INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Determinação do glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em solo via HPLC-MS/MS

MAÍSE PASTORE GIMENEZ

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. Jose Oscar Vega Bustillos

São Paulo
2019

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Determinação do glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em solo via HPLC-MS/MS

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

MAÍSE PASTORE GIMENEZ

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. Jose Oscar Vega Bustillos

São Paulo
2019

Fonte de Financiamento: CAPES

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

PASTORE GIMENEZ, M. ***Determinação do glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em solo via HPLC-MS/MS***. 2019. 123 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pastore Gimenez, Maíse
   Determinação do glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em solo via HPLC-MS/MS / Maíse Pastore Gimenez; orientador Jose Oscar Vega Bustillos. -- São Paulo, 2019.
   123 p.

   Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

   1. glifosato. 2. AMPA. 3. HPLC-MS/MS. 4. solo. 5. PITC. I. Vega Bustillos, Jose Oscar, orient. II. Título.

Dedico este trabalho à minha família: aos meus avós, Gerônimo, Alice, Osvaldo e Maria do Carmo; aos meus pais, Marco Aurélio e Marlene; e a minha irmã Maitê, que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marco Aurélio e Marlene, que sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos da minha vida.

Aos meus avós Gerônimo, Alice, Osvaldo e Maria do Carmo que são a minha base.

À minha irmã Maitê que sempre me ensina e é minha parceira de vida. À sua família, Bernhard e, ao meu sobrinho, Enzo, que sempre me apoiam.

À minha prima Thais e tia Nilza pelo suporte que sempre me deram, principalmente, nesses dois anos.

As minhas amigas Bárbara e Priscila que sempre me fazem rir e estão do meu lado nos momentos mais difíceis.

A minha amiga Priscila que me abriu as portas para a realização deste mestrado.

Ao meu orientador Dr. Oscar Vega Bustillos por ter me apoiado nesta jornada e nunca me deixar desanimar.

Ao meu "coorientador" Daniel Temponi Lebre por todas as oportunidades, ensinamentos e confiança na área de espectrometria de massas.

A todos os meus colegas de laboratório: Marcelo, Joyce, Glaucia, Kelly, Marvin, Bia, Francine e Elias pela paciência, risadas e ajuda nesses dois anos.

A Caroline Lima de Oliveira que me ensinou muito sobre espectrometria de massas.

Ao CEMSA (Centro de Espectrometria de Massas Aplicada), lugar onde me desenvolvi profissionalmente na área de espectrometria de massas e utilizei a infraestrutura deste projeto.

À Dra. Mariangela Hungria da EMBRAPA Soja pelo fornecimento inicial das amostras de solo.

Ao André Marcelo de Souza da EMBRAPA Solo pelo fornecimento das amostras analisadas.

Ao IPEN (Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares) e ao CQMA (Centro de Química e Meio Ambiente) pelo fornecimento da infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

"Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva provar ao contrário."

Albert Einstein

RESUMO

GIMENEZ, M. P. ***DETERMINAÇÃO DO GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) EM SOLO VIA HPLC-MS/MS***. 2019. 127 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

O herbicida glifosato foi introduzido no mercado em 1970 e hoje é amplamente utilizado em todo o mundo. Após a aplicação, esse herbicida pode ser metabolizado pelas plantas ou submetido à água ou ao solo e pode ser degradado por microrganismos presentes no solo. Fatores, como pH, granulometria e matéria orgânica contribuem para sua adsorção no solo. Dependendo do teor de matéria orgânica do solo, este herbicida é degradado em seu principal metabólito, o ácido aminmetilfosfônico (AMPA). Atualmente, devido à complexidade dessa matriz, não existe legislação que regule o Limite Máximo de Resíduos (LMR) de glifosato e AMPA em solo no mundo. Portanto, o objetivo deste projeto é desenvolver e validar um novo método analítico com sensibilidade, seletividade e precisão para quantificar o glifosato e AMPA no solo pela cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial. Neste projeto, parceria com a EMBRAPA Soja e a EMBRAPA Solo para obtenção das amostras. A preparação da amostra compreende as seguintes etapas: extração, limpeza e derivatização. A reação de derivatização, estado da arte, é o reagente fenilisotiocianato (PITC), alternativo ao 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl), geralmente utilizado. Esse método alternativo possui vantagens de produtividade, como uma preparação mais simples de amostra. A metodologia relatada neste trabalho é capaz de detectar resíduos de glifosato e AMPA no solo com limites de detecção e quantificação, com 5,56 e 9,47 mg kg^{-1} para o glifosato, respectivamente; 2,33 e 3,96 mg kg^{-1} para o AMPA, respectivamente. Para aplicabilidade, foram analisadas sessenta amostras de solo de diferentes regiões do Brasil. Em doze amostras, a presença de AMPA foi identificada e, em uma amostra, o glifosato foi identificado.

Palavras-chave: PITC; soja transgênica; FMOC-Cl; validação de metodologia; EPSPS.

ABSTRACT

GIMENEZ, M. P. ***DETERMINATION OF GLYPHOSATE AND AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID (AMPA) IN SOIL BY HPLC-MS/MS***. 2019. 127 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

The herbicide glyphosate was introduced in the market in 1970 and today is widely used in the worldwide. After application, this herbicide can be metabolized by the plants or undergoes to the water or soil and can be degraded by the microorganisms in the soil. Factors, as pH, granulometry and organic matter, contribute for your adsorption in the soil. Depend on organic matter content in the soil, this herbicide is degraded in your main metabolite, aminomethylphosphonic acid (AMPA). Currently, due the complexity of this matrix, there is no legislation that regulates the Maximum Residue Limit (MRL) of glyphosate and AMPA in soil in the world. Therefore, the goal of this project is developed and validate a new analytical method with sensitivity, selectivity and accuracy to quantify glyphosate and AMPA in soil, by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. In this project, partnership with EMBRAPA Soja and EMBRAPA Solo to obtain samples. The sample preparation comprises the following steps: extraction, cleaning and derivatization. The derivatization reaction, state of the art is the phenylisothiocyanate reagent (PITC), alternative to the 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl), usually used. This alternative method has throughput advantages such as simpler sample preparation. The methodology reported in this work is capable of detecting residues of glyphosate and AMPA in soil with limits of detection and quantification, with 5,56 and 9,47 mg kg^{-1} for glyphosate, respectively; 2,33 and 3,96 mg kg^{-1} for AMPA, respectively. For applicability, sixty soil samples from different regions of Brazil were analyzed. In twelve samples the presence of AMPA was identified end in one sample glyphosate was identified.

Key words: PITC; transgenic soybean; FMOC-Cl; validation of methodology.

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Fração do solo de acordo com o diâmetro dos grãos do solo (escala granulométrica)..... 26

Tabela 2 - Técnicas de análise do glifosato e AMPA e seus receptivos derivatizantes. 39

Tabela 3 - Informações dos padrões analíticos utilizados no estudo..... 51

Tabela 4 - Gradiente de eluição utilizado no método cromatográfico B..... 58

Tabela 5 - Parâmetros MRM otimizados para os compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina derivatizados com PITC..... 59

Tabela 6 - Curva de calibração estoque (CCE) do glifosato e AMPA em solução de extração. 64

Tabela 7 - Controles de qualidade estoque (CQE) do glifosato e AMPA em solução de extração. 65

Tabela 8 - Curva de calibração do glifosato e AMPA na matriz solo. 65

Tabela 9 - Concentração dos cinco níveis dos controles de qualidade e o número de replicatas..... 66

Tabela 10 - Resultados obtidos para a determinação do pH do solo. 67

Tabela 11 - Resultado obtido do teor de matéria orgânica (MO) contida no solo..... 68

Tabela 12 - Testes realizados para a escolha da solução de extração. 70

Tabela 13 - Testes realizados para determinar o clean-up a ser utilizado na metodologia final. 72

Tabela 14 - Possíveis massa molar, fórmula molecular e razões massa / carga (m/z) dos compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina a partir da reação de derivatização com PITC. 76

Tabela 15 - Testes realizados para etapa de clean-up seguido de derivatização com PITC. 84

Tabela 16 - Gradiente de eluição utilizado no método cromatográfico A..... 86

Tabela 17 - Método A: parâmetros MRM otimizados para os compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina para metodologia sem derivatização. 87

Tabela 18 - Resultados das análises realizadas em triplicata do efeito da matriz para os compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina na concentração final de 250 ng mL^{-1}. 90

Tabela 19 - Média das áreas dos compostos nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas... 95

Tabela 20 - Resultados de seletividade determinados por meio dos testes F e t para o glifosato, pela adição de padrão em solvente e matriz solo, considerando $F_{7,7,95\%} = 3,790$ e $t_{14,\ 95\%} = 2,145$. 97

Tabela 21 - Resultados de seletividade determinados por meio dos testes F e t para o AMPA, pela adição de padrão em solvente e matriz solo, considerando $F_{7,7,95\%} = 3,790$ e $t_{12,\ 95\%} = 2,179$..... 97

Tabela 22 - Curvas de calibração, regressão linear e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) para os quatro experimentos realizados para o glifosato. 98

Tabela 23 - Curvas de calibração, regressão linear e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) para os quatro experimentos realizados para o AMPA. 98

Tabela 24 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para os compostos de estudo, glifosato e AMPA, no ensaio com matriz solo. 100

Tabela 25 - Regressão linear e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) calculados a partir dos resultados de recuperação das amostras fortificadas para o glifosato. 101

Tabela 26 - Regressão linear e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) calculados a partir dos resultados de recuperação das amostras fortificadas para o AMPA..... 101

Tabela 27 - Limite de decisão (CCα) e do limite de determinação (CCβ) calculados para o glifosato..... 102

Tabela 28 - Limite de decisão (CCα) e do limite de determinação (CCβ) calculados para o AMPA..... 102

Tabela 29 – Desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) calculados para o glifosato nos níveis de validação de 25, 50 e 75 mg kg^{-1}. .. 103

Tabela 30 – Desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) calculados para o AMPA nos níveis de validação de 15, 30 e 45 mg kg^{-1}. 103

Tabela 31 - Variância (s^2) de repetibilidade, entre experimentos e de reprodutibilidade calculados para o glifosato nos níveis de validação de 25, 50 e 75 mg kg^{-1}. 104

Tabela 32 - Variância (s^2) de repetibilidade, entre experimentos e de reprodutibilidade calculados para o AMPA nos níveis de validação de 15, 30 e 45 mg kg^{-1}. 104

Tabela 33 - Resultados das doze amostras em que foi possível verificar a presença do glifosato e AMPA..... 105

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

Figura 1 - Perfil do solo com os horizontes específicos. 23

Figura 2 - Estrutura do solo identificando as fases sólida, líquida e gasosa. ... 25

Figura 3 - Estrutura química do composto glifosato. 29

Figura 4 - Constantes de ionização do glifosato e suas estruturas. 30

Figura 5 - Estrutura química do subproduto AMPA. 31

Figura 6 - Constantes de ionização do AMPA e suas estruturas. 31

Figura 7 - Principais metabólitos formados pela degradação do glifosato no solo. 32

Figura 8 - Representação do processo de Extração em Fase Sólida (SPE). .. 37

Figura 9 - Esquema do processo de Extração Líquido – Líquido (LLE). 38

Figura 10 - Estrutura molecular do reagente PITC. 40

Figura 11 - Reações envolvidas no processo de degradação de Edman. 41

Figura 12 - Componentes do sistema HPLC-MS/MS. 43

Figura 13 - Processo de ionização por electrospray. 44

Figura 14 - Sequência dos parâmetros de energia otimizados no espectrômetro de massas. 46

Figura 15 - Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas 3200 QTRAP da marca Sciex (HPLC-MS/MS). 53

Figura 16 - Fluxograma do procedimento realizado para determinação do pH do solo. 54

Figura 17 - Fluxograma do procedimento realizado para determinar matéria orgânica no solo. 55

Figura 18 - Fluxograma da metodologia analítica utilizada. 57

Figura 19 - Esquema da infusão pós-coluna. 63

Figura 20 - Estrutura da molécula do glifosato em solo com pH = 4,80. 68

Figura 21 - Comparação dos quatro testes de extração realizados pela recuperação dos analitos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina em matriz solo. 71

Figura 22 - Comparação dos três testes de clean-up realizados pela recuperação dos analitos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina em matriz solo. 74

Figura 23 - Fluxograma do procedimento empregado para reação de derivatização com PITC na determinação do glifosato e AMPA no solo. 75

Figura 24 - Espectro MS no modo negativo, indicando a formação dos compostos derivatizados. 77

Figura 25 - Espectro MS/MS referente ao composto glifosato derivatizado com PITC (Gli + PITC). 78

Figura 26 - Possíveis estruturas para os íons formados a partir da fragmentação do glifosato derivatizado. 79

Figura 27 - Espectro MS/MS referente ao composto AMPA derivatizado com PITC (AMPA + PITC). 80

Figura 28 - Possíveis estruturas para os íons formados a partir da fragmentação do AMPA derivatizado. 81

Figura 29 - Espectro MS/MS referente ao composto fosfoetanolamina derivatizado com PITC (Fosfo + PITC). 82

Figura 30 - Possíveis estruturas para os íons formados a partir da fragmentação da fosfoetanolamina derivatizada. 83

Figura 31 - Comparação dos três testes de clean-up seguidos da etapa de derivatização pela recuperação dos analitos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina em matriz solo. 85

Figura 32 - Cromatograma dos compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina sem derivatização (método A) em água na concentração de 0,5 µg mL^{-1}. 88

Figura 33 - Cromatograma dos compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina derivatizados (método B) em água na concentração de 0,5 µg mL^{-1}. 89

Figura 34 - Cromatogramas em água (A) e solo (B) do composto glifosato derivatizado em infusão pós-coluna para determinação do efeito de matriz. 92

Figura 35 - Cromatogramas em água (A) e solo (B) do composto AMPA derivatizado em infusão pós-coluna para determinação do efeito de matriz. 93

Figura 36 - Cromatogramas em água (A) e solo (B) do composto fosfoetanolamina derivatizado em infusão pós-coluna para determinação do efeito de matriz. 94

Figura 37 - Gráfico das áreas dos compostos no período de 0, 6, 12 e 24 horas. 95

Figura 38 - Curva analítica obtida do experimento 4 para o glifosato. 99

Figura 39 - Curva analítica obtida do experimento 3 para o AMPA. 99

Figura 40 - Cromatograma da amostra 11 em que foram detectados os analitos glifosato e AMPA. 106

Figura 41 - Degradação do glifosato em solo, formando o principal componente de degradação, o ácido aminometilsfosfônico (AMPA) e, consequentemente, em dióxido de carbono (CO_2) e amônia (NH_3). 107

LISTA DE ABREVIATURAS

$(M-H)^-$	Molécula desprotonada
$(M+H)^+$	Molécula protonada
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
AMPA+PITC	AMPA derivatizado com PITC
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química por Pressão Atmosférica
API	Ionização a Pressão Atmosférica
ATZ	Derivado anilinotiazolinona
CCE	Curva de calibração estoque
CCα	Limite de decisão
CCβ	Capacidade de detecção
CE	Energia de colisão (*Collision Energy)*
EC	Eletroforese capilar
CEP	Potencial de entrada de colisão (*Collision Entrance Potential*)
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CQE	Controle de qualidade estoque
CQMA	Centro de Química e Meio Ambiente
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
CV	Coeficiente de Variação
CXP	Potencial de saída da célula de colisão (*Collision Exit Potential*)
CZE	Eletroforese capilar de zona
DP	Potencial de orifício (*Declustering Potential)*
DPR	Desvio padrão relativo
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EP	Potencial de entrada (*Entrance Potential)*
EPSPS	enol-piruvilshiquimato-fosfato-sintase
ESI	Ionização por Eletronebulização (*Electrospray)*
FIA	Análise de Fluxo Contínuo *(Flow Injection Analysis)*

FLD	Detector de Fluorescência
FMOC-Cl	Cloroformiato de 9-fluorenilmetila
Fosfo+PITC	Fosfoetanolamina derivatizado com PITC
GC	Cromatografia a gás
Gli	Glifosato
Gli+PITC	Glifosato derivatizado com PITC
HPLC-ESI-MS	Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de massas com ionização por *electrospray*
HPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas em *tandem*
IAA	Ácido indol acético
IC	Cromatografia de íons
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LLE	Extração líquido – líquido
m/z	Razão massa / carga
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MO	Matéria Orgânica
MRC	Material de Referência Certificado
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MS/MS	Espectrômetro de massas em *tandem*
PI	Padrão Interno
PITC	Fenilisotiocianato
pK	Constantes de dissociação
PTH	Derivado feniltio-hidantoína
Q1	Primeiro quadrupolo
Q2	Segundo quadrupolo
Q3	Terceiro quadrupolo
r^2	Coeficiente de determinação
s^2	Variância
SD	Desvio padrão (*Standard Deviation*)
SiBCS	Sistema Brasileiro de Classificação de Solos

SIM	Monitoramento de íons selecionados (*Single Ion Monitoring)*
SPE	Extração em fase sólida
TFA	Ácido trifluoroacético
TFAA	Anidrido de ácido trifluoroacético
TFE	Trifluoroetanol
t_r	Tempo de retenção
UV-vis	Ultravioleta – visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 OBJETIVO 21

3 REVISÃO DA LITERATURA 22

3.1 Solo 22

3.1.1 Perfil do solo 23

3.1.2 Constituição do solo 24

3.2 Herbicida Glifosato 28

3.2.1 Propriedades físico-química 29

3.2.1.1 Glifosato 29

3.2.2 Ácido aminometiflfosfônico (AMPA) 30

3.2.3 Comportamento do glifosato no solo 32

3.3 Métodos Analíticos 34

3.3.1 Técnicas estudadas para desenvolvimento de preparo de amostra 36

3.3.1.1 Extração em fase sólida 36

3.3.1.2 Extração líquido–líquido 37

3.3.2 Derivatização 38

3.3.2.1 Reagente de Edman: sequenciamento de aminoácidos 40

3.3.3 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas *tandem* (HPLC-MS/MS) 42

3.4 Validação do Método 46

3.4.1 Seletividade 47

3.4.2 Linearidade 47
3.4.3 Precisão 48
3.4.4 Exatidão 49
3.4.5 Recuperação 49
3.4.6 Limite de detecção e quantificação 50
3.4.7 Incerteza de medição 50
4 MATERIAIS E MÉTODOS 51
4.1 Materiais e reagentes 51
4.2 Equipamentos e materiais 52
4.3 Caracterização do solo 53
4.3.1 Determinação do pH do solo 53
4.3.2 Determinação de Matéria Orgânica (MO) do solo 55
4.4 Procedimento experimental 56
4.4.1 Método de preparação de amostra 56
4.4.2 Metodologia no sistema HPLC-MS/MS 58
4.5 Validação do Método 59
4.5.1 Seletividade 59
4.5.2 Linearidade 61
4.5.3 Efeito da Matriz 61
4.5.3.1 Adição de padrão pós-extração 62
4.5.3.2 Infusão pós-coluna 62
4.5.4 Estudo da estabilidade da reação de derivatização 63
4.5.5 Preparação das amostras para os experimentos do *software* ResVal 64

4.5.6 Preparo da curva de calibração e dos controles de qualidade 64
4.6 Amostragem e preservação da amostra 66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 67
5.1 Caracterização do solo 67
5.1.1 Determinação do pH do solo 67
5.1.2 Determinação da matéria orgânica (MO) 68
5.2 Estudos da metodologia 69
5.2.1 Estudos da metodologia do preparo de amostra 69
5.2.1.1 Estudo 1: Escolha da solução de extração 70
5.2.1.2 Estudo 2: Escolha do *clean-up* 72
5.2.1.3 Estudo 3: Estado da arte - reação de derivatização com fenilisotiocianato (PITC) 74
5.2.1.4 Estudo 4: Otimização da etapa de *clean-up* previamente a derivatização com PITC 84
5.2.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (HPLC-MS/MS) 85
5.3 Validação do método 90
5.3.1 Efeito da matriz 90
5.3.1.1 Adição de padrão pós-extração 90
5.3.1.2 Infusão pós-coluna 91
5.3.2 Estudo da estabilidade da reação de derivatização 95
5.3.3 Validação do método utilizando o guia 2002/657/EC – ResVal e DOC-CGRE-008 do INMETRO 96
5.3.3.1 Seletividade 96
5.3.3.2 Linearidade 98

5.3.3.3 Exatidão (recuperação)..... 100
5.3.3.4 Níveis críticos: limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ)..... 102
5.3.3.5 Precisão 103
5.3.3.6 Incerteza de medição..... 104
5.4 Análises das amostras 105
6 CONCLUSÃO 108
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 111
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 112
9 APÊNDICE..... 121

1 INTRODUÇÃO

Os herbicidas são amplamente utilizados na agricultura para controlar plantas invasoras e aumentar a produção agrícola. O processo produtivo agrícola está cada vez mais condicionado ao uso de agrotóxicos, pois estas substâncias são consideradas de extrema importância para o desenvolvimento econômico e agrícola do país (MELO, 2018).

Considerando todos os agrotóxicos utilizados, o glifosato, é o produto mais vendido no Brasil e no mundo, ocupando o primeiro lugar entre os herbicidas mais utilizados, desde 2008. Desde sua introdução, na década de 1970, vem sendo amplamente utilizado no controle pós-emergente em vários tipos de cultura transgênica e em praticamente todas as partes do mundo (TÉVEZ *et al.*, 2015; KACZYŃSKI *et al*., 2015; GALLI, 2005).

A ampla utilização do glifosato no controle de plantas daninhas é relacionada à toxicologia, ecotoxicologia, facilidade de manuseio, eficácia de controle, ganhos de produtividade, entre outros, que tornaram esse herbicida, líder mundial de vendas (MORAES *et al*., 2010).

Quando o glifosato é aplicado, parte do produto é diretamente absorvida, permanecendo nas plantas daninhas, e parte é encaminhado para o solo.

A sorção de herbicidas no solo é um processo importante, uma vez que determina quanto do herbicida ficará retido no solo e quanto estará disponível na fase líquida do solo. Esta proporção pode afetar a sorção pelas plantas, a degradação microbiana, fotólise, lixiviação e transporte. A sorção de glifosato no solo é um fator chave, contribuindo para a vulnerabilidade deste durante a degradação e o transporte.

O conhecimento da toxicidade e comportamento no ambiente de forma mais detalhada em diferentes condições ambientais ainda são necessários, visando diminuir os riscos à biota e a possível contaminação de água, ar, solo e alimentos (MORAES *et al*., 2010, KOSKINEN et al., 2016; BABUJIA et al., 2016).

Devido as características físico-químicas destes compostos, existe uma grande dificuldade no monitoramento desses resíduos, como a falta de metodologias analíticas confiáveis, rápidas e simples. O preparo de amostra para as análises de glifosato e o AMPA exige uma etapa exaustiva e complexa. Portanto, é fundamental o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de monitorar e quantificar esses compostos com eficiência e rapidez, pois a demanda por análises de resíduos de glifosato e AMPA aumentam proporcionalmente com o grande avanço da agropecuária. Outro fator importante é a necessidade de se controlar e monitorar esses compostos no meio ambiente, pois devido as suas caraterísticas peculiares, seus resíduos acabam chegando no solo e em corpos hídricos (MATOS, 2014).

Deste modo, este trabalho possui o objetivo de desenvolver e validar um método analítico rápido, simples, confiável e economicamente viável para a determinação de resíduo de glifosato e AMPA em solo utilizando a técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas em *Tandem* (HPLC-MS/MS – *High Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry*).

2 OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo o desenvolvimento de metodologia analítica para determinar e quantificar o herbicida glifosato e seu principal componente de degradação, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), em solo pela técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (HPLC-MS/MS).

Para atingir este objetivo os seguintes parâmetros serão estudados:

- Caracterização da matriz solo estudada, avaliando os parâmetros de pH e de matéria orgânica do solo coletado pela EMBRAPA Soja (Warta, Londrina - PR);
- Desenvolvimento de preparo de amostra simples, rápido e de menor custo para glifosato e AMPA em solo;
- Otimização do sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (HPLC-MS/MS) para detecção dos compostos em estudo: glifosato e AMPA;
- Validação de metodologia avaliando os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, efeito de matriz e estudo da estabilidade da reação de derivatização;
- Análise das amostras coletadas pela EMBRAPA Solo (Rio de Janeiro, RJ).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Solo

O solo é fundamental para o desenvolvimento da agricultura em um país, pois é o meio que possibilita maior produção de alimentos para os seres vivos. Quando associado a um clima propício, sua produtividade se torna o bem mais valioso para uma nação (MANAHAM, 2001).

A palavra solo possui vários significados, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) o define como um meio complexo e heterogêneo, produto da alteração do remanejamento e da organização do material original (rocha, sedimento ou outro solo), sob a ação da vida, da atmosfera e das trocas de energia que se manifestam, constituído por quantidades variáveis de minerais, matéria orgânica, água, ar e organismos vivos, incluindo plantas, bactérias, fungos, protozoários, invertebrados e outros animais. Já, o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS - EMBRAPA) o classifica como uma coleção de corpos naturais, constituídos por fases sólida, líquida e gasosa, tridimensionais, dinâmicos, formados por minerais e materiais orgânicos que ocupam a maior parte do manto superficial de nosso planeta, que contém matéria viva (SANTOS et al., 2018).

As principais funções do solo são: sustentação da vida e do *habitat* para pessoas, animais, plantas e outros organismos; manutenção do ciclo da água e dos nutrientes; proteção da água subterrânea; manutenção do patrimônio histórico, natural e cultural; conservação das reservas minerais e matérias primas e produção de alimentos para manutenção da atividade sócio – econômica (CETESB, 2018; MARTINS, 2010).

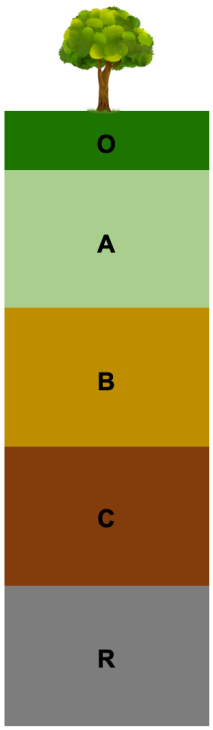
Portanto, o solo é o produto final da combinação do clima, topografia, organismos (flora, fauna e humanos) nas rochas e minerais originais ao longo do tempo. Como resultado, difere do material de origem em textura, estrutura, consis-

tência, cor, características químicas, biológicas e físicas (FAO, 2019).

3.1.1 Perfil do solo

Os solos, ao longo do tempo, por processos pedogenéticos, modificam sua composição original, devido a adições, perdas, translocações e transformações de energia e matéria, sob a influência do clima, organismos e relevo, que acarretam na formação de seções paralelas verticais, denominadas camadas e / ou horizontes, que se distinguem do material de origem inicial. A Figura 1 apresenta o perfil do solo (SANTOS *et al*., 2018).

Figura 1 - Perfil do solo com os horizontes específicos.



Fonte: Próprio autor.

Os horizontes são classificados por letras e sua classificação é (CAVARARO, 2007):

- Horizonte O: horizonte ou camada superficial da cobertura, de constituição orgânica, sobreposto a alguns solos minerais, podendo estar ocasionalmente saturado com água;

- Horizonte A: horizonte mineral, superficial ou em sequência ao horizonte ou camada O, apresenta concentração de matéria orgânica decomposta e perda ou decomposição, principalmente, de componentes minerais;

- Horizonte B: horizonte subsuperficial com acumulação de argila, ferro, alumínio, silício, húmus, carbonato de cálcio ($CaCO_3$), sulfato de cálcio ($CaSO_4$), ou de perda de $CaCO_3$, ou de acumulação de sesquióxidos[1]; ou com bom desenvolvimento estrutural

- Horizonte C: horizonte mineral pouco modificado por processos pedogenéticos, sem ou com pouca expressão de propriedades identificadoras de qualquer outro horizonte principal;

- Horizonte R: horizonte mineral de material consolidado constituído de rochas.

3.1.2 Constituição do solo

O solo é constituído pelas fases sólida, líquida e gasosa. A fase sólida é composta por matéria orgânica e, principalmente, mineral com formação de agregados e espaços vazios, denominados poros, que são preenchidos por água (fase líquida) e ar (fase gasosa).

De acordo com a Figura 2, a fase gasosa ocupa o espaço poroso do solo. O ar do solo possui composição variável, basicamente, de gás carbônico (CO_2) e oxigênio (O_2), estes produzidos ou consumidos pelas raízes das plantas e dos animais. Geralmente, o teor de CO_2 é superior ao teor de O_2 (CETESB, 2018; MEURER *et al*., 2004).

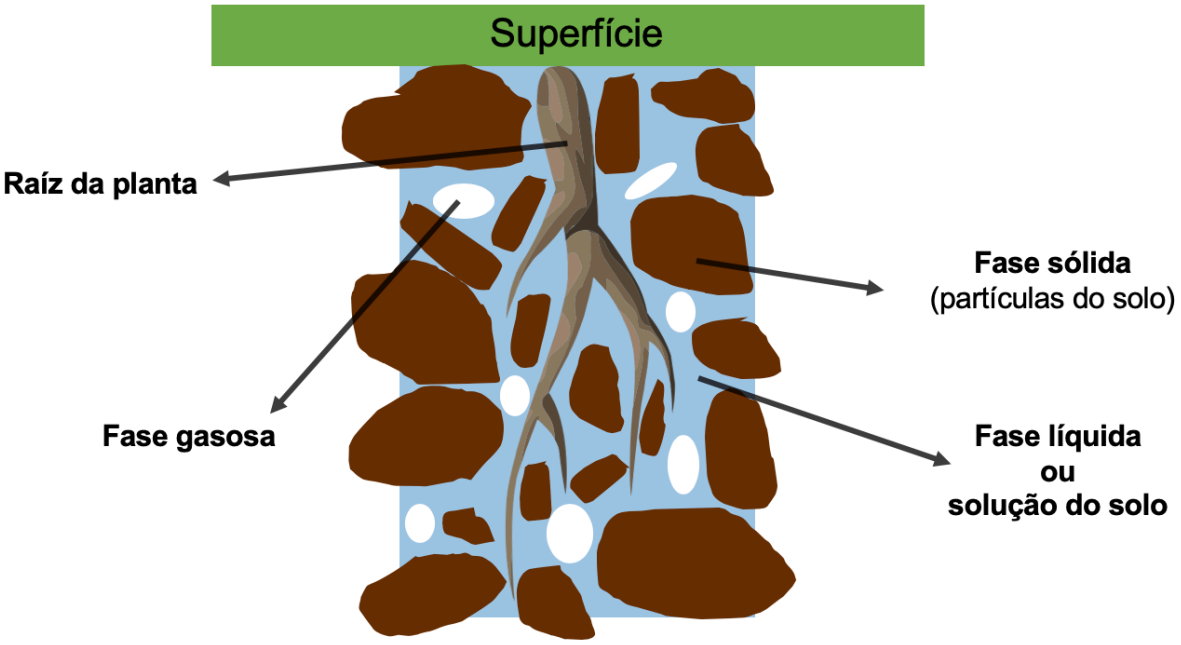
A fase líquida, denominada de solução do solo, é constituída de mistura de água com sais minerais, e compostos orgânicos. Esta fase possui função de transportar nutrientes essenciais das partículas sólidas para as raízes das plantas

[1] Composto que contém três átomos de oxigênio combinados com dois do outro constituinte da molécula (MICHAELIS, 2019).

até a atmosfera, processo conhecido como transpiração. Estas são alocadas nos poros, juntamente com o ar (MANAHAM, 2001; MEURER *et al*., 2004).

