados para o consumo humano.

A escolha desses analitos buscou atingir o Valor Máximo Permitido (VMP) estabelecido pela Portaria 2914. Devido a esses dois compostos selecionados apresentarem características peculiares, não podendo ser incluídos em método multiresíduo, avaliou-se uma metodologia empregando CIC e LC-MS/MS.

Essas técnicas demonstraram ser ideais para a determinação de resíduos de glifosato e de AMPA, visto que CIC permite a separação dos compostos por troca iônica e posteriormente detecção por condutividade com isso apresentando boa precisão, já o a técnica de LC-MS/MS usando acoplamento com a espectrometria de massas possibilita elevada detectabilidade e seletividade. Além disso, permite realizar uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massas característicos de cada analito, e quantitativa, através do modo de aquisição SRM.

As condições cromatográficas otimizadas tanto no CIC quanto no LC-MS/MS permitiram a identificação e quantificação dos compostos em estudo, num tempo total de análise de 40 min e de 3 min respectivamente e tempo de retenção dos compostos de 13 min para o AMPA nas determinações por CIC e de 1,6 min na LC-MS/MS. Já para o glifosato o tempo de retenção variou na determinação por CIC, ficando em 24 min na análise junto aos ânions F^- , Cl^- , Br^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} e PO_4^{3-} , e em 32 min na análise sem o padrão desses ânions.

Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados na validação do método foram satisfatórios. Ambos os agrotóxicos em estudo apresentaram boa linearidade

das curvas analíticas, com coeficientes de determinação maiores que 0,99 na faixa entre 25 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As recuperações do método estiveram entre 70 e 120%, e os valores de precisão obtidos ficaram dentro do limite aceitável ($\text{RSD} \leq 20\%$).

O método quando aplicado em amostras reais de água apesar de não ser detectado resíduo nenhum resíduo desses herbicidas, mostrou-se que pode ser aplicado conforme avaliação dos resultados dos parâmetros de validação. A Portaria 2914 estabelece em 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ o limite para a soma de glifosato + AMPA.

Portanto, conclui-se que o método proposto para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água potável utilizando CIC e LC-(ESI)MS/MS mostrou-se eficaz por atender as os parâmetros de validação de métodos cromatográficos.

Considerando-se que os resultados obtidos como a linearidade da resposta, bons índices de recuperação e RSD são mantidos e as quantificações das amostras podem ser realizadas por ambas as técnicas, mas mostrando a necessidade de realizar a quantificação dos compostos empregando curvas preparadas no extrato da matriz, pode-se afirmar que os objetivos traçados para este trabalho foram atingidos e o método pode ser aplicado em análise de rotina laboratorial, a metodologia proposta apresentou vantagens pois contempla injeção direta da amostra no sistema sem a necessidade de etapas exaustivas de pré-concentração, extração e derivatização nas duas técnicas de determinação, além de ser uma excelente ferramenta para programas de monitoramento de resíduos do herbicida glifosato e seu metabólito AMPA em água destinada ao consumo humano e também atende a legislação vigente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. B. G.; MATTA, M. H. D. R.; MONTAGNER, E. **Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja**. Química Nova, v. 31, n. 1, p. 5-9, 2008.

ACQUAVELLA, J. F.; ALEXANDERS, B. H.; MANDEL, J. S.; GUSTIN, C.; BAKER, B.; CHAPMAN, P. **Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the form family exposure study**. Environmental Health Perspective, v.112, n.3, p.321-326. 2004

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R., BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L., **Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão**. Quim. Nova, v. 25, n. 3, p. 420-428, 2002a.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R. **Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação**. Quím. Nova, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002b.

ANVISA. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6e400500474594899c26dc3fbc4c6735/G01.pdf?MOD=AJPERES>>. Conforme Resolução RE nº 4.452 de 23/09/10 (DOU de 27/09/10). Acesso em 03/06/2014.

ANVISA. Agrotoxicologia. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicologia>>. Acesso em: 06.06.2014.

ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S.; PERES, T. B.; BAZARIN, S.; SAVOY, V. L. T.; MATALLO, M. B. **Glyphosate: influência na biota do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola**. Planta Daninha, v.22, n.1, p.95-100, 2004.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**. Wiley: Huddersfield, 2003.

BABA, Y.; TAKEDA, M.; YOSINO, K.; SAGARA, E.; TAI, T.; YAMASITA, M. **Acute toxicity of the herbicide “Roundup” in the rat.** Jpn. J. Toxicol., 2, 397-400, 1989.

BATTAGLIN, W. A.; KOLPIN, D. W.; SCRIBNER, E. A.; KUIVILA, K. M.; SANDSTROM, M. W. **Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams, 2002.** Journal of the American Water Resources Association, v.41, n.2, p.323-332. 2005.

BENGTSSON, G.; HANSSON, L. A.; MONTENEGRO, K. **Reduced grazing rates in *Daphnia pulex* caused by contaminants: Implications for trophic cascades.** Environmental Toxicology and Chemistry, v.23, n.11, p.2641-2648. 2004.

BOLOGNESI, C.; BONATTI, S.; DEGAN, P.; GALLERANI, E.; PELUSO, M.; RABBONI, R.; ROGGIERI, P.; ABBONDANDOLO, A. **Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup.** J. Agric. Food Chem., v.45, n.5, p. 1957-1962, 1997.

BOS, S. J.; VAN LEEUWEN, S. M.; KARST, U. **From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry.** Anal. Bioanal. Chem., v. 384, n. 1, p. 85-99, 2006.

BOTTA, F.; GWENAËLLE, L.; GUILLAUME, C.; FABRICE A.; MOREAU-GUIGON, E.; FAUCHON N.; GUERY B.; CHEVREUIL M.; BLANCHOU H. **Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems.** Chemosphere, v. 77, p. 133-139, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil, 2012/2013 a 2022/2023. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica – Brasília: Mapa/ACS, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes%20-%20versao%20atualizada.pdf> Acesso em 18/08/2014

BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses_intoxicacoes/Conceitos_Basicos_de_Toxicologia.pdf> Acesso em 09/06/2014.

BRASIL. Resolução CONAMA, Nº 20, de 18 de Junho de 1986. Publicado no DOU de 30/07/1986. Disponível em: <<http://www.daejundiai.com.br/wp-content/uploads/2013/10/Resolu%C3%A7%C3%A3o-CONAMA-20-1986.pdf>>. Acesso em: 06.06.2014.

BRASIL. Portaria Nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 06/06/2014.

BRASIL. Resolução Nº 357, de 17 de Março de 2005. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>> Acesso em: 06/06/2014.

BRASIL. Política Nacional de Recursos Hídricos – Lei Nº 9.433/1997. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9433.htm>. Acesso em: 06/06/20014.

BRONSTAD, J. O.; FRIESTAD, H. O. The herbicide glyphosate, p. 200-205. Londres: Butterworth, 1985.

CARDOZO, M. H. W. M.; NÓBREGA, A. W.; ABRANTES, S. **Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso em tomates.** Revista Analítica, v. 34, p. 48-55, 2008.

CARVALHO, N. L.; PIVOTO, T. S. **Ecotoxicologia: Conceitos, Abrangência e Importância Agronômica.** Revista Eletrônica do PPGEAmb-CCR/UFSM, Vol. 2. Nº 2, 2011.

CHEN, Y.; WU, F.; LIN, Y.; DENG, N.; BAZIHIN, N; GLEBOV, E. **Photodegradation of glyphosate in the ferrioxalate system**. Journal of Hazardous Materials, v. 148, p. 360–365, 2007.

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

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos**. Quím. Nova, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. **Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica em chama**. Quimica Nova, v.24, n. 3, p. 374-380, 2001.

COUNCIL DIRECTIVE. **Relating to the quality of water intended for human consumption**. European Communities, 1980. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/>> Acesso em: 06/06/2014.