A fase sólida é constituída por material orgânico e mineral. Os materiais minerais, decorrentes das rochas, estão relacionados às frações de argila, silte e areia, presentes no solo, com dimensões e formas variáveis (CETESB, 2018; CAVARARO, 2007; MEURER *et al*., 2004).

Figura 2 - Estrutura do solo identificando as fases sólida, líquida e gasosa.



Fonte: Próprio autor.

A Tabela 1 apresenta a fração predominante do solo de acordo com a medida de granulometria (escala granulométrica).

A argila é o componente inorgânico que influencia na retenção de água e na troca de cátions, nutrientes para as plantas. Constituída por grupos de minerais secundários microcristalinos formados por silicatos de alumínio hidratados que possuem elevada superfície específica. O silte e a areia são frações menos eficientes nos processos químicos, pois são formadas por partículas mais grossas de minerais primários (MANAHAM, 2013; ROCHA, 2009).

Tabela 1 - Fração do solo de acordo com o diâmetro dos grãos do solo (escala granulométrica).

Fração do solo	Diâmetro (mm)
Argila	< 0,002
Silte	0,002 < 0,05
Areia muito fina	0,05 < 0,1
Areia fina	0,1 < 0,25
Areia Média	0,25< 0,5
Areia grossa	0,5 < 1
Areia muito grossa	1 < 2
Cascalho	2 < 20
Calhaus	20 < 200
Matacão	> 200

Fonte: CAVARARO, 2007.

A matéria orgânica é oriunda da decomposição vegetal e animal. Fonte de nutriente para os microrganismos, sofre reações químicas, como troca iônica; e, também, influencia nas propriedades físicas do solo. Além disso, dependendo do componente orgânico, contribui para o intemperismo da matéria mineral (CAVARARO, 2007; MANAHAM, 2013).

Dentre os componentes orgânicos do solo destacam-se as substâncias húmicas. Essas substâncias, também denominadas húmus, são macromoléculas de caráter complexo. Basicamente, podem ser divididas de acordo com a solubilidade em solução aquosa em ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e humina. As substâncias húmicas são propensas a formação de complexos com íons metálicos, óxidos hidratados, além de sofrerem interação com argilas minerais e herbicidas, entre outros compostos orgânicos (MARTINS, 2010).

As propriedades físico – químicas, capacidade de troca catiônica (CTC) e acidez do solo, se devem principalmente à elevada superfície específica e alta

reatividade apresentadas pelos componentes da fração argila, que possuem caráter coloidal[2] e carga líquida negativa, saturada por diversos cátions.

A CTC expressa a capacidade do solo em trocar cátions, definida como a quantidade de cátions adsorvidos reversivelmente por unidade de massa de material seco. Esta propriedade é associada à fertilidade do solo, portanto valores elevados de CTC, indicam que maiores quantidades de cátions podem ser armazenadas e, posteriormente, cedidas às raízes das plantas. Em solos com maiores quantidades de matéria orgânica, a CTC tende a ser maior, pois estes compostos possuem grupos carboxílicos, que podem ligar e trocar os cátions.

A acidez do solo é determinada pelo potencial hidrogeniônico (pH). Relacionado com o conceito de Brönsted e Lowry, uma substância ácida é aquela que tende a ceder prótons (íons hidrogênios, H^+) e uma base é qualquer substância que tende a aceitá-los. Em meio aquoso, o ácido se dissocia ou se ioniza, gerando H^+ e o ânion correspondente, como apresentado na Equação 1 (ROCHA *et al.*, 2009).

$$\underset{\text{ácido}}{HA} \leftrightharpoons \underset{\text{próton}}{H^+} + \underset{\text{ânion}}{A^-} \qquad (1)$$

Fonte: ROCHA *et al.*, 2009.

De acordo com a Equação 1, os H^+ dissociados correspondem à acidez ativa e o HA corresponde a acidez potencial. Quanto mais o equilíbrio da reação se desloca para a direita, maior é a atividade de H^+. A acidez do solo não é somente associada à acidez ativa, esta também pode ser associada à presença do íon alumínio (Al^{3+}) adsorvido no complexo de troca; à deficiência em cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e sódio (Na^+) (bases trocáveis) e ao H^+ ligado covalentemente a compostos de matéria orgânica (grupos carboxílicos e fenólicos) (ROCHA *et al.*, 2009; AGEITEC, 2019).

[2] Dispersões de partículas grandes, com diâmetro entre 1nm e 1μm, em um solvente (ATKINS *et al.*, 2006).

Portanto, os solos são matrizes altamente complexas com diversas variações de características em uma mesma região, podendo haver grandes diferenças de pH, capacidade de troca iônica e teor de matéria orgânica (HIGARASHI, 1999; MARTINS, 2010).

Ao compreender as características da matriz é possível entender o comportamento dos analitos glifosato e AMPA no solo.

3.2 Herbicida Glifosato

O herbicida glifosato, comercializado como *Round up*®, foi introduzido comercialmente pela empresa Monsanto na década de 1970. Este herbicida é o mais utilizado no mundo, registrado em pelo menos 130 países. O aumento de sua utilização deve-se a alterações na prática agrícola e ao desenvolvimento de culturas de plantas geneticamente modificadas que são resistentes a este herbicida (CETESB, 2019).

O glifosato é um herbicida sistêmico de amplo espectro, não seletivo e pós-emergente, que elimina efetivamente todos os tipos de plantas como gramíneas, plantas perenes, videiras, arbustos e árvores.

O glifosato atua na inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) que é a catalisadora do ácido chiquímico e do fosfato piruvato, responsáveis pela síntese dos aminoácidos aromáticos fenilanina, tirosina e triptofano, e assim, inibindo o crescimento das plantas daninhas. Também influencia outros processos, como a inibição da síntese de clorofila, estimula a produção de etileno, reduz a síntese de proteínas e eleva a concentração do ácido indol acético (IAA) (CETESB, 2019; GALLI *et al*., 2005; SILVA, 2016).

No Brasil, para o uso agrícola, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) autorizou seu uso nas seguintes culturas: algodão, ameixa, arroz, aveia preta, azevém, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citrus, coco, eucalipto, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagem, pêra, pêssego, pinus, seringueira, soja, trigo e uva. No entanto, também é utilizado em atividades denominadas não-agrícolas, que consiste em jardinagem; margens de rodovias e ferrovias; áreas sob rede de transmissão elétrica, pátios industriais, oleodutos e aceiros (ANVISA, 2019; GALLI *et al*., 2005).

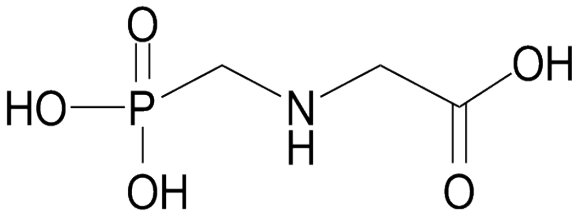
O MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) apresenta a classificação toxicológica e potencial de periculosidade ambiental e dos adjuvantes das diferentes formulações do glifosato no mercado. Apesar de ser considerado pouco tóxico, o glifosato apresenta em sua bula informações médicas para intoxicações descrevendo sintomas digestivos, cutâneos, oculares e respiratórios dos mais simples até o óbito pelas vias de absorção (FISPQ, 2008; MONSANTO, 2009).

3.2.1 Propriedades físico-química

3.2.1.1 Glifosato

O glifosato é um composto que possui o grupo químico glicina substituída. Seu nome químico é o N-(fosfonometil) glicina. Possui fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$, massa molar de 169,07 g mol^{-1} e fórmula estrutural apresentada na Figura 3 (IARC, 2017).

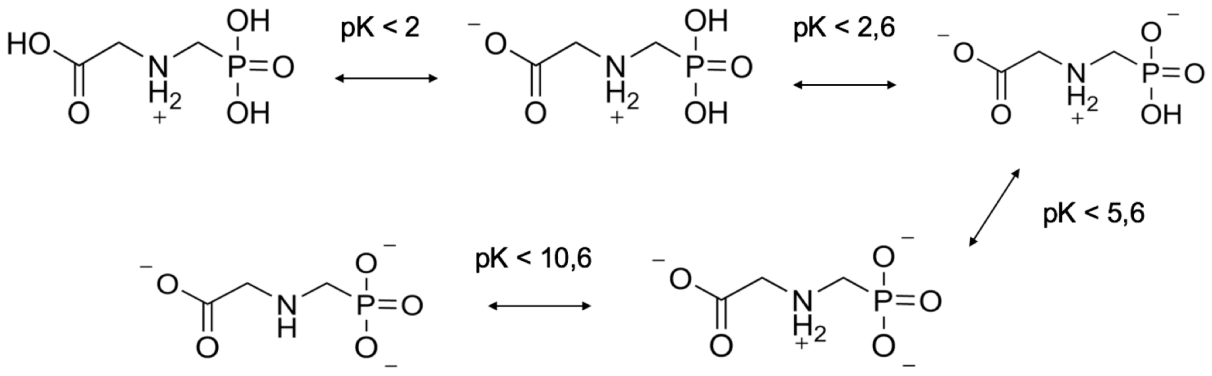
Figura 3 - Estrutura química do composto glifosato.



Fonte: Próprio autor.

Como propriedades físico-químicas apresenta solubilidade em água de 11,6 g L^{-1} a 25 °C, sendo pouco solúvel em solventes orgânicos. A densidade do glifosato é 0,5 g cm^{-3}, o ponto de fusão é 200 °C, o coeficiente de partição octanol-água, log P < -3,2; e pressão de vapor desprezível; 1,31 x 10^{-2} mPa a 25 °C. O glifosato possui comportamento zwiteriônico, podendo atuar como ácido ou base fraca ao mesmo tempo, devido suas constantes de dissociação (pK), que são apresentadas na Figura 4 (IARC,2017; MARTINS, 2005; FISPQ, 2008).

Figura 4 - Constantes de ionização do glifosato e suas estruturas.



Fonte: Adaptado MARTINS, 2005.

De acordo com a Figura 4, dependendo do valor de pK o glifosato apresenta grupos protonados ou desprotonados. Em pH menor que 2, o composto apresenta carga positiva, protonação no grupo amino. Em pH entre 2,6 e 5,6 apresenta carga neutra, pois possui uma desprotonação no grupo fosfônico e uma protonação no grupo amino. Entre pH 5,6 e 10,6 possui desprotonação do grupo ácido carboxílico, juntamente com a protonação do grupo amino e desprotonação do grupo fosfônico. Em pH superior a 10,6 a molécula encontra-se totalmente desprotonada (MARTINS, 2005).

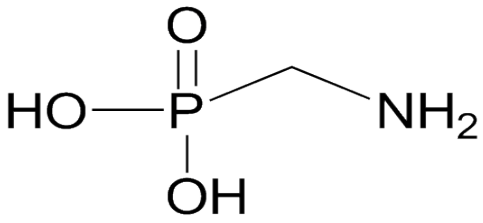
O glifosato possui elevada solubilidade em água e, devido aos grupos funcionais fosfônico e ácido carboxílico presentes em sua estrutura molecular, pode formar complexos com íons metálicos e adsorção em substâncias húmicas no solo.

Por ser estável à luz, apresentar alto ponto de fusão e ligações muito estáveis, a degradação deste composto não ocorre por fotólise, hidrólise ou evaporação. No entanto, a degradação biológica é citada como a principal forma de dissipação, formando o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (BELTRÃO, 2010).

3.2.2 Ácido aminometiflfosfônico (AMPA)

O AMPA, principal componente de degradação do glifosato, possui como fórmula molecular CH_6NO_3P, massa molar de 111,04 g mol^{-1} e fórmula estrutural apresentada na Figura 5 (IARC, 2017).

Figura 5 - Estrutura química do subproduto AMPA.

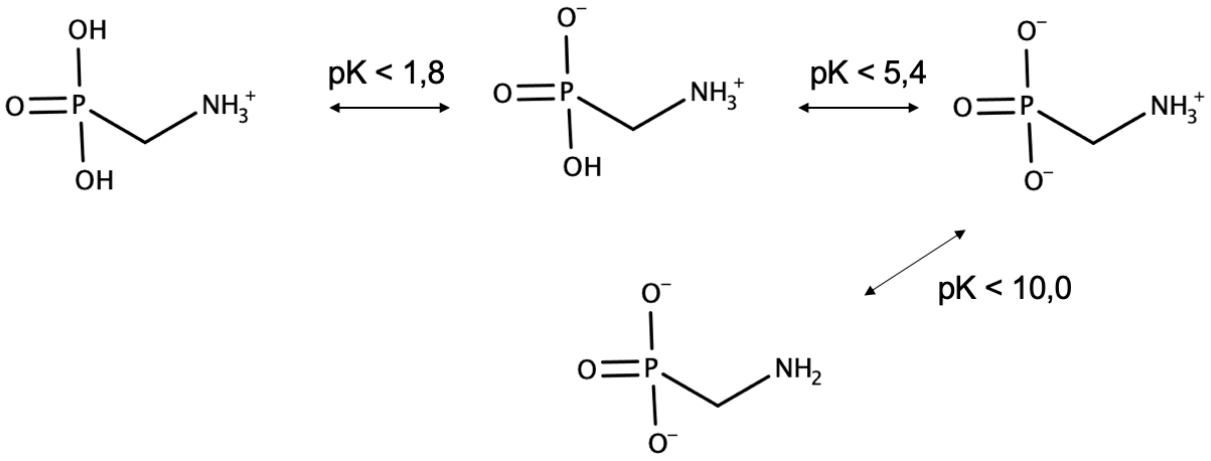


Fonte: Próprio autor.

Devido à similaridade com o glifosato, o AMPA também possui três constantes de dissociação (pK) apresentadas na Figura 6.

De acordo com a Figura 6, dependendo do valor de pK o AMPA apresenta grupos protonados ou desprotonados. Em pH menor que 1,8; o composto apresenta carga positiva, protonação no grupo amino. Em pH entre 1,8 e 5,4 apresenta carga neutra, pois possui uma desprotonação no grupo fosfônico e uma protonação no grupo amino. Entre pH 5,4 e 10,0 possui duas desprotonações do grupo fosfônico, juntamente com a protonação do grupo amino. Em pH superior a 10,0 a molécula encontra-se com duas desprotonações no grupo fosfônico.

Figura 6 - Constantes de ionização do AMPA e suas estruturas.



Fonte: Adaptado MATOS, 2014.

A partir dos dados das constantes de dissociação (pK) do glifosato e AMPA é possível compreender o comportamento destes compostos no solo.

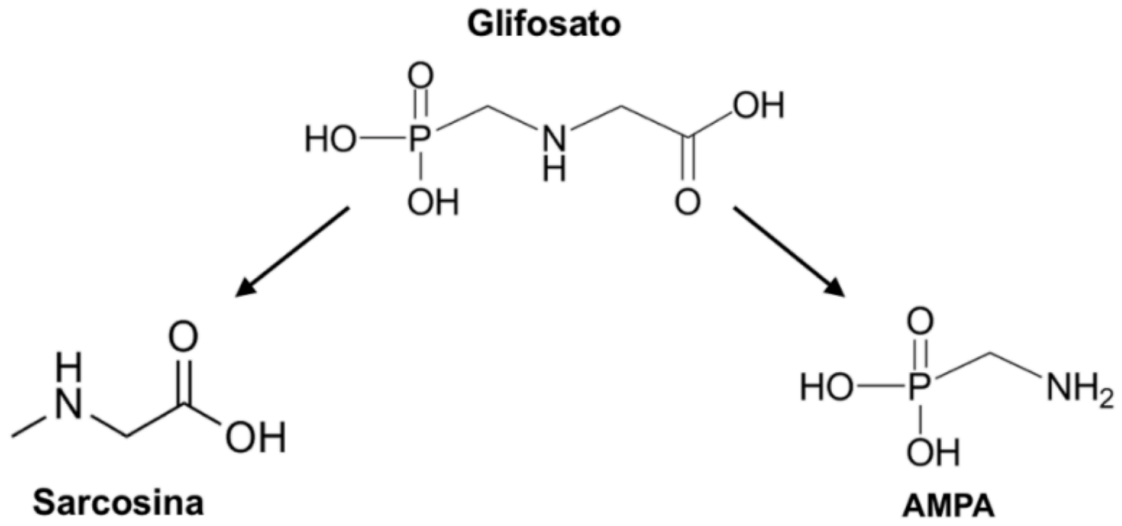
3.2.3 Comportamento do glifosato no solo

Após a aplicação, o glifosato pode ser metabolizado pelas plantas ou chegar a água e solo na sua forma original e ser degradado, adsorvido ou transportado (BELTRÃO, 2010).

A meia-vida de biodegradação do glifosato no solo é muito variável de alguns dias até vários meses dependendo dos teores de argila e matéria orgânica e do nível de atividade microbiana. No entanto, em estudos realizados com 47 amostras de campos agrícolas, determinou-se o tempo de meia-vida média do glifosato no solo varia de 2 a 197 dias e do AMPA 76 a 240 dias (CETESB, 2019; GIESY *et al*., 2005; TONI *et al*., 2006).

No entanto, GALLI *et al.* (2005), BELTRÃO (2010) e MARTINS *et al*. (2009) relatam que o herbicida glifosato ao interagir com o solo sofre rápida degradação, devido a grande variedade de microrganismos que o utilizam como fonte de energia, nitrogênio, fósforo e carbono; formando seu principal metabólito, o ácido aminometilfôsfonico (AMPA). Outra via possível, porém, menos citada, é a da transformação do glifosato em um outro metabólito, a sarcosina, por ação da enzima C-P liase, presentes em algumas bactérias. A Figura 7 apresenta a formação dos metabólitos da degradação do glifosato.

Figura 7 - Principais metabólitos formados pela degradação do glifosato no solo.



Fonte: Adaptado GALLI *et al.*, 2015.

O AMPA é o produto da biodegradação do glifosato por microrganismos em sistemas naturais antes da mineralização final e a quebra da molécula em complexos fosfonados. Por sua vez, de acordo com MORAES *et al*., 2010, o AMPA é degradado em dióxido de carbono (CO_2) e amônia (NH_3).

Em estudos realizados por BENSLAMA *et al.* (2013) e ZHELEZOVA *et al*. (2018) é comprovado um aumento na liberação de dióxido de carbono (CO_2) quando o glifosato é aplicado, confirmando sua decomposição. A estimulação na respiração dos mircroorganismos no solo é explicado pela utilização do glifosato como fonte de nutrientes.

Entretanto, a complexa interação entre microrganismos, substratos e os constituintes do solo influenciam e determinam a magnitude da biodegradação dessas moléculas (SOUZA *et al.*, 1999).

Portanto, o glifosato também possui capacidade de interações químicas e físicas no solo com elevado coeficientes de adsorção e baixo coeficientes de dessorção. A adsorção do glifosato ocorre pelo grupo químico fosfônico, que é responsável pela formação de complexos superficiais por ligações iônicas e forças eletrostáticas com a argila e matéria orgânica; por ligação de hidrogênio com a matéria orgânica; e, na fração mineral, por ligações covalentes com íons metálicos (TÉVEZ *et al.*, 2015; PRATA, 2002).

Ao interagir com os íons metálicos, o glifosato atua como agente quelante[3], pois no solo estão presentes variedades de íons, como cálcio (Ca^{2+}), manganês (Mn^{2+}), zinco (Zn^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}) e alumínio (Al^{3+}) que podem reagir com o mesmo. Este processo ocorre especialmente em níveis de pH neutros, em que os grupos químicos carboxilato e fosfônico estão desprotonados, formando complexos fortes (ver Figura 4) (TÉVEZ *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2017).

Em solos com baixos níveis de fosfato, a adsorção do glifosato aumenta. Outro fator que interfere na adsorção do composto no solo é o pH. De acordo com TÉVEZ *et al.*, 2015, vários estudos realizados em solos argilosos, relatam que a adsorção diminui com o aumento do pH.

A presença de glifosato em águas naturais e residuárias demonstra o potencial de transporte do composto por lixiviação ou por escorrimento superficial.

[3] Um complexo que contém um ou mais ligantes, que formam um anel de átomos que inclui o átomo central de metal (ATKINS *et al*., 2009).

A elevada solubilidade em água é associada ao transporte por lixiviação em períodos chuvosos. Além disso, a mobilidade do glifosato pode ocorrer por erosão com partículas de solo, sedimento ou complexos com íons aos quais pode estar associado. Já, o transporte por volatilização é desconsiderado, pelo fato de o composto não ser volátil (ARMAS *et al.*, 2007).

Devido ao vasto uso do herbicida glifosato, tem-se a importância em desenvolver e aplicar metodologias confiáveis para o monitoramento do glifosato e AMPA em lavouras e afins. Principalmente para entender o comportamento deste composto e sua interação com o meio ambiente.

3.3 Métodos Analíticos

HELLE *et al*. (2013) e KOSKINEN *et al*. (2016) relatam que a determinação do glifosato geralmente é realizada por meio da cromatografia líquida de alta performance (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) acoplada a técnica de espectrometria de massas (MS/MS). No entanto, a determinação pode ser também realizada por cromatografia a gás (GC – *Gas Chromatography*), cromatografia de íons (IC – *Íon Chromatography*), eletroforese capilar (EC – *Capillary Electrophores*) e eletroforese capilar de zona (CZE – *capillary zone electrophoresis*.

MARTINS *et al.* (2009) desenvolveram uma metodologia para análise de glifosato e AMPA em soja, sem derivatização, por HPLC-MS/MS. As amostras de soja foram extraídas com água e diclorometano, seguidas da adição de metanol. Já, as amostras de água foram somente filtradas. Os limites de quantificação para glifosato e AMPA em soja foram 0,30 e 0,34 mg kg^{-1}, respectivamente.

KOSKINEN *et al*. (2016) realizaram uma revisão analítica ressaltando o elevado uso do glifosato em plantações, que podem afetar outros meios de culturas e contaminar, por transporte externo, o solo e águas superficiais e subterrâneas. Além disso, relata que o HPLC é a técnica de separação mais eficaz para analisar os compostos glifosato e AMPA. Os analitos são extraídos das amostras de solo, em geral, com soluções aquosas de caráter básico e derivatizadas com

cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl). Todos os métodos utilizam a técnica de espectrometria de massas e seus limites de detecção estão na faixa 0,01 a 0,1 mg kg^{-1}.

BOTERO-COY *et al.* (2013) desenvolveram uma metodologia para análise de glifosato e AMPA em solo via HPLC-MS/MS. As amostras foram lixiviadas com solução de 0,6 mol L^{-1} de hidróxido de potássio (KOH), *clean-up* com o uso da técnica de extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) e seguidas de reação de derivatização com FMOC-Cl. Esta metodologia foi aplicada para amostras de solo dos países Argentina e Colômbia. Resíduos de AMPA e glifosato foram detectados em 13 amostras de solo da Colômbia em um total de 15 amostras analisadas, e para as amostras de solo da Argentina foram detectados em 10 de 11 amostras analisadas. Nas amostras analisadas, as concentrações variaram de 0,10 a 3,82 mg kg^{-1}, para o glifosato, e 0,17 a 2,07 mg kg^{-1}, para o AMPA.

SUN *et al.* (2017) desenvolveram uma metodologia para análise de glifosato em solo via cromatografia líquida acoplada ao detector de fluorescência ultravioleta (HPLC/UV). As amostras foram extraídas com uma solução de fosfato trissódico (Na_3PO_4) e citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$), seguido de *clean-up* com a técnica de extração líquido–líquido (LLE – *Liquid–Liquid Extraction*) e derivatização com FMOC-Cl. O limite de detecção e o limite de quantificação para o glifosato foi de 0,01 e 0,04 mg kg^{-1}, respectivamente.

A partir dos estudos citados é observado que não houveram publicações inovadoras nos últimos 10 anos, confirmando a dificuldade de analisar o glifosato e AMPA em matrizes complexas.

Para análise em solo, as publicações apresentadas utilizam preparo de amostra complexos que envolvem a etapa de derivatização com o FMOC-Cl. No entanto, não existem artigos que citem o uso do reagente fenilisotiocianato (PITC), para analisar glifosato e AMPA em solo por HPLC-MS/MS, que é utilizado neste trabalho. A escolha do reagente PITC, utilizado para sequenciamento de aminoácidos em proteínas, se deve a similaridade do glifosato com os aminoácidos.

Já, as técnicas de extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE) foram avaliadas em estudos iniciais deste trabalho, sendo estas técnicas descritas mais detalhadamente.

3.3.1 Técnicas estudadas para desenvolvimento de preparo de amostra

Para o desenvolvimento do preparo de amostra, as técnicas de extração em fase sólida (SPE) e extração líquido - líquido (LLE) foram avaliadas para a etapa de *clean-up*.

BOTERO-COY *et al*. (2013) e TODOROVIC *et al*. (2013) utilizaram a extração em fase sólida (SPE) para eliminar possíveis interferentes da amostra. Já SUN *et al*. (2017) utiliza a extração líquido-líquido (LLE).

3.3.1.1 Extração em fase sólida

A Extração em Fase Sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) foi desenvolvida na década de 1970 baseada nos mecanismos de separação líquido–sólido da cromatografia líquida clássica (baixa pressão). Entretanto, no caso da SPE, a coluna é aberta, conhecida como cartucho de extração, que contém a fase sólida.

Esta técnica pode ser utilizada para concentração do analito, isolamento do analito (*clean-up*), isolamento da matriz (retenção dos interferentes da matriz) e estocagem de amostra. Portanto, dependendo do modo de utilização podem ocorrer variações nas etapas envolvidas.

A SPE envolve as etapas de condicionamento de cartucho, adição de amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito. Basicamente, este procedimento é realizado adicionando uma solução que contém os analitos de interesse no cartucho, previamente condicionado, e ao produzir pequeno vácuo, esta solução é eluída, retendo os analitos no cartucho. A seguir, é adicionado um solvente específico para retirar o analito retido no mesmo. A Figura 8 representa as principais etapas do processo de SPE descrito (LANÇAS, 2009).

Figura 8 - Representação do processo de Extração em Fase Sólida (SPE).

Fonte: AMARAL, 2017.

As etapas são descritas a seguir segundo LANÇAS (2009):

1. **Etapa de condicionamento do cartucho:** Esta etapa serve para ativar o material existente dentro do cartucho com solvente apropriado. Para boa reprodutibilidade, deve-se evitar que a fase sólida no cartucho seque, evitando a formação de caminhos preferenciais.

2. **Adição da amostra:** Esta etapa ocorre sob vácuo e deve ser realizada de forma quantitativa para resultados reprodutíveis. Para pequenos volumes de amostra, esta etapa deve ser realizada somente com o auxílio da gravidade, o que melhora a separação.

3. **Remoção dos interferentes:** Esta etapa, também conhecida como lavagem com solvente ou *clean-up*, atua na eliminação dos interferentes da amostra por meio de um solvente que não possua força de eluição suficiente para remover os analitos aprisionados no cartucho.

4. **Eluição do analito:** Nesta etapa, os analitos são extraídos do cartucho com um eluente apropriado, devendo este possuir maior força de eluição que o solvente utilizado na etapa de lavagem.

3.3.1.2 Extração líquido–líquido

A extração líquido–líquido (LLE – *liquid–liquid extraction*) apresenta como vantagens a simplicidade e baixo custo. Como desvantagens estão o grande

volume de solventes utilizados e a exposição do operador ao contato com seus vapores; tempo de extração longo para a transferência do soluto entre as fases e baixa seletividade.

Nesta extração são empregadas duas fases imiscíveis: uma fase A, que contém o analito de interesse, e uma fase B, ambos são colocados em um recipiente fechado e agitadas. Após a agitação, este recipiente é colocado em repouso, ocorrendo distribuição do analito, e, consequentemente, a transferência de fase (Figura 9). Realizado este procedimento, o analito pode ser submetido a outro processo de extração ou analisado via HPLC (LANÇAS, 2009).

Figura 9 - Esquema do processo de Extração Líquido – Líquido (LLE).

Fonte: AMARAL, 2017.

3.3.2 Derivatização

A análise de glifosato e AMPA em solo via HPLC-MS/MS preconiza a adoção de uma etapa de derivatização na preparação da amostra, pois são moléculas que possuem baixo peso molecular, alta polaridade, caráter anfótero, ausência de grupos cromóforos e existe uma dificuldade de separá-lo e aplicar parâmetros cromatográficos adequados a partir de técnicas cromatográficas como a cromatografia a gás, cromatografia líquida e equipamentos com detecção por ultravioleta – visível (UV-vis) (STEINBORN *et al.*, 2016; CATRINCK *et al.*, 2014; FARIA, 2013; BÖRJESSON *et al.*, 2000; PATSIAS et al., 2001).

A técnica de derivatização é recomendada para se alcançar a sensibilidade e seletividade, objetivando a melhora na separação cromatográfica dos analitos, seguido da detecção por fluorescência ou por espectrometria de massas. Este processo envolve uma reação química utilizada para alterar a propriedade de uma substância, modificando suas propriedades cromatográficas ou de detecção (CABRICES *et al*., 2013; SCHUMMER *et al*., 2009).

KOSKINEN *et al.* (2016) relata diversas técnicas de análise e os respectivos derivatizantes utilizados para análise de glifosato e AMPA em solo (Tabela 2).