DIMTRAKOPOULOS, L. K.; THOMAIDIS, N. S.; MEGOULAS, N. C.; KOUPPARIS, M. A. **Effect of suppressor current intensity on the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by suppressed conductivity ion chromatography**. Journal of Chromatography A, v. 1217, n. 22, p. 3619-3627, 2010.

DIONEX CORPORATION. Sistema supressor para análise de ânions (A) e de cátions (B). Fonte: www.dionex.com/en-us/webdocs/87169-Man-Supressor-CES-300-065386-02-Aug12.pdf> Acesso em: 18/06/2014.

DIONEX CORPORATION. Manual de produtos. Disponível em: <<http://www.dionex.com/en-us/documents/lp-71572.html>> Acesso em: 18/06/2014.

DONATO, F. F. **Resíduos de agrotóxicos em água potável usando SPE e determinação rápida por LC-MS/MS e GC-MS/MS.** Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

DOQ-CG-CRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 03-FEV/2010. Disponível em:

<http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>

Acesso em: 18/06/2014.

DORES, E. F. G. C; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. **Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para o consumo humano em primavera do leste, Mato Grosso – análise preliminar.** *Quim. Nova*, v. 24, p. 27-36. 2001.

EITH, C. et al. **Práticas em cromatografia de íons – Uma introdução.** Suíça. 2ª Ed. Impresso por Metrohm LTDA. 2007.144p

Esquema fonte ionização APCI. Disponível em:

<<http://www.shimadzu.com/an/lcms/lcms2020/duis.html>> Acesso em: 18/06/2014.

Esquema fonte ionização APPI. Disponível em:

<http://www.uel.br/eventos/semanadaquimica/2010/arquivos/minicurso/outras_fontes_ionizacao.pdf> Acesso em: 18/06/2014

Esquema fonte de ionização ESI. Disponível em:

<http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/espectrometria_massas.pdf> Acesso em: 18/06/2014.

Esquema fonte de ionização ESI. Disponível em:

<http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/espectrometria_massas.pdf> Acesso em: 18/06/2014.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1986.: **In**. Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggieri, P. and Abbondandolo, A., **Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup**. J. Agric. Food Chem., 45, 1957-1962, 1997.

FERRER, Y. **Colombia: áreas protegidas em la mira del glifosato**. Disponível em: <http://www.biodiversidadla.org/Menu_Derecha/Prensa/Colombia_areas_protegidas_en_la_mira_del_glifosato_por_Yadira_Ferrer> Acesso em 28/09/2014.

FRIGHETTO, R.T.S. Impacto ambiental decorrente do uso de pesticidas agrícolas. **In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. Microbiologia ambiental**. Embrapa, cap 17, p. 415-438, 1997.

GALLI, A. J. B; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. Monsanto do Brasil Ltda. ACADCOM Gráfica e Editora Ltda. 2005.

GAO, S.; ZHANG, Z.; KARNES, H. T. **Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives**. J. Chromatogr. B, v. 825, p. 98-112, 2005.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.167, n.1, p.35-120, 2000.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M.C. **Signal suppression/ enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry**. J. Chromatogr. A, v. 1217, n. 25, p. 3929-3937, 2010.

HADDAD P. R.; JACKSON P. E. Ion Chromatography – Principles and Applications, 1st ed., J. Chromatogr. Library Vol. 46, Elsevier Verlag, Amsterdam. 1990.

HADDAD P. R.; NESTERENKO P. N.; BUCHBERGER W. **Recent developments and emerging directions in ion chromatography**. Journal of Chromatography A, v. 1184, p. 456–473, 2008.

HAO, C.; MORSE, D.; MORRA, F.; ZHAO, X.; YANG, P.; NUNN, B.; **Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode column**. Journal of Chromatography A, v. 1218, n. 33, p. 5638– 5643, 2011.

HORVÁTH, C.G.; PREISS, B. A.; LIPSKY, S. R. **Fast Liquid chromatography: An investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers**. Anal. Chem. v. 39, p. 1227, 1967.

ISHII, D.; HIBI, K.; ASAI, K.; JONOKUCHI, T. J. Chromatogr. 151, 147, 1978.

IUPAC. Aminomethylphosphonic Acid (AMPA). Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/842.htm>>. Acesso em 29/04/2014.

IUPAC. Glyfosate. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/373.htm>>. Acesso em 29/04/2014.

JONG, E. P.; LUCY, C. A. **Low-picomolar limits of detection using high-power light-emitting diodes for fluorescence**. Analyst, v. 131, n. 5, p. 664-669, 2006.

KIM, M.; STRIPEIKIS, J.; IÑÓN, F.; TUDINO M.; **A simplified approach to the determination of n-nitroso glyphosate in technical glyphosate using HPLC with post-derivatization and colorimetric detection**. Talanta, v. 72, n. 3, p. 1054–1058, 2007.

KRAEMER, A. F.; MARCHESAN, E.; AVILA, L. A.; MACHADO, S. L. O; GROHS, M. **Destino ambiental dos herbicidas do grupo das imidazolinonas**. Planta Daninha, v. 27, n.3, p.629-639, 2009.

KOLPIN, D. W.; THURMAN, E. M.; LEE, E. A.; MEYER, M. T.; FURLONG, E.T.; GLASSMEYER, S.T. **Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States**. *Science of the Total Environment*, v.354, n.2-3, p.191-197. 2006.

KOLLMAN, W.; SEGAWA, R. **Interim report of the pesticide chemistry database: environmental hazards assessment program**. Department of Pesticide Regulation, 1995. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/ehapreps/eh9504.pdf>>. Acesso em: 05.06.2014.

LANÇAS, F.M. **A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?** *Scientia Chromatographica*, v. 1, p. 35-61, 2009.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos, Ed. RiMa, 4ª Ed, 2004.

LEE, J.H.; BANG, K.W. **Characterization of urban stormwater runoff**. *Water Research*, v. 34, n. 6, p. 1773–1780, 2000.

LEVIGARD, Y. E.; ROZEMBERG, B. **A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas de "nervos" no meio rural: uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos**. *Cad. Saúde Pública*, vol.20, n.6, pp. 1515-1524, 2004.

LOCKE, M. A.; ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. **Integrating soil conservation practices and glyphosate-resistant crops: impacts on soil**. *Pest Management Science*, v.64, n. 4, p.457–469, 2008.

MAJEWSKI, M.S.; COUPE R.H.; FOREMAN, W.T.; CAPEL P.D. **Pesticides in Mississippi air and rain: A comparison between 1995 and 2007**. *Environ Toxicol Chem.*, v. 33, n. 6, p. 1283-1293, 2014.

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

MARTINEZ, T. T.; BROWN, K. **Oral and pulmonary toxicology of the surfactant used in Roundup herbicide**. Proc. West. Pharmacol. Soc., 34, 43-46, 1991.

MARTINS JÚNIOR, H. A. **Estudo de determinação de resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em amostras de soja e água usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem com ionização por electrospray (LC-ESI/MS/MS)**. 2005. Dissertação (Mestre em ciências na área de tecnologia nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo-SP. 2005.

MENSINK, H.; JANSSEN, P. **Glyphosate**. World Health Organization, Geneva. 1994. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>>. Acesso em 29/04/2014.

MILHOME, M. A. L.; SOUSA, D. O. B.; LIMA, F. A. F.; NASCIMENTO, R. F. **Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE**. Revista Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 14, p. 363-372, 2009.

MORAES, P.V.D.; ROSSI, P. **Comportamento ambiental do glifosato**. Scientia Agraria Paranaensis, v.9, n. 3, p. 22-35, 2010.

MOORE, S.; SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. **Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improve System**. Analytical Chemistry, n. 30, pp 1185-1190. 1958.