Tabela 2 - Técnicas de análise do glifosato e AMPA e seus receptivos derivatizantes.

Separação	Detecção	Derivatização	Referências
HPLC	MS	FMOC-Cl	Mardiana-Jansar *et al*., 2014
HPLC	MS/MS	FMOC-Cl	Botero-Coy *et al*. 2013; Ghanem *et al*., 2007
HPLC	FLD*	FMOC-Cl	Laitinen *et al*., 2006; 2007 e 2009
GC	MS	TFAA*/TFE*, TFA*, HFB*	Bergström *et al*., 2011; Börjesson *et al*., 2000; Degenhardt *et al*., 2012; Hu *et al*., 2008; Souza *et al*., 2006
GC	MS/MS	TFAA*/TFE*, TFA*, HFB*	Mamy *et al*., 2008
EC/CZE	MS	-	Iwamuro *et al*., 2010

*FLD: fluorescência *TFAA: anidrido de ácido trifluoroacético *TFE: trifluoroetanol *TFA: ácido trifluoroacético *HFB: heptafluoro-1-butanol.

Fonte: KOSKINEN *et al*., 2016.

De acordo com a Tabela 2, para análises de glifosato e AMPA em solo via HPLC-MS/MS, o FMOC-Cl é o derivatizante mais utilizado. No entanto, para a realização desta reação, a concentração de FMOC-Cl deve ser elevada, devido a alta reatividade deste composto em meio aquoso. Além disso, o pH é uma etapa importante desta reação, necessitando o preparo de solução tampão previamente à reação. (NEDELKOSKA *et al.*, 2004; MARTINS, 2005).

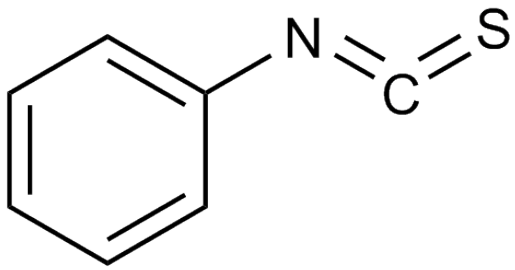
Neste trabalho foi avaliado o uso de um derivatizante alternativo, denominado fenilisotiocinanto (PITC), com o intuito de reduzir o tempo de preparo de amostra.

3.3.2.1 Reagente de Edman: sequenciamento de aminoácidos

Devido a similaridade nas moléculas do glifosato e AMPA com os aminoácidos, REMBISZ *et al.*, 2016 desenvolveu uma metodologia empregando esta reação para analisar glifosato e AMPA em amostras de alimentos. O PITC reage, em meio básico, com o grupo amino do glifosato e AMPA, formando os respectivos compostos glifosato-PITC e AMPA-PITC (SHIMADZU, 2007; JIE *et al.,* 2011; SHI *et al.*, 2013).

Em 1950, Pehr Edman propôs um método para determinar o sequenciamento de aminoácidos em proteínas pela degradação. Esta reação ocorre no grupo amino (N-terminal), presentes nos aminoácidos, com fenilisotiocianato (PITC). A Figura 10 apresenta a estrutura do reagente PITC (EDMAN *et al*., 1967).

Figura 10 - Estrutura molecular do reagente PITC.

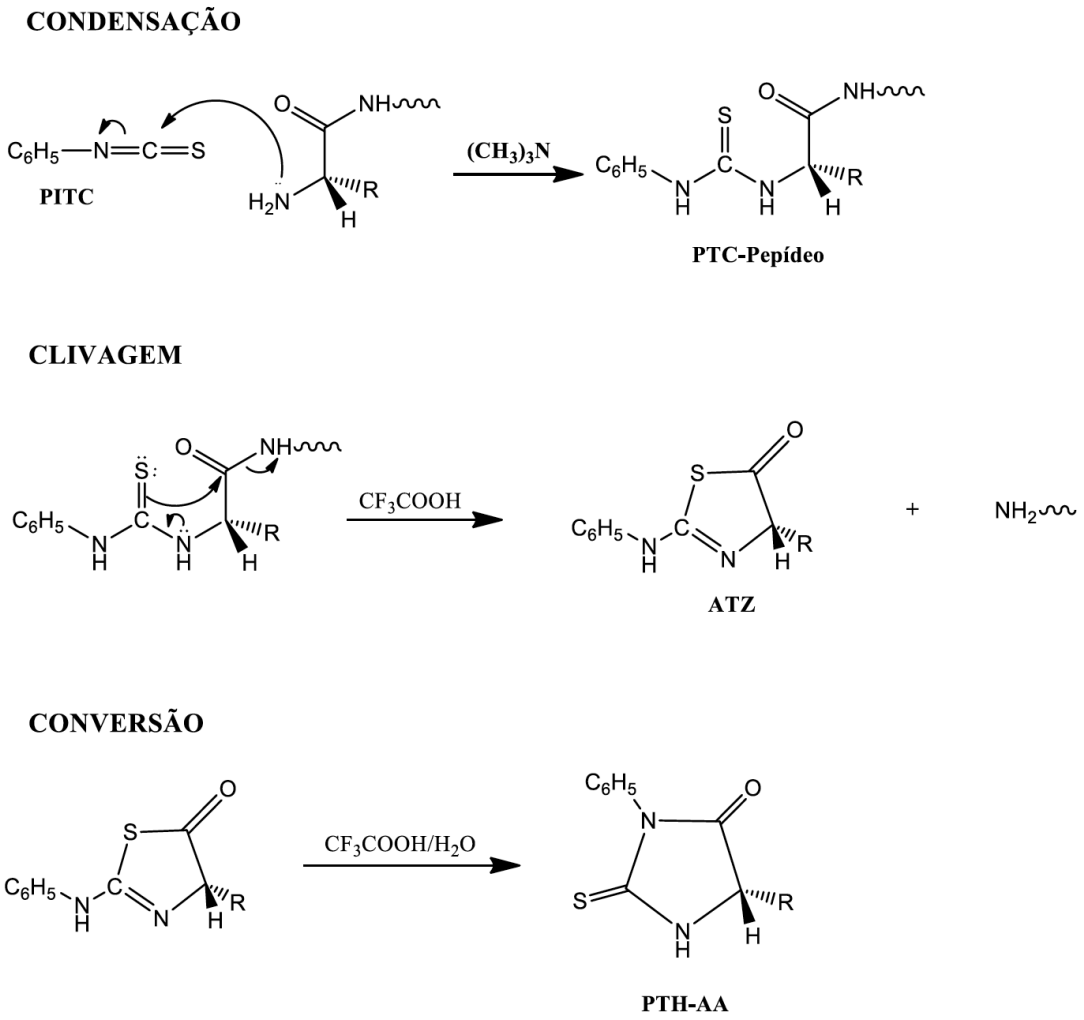


Fonte: Próprio autor.

Na reação de Edman, cada aminoácido é individualmente removido da extremidade N-terminal do peptídeo. Portanto, o PITC reage com o grupo amino N-terminal do peptídeo, formando o PTC-peptídeo. Este é submetido a tratamento

com ácido, para a remoção do resíduo N-terminal como derivado anilinotiazolinona (ATZ). O derivado ATZ instável é convertido para um derivado feniltio-hidantoína (PTH), o qual é separado e identificado por cromatografia líquida. O restante da cadeia é submetido a outra série dessas reações, permitindo-se a identificação dos novos resíduos N-terminais, até que se determine a sequência do peptídeo. As etapas que são envolvidas na degradação de Edman são apresentadas na Figura 11 (LOBAS *et al*., 2013; WALK *et al*., 1999).

Figura 11 - Reações envolvidas no processo de degradação de Edman.



Fonte: GUSMÃO, 2016.

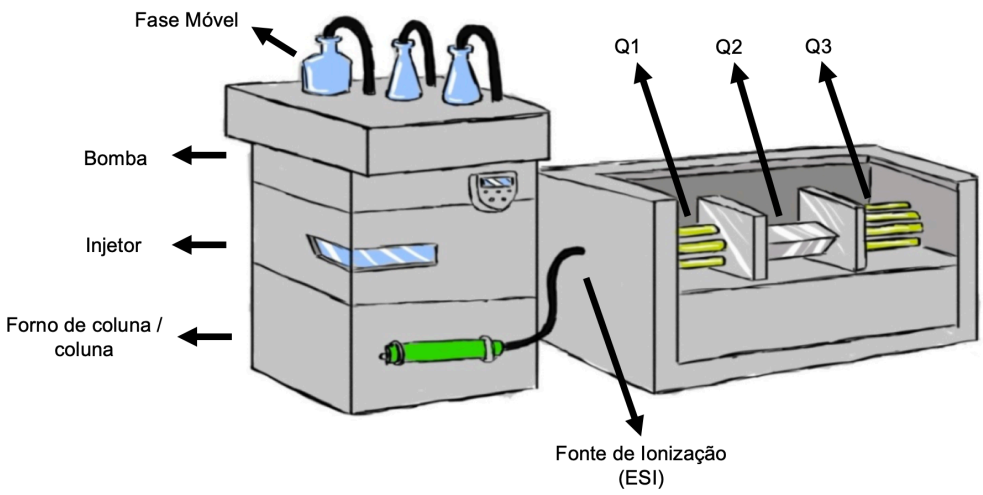
3.3.3 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas *tandem* (HPLC-MS/MS)

No início do desenvolvimento da técnica, o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas foi um processo árduo, devido a incompatibilidade entre as vazões relativamente altas empregadas no HPLC que impossibilitava a transferência direta do eluente da coluna cromatográfica para o interior da fonte de ionização do espectrômetro que opera em condições de alto vácuo. Entretanto, depois que as deficiências entre as interfaces foram parcialmente resolvidas, a cromatografia liquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) foi, cada vez mais, utilizada (MARTINS, 2010; FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; ALDER *et al.*, 2006).

A cromatografia liquida acoplada a espectrometria de massas *tandem* (HPLC-MS/MS) é uma das ferramentas analíticas mais utilizadas para determinação de compostos orgânicos em matrizes complexas, como amostras ambientais, fluidos biológicos e alimentos. Os compostos podem ser determinados livres de interferentes e com limites de detecção em níveis de ng mL^{-1} (ARDREY, 2003).

O HPLC-MS/MS (Figura 12) permite um aumento de seletividade e sensibilidade proporcionando o monitoramento de centenas de pesticidas em uma única análise. Apesar do elevado custo de aquisição e manutenção destes equipamentos, apresentam uma série de vantagens, como alta eficiência analítica, menor tempo de desenvolvimento de métodos, elevada robustez, determinação da massa molar, informação estrutural e análise quantitativa exata do analito. Além disso, esta técnica possibilita análise de diversas substâncias com ampla caraterísticas de polaridade e massas moleculares (PRESTES et al., 2009; SKOOG *et al*., 2008; LANÇAS, 2009).

Figura 12 - Componentes do sistema HPLC-MS/MS.



Fonte: Adaptado AMARAL, 2017.

A cromatografia é uma técnica de separação em que os componentes de uma mistura são separados entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial denominada fase estacionária, e um fluido que interage com a fase fixa, chamado fase móvel. A separação por cromatografia líquida ocorre com a interação dos compostos de uma mistura com a fase estacionária (sólido) e a fase móvel (líquido).

Basicamente o HPLC é formado por reservatório dos solventes, bomba, injetor de amostra, forno de coluna, detector e *software* (computador).

O funcionamento do sistema baseia-se no solvente, fase móvel, impulsionado por uma bomba de alta pressão em direção à coluna cromatográfica. Neste percurso, a amostra é introduzida na fase móvel e arrastada para a coluna, em que ocorre a separação dos componentes (analitos) presentes na amostra. O efluente da coluna é direcionado para um detector, que acusa a presença dos analitos eluídos da coluna, de acordo com os respectivos tempos de retenção (t_r), em minutos. O sinal gerado pelo detector é captado por um *software* apropriado (LANÇAS, 2009).

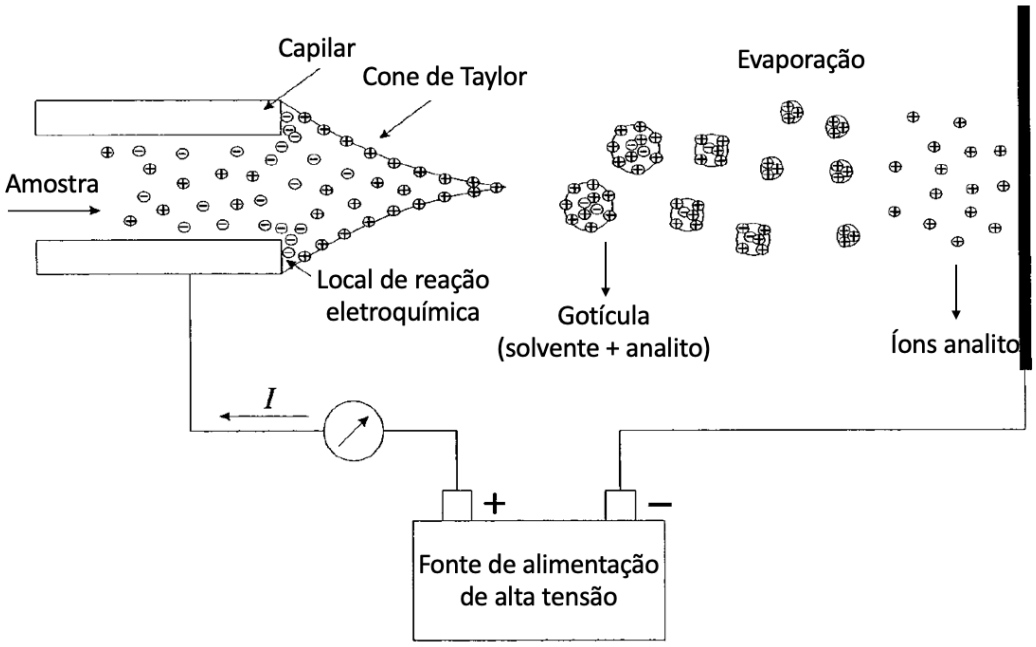
A interface situada entre o HPLC e o MS possui como objetivo remover o solvente e transferir a amostra para a fonte de íons. A principal interface utilizada neste sistema é a Ionização a Pressão Atmosférica (API – *Atmospheric Pressure*

Ionization). O tipo de ionização API utilizada neste trabalho foi a Ionização por Eletronebulização (ESI – *Electrospray Ionization*) (FENN, 2003).

A ionização por *electrospray* (ESI) é uma técnica referida como “ionização suave”, utiliza-se pouca energia residual, entre 2 a 7 kV, retida pelos analitos após a ionização, gerando espécies carregadas com pequena ou nenhuma fragmentação da molécula a ser analisada. Esta ionização é aplicada para análise de moléculas iônicas e polares com uma única carga, podendo ser utilizada no modo positivo ou negativo (LEE, 2012; FENN, 2003).

As principais etapas do processo de ionização são: produção de gotas carregadas na ponta do capilar do *electrospray*; dessolvatação e fissão destas gotas em gotículas menores; e a formação de íons na fase gasosa. A Figura 13 apresenta o processo de ionização na fonte ESI (FENN, 2003).

Figura 13 - Processo de ionização por *electrospray*.



Fonte: Adaptado ENKE, 1997.

De acordo com a Figura 13, o líquido no qual o analito se encontra dissolvido (fase móvel) é introduzido por um capilar, à pressão atmosférica, sob alta voltagem.

A ponta do capilar fica posicionado a cerca de 1 a 3 cm de um contra eletrodo que conduz por um orifício ao sistema de amostragem do espectrômetro

de massas. O elevado campo elétrico na ponta do capilar gera um acúmulo de cargas na superfície do líquido, produzindo uma deformação na gota denominado cone de Taylor.

A dessolvatação ocorre no deslocamento das gotas para o contra eletrodo por um gás nebulizante e secante, em geral gás nitrogênio (N_2).

À medida que ocorre o processo de dessolvatação, o tamanho da gota ascendente é reduzido até que a força de repulsão entre as cargas similares (aumento da densidade de cargas) é superior a tensão superficial da fase líquida. Neste momento, ocorre a “explosão coulômbica” da gota ascendente que gera gotas descendentes de tamanhos menores. Uma série de explosões ocorrem até que são produzidos os íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (MARCH, 2010; FENN, 2003).

A ionização dos analitos por meio do ESI é obtida pela protonação $(M+H)^+$ ou desprotonação $(M-H)^-$ do analito (MARCH, 2010; JÚNIOR *et al*., 2018).

A espectrometria de massas em *tandem* é a área da espectrometria de massas que estuda a geração de íons produtos formados por colisões de um íon precursor previamente selecionado. Este processo de fragmentação de um íon de razão massa / carga (m/z) específico requer o isolamento deste íon, seguido da fragmentação do mesmo e da análise dos íons produtos formados por um outro analisador de massas (BUSTILLOS *et al*., 2003)

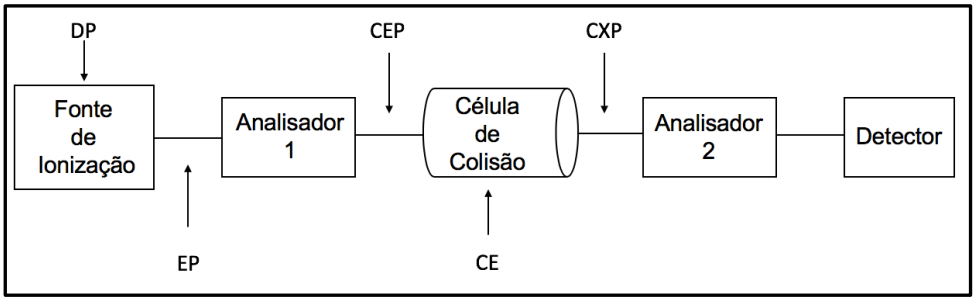
O triplo quadrupolo é formado por três analisadores quadrupolos em série. O primeiro quadrupolo (Q1) e terceiro quadrupolo (Q3) atuam como filtro de massas, e o segundo quadrupolo (Q2) atua como célula de colisão, em que reações de dissociação de íons de interesse são realizadas por Dissociação Induzida por Colisão (CID – *Collision Induced Dissociation*) com gás nitrogênio (N_2) (HOFFMANN *et al*., 2007).

Este sistema opera nos seguintes modos para aquisição de dados: *SCAN*, SIM (*Single Ion Monitoring)* e Monitoramentos de Reações Múltiplas (MRM – Multiple Reactions Monitoring). No modo SCAN o analisador(es) do sistema são programados para analisar todas as massas em uma determinada faixa de m/z. No modo SIM após a ionização do analito, no(s) analisador(es) é analisado somente um íon específico, o que aumenta a sensibilidade, uma vez que os íons correspondentes ao ruído são ejetados sem chegar ao detector (VÉKEY, 2001).

No modo MRM, o espectrômetro é programado de forma que um ou mais íons de interesse (íon precursor) são selecionados no Q1, estes são fragmentados no Q2 (MS/MS) e no Q3, em geral, são identificados os dois fragmentos (íon produto) mais intensos, correspondentes aos íons selecionados no Q1. Neste modo, é possível analisar vários analitos dentro de uma mesma análise, uma vez que, permite a identificação e separação de cada transição (par íon precursor / íon produto) monitorada (TSIPI *et al*., 2015; DEMOLINER, 2008).

A Figura 14 apresenta a sequência dos parâmetros otimizados no modo MRM no espectrômetro de massas realizada com a introdução de padrões analíticos no espectrômetro continuamente. Em geral, são monitoradas duas transições (par íon precursor / íon produto) do mesmo íon precursor mais intensas e os parâmetros otimizados são: DP (*Declustering Potential*), EP (*Entrance Potential*), CEP (*Collision Entrance Potential*), CE (*Collision Energy*), CXP (*Collision Exit Potential*).

Figura 14 - Sequência dos parâmetros de energia otimizados no espectrômetro de massas.



Fonte: Adaptado AMARAL, 2017.

3.4 Validação do Método

A validação é uma verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido (VIM, 2012).

Existem diversos documentos que podem ser utilizados para validação de um método, em que figuras de mérito, parâmetros, são avaliados. Nesta seção serão descritos alguns parâmetros avaliados na validação.

Para a validação deste trabalho, as figuras de mérito avaliadas foram determinadas pela Decisão da Comissão 2002/657/EC da União Europeia, que são: especificidade, linearidade, exatidão, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), limite de decisão (CCα), capacidade de detecção (CCβ) e incerteza.

Devido à complexidade da matriz e a necessidade da reação de derivatização foram realizados a avalição do efeito de matriz e da estabilidade da reação. Para isso foi utilizado o guia de validação de método bioanalítico da *European Medicines Agency*.

Os parâmetros avaliados serão descritos mais detalhadamente.

3.4.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias de interesse (analito) na presença de componentes que podem interferir na determinação dos analitos em uma amostra complexa.

A avaliação da seletividade é realizada comparando-se a matriz isenta da substância de interesse e a matriz fortificada com substância (padrão), sendo que, neste caso, na cromatografia nenhum composto presente na matriz deve eluir no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse ou, no caso, dos espectrômetros de massas, que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão (RIBANI *et al*., 2004).

3.4.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma faixa de aplicação.

A relação matemática entre o sinal e a concentração de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para concentrações

conhecidas, denominada equação de reta ou curva analítica, apresentada na Equação 2.

$$y = ax + b \quad (2)$$

Onde:

y = sinal resposta medido;

x = concentração do analito;

a = coeficiente angular (inclinação da curva analítica em relação aos eixos); e

b = coeficiente linear (intersecção da curva aos eixos).

Para verificar a linearidade em uma curva analítica, utiliza-se o coeficiente de correlação (r) ou de determinação (r^2), onde os valores ideais esperados são próximos de 1, ou seja, quanto mais próximo da unidade, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados (RIBANI *et al*., 2004).

3.4.3 Precisão

A precisão representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos em uma mesma amostra, amostra semelhante ou padrões, sob condições definidas. É dividida basicamente em: repetitividade e reprodutibilidade.

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas do mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições.

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, entre outros). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada

em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos (RIBANI *et al*., 2004).

A precisão é avaliada a partir do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) apresentados na Equação 3.

$$DPR\ ou\ CV\ (\%) = \left(\frac{Desvio\ Padrão}{Média}\right) * 100 \quad (3)$$

3.4.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A avaliação da exatidão de um método pode ser realizada a partir de ensaios com materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI *et al*., 2004).

3.4.5 Recuperação

De acordo com a decisão da comissão 2002/657/EC, a recuperação é a porcentagem da concentração real de uma substância recuperada durante o processo analítico.

A recuperação deve ser utilizada pela realização de experimentos com uma matriz em branco fortificada, caso não exista um Material de Referência Certificado (MRC) disponível.

A amostra deve ser fortificada com o analito em três níveis com 1; 1,5 e 2 vezes o limite mínimo de desempenho requerido. Cada nível deve ser analisado seis vezes e ter sua concentração determinada. A recuperação é calculada pela Equação 4.

$$Recuperação\ (\%) = \left(\frac{Teor\ medido}{Nível\ de\ fortificação}\right) * 100 \quad (4)$$

3.4.6 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al*., 2004).

Para a decisão da comissão 2002/657/EC, o limite de detecção é denominado limite de decisão (CCα). Este limite pode ser estabelecido com análise de pelo menos 20 amostras em branco com a matriz fortificada com as substâncias de interesse, sendo determinado como três vezes a razão sinal / ruído.

Já, o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al*., 2004).

No caso da decisão da comissão 2002/657/EC é denominado capacidade de detecção (CCβ). A capacidade de detecção é igual ao valor do limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio padrão.

3.4.7 Incerteza de medição

A incerteza é um parâmetro não negativo associado ao resultado de medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos ao mensurável, com base nas informações/etapas do método de análise.

Este parâmetro é associado a dois tipos de incertezas: tipo A, em que se utiliza de análise estatística dos valores medidos; e tipo B; em que é determinada com base em valores publicados por autoridades competentes, material de referência certificado (MRC), certificado de calibração, entre outros (VIM, 2012).

O objetivo da incerteza de medição não é obter a menor incerteza, mas a incerteza que represente a dispersão dos resultados obtidos pelo método avaliado (GUM, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e reagentes

Os solventes orgânicos empregados neste estudo foram o acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e n-hexano (HEX), os quais apresentam grau cromatográfico. A água ultrapura foi obtida pelo equipamento Integral 3, da Millipore (alta resistividade 18,2 M Ohms). O ácido utilizado no estudo foi o ácido fórmico (CH_2O_2). Os sais e bases empregados foram hidróxido de potássio (KOH), fosfato trissódico dodehidratado ($Na_3PO_4.12H_2O$) e citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$). Para a derivatização foram empregados o fenilisotiocionato (PITC) e trietilamina (Et3N).

Já para os padrões analíticos, foram preparadas soluções analíticas estoque de glifosato e AMPA na concentração de 10 mg mL^{-1} e para a fosfoetanolamina, padrão interno, na concentração de 5 mg mL^{-1} apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Informações dos padrões analíticos utilizados no estudo.

Informações	Glifosato	AMPA	Fosfoetanolamina
Marca	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich
Fórmula Molecular	$C_3H_8NO_5P$	CH_6NO_2P	$C_2H_8NO_4P$
Massa Molar (g mol^{-1})	169,07	111,04	141,06
Pureza (%)	100	98	100
Número CAS	1071-83-6	1066-51-9	1071-23-4

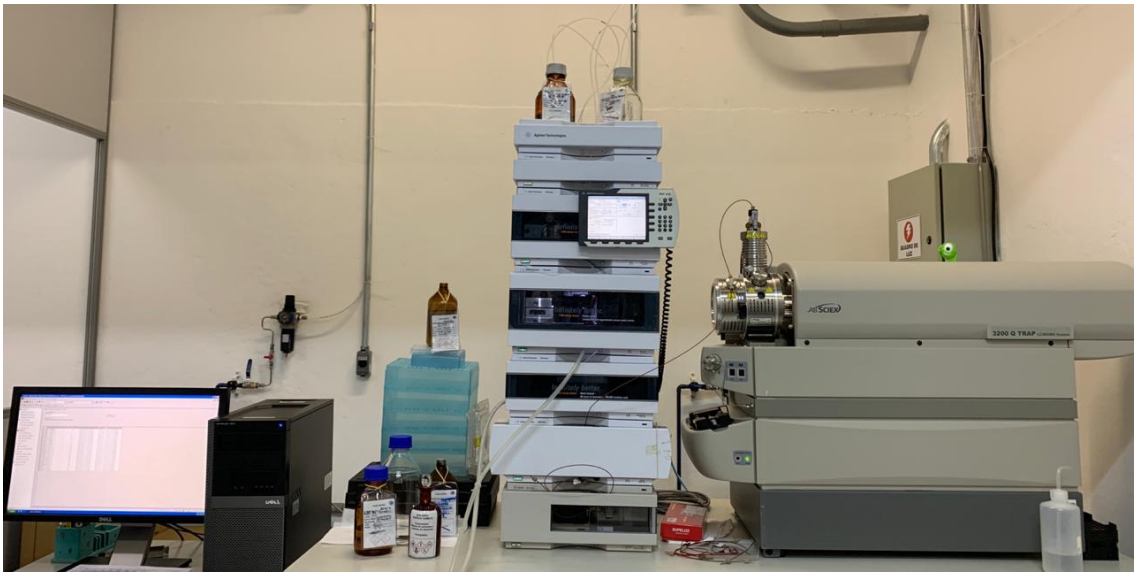
Fonte: Próprio autor.

4.2 Equipamentos e materiais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- Vidraria básica de laboratório: balões volumétricos, béqueres, erlenmeyer e provetas;
- Cápsulas de porcelana;
- Dessecador;
- Cartuchos de SPE Oasis® HLB da marca Waters;
- Microtubo de polipropileno de 1,5 e 2,0 mL da marca Eppendorf;
- Tubo falcon de 50 mL;
- Microplaca 96 poços redondos 0,5 mL da marca Agilent;
- Borracha seladora de silicone 96 poços da marca Axygen;
- Thermomixer modelo *comfort* da marca Eppendorf;
- Centrífuga de placas modelo 5430 da marca Eppendorf;
- Centrífuga para microtubo modelo 5415R da marca Eppendorf;
- Centrífuga para tubos modelo NT-810 da marca Nova Técnica;
- Vortex modelo VM-3000 da marca Vivax;
- Micropipetas automáticas 2-20, 20-200 e 100-1000 µL da marca Eppendorf;
- Balança analítica da marca Shimadzu modelo AUW220D;
- pHmetro da marca Hanna modelo pH 21;
- Sistema de purificação de água Milli Q Integral 3 da marca Merck Millipore;
- Banho ultrassônico da marca Thornton;
- Estufa modelo 515 da marca Orion;
- Mufla modelo 901/3 da marca Eletrolab.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência série 1200 da marca Agilent acoplado ao espectrômetro de massas *tandem*, modelo 3200 QTRAP da marca SCIEX (HPLC-MS/MS) apresentado na Figura 15.

Figura 15 - Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas 3200 QTRAP da marca Sciex (HPLC-MS/MS).



Fonte: próprio autor.

4.3 Caracterização do solo

Previamente foram realizados dois experimentos para determinar o pH e o teor de matéria orgânica no solo. A caracterização destas duas propriedades permite entender o comportamento do glifosato na matriz.

As amostras caracterizadas foram coletadas pela EMBRAPA Soja, localizada no município de Warta, no Paraná. O estado do Paraná foi escolhido para desenvolver a pesquisa, pois a região sul do país é uma das maiores produtoras de soja do Brasil.

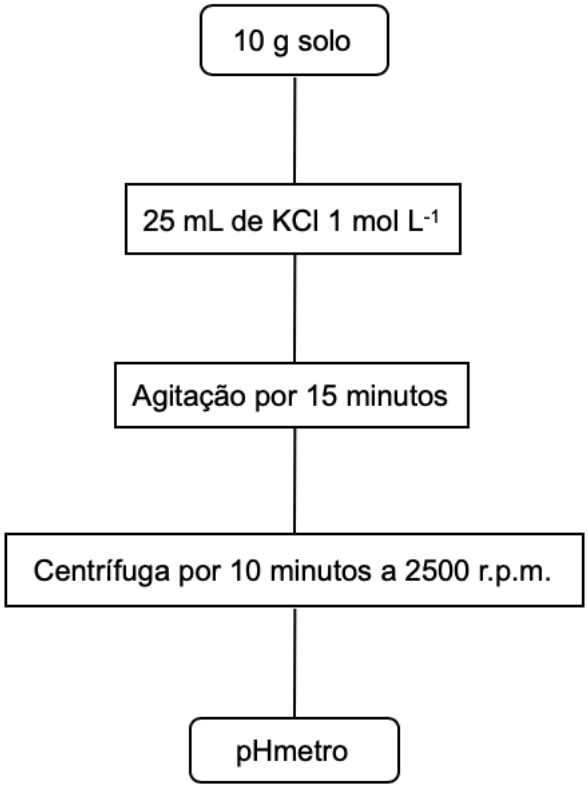
4.3.1 Determinação do pH do solo

Para a realização deste experimento, foi utilizado o fluxograma descrito na Figura 16 por PAULA *et al*., 1997.