NETO, S. A. **Degradação do herbicida glifosato e suas formulações comerciais: uma comparação entre processos eletroquímicos**. 2009. Dissertação (Mestrado em ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. São Paulo. 2009.

NORTOX S/A. Glifosato Nortox. Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA sob nº 03078394 (Bula). Disponível em: <http://www.nortox.com.br/imagens/produtos/glifosato_bula.pdf> Acesso em 09/06/2014.

O'TOOLE, M.; LAU, K. T.; SHAZMANN, B.; SHEPHERD, R.; NESTERENKO, P. N.; PAULL, B.; DIAMOND, D. **Novel integrated paired emitter-detector diode (PEDD) as a miniaturized photometric detector in HPLC**. *Analyst*, v. 131, n. 8, p. 938-943, 2006.

PAPADOYANNIS, I.N.; SAMANIDOU, V.F. **Ion Chromatography Principles, suppressed and Nonsuppressed**. *Encyclopedia of chromatography*, p. 858-861, 2004.

PASCHOAL, R. A. J.; RATH, S.; AIROLDI, S. P. F. **Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos**. *Quim. Nova*, v 31, n.5, p. 1190-1198, 2008.

PAULL B.; NESTERENKO P. N. **Novel ion chromatographic stationary phases for the analysis of complex matrices**. *Analyst*, v. 130, n. 2, p. 134-146, 2005.

PEIXOTO, S. C. **Validação e aplicação de método empregando quechers modificado e GC-ECD para determinação de resíduos de pesticidas em grão e casca de arroz**. Tese de Doutorado em Química, UFSM, Santa Maria, 2010.

PRATA, F.; LAVORENTI, A. **Retenção e mobilidade de defensivos agrícolas no solo**. In: ALLEONI, L. R. F.; REGITANO, J. B. (Ed.). *Apostila do simpósio sobre dinâmica de defensivos agrícolas no solo: aspectos práticos e ambientais*. Piracicaba: ESALQ, Universidade de São Paulo, pp. 57-69, 2002.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. **QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas.** Quim. Nova, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

QUAGHEBEUR, D.; SMET, B.; WULF, E.; STEURBAUT, W. Pesticides in rainwater in Flanders, Belgium: results from the monitoring program 1997-2001. **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v.6, n.3, p.182-190. 2004.

RAMWELL, C. T.; HEATHER, A. I.; SHEPHERD, A. J. **Herbicide loss following application to a railway.** Pesticide Management Science, v.60, n. 6, p.556-564. 2004.
REMIÃO, F. **Trabalho realizado no âmbito da disciplina de Biotoxicologia no ano lectivo 2006/07.** Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Disponível em: <http://www.ff.up.pt/monografias_toxicologia/monografias/ano0607/glifosato/frame11.html>. Acesso em: 10.06.2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Quim Nova, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

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-RJ, 2011.

RIOS, C., SALVADO, V., HIDALGO M. **Facilitated transport and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA through a solid supported liquid-membrane.** J. Membr. Sci., 83, 5231, 2002.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. **Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation.** Journal of Chromatography A, v. 1158, p. 111-125, 2007.

RELYEA, R. A. **The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians**. *Ecological Applications*, v.15, n.4, p.1118-1124. 2005.

RICORD, A. H.; OKUBO, M. A. IKEMORI, K. M.; YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. **Efeitos do glifosato no crescimento da cana-de açúcar quando aplicado via foliar e no solo**. ESALQ, Universidade de São Paulo. Disponível em: <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2396&numeroEdicao=15>>. Acesso em: 28/09/2014.

SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo). **Nova Portabilidade de Potabilidade de Água**: Busca de consenso para viabilizar a melhoria da qualidade de água potável distribuída no Brasil. *Revista do Departamento de água e esgoto (DAE)*. São Paulo, Nº 189. Mai/ago,2012. Disponível em: <http://revistadae.com.br/downloads/Revista_DAE_Edicao_189.pdf>. Acesso em 06/06/2014.

SALVADOR, J. F. **Análise da deposição em aplicações aéreas de defensivos em função de diferentes alturas de vôo e volumes de calda**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – UNESP – Campus de Botucatu-SP, 2011.

SANCO (EUROPEAN COMMISSION) *Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis*, 4a Edição, Documento Nº SANCO/12495/2011, 01 de Fevereiro 2012, Bruxelas, Bélgica. 2012.

SANTOS, E. A.; CORREIA, N. M.; BOTELHO, R. G. **Resíduos de herbicidas em corpos hídricos - Uma revisão**. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v.12, n.2, p.188-201, 2013.

SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. **Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água**. *In. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. Curitiba. v. 13, 2003.

SAWADA, Y.; NAGAI, Y.; UHEYAMA, M.; YAMAMOTO, I. **Probable toxicity of surface-active agent in commercial herbicide containing glyphosate.** The Lancet, v. 331, p. 299, 1988.

SCRIBNER, E. A.; BATTAGLIN, W. A.; GILLIOM, R. J.; MEYER, M. T. 2007. **Concentration of glyphosate, its degradation product, aminomethylphosphonic acid and glufosinat in ground and surface water, rainfall, and soil samples collected in the United States, 2001-2006.** 2007. Disponível em: <<http://pubs.usgs.gov/sir/2007/5122/pdf/SIR2007-5122.pdf>. Acesso em 16/06/2014>.

SCHIESARI, L. **Defensivos Agrícolas: Como evitar danos à saúde e ao meio ambiente.** Séries Boas Práticas. Nº 8. Disponível em: <<http://www.ipam.org.br/biblioteca/livro/Defensivos-agricolas-Como-evitar-danos-a-saude-e-ao-meio-ambiente/681>> Acesso em: 06.06.2014.

SCHORODER, E. P.; JAUER, A.; ANDRADE, G. P. MARTINI, A. T. **Aplicação aérea de glifosato com diferentes equipamentos e volumes de calda no controle de plantas daninhas.** Sociedade Brasileira da Ciência das plantas Daninhas Disponível em: <http://congressosbcpd.com.br/sistema-inscricoes/documentos_cientificos/pdf/27_XXVIIIICBCPD.pdf> Acesso em 28/09/2014.

SCOTT, R. P. W.; KUCERA, P.; J. Chromatogr. 169, 51, 1979.

SILVA, A.S; FERNANDES, F.C.; TOGNOLLI, J.O.; PEZZA, L.; PEZZA, H.R.; **A simple and green analytical method for determination of glyphosate in commercial formulations and water by diffuse reflectance spectroscopy.** Spectrochimica Acta, v. 79, n. 5, p. 1881-1885, 2011.

SILVA, R. G. C.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. **Cromatografia líquida capilar: estado da arte e aplicações.** Química Nova, v. 34, n. 5, p. 841-849. 2011.

SKARK, C.; ZULLEI-SEIBERT, N.; WILLME, U.; GATZEMANN, U.; SCHLETT C. **Contribution of non-agricultural pesticides to pesticide load in surface water.** Pesticide Management Science, v.60, n. 6, p.525-530. 2004.

SKOOG, D. A.; *et. al.* **FUNDAMENTOS DE QUÍMICA ANALÍTICA.** 8ª ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning. 2006.

SMALL, H.; STEVENS, T.S.; BAUMAN, W.C.; **Novel ion exchange chromatography method using conductimetric detection.** Analytical Chemistry, v.47, n.11, 1975.

SPADOTTO, C. A. **Classificação do impacto ambiental.** Comitê do Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da ciência das Plantas Daninhas, 2002.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C.; DE ANDRÉA, M.M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações.** Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42, 2004.

SPADOTTO, C. A. **Avaliação de riscos ambientais de agrotóxicos em condições brasileiras.** Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 58, 2006.

SOLOMON, K. R.; THOMPSON, D. G. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health B**, v.6, n.3, p.211-246, 2003.