As amostras foram preparadas em duplicata. Para o preparo, 10,0 g de solo foram pesados e solubilizados com 25,0 mL de solução de cloreto de potássio

(KCl) a concentração de 1,0 mol L^{-1}. Foram agitadas por 15 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 2500 r.p.m. e medido o pH.

Figura 16 - Fluxograma do procedimento realizado para determinação do pH do solo.



Fonte: Próprio autor.

Neste estudo, as amostras foram preparadas em triplicata e o resultado foi obtido pelo cálculo da média das três medidas de pH e do desvio padrão (SD), apresentado na Equação 5.

$$SD = \sqrt{\sum_{i=1}^{n} \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (5)$$

Onde:

$\sum$: símbolo de somatória = indica a soma de todos os termos, desde a primeira posição (i = 1) até a posição n.

x_i = valor na posição i no conjunto de dados;

$\bar{x}$= média aritmética dos dados; e

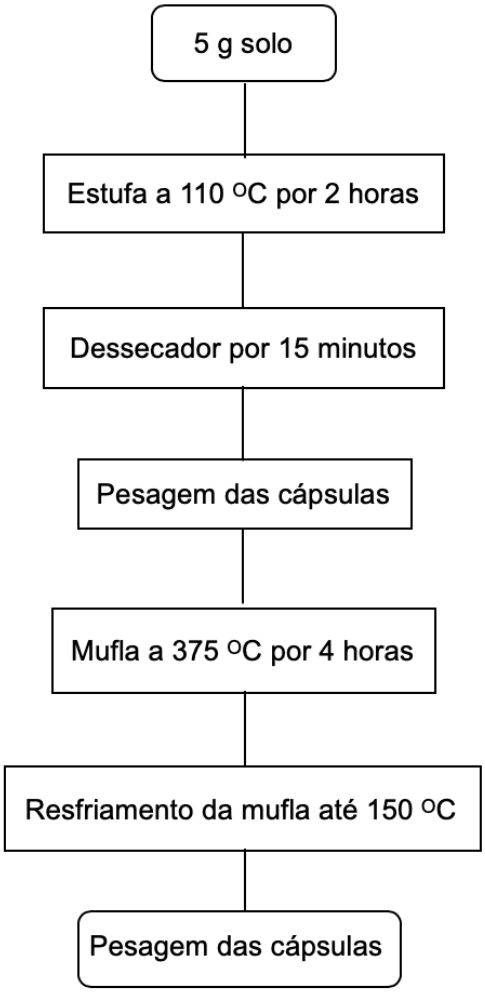
n = quantidade de dados.

O resultado foi obtido pelo cálculo da média do pH das três amostras analisadas.

4.3.2 Determinação de Matéria Orgânica (MO) do solo

Para a determinação do teor de matéria orgânica, as amostras de solo foram pesadas em duplicata e preparadas de acordo com o fluxograma do procedimento descrito na Figura 17 (ABNT,1996).

Figura 17 - Fluxograma do procedimento realizado para determinar matéria orgânica no solo.



Fonte: Próprio autor.

As etapas da Figura 17 são descritas detalhadamente:

Para o preparo, pesou-se, aproximadamente, 5 g da amostra de solo em duas cápsulas de porcelanas. A seguir, as amostras foram submetidas à temperatura de 110 ºC por 2 horas em estufa. Após a estufa, as cápsulas foram retiradas e depositadas em dessecador para esfriamento, por aproximadamente 15 minutos, então as cápsulas foram pesadas. A seguir, as mesmas cápsulas de porcelana contendo o solo, foram submetidas à temperatura de 375 ºC por 4 horas em mufla, seguidas de resfriamento até 150 ºC. E então, as cápsulas foram retiradas e depositadas no dessecador para resfriamento por 15 minutos e foram pesadas novamente.

A porcentagem do teor de matéria orgânica (MO) foi calculada de acordo com a Equação 6.

$$MO(\%) = \left(\frac{m\ (g)\ solo\ seco\ em\ estufa - m\ (g)\ solo\ queimado\ em\ mufla}{m\ (g)\ solo\ seco\ em\ estufa}\right) * 100 \qquad (6)$$

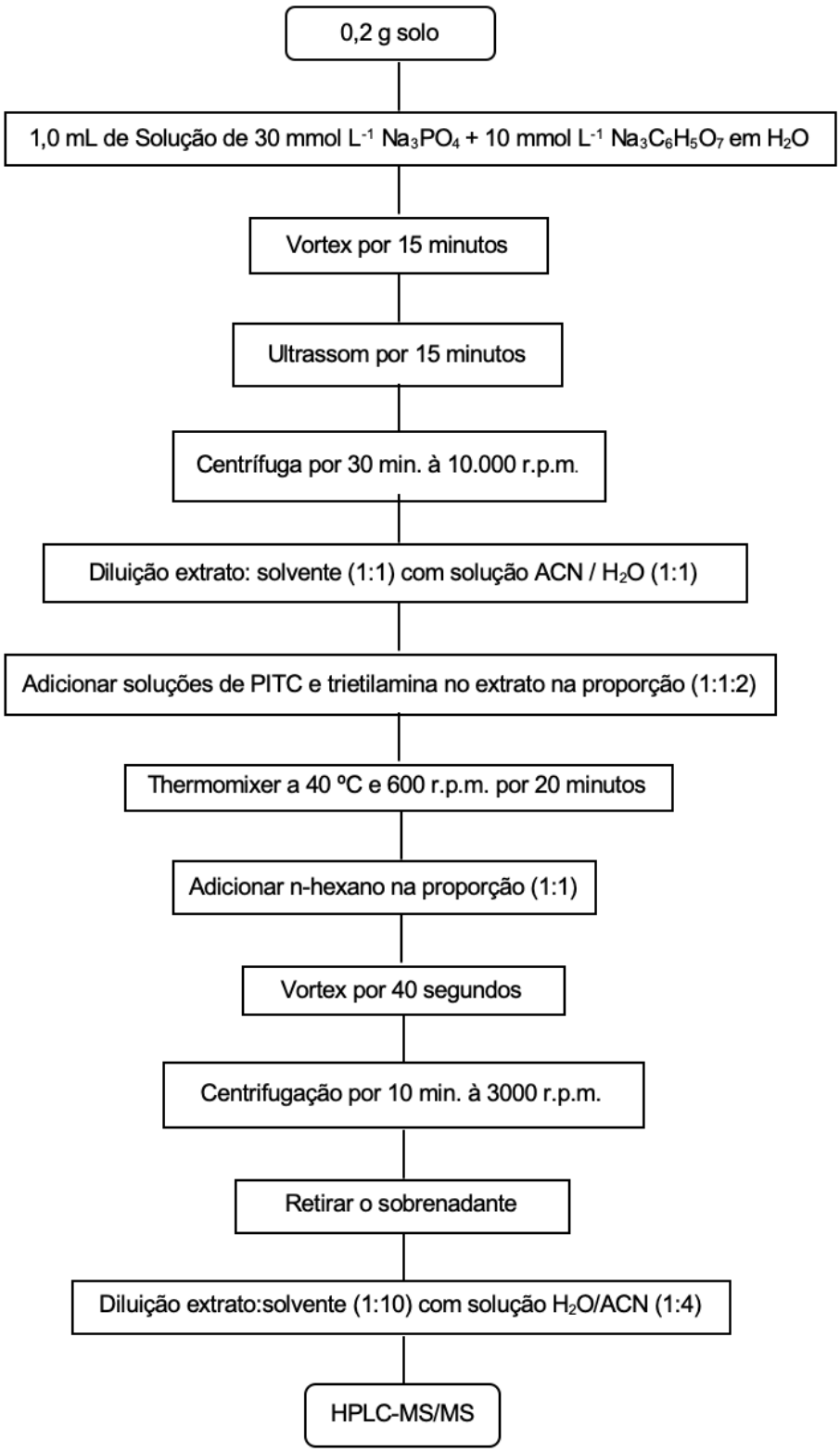
O resultado foi obtido pelo cálculo da média do teor de matéria orgânica das duas amostras preparadas.

4.4 Procedimento experimental

4.4.1 Método de preparação de amostra

A Figura 18 apresenta o fluxograma do preparo da amostra definido para determinar do glifosato e AMPA no solo. Para defini-lo, testes metodológicos para cada etapa analítica foram realizados com base em métodos descritos na literatura por IBAÑEZ *et al.*, 2005; TODOROVIC *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2017; SHIMADZU, 2007; JIE *et al.,* 2011 e SHI *et al.*, 2013.

Figura 18 - Fluxograma da metodologia analítica utilizada.



Fonte: Próprio autor.

Para o procedimento apresentado na Figura 18, previamente a reação de derivatização, as soluções dos reagentes de derivatização PITC e trietilamina foram preparadas em acetonitrila (ACN).

- **Trietilamina em acetonitrila (C = 5,46x10^{-9} g cm^{-3})**: 70 µL de trietilamina foi adicionado a 930 µL de ACN;
- **PITC em acetonitrila (C = 1,36x10^{-2} g cm^{-3})**: 12 µL de PITC foi adicionado a 988 µL de ACN.

4.4.2 Metodologia no sistema HPLC-MS/MS

O método cromatográfico desenvolvido para os compostos derivatizados utiliza a coluna pentafluorofenilpropilo (PFPP) de dimensões 150 x 2,1 mm; 5 µm, da marca *Restek*; fase móvel (A) água com 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila com 0,1% ácido fórmico; volume de injeção da amostra 5 µL e temperatura do forno de coluna de 45 °C. A Tabela 4 apresenta o gradiente de eluição deste método.

Tabela 4 - Gradiente de eluição utilizado no método cromatográfico B.

Instante	Tempo (min)	Fluxo (µL min^{-1})	A (%)	B (%)
0	4,00	350	90	10
1	1,40	350	90	10
2	1,41	350	20	80
3	4,40	350	20	80

Fonte: Próprio autor.

As condições otimizadas no espectrômetro de massas para os compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina derivatizados com PITC são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros MRM otimizados para os compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina derivatizados com PITC.

Compostos	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Glifosato + PITC	**303,0**	**168,0*** 150,0	- 66	- 7	- 15	- 20 - 30	- 2
AMPA + PITC	**245,0**	**110,0*** 152,0	- 30	- 6	- 14	- 20 - 12	- 2
Fosfoetanolamina + PITC	**275,0**	**140,0*** 79,0	- 35	- 6	- 16	- 16 - 46	- 2

* Os valores em negritos representam as transições (par íon precursor / íon produto) de quantificação.

Fonte: Próprio autor.

4.5 Validação do Método

4.5.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias de interesse (analito) na presença de componentes que podem interferir na determinação dos analitos em uma amostra complexa (RIBANI *et al*., 2004).

Para a avaliação deste parâmetro, neste trabalho, foi utilizado a técnica de espectrometria de massas em que foram realizadas as otimizações do sistema para a detecção dos compostos de estudo.

A seletividade também foi avaliada pelas curvas analíticas com e sem matriz nas seguintes concentrações para os compostos glifosato e AMPA, apresentada na Tabela 8 no item 4.5.6 do capítulo 4.

De acordo com o DOC-CGRE-008 do INMETRO (2017) para a verificação desta figura de mérito, podem ser aplicados os seguintes testes: Teste F de Snedecor (Teste de Homogeneidade das Variâncias) e o teste t (*Student*) para comparação das médias para cada ponto da curva.

Para verificar se as variâncias de cada ponto da curva podem ser consideradas iguais e se a matriz interfere na precisão das medidas, utiliza-se o teste F, que é calculado pela Equação 7.

$$F_{calculado} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (7)$$

Onde:

s_1^2 = maior variância

s_2^2 = menor variância.

Os resultados de $F_{calculado}$ foram comparados com o valor de $F_{tabelado}$ (considerando devido número de graus de liberdade e intervalo de confiança de 95%). Se os valores de $F_{calculado}$ for superior ao de $F_{tabelado}$, ou seja, se $F_{calculado} > F_{tabelado}$, então conclui-se que o teste F é significante portanto, a matriz influencia na precisão do método na faixa de concentração em estudo e as variâncias podem ser consideradas desiguais.

Para o teste t, o $t_{calculado}$ é obtido pela Equação 8.

$$t_{calculado} = \frac{|\overline{x_1} - \overline{x_2}|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (8)$$

Em que:

$\bar{x}_1$ e $\bar{x}_2$ = média das respostas dos analitos em amostras com matriz e sem matriz no mesmo nível de concentração;

n_1 e n_2 = número de replicatas para cada nível de concentração (oito replicatas).

Para a obtenção do $t_{tabelado}$, o número de graus de liberdade (ν) é determinado pela Equação 9.

$$\nu = \frac{(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2})}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{(n_1+1)} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{(n_2+1)}} - 2 \quad (9)$$

Os valores de $t_{calculado}$ para cada nível da curva analítica com e sem matriz são comparados ao valor de $t_{tabelado}$. Caso os valores de $t_{calculado}$ forem superiores ao valor de $t_{tabelado}$, ou seja, $t_{calculado} > t_{tabelado}$, então, pode-se concluir que há diferença na média dos dois conjuntos de soluções e a matriz interfere estatisticamente sobre o resultado do método.

4.5.2 Linearidade

A linearidade é verificada pela curva analítica, determinando o coeficiente de correlação (r) ou de determinação (r^2), onde os valores ideais esperados são próximos de 1, ou seja, quanto mais próximo da unidade, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais (RIBANI *et al*., 2004).

Segundo o DOC-CGRE-008 do INMETRO (2017) sugere-se a avaliação da linearidade pela Análise de Variância (ANOVA) da regressão como ferramenta estatística. A ANOVA é utilizada para verificar a significância das regressões, baseada no teste F de regressão.

4.5.3 Efeito da Matriz

O efeito da matriz é o resultado da coeluição de elementos da matriz, que afetam a ionização dos analitos de interesse, resultando em supressão ou amplificação nas ionizações dos mesmos. Para isso, foram empregados dois métodos para a avaliação do efeito da matriz sobre os compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina (NOGUEIRA, 2013).

4.5.3.1 Adição de padrão pós-extração

Neste método é preparado uma amostra branco da matriz e ao final do preparo são adicionados os analitos de interesse na matriz.

Para a realização deste experimento foi preparada uma solução mista dos padrões glifosato, AMPA e fosfoetanolamina. A seguir, em triplicata, foram preparados brancos da matriz utilizando a metodologia descrita no item 4.4.1 no capítulo 4. Após o preparo, o branco da matriz foi fortificado com a solução mista dos compostos (NIESSEN *et al*., 2006; EECKHAUT *et al*., 2009).

A avaliação do efeito de matriz é determinada a partir do Fator de Matriz Normalizado pelo padrão interno (FMN), de acordo com a Equação 10

$$FMN = \frac{\left(\frac{Resposta\ do\ analito\ em\ matriz}{Resposta\ do\ PI\ em\ matriz}\right)}{\left(\frac{Resposta\ do\ analito\ em\ solução}{Resposta\ do\ PI\ em\ solução}\right)} \quad (10)$$

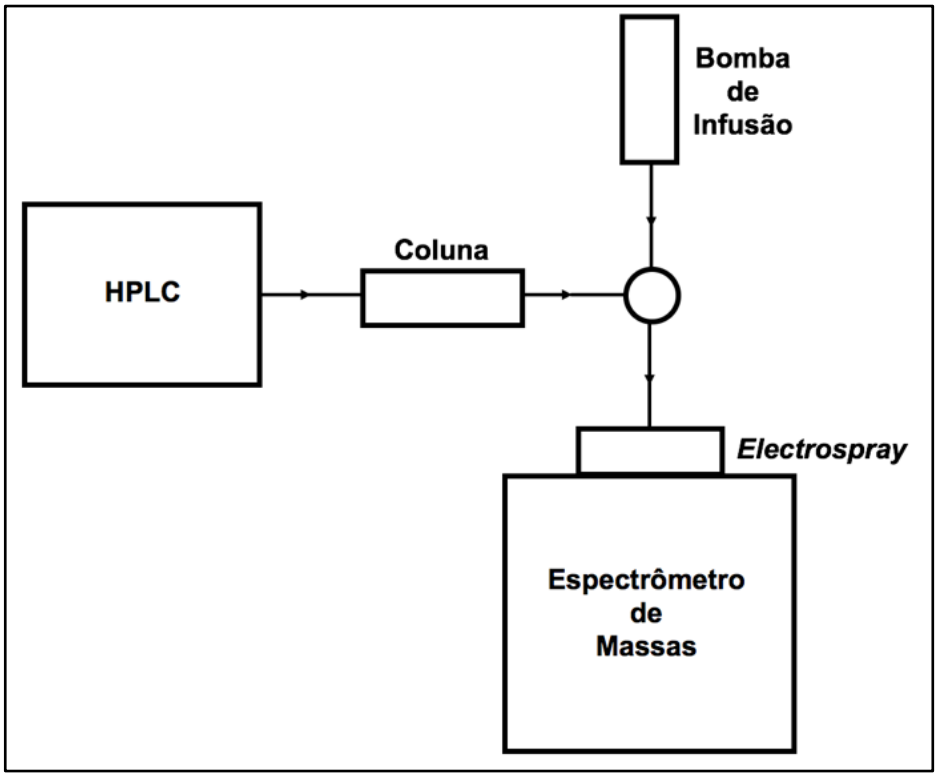
Considera-se que não há efeito de matriz, se o valor do coeficiente de variação (CV) entre as replicatas for igual ou menor que 15% (EMA, 2011; ANVISA, 2012).

4.5.3.2 Infusão pós-coluna

No método de infusão pós-coluna utiliza-se a fonte de íons (*electrospray*).

Neste ensaio, uma amostra de branco da matriz é injetada no método desenvolvido no HPLC. Na saída da coluna analítica, um fluxo de infusão auxiliar dos padrões analíticos concentrados é adicionado. A Figura 19 apresenta o esquema para a realização deste método.

Figura 19 - Esquema da infusão pós-coluna.



Fonte: Adaptado MARTINS, 2005.

Neste procedimento, a linha de base dos compostos é alta no cromatograma, devido a introdução contínua do analito que está sendo infundida. Com a eluição da amostra (matriz) injetada na coluna analítica, são analisadas as possíveis perturbações que podem ocorrer na linha de base gerada pelo sinal do analito sob fluxo de infusão constante. Estas possíveis perturbações caracterizam o efeito da matriz.

O efeito da matriz é a variação do sinal do analito pela coeluição ou presença de interferentes na amostra (matriz), pelos fenômenos de supressão ou adição de sinal (NIESSEN *et al*., 2006; ANNESLEY, 2003).

4.5.4 Estudo da estabilidade da reação de derivatização

Para resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras devem ser estáveis por um determinado período. Devido a este fato, estudo de estabilidade da reação de derivatização foi realizado (RIBANI *et al*., 2004).

Para a realização deste estudo, foi preparada uma amostra da matriz fortificada com solução mista dos compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina na concentração final de 0,5 µg mL^{-1} e injetados em triplicata no sistema HPLC-MS/MS nos seguintes tempos de 0; 6; 12 e 24 horas.

Os resultados foram determinados pela média das áreas do sinal analítico da triplicata para cada composto.

4.5.5 Preparação das amostras para os experimentos do *software* ResVal

Para a realização da validação utilizando o *software* ResVal é necessário determinar um nível de concentração para cada analito. Estes experimentos são realizados com a preparação de seis replicatas para concentrações 0,5; 1; 1,5; 2 e 5 vezes em relação a concentração determinada. Estes ensaios são repetidos em três dias diferentes em que são realizados tratamentos estatísticos dos resultados de exatidão (recuperação), precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, limite de decisão e limite de detecção.

4.5.6 Preparo da curva de calibração e dos controles de qualidade

Para o desenvolvimento da validação, foram preparados a curva de calibração e os controles de qualidade nos cinco níveis de concentração 20 vezes mais concentrados em solução de extração para ajuste do pH. Os níveis de concentração da curva de calibração e os controles de qualidade são apresentadas nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6 - Curva de calibração estoque (CCE) do glifosato e AMPA em solução de extração.

CCE	Concentração Gli (µg mL^{-1})	Concentração AMPA (µg mL^{-1})
P1	80	40
P2	160	80
P3	320	160
P4	640	320
P5	1280	640
P6	2560	1280

Fonte: Próprio autor.

Tabela 7 - Controles de qualidade estoque (CQE) do glifosato e AMPA em solução de extração.

CQE	Concentração Gli ($\mu g\ mL^{-1}$)	Concentração AMPA ($\mu g\ mL^{-1}$)
CQ1	100	60
CQ2	200	120
CQ3	300	180
CQ4	400	240
CQ5	1000	600

Fonte: Próprio autor.

Para a realização dos experimentos de validação, as amostras foram fortificadas durante o preparo das curvas de calibração e controles de qualidade.

A fosfoetanolamina (padrão interno) foi adicionada na etapa de diluição com solução de água / acetonitrila (50% / 50%, v/v) durante o preparo de amostra, etapa anterior à reação de derivatização.

No primeiro experimento foram preparadas a curva de calibração e os controles de qualidade em cinco níveis de concentração relacionados ao nível de validação (NV) apresentados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente. Esses cinco níveis foram adicionados durante a extração.

Tabela 8 - Curva de calibração do glifosato e AMPA na matriz solo.

Nível	Concentração Gli ($mg\ kg^{-1}$)	Concentração AMPA ($mg\ kg^{-1}$)
P1	20	10
P2	40	20
P3	80	40
P4	160	80
P5	320	160
P6	640	320

Fonte: Próprio autor.

Tabela 9 - Concentração dos cinco níveis dos controles de qualidade e o número de replicatas.

Nível	Glifosato (NV = 50 mg kg^{-1})	AMPA (NV = 30 mg kg^{-1})	Número de replicatas
QC1	25	15	3
QC2	50	30	3
QC3	75	45	3
QC4	100	60	2
QC5	250	150	2

Fonte: Próprio autor.

Para o segundo e terceiro experimento foram preparados mais treze pontos dos níveis de concentração apresentado na Tabela 9 e a curva de calibração apresentado na Tabela 8 com o mesmo modo de preparo do primeiro experimento.

Para o quarto experimento foram preparadas a curva de calibração apresentada na Tabela 8, doze amostras em branco (sem fortificação) da matriz solo e doze amostras fortificadas no nível do QC2.

4.6 Amostragem e preservação da amostra

Para aplicação da metodologia analítica desenvolvida neste trabalho foi realizado uma parceria com a EMBRAPA Solo (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizada na cidade do Rio de Janeiro, que recebe solos para análise de todos os estados brasileiros.

As sessenta amostras de solo foram enviadas ao laboratório do CQMA (Centro de Química e Meio Ambiente) / IPEN (Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucelares) e armazenadas para análise.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são discutidos os resultados obtidos para cada teste realizado para o desenvolvimento desta dissertação.

5.1 Caracterização do solo

Previamente foram realizados dois experimentos para determinar o pH e o teor de matéria orgânica no solo cedido pela EMBRAPA Soja. A realização destes experimentos permite entender possíveis comportamentos do analito glifosato no solo, avaliar potenciais adsorverdores do glifosato e possíveis interferentes presentes na matriz.

5.1.1 Determinação do pH do solo

O pH do solo foi determinado realizando o experimento em triplicata, para isso três amostras do mesmo solo foram preparadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.1 do capítulo 4.

O resultado obtido é descrito na Tabela 10, em que a média do pH determinado no solo foi 4,80.

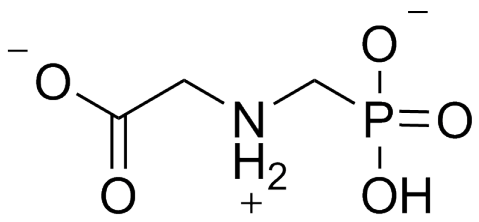
Tabela 10 - Resultados obtidos para a determinação do pH do solo.

Replicata	Massa solo (g)	pH	Média pH	SD
1	10,1	4,77		
2	10,0	4,82	4,80	0,0265
3	10,1	4,81		

Fonte: Próprio autor.

Pelo fato de o glifosato ser uma molécula que possui quatro pKs distintos, dependendo do pH, o glifosato apresentará um comportamento no solo (ver Figura 4). A Figura 20 apresenta a estrutura do glifosato em pH igual a 4,80.

Figura 20 - Estrutura da molécula do glifosato em solo com pH = 4,80.



Fonte: Próprio autor.

Neste pH, a molécula do glifosato sofre duas desprotonações, uma no grupo fosfônico e, outra, no carboxílico; e uma protonação, no grupo amino. Como ambas as extremidades da molécula estão desprotonadas, estas podem formar complexo com metais. Também, pode ser adsorvido no solo pelo grupo fosfônico do glifosato ou interagir com a fração argila, pois a adsorção do glifosato aumenta com a diminuição do pH.

5.1.2 Determinação da matéria orgânica (MO)

O resultado obtido foi calculado pela Equação 7 apresentada no item 4.3.2, no capítulo 4. Para a realização do cálculo de teor de matéria orgânica (MO) foram utilizados os dados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultado obtido do teor de matéria orgânica (MO) contida no solo.

Replicata	Massa solo (g)	Massa solo estufa (g)	Massa solo mufla (g)	% de MO	Média % de MO
1	5,003	1,301	0,9591	26,26	**22,61**
2	5,004	1,824	1,478	18,97	

Fonte: Próprio autor.

O teor médio de matéria orgânica determinado foi de aproximadamente 23%. Para teores de matéria orgânica acima de 5%, o solo é considerado fértil (EMBRAPA, 2017).

O elevado teor de matéria orgânica indica a adsorção do composto glifosato no solo por ligações de hidrogênio e, possível degradação do composto em seu principal metabólito, o AMPA, e consequentemente, em CO_2 e NH_3.

Além disso, a matéria orgânica é derivada da degradação de animais e vegetais presentes no solo com características polares, portanto, é um potencial interferente para análise de glifosato e AMPA. Devido a este fato, estes compostos podem ser extraídos em conjunto com o glifosato e AMPA, prejudicando a análise.

5.2 Estudos da metodologia

Nesta seção, serão apresentados os estudos realizados para o desenvolvimento da metodologia analítica.

5.2.1 Estudos da metodologia do preparo de amostra

Após a caracterização e determinação de possíveis comportamentos do glifosato no solo foram realizados estudos para o preparo de amostra.

Os estudos avaliados neste trabalho foram realizados de acordo com levantamento bibliográfico. O preparo de amostra para analisar glifosato e AMPA em solo envolvem, basicamente, as seguintes etapas: extração, *clean-up* e derivatização.

5.2.1.1 Estudo 1: Escolha da solução de extração

Estudos voltados para definir a solução de extração foram realizados a partir de soluções já definidas por outros autores, os quais são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Testes realizados para a escolha da solução de extração.

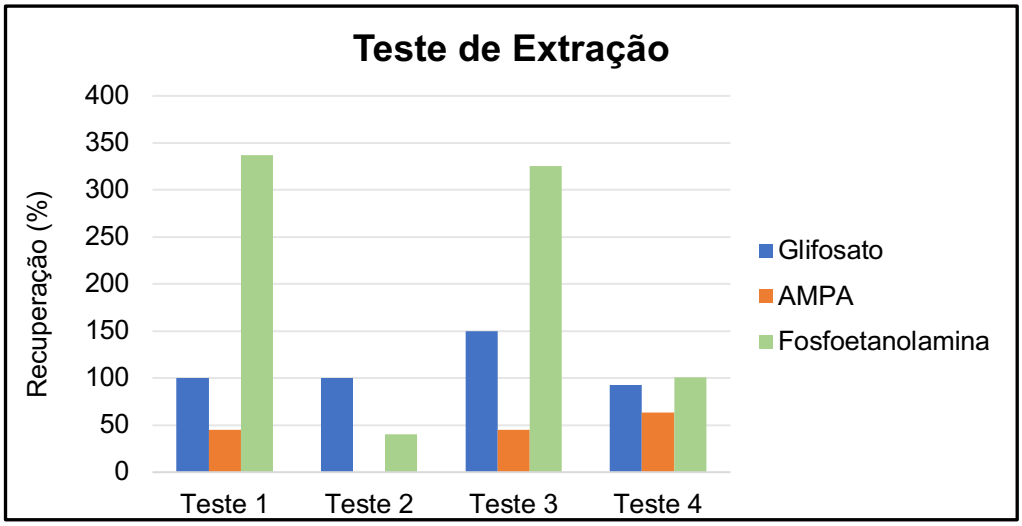
Teste	Soluções de extração	Referência
1	0,1 mol L^{-1} KOH em ACN : H_2O (1:1)	Adaptado IBAÑEZ *et al*., 2005; TODOROVIC *et al.*, 2013.
2	0,1 mol L^{-1} KOH em MeOH : H_2O (1:1)	Adaptado IBAÑEZ *et al*., 2005; TODOROVIC *et al*., 2013.
3	0,1 mol L^{-1} KOH em H_2O	IBAÑEZ *et al*., 2005; TODOROVIC *et al*., 2013.
4	0,03 mol L^{-1} Na_3PO_4 + 0,01 mol L^{-1} $Na_3C_6H_5O_7$ em H_2O	SUN *et al.*, 2017

Fonte: Próprio autor.

Para a realização deste estudo, no solo, foi realizado adição de solução mista dos três padrões analíticos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina para a concentração final de 0,25 µg mL^{-1}. Foi pesado aproximadamente 0,2 g de solo e adicionado a solução mista dos padrões analíticos. A seguir, 1 mL das soluções representadas nos quatro testes na Tabela 12 foram adicionados, seguidos de agitação por 15 minutos, banho ultrassônico por 15 minutos, centrífuga por 30 minutos e analisados no sistema HPLC-MS/MS.

Os resultados foram avaliados pelo cálculo da recuperação. A Figura 21 apresenta os resultados dos testes realizados.

Figura 21 - Comparação dos quatro testes de extração realizados pela recuperação dos analitos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina em matriz solo.



Fonte: Próprio autor.

Ao comparar os quatro testes realizados, observou-se que para o teste 1, o analito de interesse fosfoetanolamina apresentou elevada recuperação, indicando possíveis compostos com características similares interferiram na ionização, ocasionando em um aumento do sinal analítico.

No teste 3, também, foram observadas elevadas recuperações para os compostos glifosato e fosfoetanolamina. Já, no teste 2, não houve sinal analítico para o composto AMPA.

No teste 4, os três apresentaram recuperação igual ou inferior a 100%. De acordo com SUN *et al*., 2017, a solução de extração foi preparada com fosfato trissódico (Na_3PO_4) e citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$). A função de ambos os sais é competir com o glifosato no solo. No caso do Na_3PO_4, sua função é adsorver o átomo de fósforo presente em sua estrutura no solo, e o $Na_3C_6H_5O_7$ é formar complexos com os metais no solo, tornando esta solução de extração mais seletiva.

Além disso, esta solução apresenta pH aproximadamente igual a 11,0 e neste pH, o glifosato e o AMPA, encontram-se mais polares, pois os grupos do ácido carboxílico e fosfônico, do glifosato, e o grupo fosfônico do AMPA, estão desprotonados. Portanto, a solubilidade do glifosato e o AMPA aumenta, não adsorvendo no solo.

Outro fator observado neste experimento foi que para a soluções de extração que utilizavam o sal hidróxido de potássio (KOH) a coloração da solução após a extração, era mais intensa do que quando comparado a solução de extração do teste 4. A explicação para este fato, se deve a baixa seletividade do KOH quando comparado com a solução do teste 4, extraindo mais componentes do solo.

5.2.1.2 Estudo 2: Escolha do *clean-up*

Em testes iniciais envolvendo a matriz foi observado que o sistema não apresentou sensibilidade considerável em relação aos compostos estudados, devido a presença de interferentes na matriz que reduziam a intensidade do sinal dos compostos.

A etapa de *clean-up* previamente à etapa de derivatização possui o intuito de reduzir interferentes, aumentando a seletividade na derivatização dos compostos estudados e, consequentemente, reduzindo do efeito de matriz do solo.

Neste caso, foi realizado um estudo para definir qual técnica de *clean-up* seria a mais adequada para a eliminação dos interferentes da matriz. A Tabela 13 apresenta as técnicas empregadas nesta etapa do estudo.

Tabela 13 - Testes realizados para determinar o *clean-up* a ser utilizado na metodologia final.

Teste	*Clean-up*	Referência
1	Diluição com ACN : H_2O (1:1)	-
2	Ajuste do pH=9 e Extração em Fase Sólida (SPE)	IBAÑEZ *et al*., 2005
3	Extração Líquido – Líquido (LLE)	SUN *et al*., 2017

Fonte: Próprio autor.

Para a realização deste experimento, a amostra foi extraída com a solução e condições definidas no estudo 1.

No procedimento de diluição, as amostras fortificadas foram diluídas na proporção extrato:solvente (1:1) com solução de água / acetonitrila (50% / 50%, v/v).

Para o estudo de extração em fase sólida (SPE), devido às características dos compostos estudados, o processo foi adaptado da técnica original de SPE. Inicialmente o pH do extrato fortificado foi ajustado para aproximadamente 9. Em seguida, iniciou-se o procedimento com as seguintes etapas:

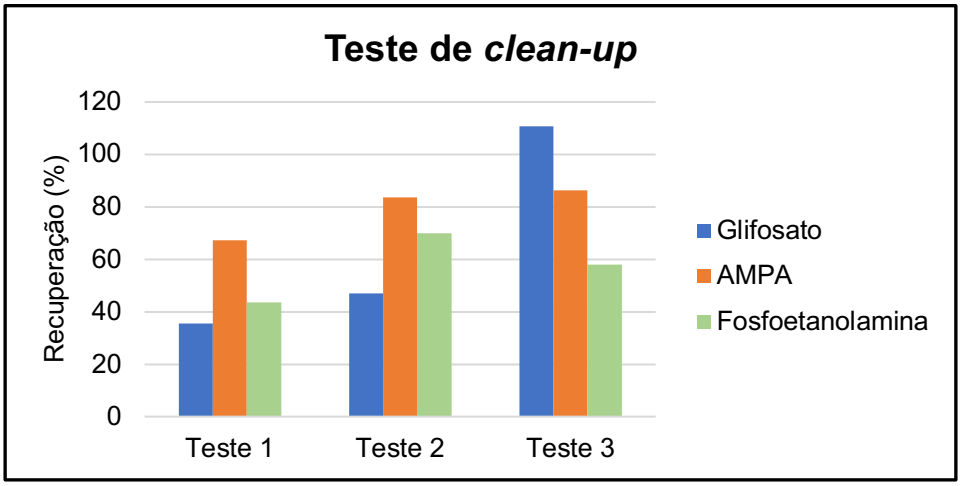
1. **Condicionamento do cartucho**: a ativação do cartucho Oasis HLB® foi realizado com 1 mL de metanol, seguido de 1 mL de água. Na etapa de condicionamento, a fase estacionária foi mantida em contato com os solventes, evitando a secagem do material de empacotamento da fase sólida.
2. **Percolação do extrato:** o volume de 1 mL do extrato fortificado foi percolado pelo cartucho, a fim de remover possíveis interferentes da matriz.
3. **Eluição do analito:** como os compostos estudados apresentam as características altamente polares, este foram eluídos na etapa de percolação do extrato, não havendo percolação dos compostos estudados no cartucho.

Para a avaliação da técnica de extração líquido-líquido (LLE), em um microtubo foi adicionado o volume de 1 mL do extrato fortificado e 1 mL do solvente n-hexano, seguido de agitação por 1 minuto e repouso por 30 segundos, formando duas fases imiscíveis. O sobrenadante, n-hexano é retirado, e então, repetindo o procedimento, é adicionado 1 mL de n-hexano.

A determinação da etapa de *clean-up* mais adequada também foi realizada pelo cálculo da recuperação.

Para a realização deste estudo, foi realizado adição de solução mista dos três padrões analíticos nas amostras de solo e estas extraídas com solução de extração e condições determinadas no estudo 1. A Figura 22 apresenta os resultados obtidos referentes aos três testes realizados nesta etapa.

Figura 22 - Comparação dos três testes de clean-up realizados pela recuperação dos analitos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina em matriz solo.



Fonte: Próprio autor.

Os valores das recuperações nos três testes realizados para os compostos variaram entre 35 a 110%. Em decorrência da variação dos resultados deste estudo, este teste foi repetido com a adição da etapa de derivatização dos compostos com o derivatizante PITC.

5.2.1.3 Estudo 3: Estado da arte - reação de derivatização com fenilisotiocianato (PITC)

Na literatura, estudos envolvendo a análise de glifosato e AMPA em solo via HPLC-MS/MS preconizam a etapa de derivatização.

A derivatização é uma etapa necessária para analisar glifosato e AMPA no solo, devido suas características altamente polares e pela presença de interferentes presentes no solo que dificultam a quantificação destes compostos.

A reação utilizando o derivatizante FMOC-Cl é a mais empregada. No entanto, esta reação é lenta, sendo necessário horas para ocorrer.

Portanto, neste estudo, como estado da arte, foi avaliado uma reação de derivatização alternativa ao FMOC-Cl com a utilização do reagente fenilisotiocianato (PITC).

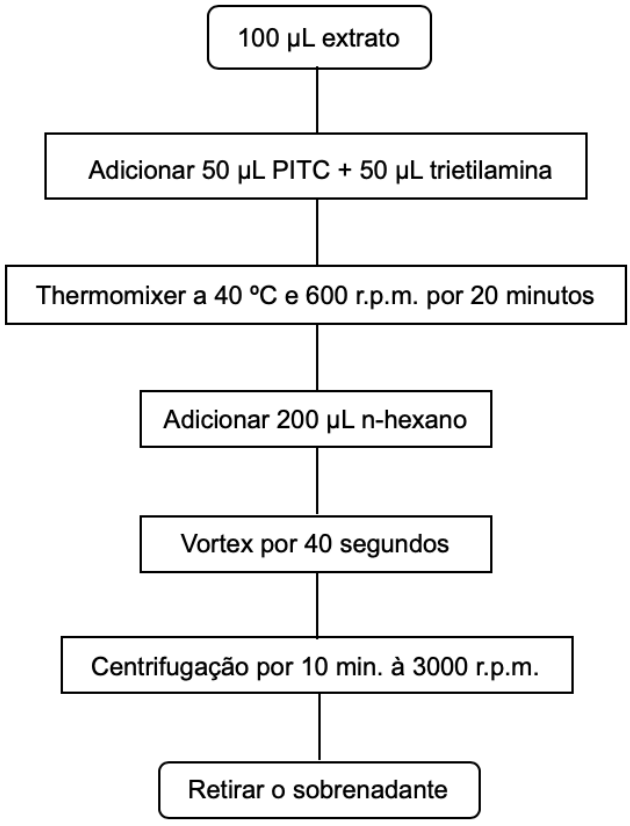
A metodologia empregada foi definida de acordo com os seguintes autores: SHIMADZU, 2007; JIE *et al.,* 2011 e SHI *et al.*, 2013. Esta reação ocorre em meio básico, por isso utiliza-se a trietilamina. O carbono do derivatizante PITC reage com o nitrogênio do grupo amino presente nas moléculas de glifosato, AMPA e fosfoetanolamina.

Para o estudo foi utilizado uma solução mista dos três padrões analíticos na concentração de 5 μg mL^{-1} preparadas em água ultrapura a partir das soluções estoques de cada composto.

Previamente a reação, soluções dos reagentes de derivatização PITC e trietilamina foram preparadas em acetonitrila (ACN).

A Figura 23 apresenta o procedimento de reação.

Figura 23 - Fluxograma do procedimento empregado para reação de derivatização com PITC na determinação do glifosato e AMPA no solo.



Fonte: Próprio autor.

Após a reação, a solução mista dos compostos derivatizados foi infundida no espectrômetro de massas e obtidos os espectros MS e MS/MS. A partir desses espectros é possível determinar os íons moleculares dos compostos derivatizados e seus respectivos íons produtos, confirmando a ocorrência da reação.

Esperava-se que os compostos apresentassem as seguintes massas moleculares, fórmulas moleculares e razões massa / carga (m/z) apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Possíveis massa molar, fórmula molecular e razões massa / carga (m/z) dos compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina a partir da reação de derivatização com PITC.

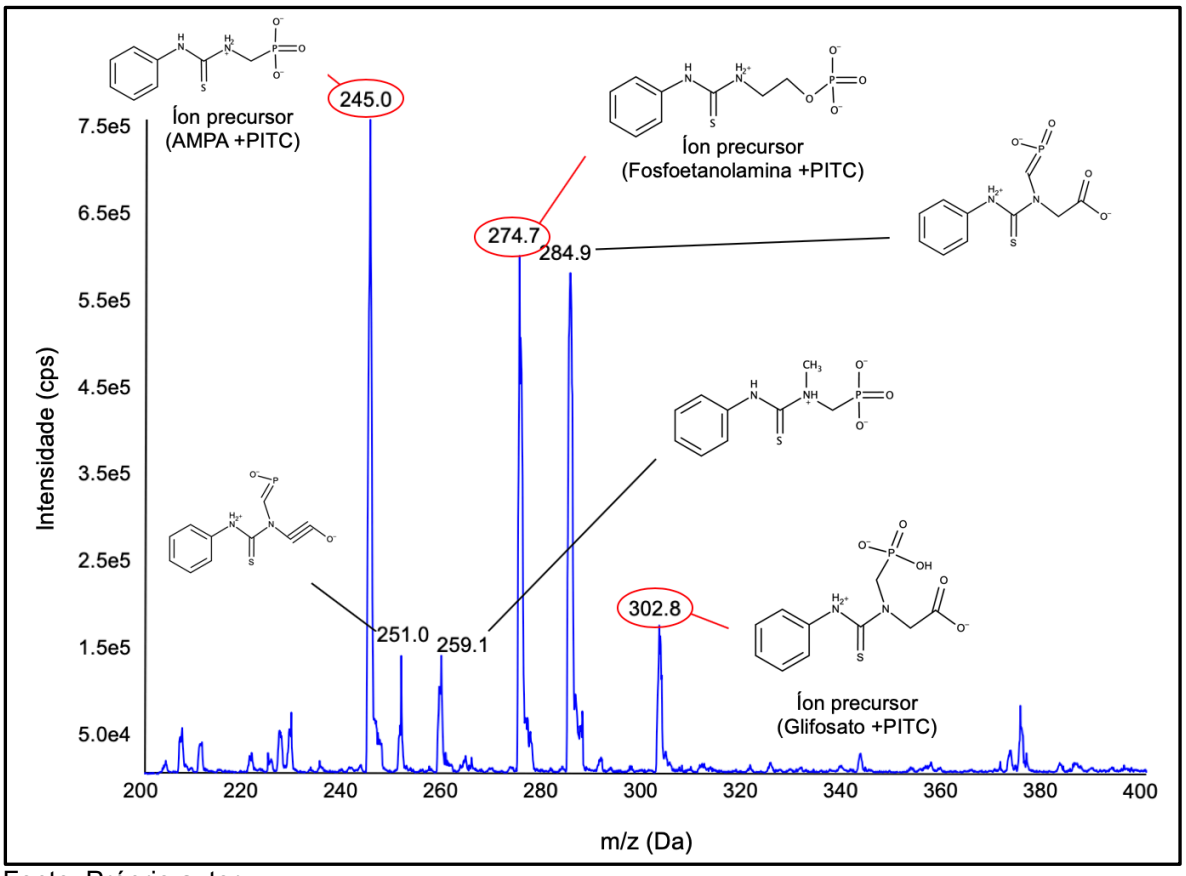
Compostos	**Fórmula Molecular**	**Massa Molar (g mol^{-1})**	**Razão m/z esperada no ESI (-) ***	**Razão m/z esperada no ESI (+) ****
Glifosato + PITC	$C_{10}H_{13}N_2O_5PS$	304,03	303,0	305,0
AMPA + PITC	$C_8H_{11}N_2O_3PS$	246,03	245,0	247,0
Fosfoetanolamina + PITC	$C_9H_{13}N_2O_4PS$	276,03	275,0	277,0

* ESI (-): fonte de ionização no modo negativo.
** ESI (+): fonte de ionização no modo positivo.

Fonte: Próprio autor.

Após a reação, os compostos foram infundidos no espectrômetro de massas. Foi observado maior sensibilidade no modo negativo. Primeiramente, a aquisição de dados no sistema ocorreu em modo de varredura SCAN, em que o sistema realiza uma varredura em determinada faixa de m/z dos íons obtidos na ionização. A partir do espectro MS (Figura 24) foi possível verificar a formação dos compostos derivatizados.

Figura 24 - Espectro MS no modo negativo, indicando a formação dos compostos derivatizados.



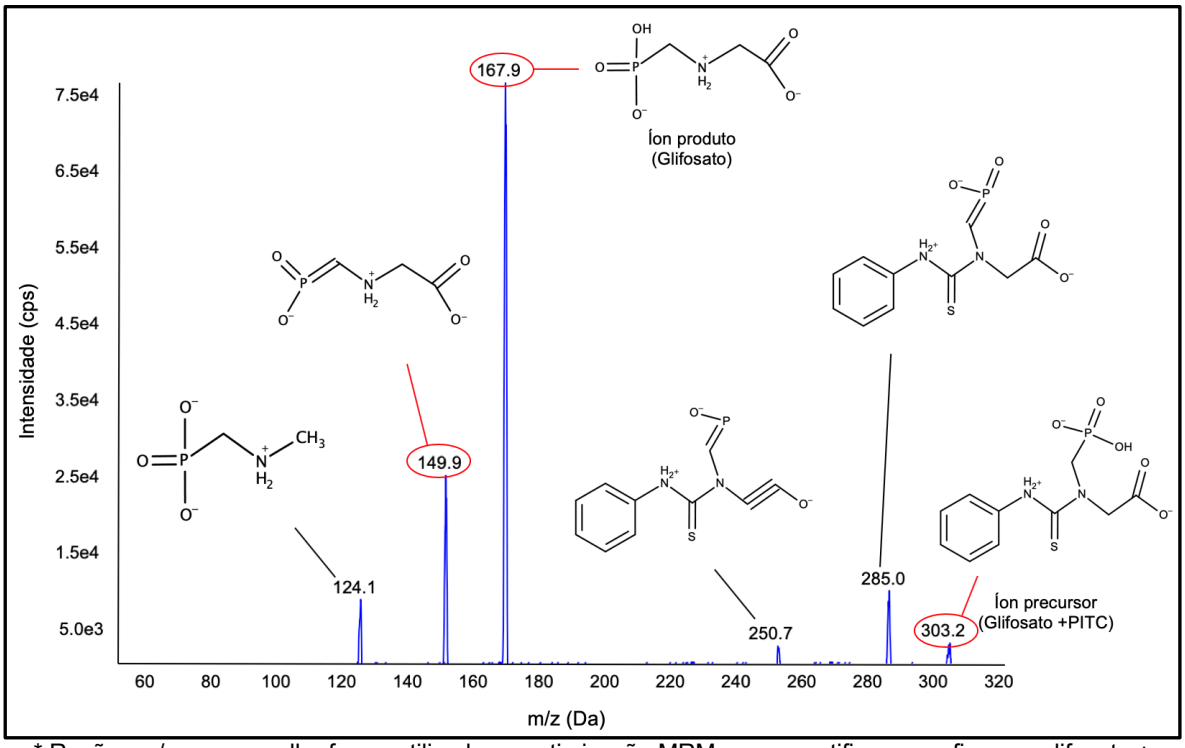
Fonte: Próprio autor.

No espectro MS, Figura 24, as seguintes razões m/z iguais a 245,0; 274,7 e 302,8 representam, respectivamente, os compostos AMPA, fosfoetanolamina e glifosato derivatizados com PITC. No entanto, as razões m/z 251,0; 259,1 e 284,9 correspondem à fragmentação do composto glifosato durante a ionização na fonte.

Para confirmar a formação dos compostos derivatizados, foi realizado a fragmentação destes íons, permitindo a confirmação, pelo modo de varredura do íon produto, formando um espectro MS/MS.

No modo de varredura do íon produto, o sistema aplica um filtro e seleciona o íon precursor com m/z específico no primeiro analisador (Q1), fragmenta (Q2) e no segundo analisador (Q3), uma varredura é realizada em determinada faixa de m/z, identificando os íons produtos (fragmentos), permitindo a confirmação dos compostos derivatizados. A Figura 25 apresenta o espectro MS/MS do íon precursor referente ao glifosato derivatizado de m/z igual a 303.

Figura 25 - Espectro MS/MS referente ao composto glifosato derivatizado com PITC (Gli + PITC).



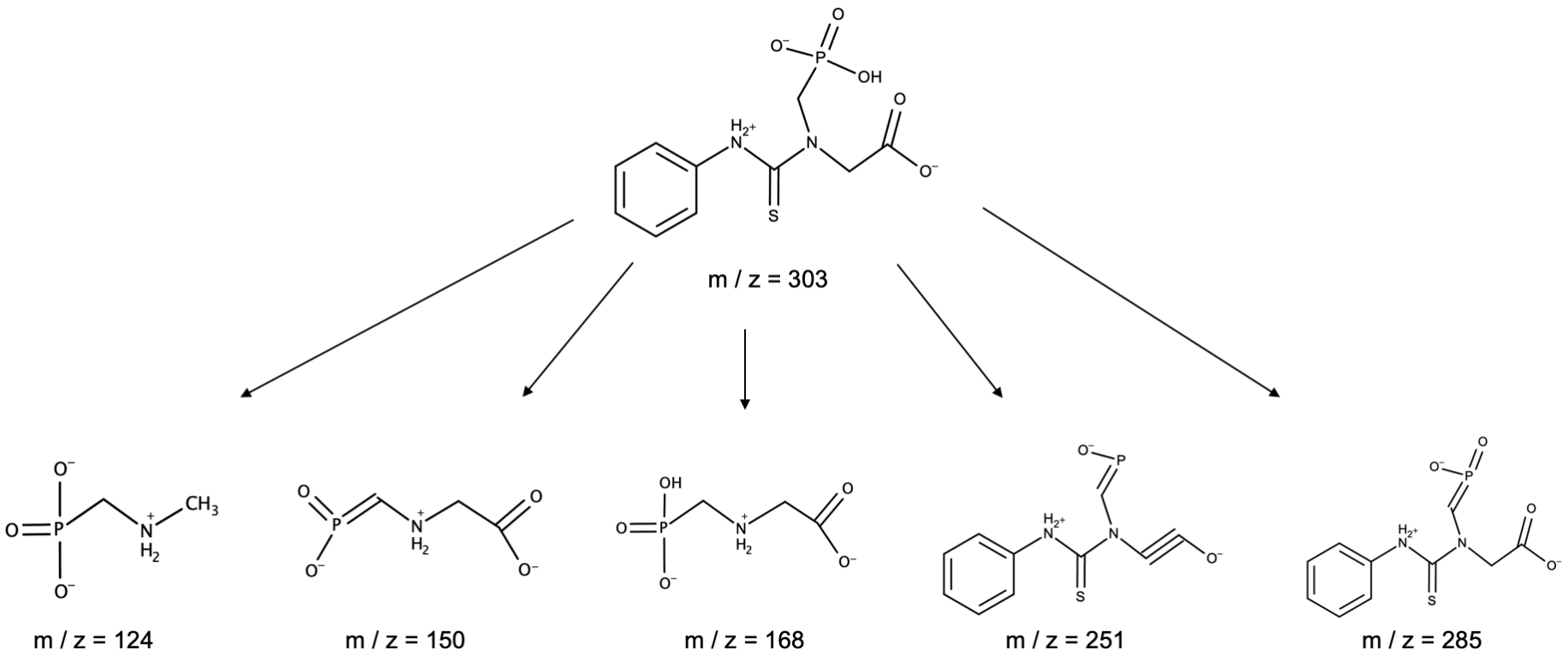
* Razões m/z em vermelho foram utilizadas na otimização MRM para quantificar e confirmar o glifosato + PITC.

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 25, foi possível observar a formação do íon produto com razão m/z igual a 167,9. Este íon é referente à fragmentação da molécula Gli+PITC, formando o composto glifosato. Além disso, pode-se observar a razão m/z igual a 150,0; que corresponde a outro íon produto correspondente da fragmentação do glifosato.

A Figura 26 apresenta as possíveis estruturas moleculares do íon precursor e dos demais produtos formados

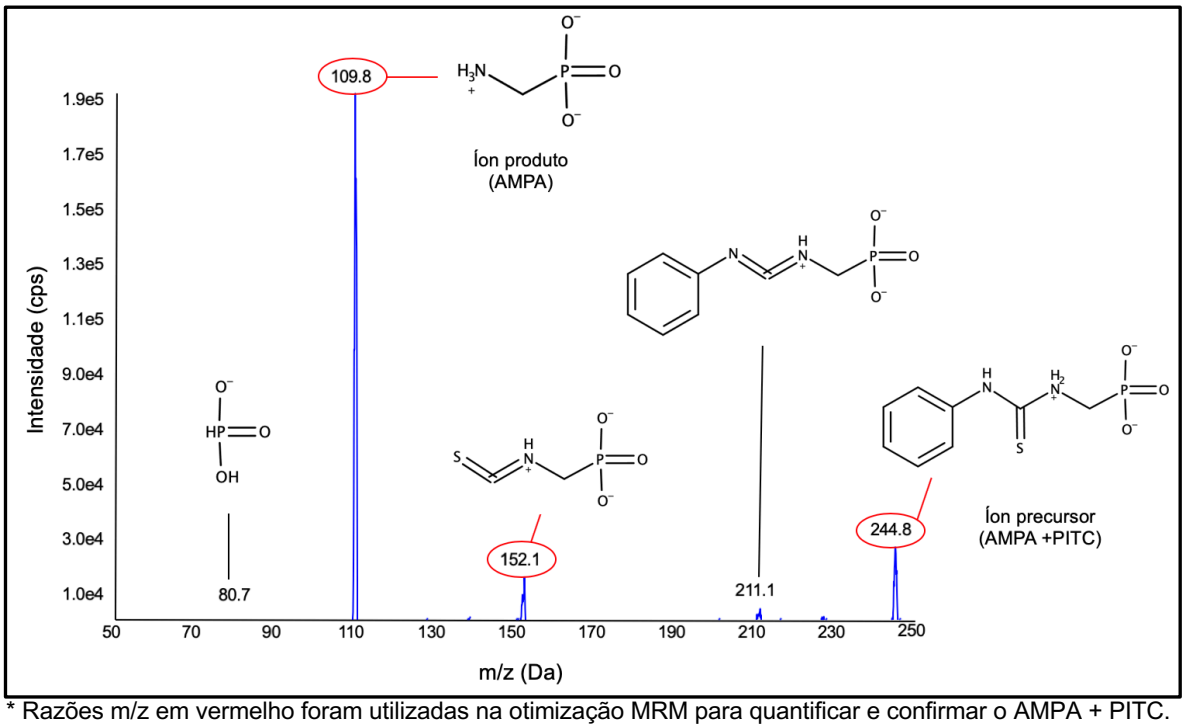
Figura 26 - Possíveis estruturas para os íons formados a partir da fragmentação do glifosato derivatizado.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 27 apresenta o espectro MS/MS do íon precursor referente ao AMPA derivatizado de m/z igual a 245.

Figura 27 - Espectro MS/MS referente ao composto AMPA derivatizado com PITC (AMPA + PITC).

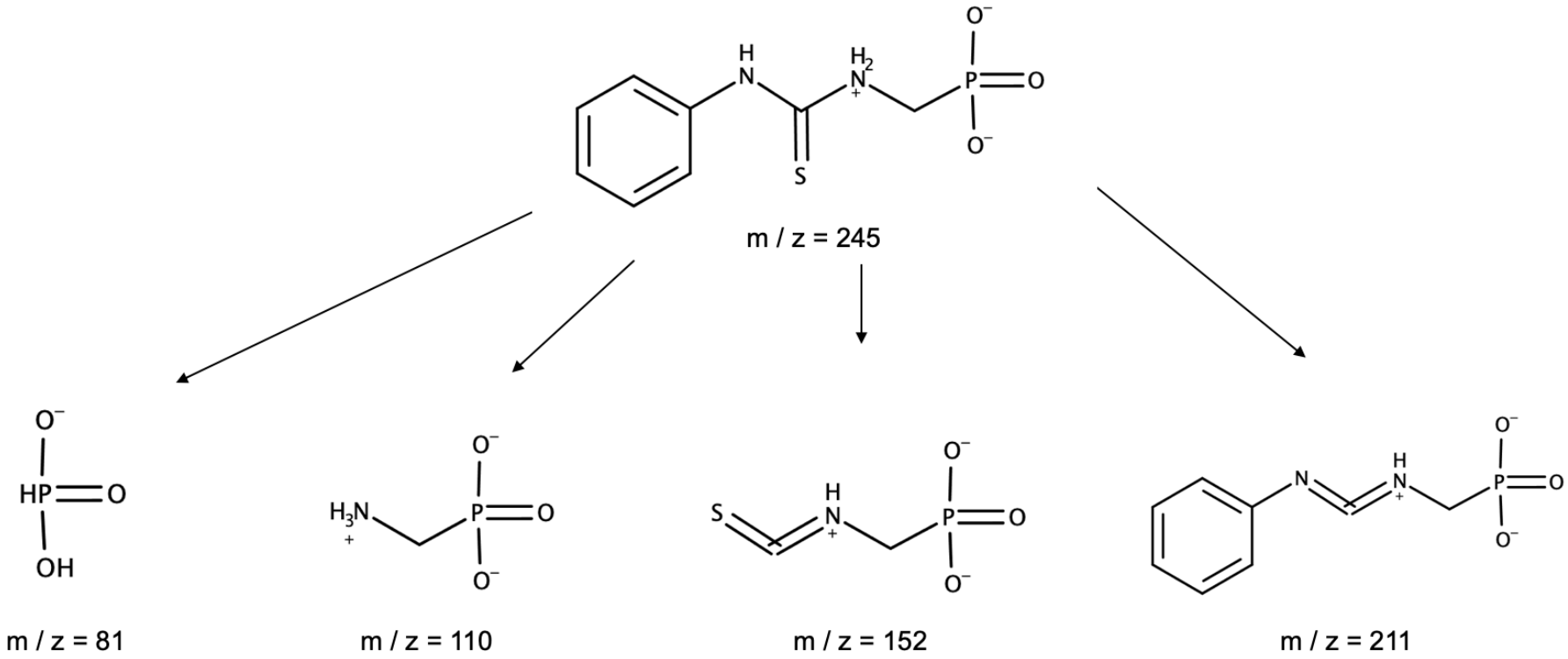


* Razões m/z em vermelho foram utilizadas na otimização MRM para quantificar e confirmar o AMPA + PITC.

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 27 observa-se a formação do íon produto com razão m/z igual a 109,8; que corresponde a formação do composto AMPA, a partir da fragmentação da molécula AMPA + PITC. A Figura 28 apresenta as possíveis estruturas moleculares do íon precursor e dos demais produtos formados.

Figura 28 - Possíveis estruturas para os íons formados a partir da fragmentação do AMPA derivatizado.