SULLIVAN, T.P.; SULLIVAN, D.S.: 1979. In. CARLISLE, S.M.; TREVORS, J.T. **Glyphosate in the environment.** Water, air and soil pollution, v.9, pp. 409-420, 1988.

SUN, Y.; WANG, C.; WEN, Q.; WANG, G.; WANG, H.; QU, Q.; HU, X. **Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in water by LC using a New Labeling Reagent, 4 – Methoxybenzenesulfonyl Fluoride.** Chromatographia, v. 72, p.679 – 686, 2010.

TAROUCO, C.P. **Cinética e Fisiologia da biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos expostos a este herbicida**. Dissertação de mestrado, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

TATE, T. M; JACKSON, R. N; CHRISTIAN, F. A. **Effects of glyphosate and dalpon on total free amino acids profiles of *Pseudosuccinea columella* snails**. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v.64, n.1, p.258-262. 2000.

TELLES, D. D. A. **Água na agricultura e pecuária**. São Paulo, Ed. Escrituras, 2ª ed., 2002.

TEÓFILO, R. F. **Planejamentos Experimentais para a Otimização da Resposta Voltamétrica na Determinação do Herbicida Glifosato em Solo, Água e Vegetais**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2003.

THOMPSON, H. S. **On the absorbent power of soils**. J. Roy. Agric. Soc. Engl., v. 11, p. 68-74, 1850.

TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G.; CAPPLELLO, A. **An Overview of Matrix effects in liquid chromatography – mass spectrometry**. Mass Spectrom Rev., v. 30, n. 3, p. 491-509, 2010.

TSUDA, T.; NOVOTNY, M. V. Anal. Chem. 50, 632, 1978.

TSUI, M. T. K.; CHU, T. L. M. **Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors**. Chemosphere, v.52, n. 7, p.1189-1197. 2003.

WAY, J. T. **On the power of soils to absorb manure**. J. Roy. Agric. Soc. Engl., v. 11, p. 313-379, 1850.

WEISS, J. **Handbook of Ion Chromatography**. 3ª ed. República Federativa da Alemanha: Editora Wiley, 2004. 902p

World Health organization (WHO). Em **Glyphosate: Environmental Health Criteria159**. Genebra: WHO, 1994.

VAN STEMPVOORT, D.R.; ROY, J.W.; BROWN, S. J.; BICKERTON, G. **Residues of the herbicide glyphosate in riparian groundwater in urban catchments**. Chemosphere, v. 95, p. 455-463, 2-14.

VAN STEMPVOORT, D.R.; ROY, J.W.; GRABUSKI, J., BROWN, S. J., BICKERTON, G.; SVERKO, E. **An artificial sweetener and pharmaceutical compounds as co-tracers of urban wastewater in groundwater**. Sci. Total Environ., v. 461–462, p. 348–359, 2013.

7. ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Conforme o andamento das atividades laboratoriais gera-se uma quantidade significativa de resíduos líquidos e sólidos. Esses devem ser tratados ou descartados de forma adequada para que os mesmos não acabem contaminando o ambiente.

Neste sentido, os resíduos gerados durante o desenvolvimento da metodologia foram armazenados em recipientes adequados, devidamente separados, identificados e encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química (DQ) da UFSM. O DQ é responsável pela destinação dos resíduos gerados que serão posteriormente tratados por uma empresa terceirizada capacitada para essa finalidade.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Continuar a avaliação da aplicabilidade do método no monitoramento de diferentes amostras de água, como por exemplo, água superficial, água tratada e também, água mineral e água subterrânea determinando a presença e a concentração de resíduos dos herbicidas em estudados.

Avaliar a necessidade de descloração da água tratada antes da análise, a fim de verificar a degradação do glifosato pelo cloro residual presente amostra.

Aumentar o escopo de herbicidas altamente polares.

Testar outras condições na separação cromatográfica como outros tipos de colunas analíticas, a fim de obter melhores resultados para os compostos avaliados.

Aplicar o método para outros tipos de matrizes.