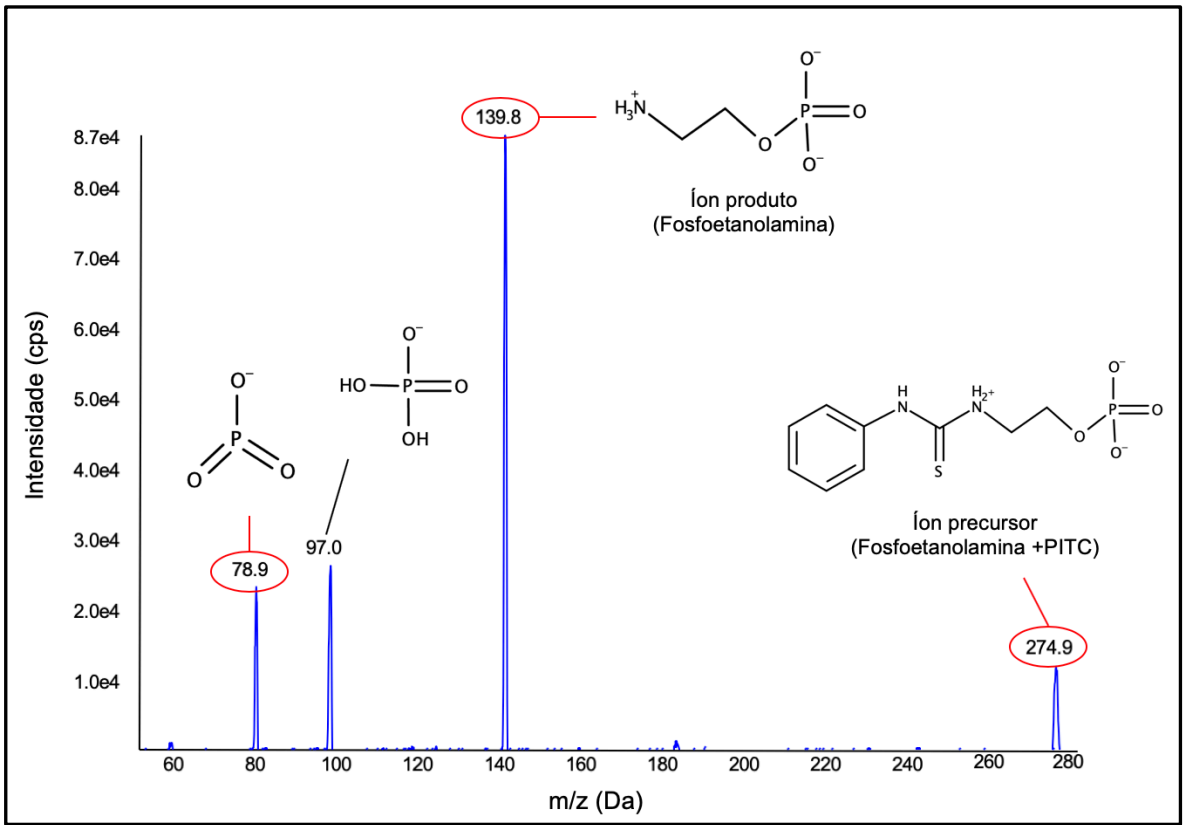


Fonte: Próprio autor.

A Figura 29 apresenta o espectro MS/MS do íon precursor referente ao fosfoetanolamina derivatizado de m/z igual a 275.

De acordo com a Figura 29, pode-se observar a formação do íon produto com razão m/z igual a 139,8. Este íon formado é referente a fragmentação da molécula Fosfo + PITC na ligação carbono – nitrogênio, formando o composto fosfoetanolamina.

Figura 29 - Espectro MS/MS referente ao composto fosfoetanolamina derivatizado com PITC (Fosfo + PITC).

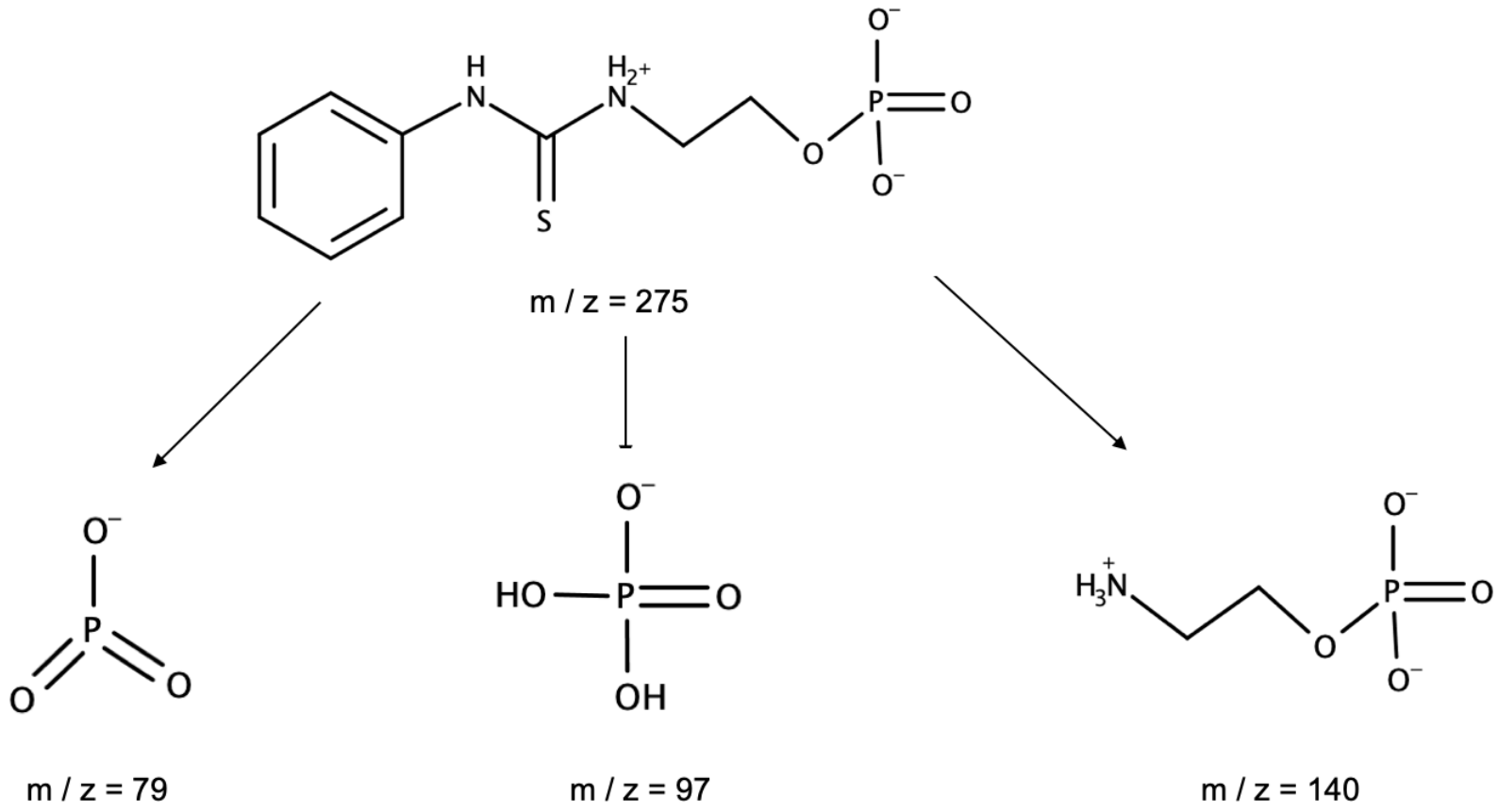


* Razões m/z em vermelho foram utilizadas na otimização MRM para quantificar e confirmar o fosfoetanolamina + PITC.

Fonte: Próprio autor.

A Figura 30 apresenta as possíveis estruturas moleculares do íon precursor e dos produtos formados

Figura 30 - Possíveis estruturas para os íons formados a partir da fragmentação da fosfoetanolamina derivatizada.



Fonte: Próprio autor

5.2.1.4 Estudo 4: Otimização da etapa de *clean-up* previamente a derivatização com PITC

Como os resultados obtidos no estudo 2 não foram satisfatórios, o estudo de *clean-up* foi reavaliado com a adição da etapa de derivatização.

Para a realização deste estudo, foi realizada a adição de solução mista dos padrões nas amostras de solo e preparadas de acordo com o fluxograma da metodologia analítica descrita na Figura 18 no item 4.4.1 do capítulo 4 com as seguintes condições testadas, apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 - Testes realizados para etapa de *clean-up* seguido de derivatização com PITC.

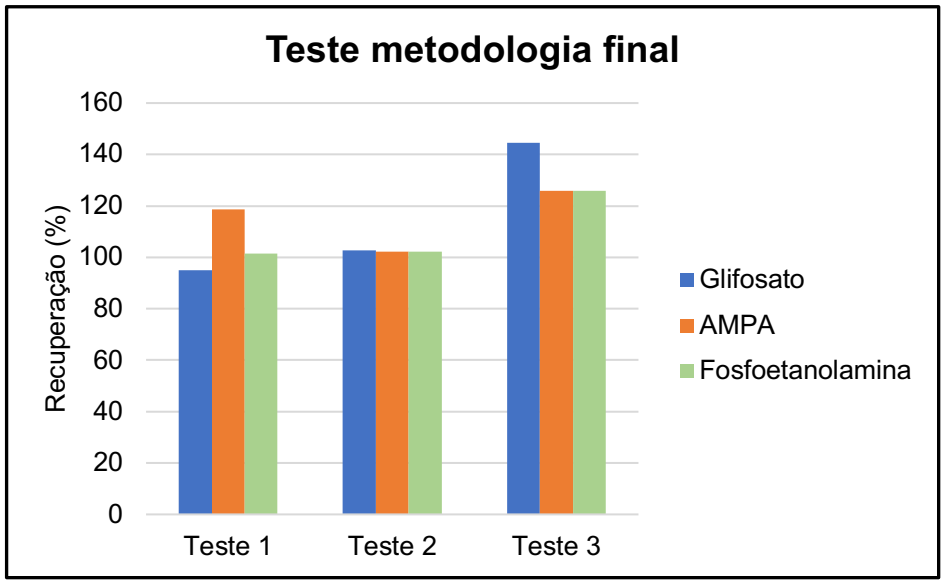
Teste	Solução de extração	*Clean-up*
1	1 mL de solução de Na_3PO_4 e $Na_3C_6H_5O_7$	Diluição 1:1 com ACN : H_2O (1:1)
2	1 mL de solução de Na_3PO_4 e $Na_3C_6H_5O_7$	Ajuste do pH=9 e SPE
3	1 mL de solução de Na_3PO_4 e $Na_3C_6H_5O_7$	LLE

Fonte: Próprio autor.

Neste estudo foi considerado o fator de diluição para os três testes realizados, em que as concentrações dos padrões analíticos após o preparo foram iguais a 0,25 μg mL^{-1}.

Os resultados foram avaliados pela recuperação, e assim, definida a metodologia mais adequada para o preparo de amostra. A Figura 31 apresenta os resultados obtidos referentes aos três testes realizados neste estudo.

Figura 31 - Comparação dos três testes de *clean-up* seguidos da etapa de derivatização pela recuperação dos analitos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina em matriz solo.



Fonte: Próprio autor.

Após a adição da etapa de derivatização no estudo de *clean-up* reavaliado, as recuperações obtidas para os três compostos foram superiores a 120% para o teste 3.

Para os testes 1 e 2, os resultados das recuperações dos compostos foram aproximadamente 100%.

A escolha do teste 1 como metodologia final se deve à etapa de *clean-up* estudada, pois a diluição é uma técnica simples. Além disso, em testes de efeito de matriz não foi observado interferência em ambos os testes realizados.

5.2.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (HPLC-MS/MS)

Para a análise no sistema HPLC-MS/MS, o desenvolvimento envolve as seguintes etapas: otimização do espectrômetro de massas e o desenvolvimento do método cromatográfico.

No espectrômetro de massas foi realizada a otimização dos analisadores (Q1 e Q3) e célula de colisão (Q2) no modo de operação MRM, definindo as

condições ótimas para as duas transições (par íon precursor / íon produto) mais intensas para cada composto.

Após a otimização no espectrômetro de massas, foi desenvolvida a cromatografia em que as seguintes condições foram determinadas: coluna cromatográfica, composição da fase móvel, fluxo da fase móvel, temperatura do forno de coluna, volume de injeção da amostra e gradiente de eluição da corrida cromatográfica.

A escolha do método cromatográfico foi realizada pela avaliação da intensidade do sinal analítico e resolução dos picos cromatográficos dos compostos em estudo.

Nos testes iniciais, foi reproduzida a cromatografia desenvolvida por SCHREIBER *et al.*, 2016 para analisar glifosato e AMPA em água sem derivatização.

Nesta metodologia (método A), a coluna utilizada foi a Acclaim™ Trinity™ Q1 com dimensões de 100 x 3 mm; 3 µm, da marca *Thermo Scientific*; fase móvel (A) água com solução tampão de 50mM formiato de amônio / ácido fórmico (pH = 2,9) e (B) acetonitrila; volume de injeção da amostra 10 µL e temperatura do forno de coluna de 40 °C. A Tabela 17 apresenta o gradiente de eluição do método A.

Tabela 16 - Gradiente de eluição utilizado no método cromatográfico A.

Instante	Tempo (min.)	Fluxo (µL min^{-1})	A (%)	B (%)
0	3,00	500	100	0
1	3,00	500	100	0
2	3,01	500	5	95
3	6,00	500	5	95
4	6,01	500	100	0

Fonte: Próprio autor.

As condições otimizadas no espectrômetro de massas para os analitos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina sem derivatização são apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17 - Método A: parâmetros MRM otimizados para os compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina para metodologia sem derivatização.

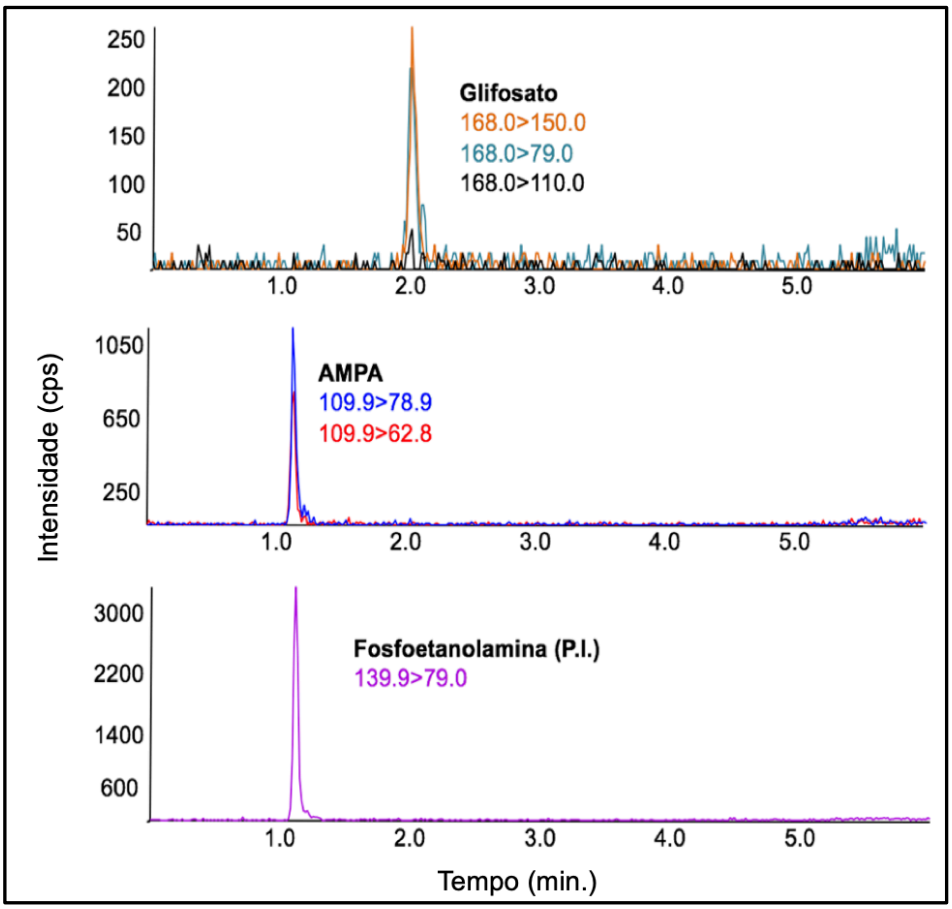
Compostos	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Glifosato	**168,0**	**79,0***	- 25	- 4	- 10	- 42	- 2
		110,0				- 30	
		124,0				- 14	
AMPA	**110,0**	**78,9***	- 50	- 6	- 8	- 34	- 2
		62,8				- 28	
Fosfoetanolamina	**139,9**	**79,0***	- 45	- 8	- 10	- 22	- 2

* Os valores em negritos representam as transições (par íon precursor / íon produto) de quantificação.

Fonte: Próprio autor.

O método A foi aplicado para testes iniciais na etapa de extração e *clean-up* durante o desenvolvimento do preparo de amostra. A Figura 32 apresenta o cromatograma da solução mista dos padrões analíticos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina em água ultrapura na concentração de 0,5 µg mL^{-1}.

Figura 32 - Cromatograma dos compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina sem derivatização (método A) em água na concentração de 0,5 µg mL^{-1}.



Fonte: Próprio autor.

Os compostos AMPA, fosfoetanolamina e glifosato foram eluídos com os respectivos tempos de retenção, 1,20; 1,20 e 2,00 minutos, respectivamente.

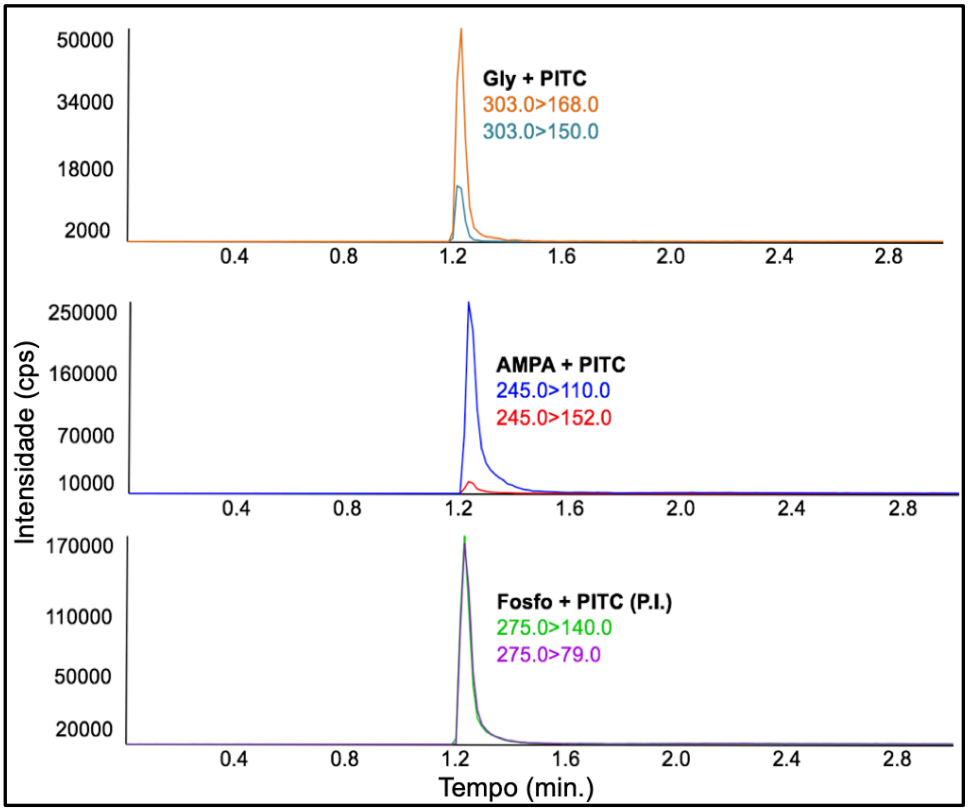
Nesta metodologia, os três compostos apresentaram baixa sensibilidade em solvente, as intensidades dos sinais analíticos apresentadas para o glifosato e AMPA foram 250 e 1050 cps, respectivamente.

Em testes com a matriz, as sensibilidades dos compostos diminuíram quando comparados em solvente, pois supõe-se a coeluição das substâncias húmicas. Portanto, um segundo método, foi desenvolvido para os compostos derivatizados, denominado método B.

Para o desenvolvimento da metodologia B para os compostos derivatizados com PITC, foram avaliados diversos métodos com diferentes tipos de colunas cromatográficas e fases móveis.

O cromatograma do método B desenvolvido para os compostos derivatizados com PITC é apresentado na Figura 33. As condições do método B são apresentadas no item 4.4.2 no capítulo 4 desta dissertação.

Figura 33 - Cromatograma dos compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina derivatizados (método B) em água na concentração de 0,5 µg mL^{-1}.



Fonte: Próprio autor.

No método B, após a derivatização dos compostos foi observado um aumento na sensibilidade. No entanto, não houve separação dos sinais analíticos dos três compostos, apresentando tempo de retenção igual a 1,24 minutos. Devido à alta seletividade da técnica de espectrometria de massas em *tandem*, mesmo que os compostos apresentem mesmo tempo de retenção, é possível separar os sinais dos analitos, permanecendo a seletividade.

Após testes envolvendo a matriz, não foi observado diminuição do sinal dos compostos em presença de interferentes da matriz. Portanto, o método B foi utilizado como método cromatográfico final.

5.3 Validação do método

Nesta seção serão abordados os resultados dos estudos realizados para a validação da metodologia.

5.3.1 Efeito da matriz

Como o solo é considerado uma matriz complexa, dois testes foram realizados para avaliar o efeito da matriz para os compostos estudados: adição de padrão pós-extração e infusão pós-coluna.

5.3.1.1 Adição de padrão pós-extração

Neste estudo, o branco do solo foi preparado em triplicata pelo método descrito na Figura 18 no item 4.4.1 do capítulo 4 desta dissertação. Ao final do preparo, uma solução mista dos padrões analíticos derivatizados foram adicionados na matriz e analisados.

Os resultados foram avaliados pelo coeficiente de variação (CV) em que o valor de CV inferior a 15%, indica que não há efeito de matriz. A Tabela 18 apresenta os dados e resultados obtidos das análises realizadas.

Tabela 18 – Resultado do Fator de Matriz Normalizado (FMN) para glifosato, AMPA na concentração final de 250 ng mL^{-1}.

Composto	FMN 1	FMN 2	FMN 3	FMN médio	Desvio Padrão	CV (%)
Gli + PITC	1,17	1,50	1,08	1,25	0,216	**17,3**
AMPA + PITC	1,11	1,23	1,09	1,14	0,0726	**6,36**

Fonte: Próprio autor.

A partir dos resultados de CV obtidos, pode-se verificar que para o composto glifosato houve efeito de matriz (CV > 15%) e para o AMPA não houve efeito de matriz (CV< 15%).

5.3.1.2 Infusão pós-coluna

A avaliação do efeito da matriz para os compostos também pode ser realizada pela infusão dos padrões analíticos na fonte de espectrômetro de massas concomitante com a injeção da matriz ou solvente no sistema de HPLC-MS/MS.

Neste teste são avaliadas variações no sinal dos compostos durante a corrida cromatográfica, em presença da matriz, se ocorrer diminuição do sinal dos analitos (supressão) ou aumento do sinal dos analitos (adição), comparado com o sinal dos analitos em solvente, indica a presença do efeito da matriz. As Figuras 34, 35 e 36 apresentam os cromatogramas obtidos na infusão pós coluna em água ultrapura e em matriz para o glifosato, o AMPA e a fosfoetanolamina, respectivamente.

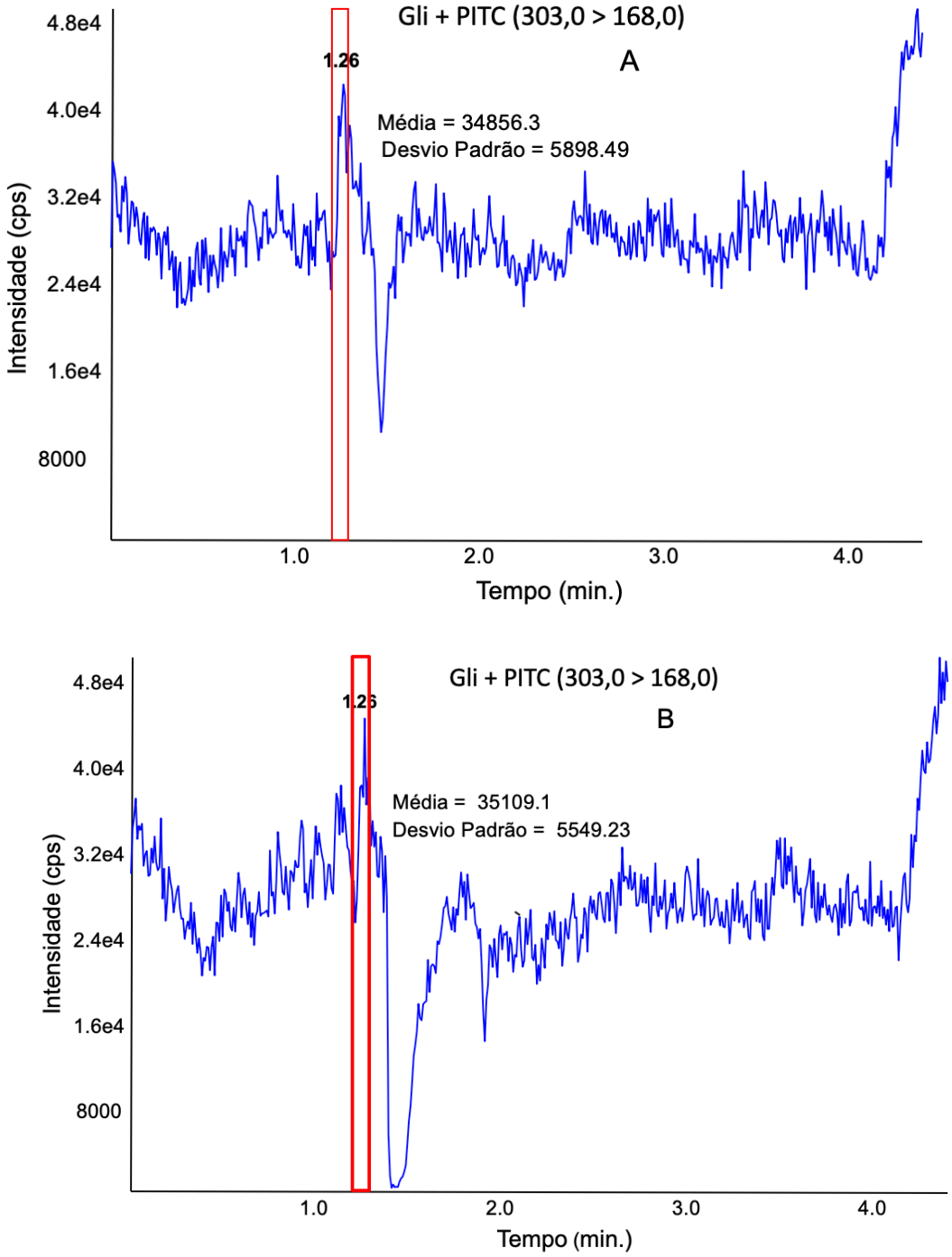
A variação do sinal dos compostos foi determinada na faixa de tempo de 1,20 a 1,29 minutos, pois é neste intervalo que os compostos são eluídos durante a corrida cromatográfica.

As intensidades dos sinais dos cromatogramas em água (A) e em solo (B) para o glifosato e a fosfoetanolamina (Figuras 34 e 36, respectivamente), não houve variações significativas em água e em solo, sendo as intensidades aproximadamente, em água e solo, 35.000 e 40.000 cps, respectivamente para cada analito.

Já, para o AMPA derivatizado, (Figura 35) ocorreu diminuição (supressão) na intensidade do sinal, em água (A) a intensidade do sinal foi aproximadamente 77.000 cps e em solo (B) a intensidade obtida foi de 68.000 cps.

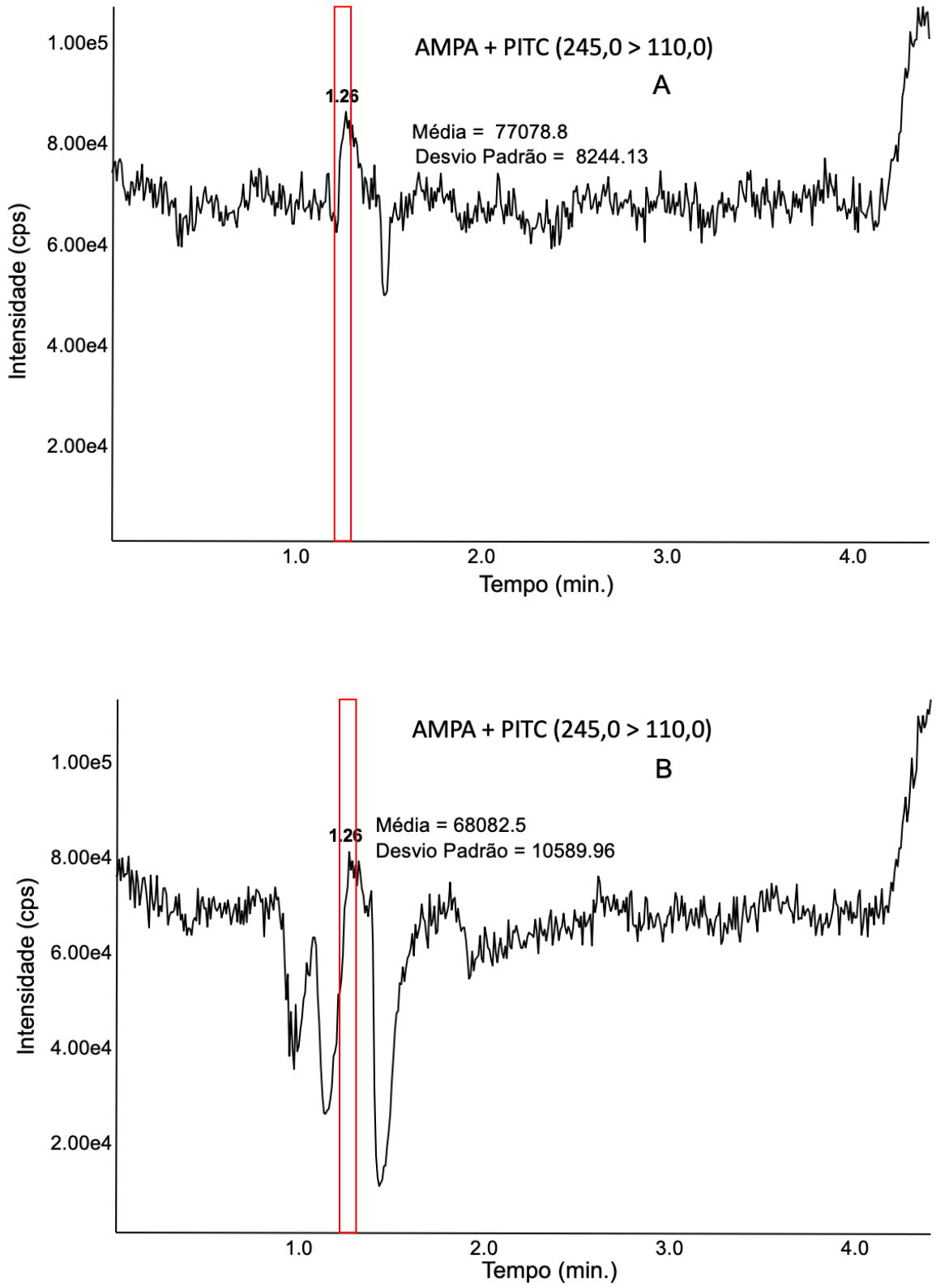
De acordo com os resultados, para o AMPA houve interferência da matriz. Portanto, para validação da metodologia a curva de calibração foi realizada na matriz.

Figura 34 - Cromatogramas em água (A) e solo (B) do composto glifosato derivatizado em infusão pós-coluna para determinação do efeito de matriz.



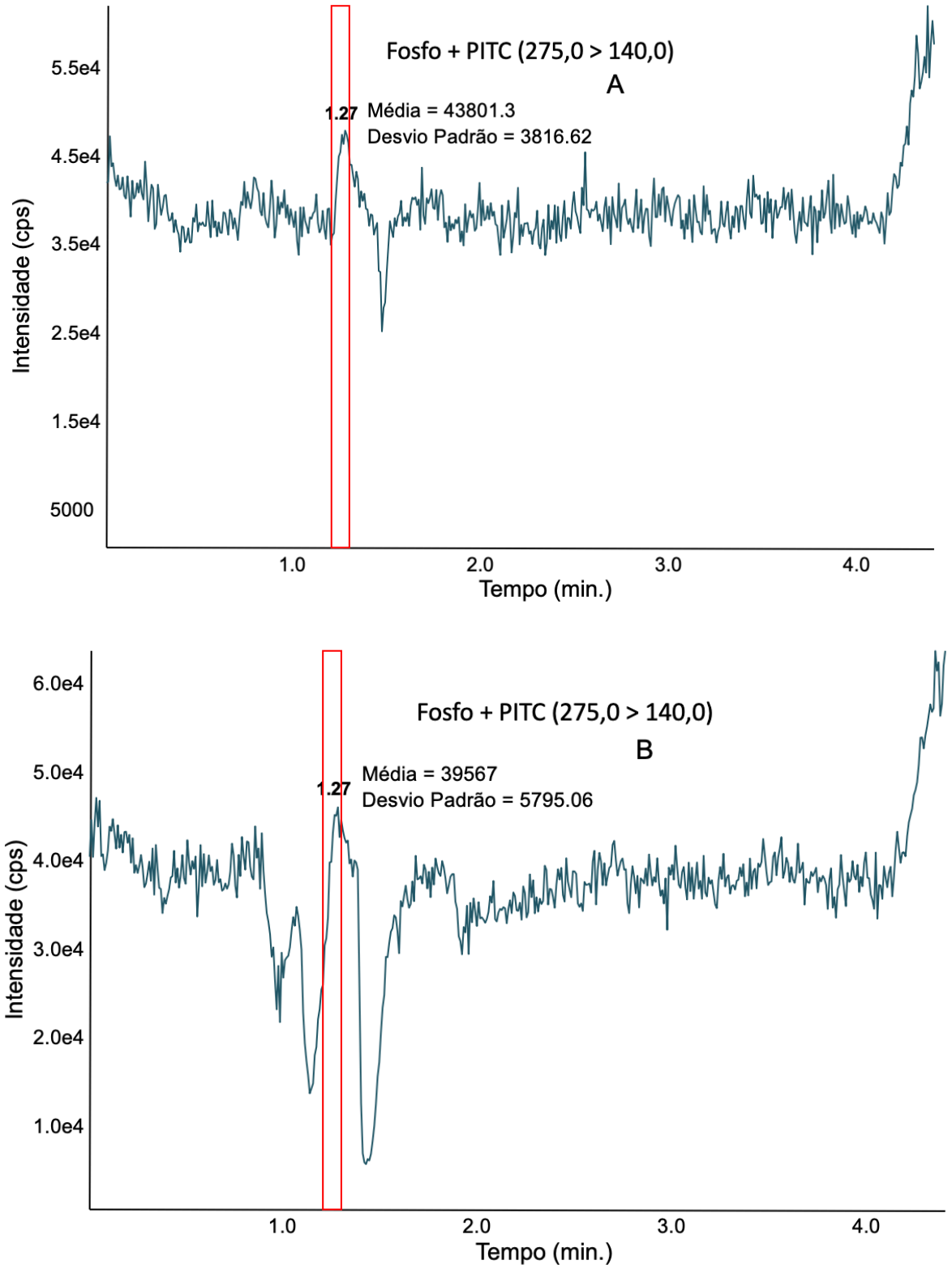
Fonte: Próprio autor

Figura 35 - Cromatogramas em água (A) e solo (B) do composto AMPA derivatizado em infusão pós-coluna para determinação do efeito de matriz.



Fonte: Próprio autor.

Figura 36 - Cromatogramas em água (A) e solo (B) do composto fosfoetanolamina derivatizado em infusão pós-coluna para determinação do efeito de matriz.



Fonte: Próprio autor.

5.3.2 Estudo da estabilidade da reação de derivatização

Definido o uso da derivatização para o preparo de amostra, foi realizado o teste de estabilidade dos derivados. Para a realização deste experimento, uma amostra fortificada com solução mista dos compostos na concentração final de 500 ng mL^{-1}.

A amostra foi injetada, em triplicata, no sistema em tempos determinados de 0, 6, 12 e 24 horas. As médias das áreas dos compostos foram calculados juntamente com o CV, onde foi considerado a variação entre 15% aceitável. Na Tabela 19 são apresentados os resultados obtidos.

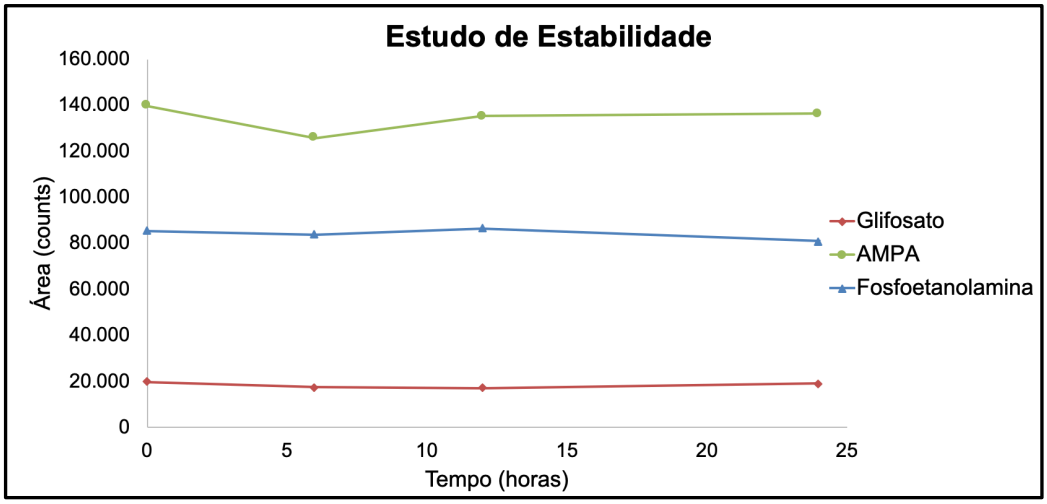
Tabela 19 - Média das áreas dos compostos nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas.

Tempo (horas)	Áreas Gli+PITC (n=3)	CV (%)	Áreas AMPA+PITC (n=3)	CV (%)	Áreas Fosfo+PITC (n=3)	CV (%)
0	19.972	2,28	139.900	2,10	85.470	3,56
6	17.500	2,83	126.000	1,25	84.000	2,44
12	17.242	7,98	135.297	1,79	86.727	3,87
24	19.295	2,92	136.306	0,92	80.869	7,01

Fonte: Próprio autor.

O gráfico da Figura 37 representa a variação da área em função do tempo.

Figura 37 - Gráfico das áreas dos compostos no período de 0, 6, 12 e 24 horas.



Fonte: Próprio autor.

De acordo, com os dados obtidos, a reação de derivatização foi estável para os compostos glifosato, AMPA e fosfoetanolamina pelo período de 24 horas.

5.3.3 Validação do método utilizando o guia 2002/657/EC – ResVal e DOC-CGRE-008 do INMETRO

Nesta seção, serão apresentados os resultados obtidos dos experimentos realizados durante a validação do método para os compostos glifosato e AMPA. Os resultados de seletividade e linearidade foram determinados de acordo com o guia DOC-CGRE-008 do INMETRO (2017). Para a avaliação os parâmetros de exatidão, precisão, limite de decisão (CCα), capacidade de detecção (CCβ) e a incerteza foi utilizado a planilha ResVal, de acordo com o guia da união europeia 2002/657/EC (2002).

5.3.3.1 Seletividade

A seletividade foi confirmada com a técnica HPLC-MS/MS em que foram utilizados pelo menos quatro pontos de identificação para cada composto, que mesmo eluídos no mesmo tempo de retenção, ocorreu a identificação dos compostos pelo espectrômetro de massas, assegurando a seletividade do método.

A seletividade também foi avaliada pelos testes estatísticos: teste F (Snedecor) de homogeneidade das variâncias e teste t (*Student*) de significância das diferenças, em que foram observadas as áreas para cada uma das oito replicatas para os seis níveis de concentração com e sem matriz.

As Tabelas 20 e 21 apresentam os resultados dos testes F (Snedecor) e t (*Student*) obtidos pelas Equações 7, 8 e 9 no item 4.5.1 do capítulo 4 para os ensaios com e sem matriz.

Tabela 20 - Resultados de seletividade determinados por meio dos testes F e t para o glifosato, pela adição de padrão em solvente e matriz solo, considerando $F_{7,7,95\%} = 3,790$ e $t_{14,\ 95\%} = 2,145$.

Concentração glifosato (mg kg^{-1})	Sem matriz s^2	Com matriz s^2	$F_{calculado}$	$t_{calculado}$
20	0,0007624	0,0006790	1,123	0,4442
40	0,005169	0,002589	1,997	1,797
80	0,001977	0,003188	1,613	3,470
160	0,02856	0,03141	1,100	4,039
320	0,2006	0,07971	2,516	4,010
640	16,14	0,9995	16,15	0,6130

Fonte: Próprio autor.

Tabela 21 - Resultados de seletividade determinados por meio dos testes F e t para o AMPA, pela adição de padrão em solvente e matriz solo, considerando $F_{7,7,95\%} = 3,790$ e $t_{12,\ 95\%} = 2,179$.

Concentração AMPA (mg kg^{-1})	Sem matriz s^2	Com matriz s^2	$F_{calculado}$	$t_{calculado}$
10	0,001141	0,002986	2,617	0,06524
20	0,003872	0,01887	4,872	0,5698
40	0,005743	0,07288	12,69	0,8671
80	0,07513	0,3219	4,284	0,4182
160	0,2870	1,142	3,978	0,8036
320	17,60	3,202	5,497	0,8447

Fonte: Próprio autor.

A partir dos resultados das Tabelas 20 e 21 é observado que para determinados níveis de concentração, os valores calculados de F e t foram superiores aos valores tabelados de F e t, respectivamente. Portanto, estes

resultados indicam que a matriz interfere na precisão do método, ou seja, possui um efeito significativo sobre a faixa de concentração avaliada, evidenciando que a quantificação deve ser realizada com curva analítica preparada na matriz solo.

5.3.3.2 Linearidade

Para a construção das curvas analíticas para o glifosato e AMPA foram analisados seis pontos com as concentrações apresentadas na Tabela 8 do item 4.5.6 no capítulo 4. Cada ponto foi preparado em duplicata para cada experimento e a média dos dois pontos foi utilizada para a curva de calibração final para cada experimento. As Tabelas 20 e 21 apresentam as curvas de calibração, a regressão linear e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) para os compostos glifosato e AMPA derivatizados com PITC.

Tabela 22 - Curvas de calibração, regressão linear e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) para os quatro experimentos realizados para o glifosato.

Experimento	Regressão linear (y = ax +b)	r^2
1	$y = 0{,}013\,x - 0{,}225$	0,9934
2	$y = 0{,}017\,x - 0{,}321$	0,9947
3	$y = 0{,}015\,x - 0{,}583$	0,9931
4	$y = 0{,}006\,x - 0{,}167$	0,9960

Fonte: Próprio autor.

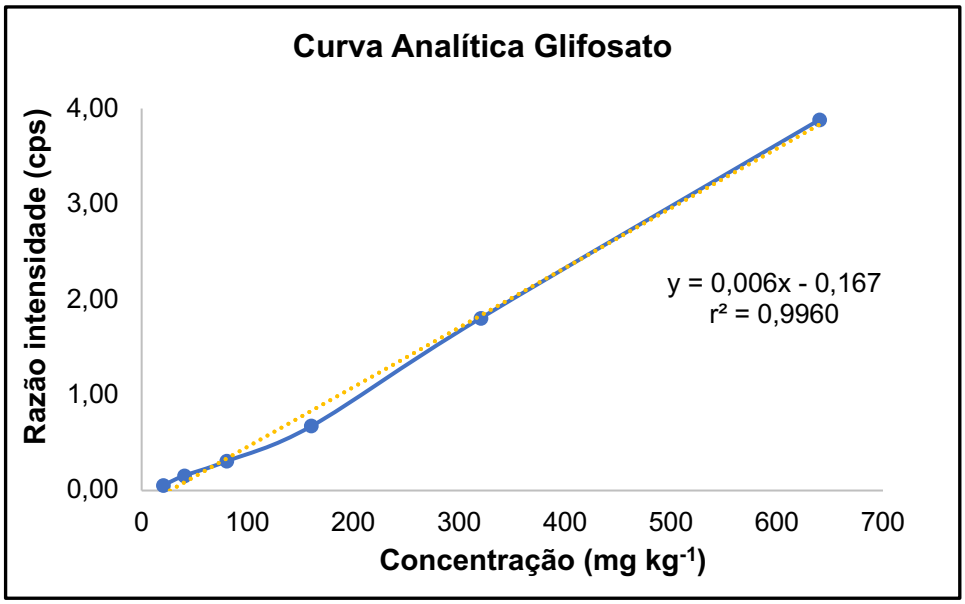
Tabela 23 - Curvas de calibração, regressão linear e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) para os quatro experimentos realizados para o AMPA.

Experimento	Regressão linear (y = ax +b)	r^2
1	$y = 0{,}043\,x - 0{,}040$	0,9991
2	$y = 0{,}031\,x - 0{,}037$	0,9975
3	$y = 0{,}036\,x - 0{,}085$	0,9997
4	$y = 0{,}035\,x - 0{,}099$	0,9965

Fonte: Próprio autor.

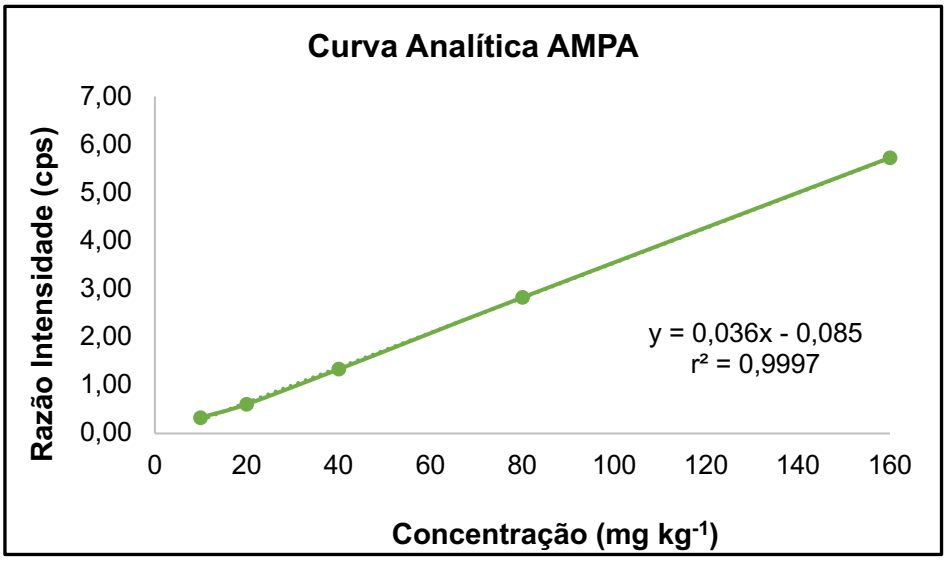
A partir dos dados apresentados, a curva analítica do composto AMPA apresentou melhor linearidade, em que os coeficientes de determinação variaram entre 0,9965 a 0,9997 para os quatro experimentos. Já para o glifosato, os coeficientes de determinação para os quatro experimentos variaram entre 0,9931 a 0,9960. As Figuras 38 e 39 apresentam as curvas analíticas do experimento 4 para o glifosato e do experimento 3 para o AMPA, respectivamente.

Figura 38 - Curva analítica obtida do experimento 4 para o glifosato.



Fonte: Próprio autor.

Figura 39 - Curva analítica obtida do experimento 3 para o AMPA.



Fonte: Próprio autor.

O INMETRO (2017) também sugere a aplicação da análise de variância (ANOVA), que avalia a linearidade pelo uso da estatística. A partir dos cálculos estatísticos ANOVA, a análise foi realizada pelo teste F de regressão, em que é verificado a adequação do modelo de regressão adotado aos dados obtidos. A Tabela 24 apresenta os resultados deste estudo.

Tabela 24 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para os compostos de estudo, glifosato e AMPA, no ensaio com matriz solo.

Composto	**$F_{calculado}$ matriz solo**
Glifosato	1919,17
AMPA	1028,95

*$F_{tabelado\ (1,\ 47,\ 95\%)}$ = 4,085

Fonte: Próprio autor.

A partir dos resultados de variância apresentados na Tabela 24 é observado que os valores de $F_{calculado}$ para ambos os compostos, glifosato e AMPA, foram superiores ao $F_{tabelado}$, ou seja, $F_{calculado} > F_{tabelado}$, confirmando a significância da equação de reta. Portanto, a equação de reta é adequada para as oito replicatas de cada ponto avaliado.

5.3.3.3 Exatidão (recuperação)

Os dados de recuperação dos analitos nas amostras de solo foram plotados em curva de regressão linear para a avaliação da recuperação dos métodos em diferentes concentrações de fortificação. As Tabelas 22 e 23 apresentam os dados das curvas construídas para glifosato e AMPA no *software* ResVal a partir dos dados de recuperação.

Tabela 25 - Regressão linear e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) calculados a partir dos resultados de recuperação das amostras fortificadas para o glifosato.

Experimento	Regressão linear (y = ax +b)	r^2	n
1	$y = 0{,}011\,x - 0{,}007$	0,9862	21
2	$y = 0{,}015\,x - 0{,}142$	0,9788	21
3	$y = 0{,}011\,x - 0{,}158$	0,9811	21

Fonte: Próprio autor.

Tabela 26 - Regressão linear e os respectivos coeficientes de determinação (r^2) calculados a partir dos resultados de recuperação das amostras fortificadas para o AMPA.

Experimento	Regressão linear (y = ax +b)	r^2	n
1	$y = 0{,}045\,x - 0{,}110$	0,9907	21
2	$y = 0{,}033\,x - 0{,}005$	0,9896	21
3	$y = 0{,}032\,x - 0{,}002$	0,9932	21

Fonte: Próprio autor.

As curvas representam as recuperações obtidas nos experimentos 1, 2 e 3 realizados nos três primeiros dias de validação, nas concentrações de 0 (n = 1), 25 (n = 6), 50 (n = 6), 75 (n = 6), 100 (n = 1) e de 250 mg kg^{-1} (n = 1) para o glifosato. Para o AMPA, as concentrações foram: 0 (n = 1), 15 (n = 6), 30 (n = 6), 45 (n = 6), 60 (n = 1) e de 150 mg kg^{-1} (n = 1).

Para o glifosato, as linearidades das curvas demonstram que a matriz influencia na recuperação nesta faixa de fortificação. No Apêndice A, a partir dos resultados de recuperação para o segundo dia de experimento, foi observado efeito da matriz na recuperação no primeiro nível de fortificação nas amostras.

Já, para o AMPA, as recuperações obtidas nos experimentos foram adequadas dentro da faixa de fortificação nas amostras. O Apêndice B, apresenta os resultados de recuperação para o terceiro dia de experimento.

5.3.3.4 Níveis críticos: limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ)

O limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ) também foram calculados para o glifosato e AMPA a partir dos experimentos 1, 2 e 3. As Tabelas 24 e 25 apresentam os resultados.

Tabela 27 - Limite de decisão (CCα) e do limite de determinação (CCβ) calculados para o glifosato.

	CCα (mg kg^{-1})	CCβ (mg kg^{-1})
Experimento 1	4,88	8,32
Experimento 2	6,07	10,34
Experimento 3	5,72	9,74
Média	**5,56**	**9,47**

Fonte: Próprio autor.

Tabela 28 - Limite de decisão (CCα) e do limite de determinação (CCβ) calculados para o AMPA.

	CCα (mg kg^{-1})	CCβ (mg kg^{-1})
Experimento 1	2,39	4,08
Experimento 2	2,53	4,32
Experimento 3	2,05	3,49
Média	**2,33**	**3,96**

Fonte: Próprio autor.

O limite de decisão (CCα) calculado para o glifosato e AMPA foram 5,56 e 2,33 mg kg^{-1}, respectivamente, e a capacidade de determinação (CCβ) calculado para o glifosato e AMPA foram 9,47 e 3,96 mg kg^{-1}, respectivamente.

5.3.3.5 Precisão

O *software* ResVal também calcula o desvio padrão (SD) e o coeficiente de variação (CV) obtidos nos estudos de recuperação dos analitos glifosato e AMPA nas amostras de solo fortificadas. Os resultados obtidos nos experimentos 1, 2, 3 e 4 para os níveis de validação 15, 30 e 45 mg kg^{-1}, para o AMPA, e 25, 50 e 75 mg kg^{-1} para o glifosato são apresentados nas Tabelas 26 e 27.

Tabela 29 – Desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) calculados para o glifosato nos níveis de validação de 25, 50 e 75 mg kg^{-1}.

	Exp. 1		Exp.2		Exp. 3		Exp. 4	
Nível de fortificação (mg kg^{-1})	**SD (%)**	**CV (%)**	**SD (%)**	**CV (%)**	**SD (%)**	**CV (%)**	**SD (%)**	**CV (%)**
25	7,4	5,1	5,0	3,7	5,5	2,9	-	-
50	4,2	3,7	11,1	10,7	5,1	4,4	7,2	7,4
75	8,7	8,2	11,2	11,0	5,0	4,4	-	-

Fonte: Próprio autor.

Tabela 30 – Desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) calculados para o AMPA nos níveis de validação de 15, 30 e 45 mg kg^{-1}.

	Exp. 1		Exp.2		Exp. 3		Exp. 4	
Nível de fortificação (mg kg^{-1})	**SD (%)**	**CV (%)**	**SD (%)**	**CV (%)**	**SD (%)**	**CV (%)**	**SD (%)**	**CV (%)**
25	5,3	5,8	12,9	10,6	8,6	8,7	-	-
50	6,6	6,9	11,5	10,0	5,2	5,3	2,7	2,7
75	5,0	5,7	7,8	7,5	8,3	8,9	-	-

Fonte: Próprio autor.

A partir dos dados apresentados nas Tabelas 26 e 27 foi possível observar que o método foi preciso para o glifosato e AMPA na faixa de concentração estudada, pois os valores de SD e CV foram inferiores a 15%.

5.3.3.6 Incerteza de medição

Para o cálculo da incerteza de medição do método, o *software* ResVal utiliza os resultados de variância de repetibilidade, entre experimentos e reprodutibilidade determinados para cada analito nos níveis de validação 15, 30 e 45 mg kg^{-1} para o AMPA; e 25, 50 e 75 mg kg^{-1} para o glifosato. Os resultados são apresentados nas Tabelas 28 e 29.

Tabela 31 - Variância (s^2) de repetibilidade, entre experimentos e de reprodutibilidade calculados para o glifosato nos níveis de validação de 25, 50 e 75 mg kg^{-1}.

Nível de fortificação (mg kg^{-1})	Repetibilidade (s_r^2)	Entre experimentos (s_L^2)	Reprodutibilidade (s_R^2)
25	1,7743	50,2304	52,0046
50	13,8074	8,6103	22,4177
75	42,2609	13,7829	56,0439

Fonte: Próprio autor.

Tabela 32 - Variância (s^2) de repetibilidade, entre experimentos e de reprodutibilidade calculados para o AMPA nos níveis de validação de 15, 30 e 45 mg kg^{-1}.

Nível de fortificação (mg kg^{-1})	Repetibilidade (s_r^2)	Entre experimentos (s_L^2)	Reprodutibilidade (s_R^2)
15	0,7599	5,8506	6,6105
30	6,0547	9,6911	15,7459
45	10,4904	12,1034	22,5938

Fonte: Próprio autor.

Os resultados apresentados nas tabelas acima indicam que a variação apresentada na reprodutibilidade para o glifosato e AMPA podem estar associadas

à matriz, pois os valores das variâncias da reprodutibilidade e entre experimentos foram os maiores para ambos os analitos.

A partir dos dados apresentados nas Tabelas 28 e 29, o *software* ResVal calcula estatisticamente a incerteza de medição do método para cada analito, em que os valores obtidos foram 0,095 mg kg^{-1} para o glifosato e 0,079 mg kg^{-1} para o AMPA. Esse valor é associado a dispersão dos valores, em que é averiguado pelos resultados apresentados de variância para ambos os analitos.

5.4 Análises das amostras

Sessenta amostras cedidas pela EMBRAPA Solo foram analisadas. Nas amostras não foram verificados variação do sinal analítico da fosfoetanolamina, utilizada como padrão interno.

A Tabela 30 apresenta os resultados das amostras em que foram detectados os analitos de interesse.

Tabela 33 - Resultados das doze amostras em que foi possível verificar a presença do glifosato e AMPA.

Identificação das amostras	Glifosato (mg kg^{-1})	AMPA (mg kg^{-1})
A_2	-	<LQ
A_11	<LQ	<LQ
A_15	-	<LQ
A_16	-	<LQ
A_26	-	<LQ
A_27	-	<LQ
A_32	-	<LD
A_35	-	<LQ
A_39	-	<LD
A_44	-	<LQ
A_55	-	<LQ
A_59	-	<LQ

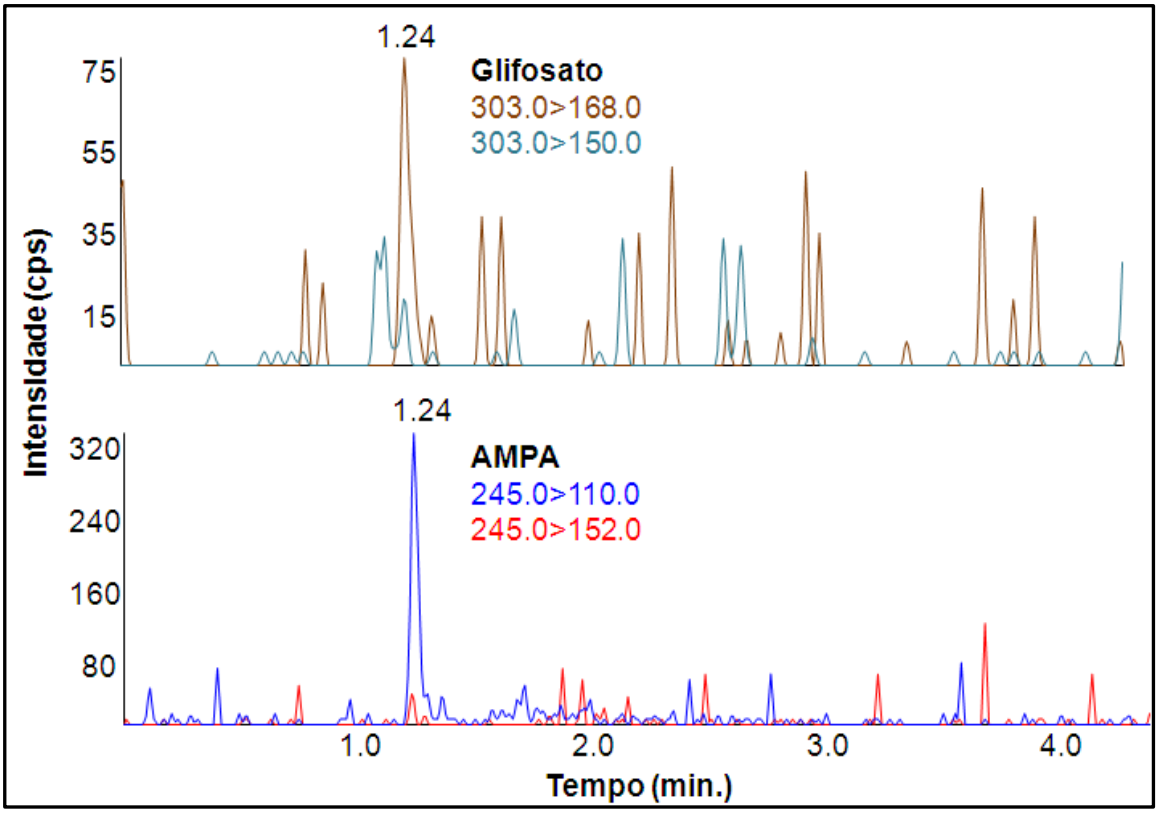
* LD (Limite de Detecção) e LQ (Limite de Quantificação).

Fonte: Próprio autor.

A partir das análises das sessenta amostras, em doze amostras de solo foi possível detectar a presença do analito AMPA, e somente em uma das amostras foi possível detectar a presença do analito glifosato.

A Figura 40 apresenta o cromatograma da amostra 11, em que foi identificado a presença de ambos os analitos, glifosato e AMPA.

Figura 40 - Cromatograma da amostra 11 em que foram detectados os analitos glifosato e AMPA.

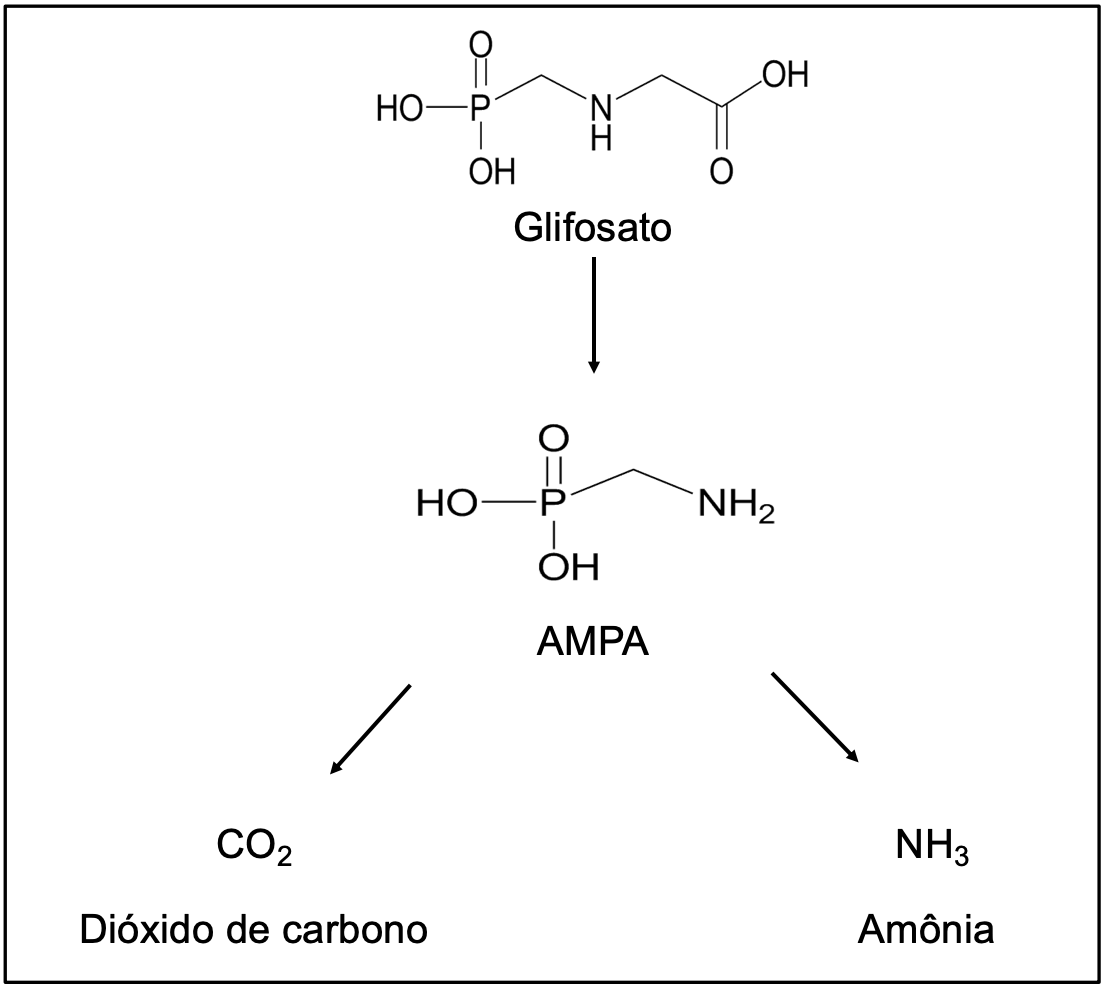


Fonte: Próprio autor.

A detecção de ambos os compostos comprova que na amostra 11, o solo é um adsorvedor do glifosato. A detecção do AMPA, indica a degradação do glifosato pelos microorganismos presentes que o utilizam como fonte de energia.

A não identificação nas outras amostras de solos analisadas, pode ser explicado pela degradação do AMPA em gás carbônico (CO_2) e amônia (NH_3) (Figura 41).

Figura 41 - Degradação do glifosato em solo, formando o principal componente de degradação, o ácido aminometilsfosfônico (AMPA) e, consequentemente, em dióxido de carbono (CO_2) e amônia (NH_3).



Fonte: próprio autor.

Em nenhuma das amostras detectadas, foi possível a quantificação dos compostos de estudo. Este fato se deve ao limite de quantificação do método.

Portanto, para a quantificação os compostos glifosato e AMPA em solo, em níveis mais baixos, é necessário a utilização de um sistema mais sensível.

6 CONCLUSÃO

As conclusões deste trabalho são:

No pH igual a 4,80 determinado no solo, o glifosato adsorve pela formação de complexos com metais ou pelo grupo fosfônico. O teor de matéria orgânica igual a 22%, indica a presença de potenciais interferentes presentes na matriz, sendo estes, extraídos em conjunto com os analitos de estudo. E adsorção do glifosato, seguido de sua degradação, em ácido aminometilfosfônico (AMPA), dióxido de carbono (CO_2) e amônia (NH_3);

Como estado da arte, neste trabalho, foi aplicada uma reação de derivatização utilizando o reagente fenilisotiocianato (PITC), reduzindo o tempo de reação quando comparado à reação com FMOC-Cl para a técnica HPLC-MS/MS;

Comparado com a literatura foi desenvolvido um método de extração mais simples, rápido e de menor custo, devido a reação de derivatização que ocorre em apenas 20 minutos;

Para confirmar a ocorrência da reação de derivatização foram obtidos espectros MS e MS/MS dos compostos em estudo glifosato, AMPA e fosfoetanolamina derivatizados, comprovando a ocorrência da reação;

Duas metodologias foram desenvolvidas para analisar glifosato e AMPA em solo via HPLC-MS/MS, método A (sem derivatização) e método B (com derivatização). A reprodução do método A (sem derivatização), desenvolvido por SCHREIBER *et al.*, 2016, no sistema HPLC-MS/MS para analisar glifosato e AMPA em solo não foi adequada, pois este método apresentou baixa sensibilidade, devido a coeluição de interferentes da matriz, reduzindo a intensidade do sinal analítico;

O método B (com derivatização) apresentou melhor sensibilidade, em relação ao método A, em testes envolvendo a matriz, se tornando o método mais adequado para análise de glifosato e AMPA em solo;

Após estudos de estabilidade, a reação de derivatização se mostrou estável por 24 horas;

Estudos de efeito de matriz indicaram interferências da matriz para os compostos glifosato e AMPA. No entanto, para a fosfoetanolamina não foi observado. Portanto, para a validação, as curvas analíticas para ambos os compostos foram realizadas com matriz;

A seletividade foi avaliada por meio dos testes F (Sendecor) e t (Student) em que os valores de $F_{calculado}$ e $t_{calculado}$ para ambos os compostos, glifosato e AMPA, foram superiores aos valores de $F_{tabelado}$ e $t_{tabelado}$ para cada ponto da curva analítica, indicando que a matriz interfere na precisão do método, ou seja, a quantificação deve ser realizada com curva analítica preparada na matriz solo.

Para a avaliação da linearidade foram determinados os coeficientes de determinação (r^2) para as curvas analíticas do glifosato e AMPA que foram superiores a 0,99. Também foi realizado o teste estatístico de análise de variância (ANOVA), a partir do qual foram determinados valores F de regressão para ambos os compostos de estudo, glifosato e AMPA. Os valores $F_{calculado}$ para os compostos, foram superiores aos valores de $F_{tabelado}$, confirmando a significância da equação de reta, e consequentemente, comprovando que a equação de reta é adequada para quantificação dos analitos.

A partir dos resultados de validação apresentados e discutidos foi possível a validação do método no solo no nível de concentração para o AMPA e o glifosato de 30 e 50 mg kg^{-1}, respectivamente, com incerteza de medição igual a 0,079 e 0,095 mg kg^{-1} para o glifosato e AMPA, respectivamente.

Ao analisar as sessenta amostras cedidas pela EMBRAPA Solo foi possível detectar a presença do AMPA e glifosato no solo, mas não os quantificar. Este fato pode ser associado ao limite de quantificação do método. Outra possibilidade é que o glifosato pode se decompor em AMPA, em presença de microorganismos, e, consequentemente, em gás carbônico (CO_2) e amônia (NH_3), impossibilitando sua detecção.

A partir das análises das amostras é possível concluir que o solo é um adsorvedor de glifosato. Este fato é confirmado pela detecção do AMPA e glifosato pelo método.

Para a quantificação do glifosato e AMPA em níveis mais baixos é necessário a utilização de um sistema HPLC-MS/MS mais sensível.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho de pesquisa é de suma importância em virtude dos escassos estudos envolvendo análise de glifosato e AMPA em solo.

Nos tópicos são apresentadas sugestões para trabalhos futuros:

- Estudar o efeito em amostras de solos, como: determinação pH, teor de matéria orgânica e granulometria.
- A aplicação de técnicas cromatográficas e detecção mais sensíveis objetivando alcançar limites de detecção inferiores aos obtidos neste estudo, além de otimizações nas etapas de tratamento de amostra.
- Sugere-se o monitoramento contínuo de uma área de estudo controlada, em que são avaliados o teor de glifosato e AMPA no solo e água e a determinação dos gases dióxido de carbono (CO_2) e amônia (NH_3). A fim de compreender o comportamento do glifosato em um sistema de plantio controlado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. (Associação Brasileira de Normas Técnicas); Solo – Determinação do teor de matéria orgânica por queima a 440 °C (NBR 13600), 1996.

AGEITEC. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01_34_27102 0069132.html>. Acesso em 11 jan. 2019.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? **Mass spectrometry review**. v. 25, p. 838-865, 2006.

AMARAL, P.O. ***Caracterização química dos neonicotinóides em águas superficiais via cromatografia liquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem (HPLC-MS/MS)***. 2017. 108 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisa Energéticas Nucleares, São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br> Acesso em: 12 jul. 2018.

ANNESLEY, T. M. Ion Supression in Mass Spectrometry. Clinical Chemistry, v. 49, n. 7, p. 1041-1044, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice monográfico: glifosato. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/G01%2B%2BGlifosato.pdf/ 6a549ab8-990c-4c6b-b421-699e8f4b9ab4>. Acesso em 17 jan. 2019.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada – **RDC n° 27**, de 17 de maio de 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0027_17_05_2012.pdf/c6edeb 56-200d-4482-8a19-99fa11c33fd3>. Acesso em 22 jan. 2019.

ARDREY, R.E. ***Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction***. Huddersfiled: John Wiley & Sons Ltda, 2003.

ARMAS, E.D. de; MONTEIRO, R.T.R.; ANTUNES, P.M.; SANTOS, M.A.P.F. dos; CAMARGO, P.B. de. Diagnóstico espaço – temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. ***Química Nova***, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007.

ATKINS, P.; JONES, L. ***Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente***. Porto Alegre: Bookman, 2006.

BABUJIA, L. C.; SILVA, A. P.; NAKATANI, A. S.; CANTÃO, M. E.; VASCONCELOS, A. T. R.; VISENTAINER, J. V.; HUNGRIA, M. Impact os long-temr cropping of glphosate-resistant transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] on soil microbiome. **Transgenic Res**. v. 25, p. 425-440, 2016.

BELTRÃO, D.S. *Efeitos da aplicação de glifosato na química de solos alagados*. 2010. 112 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Goiás, Goiás.

BENSLAMA, O.; BOULAHROUF, A. Impact of glyphosate application on the microbial activity of two Algerian soils. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 2, n. 12, p. 628-635, 2013.

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

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

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

BUSTILLOS, O.; SASSINE, A.; MARCH, R. A espectrometria de massas quadrupolar. São Paulo: Editora Scortecci, 2003.

CABRICES, O.G.; SCHREIBER, A. Automated derivatization, SPE cleanup and LC/MS/MS determination of glyphosate and other polar pesticides. **Application Note**. Set. 2013.

CATRINCK, T.C.P.G.; DIAS, A.; AGUIAR, M.C.S.; SILVÉRIO, F.O.; FIDÊNCIO, P.H.; PINHO, G.P. A simple and eficiente method for derivatization of gluphosate amd AMPA using 9-fluorenylmethyl chloroformate and spectrophotometric analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 1194-1199, 2014.

CAVARARO, R. ***Manual técnico de Pedologia***. 2. ed. Rio de Janeiro: IBGE. 2007.

CETESB. Ficha de Informação Toxicológica: Glifosato. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2018/07/Glifosato.pdf>. Acesso em 16 jan. 2019.

CETESB. Qualidade do solo: definição. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/solo/>. Acesso em 18 nov. 2018.

CETESB. Qualidade do solo: propriedades. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/solo/propriedades/>. Acesso em: 18 nov. 2018.

DEGENHARDT, D.; HUMPHRIES, D.; CESSNA, A.J.; MESSING, P.; BADIOU, P.H.; RAINA, R.; FARENHORST, A.; PENNOCK, D.J. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediment of two Canadian prairie wetlands. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**. v. 47, p. 631-639, 2012.

DEMOLINER, A. ***Otimização e validação de metodologia analítica empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para determinação de multiclasses de agrotóxicos e metabólitos em água de superfície e de abastecimento público***. 2008. 130 p. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **European Journal of Biochemistry**. v. 1, p. 80-91, 1967.

EECKHAUT, A. V.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of Matrix Effect. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2198-2207, 2009.

EMA. European Medicines Agencys. **Guideline on bioanalytical method validation**. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, 2011.

EMBRAPA SOLOS. Manual de Métodos de Análise de solo. Brasília: EMBRAPA, 3ª Ed. 2017.

ENKE, C. G. A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. **Anal. Chem.** v. 69, p. 4885-4893, 1997.

FARIA, V.H.F. de. ***Glifosato: desenvolvimento de metodologia para determinação em soja e milho e avaliação de parâmetros laboratoriais em trabalhadores expostos a agrotóxicos***. 2013. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br> Acesso em: 20 jan. 2019.

FENN, J. B. ***Electrospray wings for molecular elephants (Nobel Lecture)***. Angew. Chem. Int., v. 42, p. 3871-3894, 2003.

FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. ***Chromatographic – Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues***, Elsevier, v. XLIII, capitulo 4, 2005.

FISPQ. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Produto: ROUNDUP. 2008.

Food and Agriculture Organization. What is soil?. Disponível em: <http://www.fao.org/soils-portal/about/all-definitions/pt/>. Acesso em 07 jan. 2019.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. **Glifosato: alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. ACADCOM: São Paulo, 2005.
GHANEM, A.; BADOS, P.; KERHOAS, L.; DUBROCA, J.; EINHORN, J. Glyphosate and AMPA analysis in sewage sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOC derivatization on strong anion-exchange resin as solid support. **Anal Chem**. v. 79, p. 3794-3801, 2007.

GIESY, J.P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K.R. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. **Rev. Environ**., v. 167, p. 35-120, 2000.

GUSMÃO, K. A. G. ***Sequenciamento, síntese, atividade biológica, estudos biofísicos e estudos estruturais por RMN de três peptídeos isolados da secreção cutânea do anuro Leptodactylus labyrinthicus***. 2016. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências – Química) Instituti de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG/MG – Minas Gerais. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SFSA-AL4RU4>. Acesso em: 26 jul. 2019

HELLE, N.; CHMELKA, F. Automated derivation, cleanup and LC-MS-MS determination of glyphosate and AMPA. **The Column**, v. 9, p.2-8, 2013.

HIGARASHI, M.M. ***Processos oxidativos avançados aplicados à remediação de solos brasileiros contaminados com pesticidas***. 1999. 96 p. Tese (Doutorado em química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

HOFFMANN, E. de; STROOBANT, V. ***Mass Spectrometry: Principles and applications***. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

HU, J.-Y.; CHEN, C.-L.; LI, J.-Z. A simple method for the determination of glyphosate residues in soil by capillary gas chromatography with nitrogen phosphorus. **Journal of Analytical Chemistry**. v. 63, n. 4, p.371-375, 2008.

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

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGRE-008, 2017.

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Avaliação de dados de medição – Guia para expressão de incerteza de medição – GUM, Duque de Caxias: INMETRO/CICMA/SEPIN, 2008, p. 138.

International Agency for Research on Cancer (IARC). **Some organophosphate insecticides and herbicides – volume 112**. Lyon: IARC, 2017. Disponível em:

<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/mono112.pdf>. Acesso em: 11 mai. 2019.

IWAMURO, Y.; IIO-SHIMARU, R.; CHINAKA, S.; TAKAYAMA, N.; KODAMA, S.; HAYAKAWA, K. Analysis of phosphorus-containing amino acid-type herbicides by capillary electrophoresis/mass spectrometry using a chemically modified capillary having amino groups. Journal of Health Science, v. 56, p. 606-612, 2010.

JIE, X.; WEI, E. T.Z.; ZHE, S.; ZHAOQI, Z. ***Quantitative analysis of twenty amino acids by pre-column derivatization with PITC reagent and UHPLC-UV method.*** Kyoto: Shimadzu Cor., 2011. (Application Note AD-0044). Disponivel em: <http://www.sinc.com.br/wp-content/uploads/2015/05/Quantitative-Analysis-of-Twenty-Amino-Acids-by-Pre-Column-Derivatization-with-PITC-Reagent-and-UHPLCUV-Method.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2019.

JÚNIOR, V.L.; BEATRIZ, A. ***Fundamentos de Espectrometria e Aplicações – volume 7***. 1ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2018.

KACZYŃSKI, P.; ŁOZOWICKA, B. Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection. **De Gruyter Open**, v. 13, p. 1011-1019, 2015.

KOSKINEN, W.C.; MAREK, L.J.; HALL, K.E. Analysis of glyphosate and aminomethylphosponic acid in water, plant materials and soil. **Society of Chemical Industry**, v.72, p. 423-432, 2016.

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

LAITINEN, P.; RÄMÖ, S.; SIIMES, K. Glyphosate translocation from plants to soil – does this constitute a significant proportion of resideus in soil? **Plant Soil**. v. 300, p. 51-60, 2007.

LAITINEN, P.; SIIMES, K.; ERONEN, L.; RÄMÖ, S.; WELLING, L.; OINONEN, S.; MATTSOFF, L.; RUOHONEN-LEHTO, M. Fate of the herbicide glyphosate, glufosinate-ammonium, phenmedipham, ethofumesate and metamitron in two finnish arable soil. **Pest Management Science**. v. 62, p.473-491, 2006.

LANÇAS, F. ***Cromatografia Líquida Moderna HPLC/CLAE***. 1ª ed. Átomo: Campinas, 2009.

LEE, M.S. ***Mass Spectrometry Handbook***. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012.

LOBAS, A.A.; VERENCHIKOV, A.N.; LEVISTSKY, L.I.; GORSHKOV, M.V. Combination of Edman degradation of peptides with liquid chromatography/mass

spectrometry workflow for peptide identification in bottom-up proteomics. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 27, p. 391-400, 2013.

MAMY, L.; GABRIELLE, B.; BARRIUSO, E. Measurement and modelling of glyphosate fate compared with that of herbicides replaced as a result of the introduction of glyphosate-resistant oilseed rape. **Pest Management Science**.v. 64, p. 262-275, 2008.

MANAHAM, S.E. ***Química Ambiental***. Porto Alegre: Bookman, 2013.

MANAHAM, S.E. ***Fundamentals of environmental Chemistry***. Boca Raton: CRC Press LLC, 2001.

MARCH, R. E.; TODD, J.F.J. ***Practical aspects of rapped ion mass spectrometry***. Boca Raton, FL: CRC, 2010. Cap. 11.7, applications. p. 567-569.

MARDIANA-JANSAR, K.; ISMAIL, B.S. Residue determination levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with oil palm plantation in Tasik Chini, Pahang, Malaysia. **AIP Conf. Proc**. v. 1614, p. 795-802, 2014.

MARTINS, G. L. ***Determinação de resíduos de pesticidas em solo de lavoura de arroz irrigado empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS***. 2010. 149 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM/RS, Rio Grande do Sul. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/10477>. Acesso em: 03 jan. 2019.

MARTINS, 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. 121 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisa Energéticas Nucleares, São Paulo.

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

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

MELO, K. G. ***Determinação de glifosato em amostras de urina humana pela derivatização com cloroformato de 9-fluorenilmetilo por cromatografia líquida com detecção de fluorescência.*** 2018. 89 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de

Campinas – UNICAMP/SP – São Paulo. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/331789/1/Melo_KarolyneGramlichDe_M.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2019.

MEURER, E.J.; CASTILHOS, D.D.; TEDESCO, M.J. ***Fundamentos de química do solo***. 2. ed. Porto Alegre: Genesis, 2004.

Michaelis. Disponível em: <http://michaelis.uol.com.br/busca?id=jOq9o>. Acesso em 07 jan. 2019.
MONSANTO. **Bula Roundup Original**. 2008.

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

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

NIESSEN, W.M.A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix Effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography – mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, n. 25, p. 881-899, 2006.

NOGUEIRA, F. H. A. ***Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação dos antimaláricos artesunato e mefloquina***. 2013. 172 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

PATSIAS, J.; PAPADOPOULOU, A.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Automated trace level determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization. **Journal of Chromatography A**. v. 932, p. 83-90, 2001.

PAULA, J.L.; DUARTE, M.N. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: EMBRAPA. Ed. UFV, 2ª Ed. 1997.

PRATA, F. ***Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina***. 2002. 161 p. Tese (Doutorado em Agronomia: Solos e Nutrição de Plantas) Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 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. **Química Nova**. v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

REMBISZ, Z.; ZAKRZEWSKI, R.; SKOWRON, M.; CIESIELSKI, W. Image analysis of phenylisothiocyanate derivatized and charge-couple device-detected glyphosate and glufosinate in food samples separated by thin-layer

chromatography. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 320-331, 2016.

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

ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; CARDOSO, A.A. ***Introdução à química ambiental***. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SANTOS, H.G. dos; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H.C. dos. ***Sistema brasileiro de classificação de solos***. 5. ed. Brasília: EMBRAPA, 2018.

SCHREIBER, A.; WIN, J.; WINKLER, P. **Quantitation of underivatizeted glyphosate and other polar pesticides using LC-MS/MS and LC-HR-MS/MS in food and beer samples**. AB Sciex. 2016. (RUO-MKT-10-3998-A).
SCHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B.M.R.; WENNIG, R.; MILLET, M. Comparison of MTBSFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**. v. 77, p. 1473-1482, 2009.

SHI, Z.; LI, H.; LI, Z.; HU, J.; ZHANG, H. Pre-column derivatization RP-HPLC determination of amino acids in asparagi radix before and after heating process. **IERI Procedia**. v. 5, p. 351-356, 2013.

SHIMADZU CORP. ***High speed analysis of amino acids by pre-column derivatization***. Kyoto: Shimadzu Corp. 2007 (Application Data Sheet nº 8 – Prominence UFLC – LAAN- A-LC-E076A). Disponível em: <https://shimadzu.com.au/sites/default/files/HPLC_AminoAcid_pre_column_deriv2_datasheet_8a_en.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2019.

SILVA, W. da C. *Desempenho dos herbicidas indazilflam e glifosato na cultura do café conilon*. 2016. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias Agropecuárias) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Rio de Janeiro.

SKOOG, D.A. ***Fundamentos de Química Analítica***. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SOUZA, A. P. de; FERREIRA, F. A.; SILVA, A. A. da; CARDOSO, A. A.; RUIZ, H. A. Respiração microbiana do solo sob dose de glyphosate e de imazapyr. **Planta Daninha**. v. 17, n. 3, p. 387-398, 1999.

SOUZA, T.A.de; MATTA, H. de R. da; MONTAGNER, É.; ABREU, A.B.G. de Estudo de recuperação de glifosato e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. **Quim. Nova**. v. 29, n. 6, p. 1372-1376, 2006.

STEINBORN, A.; ALDER, L; MICHALSKI, B; ZOMER, P.; BENDIG, P.; MARTONEZ, S. A.; MOL, H. G. J.; CLASS, T. J.; PINHEIRO, N. C. Determination

of glyphosate levels in breast milk samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, p. 1414-1421, 2016.

SUN, L.; KONG, D.; GU, W.; GUO, X.; TAO, W.; SHAN, Z.; WANG, Y.; WANG, N. Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1052, p. 8-13, 2017.

TÉVEZ, H.R.; AFONSO, M.S. pH dependence of Glyphosate adsorption on soil horizons. **Boletin de la Sociedad Geológica Mexicana**. v. 67, n. 3, p. 509-516, 2015.

TODOROVIC, G.R.; MENTLER, A.; POPP, M.; HANN, S.; KÖLLENSPERGER, G.; RAMPAZZO, N.; BLUM, W.E.H. Determination of Glyphosate and AMPA in Three Representative Agricultural Austrian Soils with a HPLC-MS/MS Method. **Taylor & Francis Group: Soil and Sediment Contamination**, v. 22, p.332-350, 2013.

TONI, L.R.M.; SANTANA H. de; ZAIA, D.A.M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**. v. 29, n. 4, p. 829-833, 2006.

TSIPI, D. BOTOTSI, H. ECONOMOU, A. **Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and their Metabolities**, Hokoken: Wiley, 2015.

UNIÃO EUROPEIA. Comission Decision 2002/657/EC, **Official Journal of the European Communities**, L221, 8, 2002.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of chromatography A**. v. 921, p. 227, 2001.

Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012.

WALK, T.B.; SÜßMUTH, R.; KEMPTER, C.; GNAU, V.; JACK, R.W.; JUNG, G. Identification of unusual amino acids in peptides using automated sequential Edman degradation coupled to direct detection by electrospray-ionization mass spectreometry. **Biopolymers**. v. 49, p. 329-340, 1999.

ZHELEZOVA, A. D.; MANUCHAROVA, N. A.; GORLENKO, M. V. Structural and Functional Characteristics of the Prokaryotic Community of Soddy-Podzolic Soil Influenced by the Herbicide Glyphosate. **Moscow University Soil Science Bulletin**. v. 73, n. 2, p. 89-94, 2018.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Intensidade e recuperação para os pontos de confirmação do glifosato no experimento 2.

Nível de fortificação (mg kg^{-1})	Intensidade glifosato (cps)	Intensidade PI* (cps)	Concentração glifosato (mg kg^{-1})	Recuperação (%)
0	0	28600	19,18	-
25	7500	29900	34,15	137,0
25	6930	30100	32,92	132,0
25	6620	25000	34,98	140,0
25	6970	25900	35,24	141,0
25	6080	28100	32,09	128,0
25	6000	26000	32,95	132,0
50	18000	27300	58,53	117,0
50	14400	30100	47,73	95,50
50	15100	28900	50,36	100,7
50	19000	29800	57,23	114,0
50	12800	30700	44,06	88,00
50	16600	30000	52,20	104,0
75	29800	31000	76,54	102,0
75	29900	26300	87,02	116,0
75	25300	34000	63,59	85,00
75	27500	28300	77,17	103,0
75	28600	26800	82,86	110,0
75	26600	30800	70,72	94,00
100	33200	30200	84,78	85,00
250	96000	26800	22,9	93,20

* PI – padrão interno: fosfoetanolamina.

APÊNDICE B – Intensidade e recuperação para os pontos de confirmação do AMPA no experimento 3.

Nível de fortificação (mg kg^{-1})	Intensidade glifosato (cps)	Intensidade PI* (cps)	Concentração AMPA (mg kg^{-1})	Recuperação (%)
0	0	28200	2,330	-
15	14400	30500	15,34	102,3
15	14200	31300	14,83	98,90
15	12900	32000	13,44	89,60
15	16200	30600	16,92	112,8
15	13300	31000	14,15	94,40
15	13100	31800	13,68	91,20
30	27400	30300	27,25	90,80
30	29500	30600	28,90	96,30
30	31600	29700	31,65	105,5
30	30100	31000	29,09	97,00
30	27900	28100	29,69	99,00
30	28300	30600	27,82	92,70
45	43300	28800	43,76	97,20
45	39300	29300	39,29	87,30
45	45200	27500	47,62	105,8
45	41900	27600	44,16	98,10
45	35500	27700	37,64	83,70
45	42100	30900	39,87	88,60
60	55500	28800	55,43	92,40
150	112000	23600	133,1	88,70

* PI – padrão interno: fosfoetanolamina.

APÊNDICE C – Resumo do artigo apresentado no congresso INAC 2017.

Chemical characterization glyphosate by gas chromatography with electron capture detector (GC/ECD) generated by nuclide ^{63}Ni

Glyphosate is the most used herbicide in the world for weed control, because of its non-selective and broad-spectrum characteristics. This herbicide is considerate toxicologically and environmentally safe, but the high use of glyphosate in plantations may affect other culture and contaminate surface and groundwater by external transport. The aim of this work was develop a methodology to identify this herbicide in water using Gas Chromatography with Electron Capture Detector (GC/ECD). This technique is less expensive comparing to other techniques, like Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) or Gas Chromatograph with Mass Spectrometry (GC/MS). Due the polar and amphoteric characteristics of the molecule, the derivatization is required to change these characteristics *using* trifluoroacetic anhydride (TFAA) and 2,2,2-*trifluoroethanol (TFE) reactants* before the GC/ECD analysis. *The GC/ECD* is widely used in environmental analysis, specially halogenates pesticides and herbicides. The electron capture detector is based on the decay of the radioactive isotope ^{63}Ni, producing beta particles. These particles collide with the carrier gas (N_2), producing electrons, that form a current. When the compounds are eluted from the gas chromatography, the halogenated molecules capture these electrons, reducing the current, generating a chromatographic peak proportional to the concentration of the molecule*. Therefore, the methodology developed is appropriate to identify the herbicide glyphosate with resolution and sensibility.*

APÊNDICE D – Resumo do artigo apresentado no congresso BrMASS 2018.

Analytical methodology for glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in soil by HPLC-MS/MS

The glyphosate herbicide was introduced on the world market in the 1970s in conjunction with transgenic soybeans (*glycine max L.*), and this herbicide was considered safe for the environment. However, an increase in the application of glyphosate in the fields of soybean and other crops is identified every year, which increases the concentration of this compound in the plants and in the environment that exceeds acceptable levels recommended by the regulatory agencies. Although, there is no legislation reporting the Maximum Residue Limit (MRL) of glyphosate in soil, and few finds regards the presence of this compound entrance in the environment via soil. This herbicide undergoes rapid degradation, forming its main metabolite, aminomethylphosphonic acid (AMPA). In this work it is proposed to develop an analytical method that presents sensitivity, selectivity and accuracy to quantify the glyphosate and AMPA in the soil by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS / MS). A partnership was made with Embrapa Soja located in the municipality of Warta, Paraná, to collect the samples. Sample preparation comprises the extraction, clean-up and derivatization step. After the preparation of the sample, the matrix effect test was performed. The recovery obtained for glyphosate and AMPA were 93 and 64%, respectively.