

**Desenvolvimento e validação de um método HPLC-FLD
para a quantificação do glifosato e AMPA em águas de
consumo**

Josete Karina Guerra

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química

Orientadores: Prof^a. Dr.^a. Margarida Maria Portela Correia dos Santos Romão

Eng^a Georgina Maria Sarmento Felisberto

Júri

Presidente: Prof^a. Maria Teresa Nogueira Leal da Silva Duarte

Orientador: Prof^a. Dr.^a. Margarida Maria Portela Correia dos Santos Romão

Vogal: Eng^a Maria Paula Machado de Barros Viana

Janeiro 2021

Agradecimentos

Quero agradecer, em primeiro lugar, à minha família, começando pelos meus pais que são sem dúvida o meu pilar, pela minha formação pessoal e profissional, ao transmitirem-me sempre força, coragem e motivação, ajudando-me a manter o foco mesmo em momentos pouco felizes deste processo. Aos meus três irmãos quero agradecer por estarem ao meu lado; a Miriã Guerra, a Yanessa Guerra e ao Márcio Guerra. O apoio de quem nos ama é fundamental para atingir os nossos objetivos, quer sejam pessoais ou profissionais.

Quero em especial agradecer a Professora Margarida Romão pela oportunidade, disponibilidade e por toda orientação. Agradeço a Eng^a. Georgina Sarmiento, por me ter recebido de braços abertos no LAIST (Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico), por transmitir-me a sua força e o seu conhecimento e por me ter mostrado sempre disponibilidade em esclarecer as minhas dúvidas.

A toda equipa do laboratório, por todo apoio e paciência, mas principalmente pelo carinho e amizade que sempre me trataram e por me terem recebido tão bem.

Agradeço também, a todas as pessoas que entraram na minha vida inesperadamente, que cruzaram o meu caminho ao longo destes anos e cultivaram em mim a capacidade de aprender muito mais.

Muito Obrigado!

Resumo

O glifosato é um herbicida organofosforado pós- emergência que elimina e controla a propagação das plantas infestantes. É considerado um herbicida não tóxico e não carcinogénico, apesar de vários estudos científicos garantirem o contrário. Devido a esta situação, a comunidade científica europeia pediu uma reavaliação do glifosato nos quais os resultados serão conhecidos no final do ano 2022.

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento, otimização e validação de uma metodologia analítica capaz de quantificar o glifosato e o AMPA em águas de consumo.

A metodologia analítica utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência – HPLC-FLD, recorrendo à derivatização com FMOC-Cl que confere um cromóforo à molécula.

Os métodos validados permitiram uma quantificação do glifosato e do seu metabolito a partir de 1 µg/L em amostra de água de consumo, tendo obtido recuperações entre 86 % a 104% para a gama de linearidade estudado de 1 – 20 µg/L.

Palavras-chaves: Águas de consumo, Glifosato, AMPA, HPLC – FLD, FMOC-Cl, Derivatização

Abstract

Glyphosate is a post-emergence organophosphate herbicide that eliminates and controls the spread of infesting plants. It is considered a non-toxic and non-carcinogenic herbicide, although several scientific studies assure the opposite. Due to this situation, the European scientific community has asked for a re-evaluation of glyphosate in which the results will be known by the end of the year 2022.

The main objective of this work was the development, optimization and validation of an analytical methodology capable of quantifying glyphosate and AMPA in drinking water.

The analytical methodology used was High-performance liquid chromatography with fluorescence detection - HPLC-FLD, using the derivatization with FMOC-Cl that gives a chromophore to the molecule.

The validated methods allowed a quantification of glyphosate and its metabolite from 1 µg/L in a sample of drinking water, having obtained recoveries between 86 % and 104% for the studied linearity range of 1 - 20 µg/L.

Keywords: Drinking water, Glyphosate, AMPA, HPLC - FLD, FMOC-Cl, Derivatization

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	iv
Abstract	vi
Índice	viii
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
1. Âmbito de trabalho	1
1.1. Enquadramento.....	1
1.2. Objetivo	1
2. Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico (LAIST)	3
3. Pesticidas.....	5
3.1. Herbicidas.....	5
3.1.1. Glifosato	5
3.1.1.1. Propriedades Físico-químicas.....	6
3.1.1.2. Histórico e uso mundial.....	8
3.1.1.3. Toxicologia.....	9
3.1.1.4. Impacte Ambiental	10
3.1.1.5. Legislação	10
4. Metodologia Analítica	13
4.1. Estado da Arte	13
4.1.1. Métodos cromatográficos	13
4.2. Cromatografia Líquida	15
4.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	15
• Instrumentos de HPLC.....	16
• Colunas Cromatográficas.....	17
4.3. Detenção por Fluorescência (FLD).....	18
4.4. Derivatização	18
5. Validação	19
6. Parte Experimental.....	21
6.1. Equipamento	21
6.2. Material	21
6.3. Reagentes	21

6.4. Interferências e contaminações	22
6.5. Descontaminação de Material	22
6.6. Segurança	22
6.7. Soluções.....	22
6.7.1. Tampões	22
6.7.2. Derivatizante (FMOC-Cl).....	22
6.7.3. Padrões.....	23
6.7.4. Fase Móvel	23
6.8. Procedimento experimental.....	24
6.8.1. Condições de derivatização das amostras.....	24
6.8.2. Condições operatórias.....	24
7. Apresentação e Discussão de Resultados	26
7.1. Metodologias Testadas	26
7.1.1. Metodologia A.....	28
7.1.2. Metodologia B.....	31
7.1.3. Validação do Método	36
7.1.3.1. Gama de Trabalho	36
7.1.3.2. Calibração Analítica	36
7.1.3.3. Limiares Analíticos.....	38
7.1.3.4. Exatidão.....	38
7.2. Comparação entre as metodologias A e B	38
8. Conclusões e Perspetivas Futuras	40
Referências.....	42
Anexo A	47
Critérios de Validação.....	47
Precisão	50
Exatidão	51
Sensibilidade.....	52
Seletividade e Especificidade	52
Anexo B – Testes de Validação	54
Anexo C – Metodologias Testadas	57

Índice de figuras

Figura 1- Aspeto exterior do LAIST [2].....	3
Figura 2- Estrutura molecular do Glifosato.....	5
Figura 3- Estrutura molecular do AMPA.....	5
Figura 4- Via metabólica do xiquimato [7].....	6
Figura 5- Representação esquemática da degradação do Glifosato [10].....	7
Figura 6- Constantes de dissociação do glifosato (pKa1 0,8 Fosfónico, pKa2 2,3 Ácido carboxílico, pKa3 5,57 Fosfónico, pKa4 10,3 Amina [11]	7
Figura 7- Constantes de dissociação do AMPA (pKa1 = 1,8; pKa2 = 5,4; pKa3 = 10,0 [52];.....	8
Figura 8- Preço médio nas aplicações do glifosato para o milho e a soja nos EUA em Kg (1992-2014) [14].....	9
Figura 9- HPLC Agilent, usado no presente trabalho	16
Figura 10- Esquema dos componentes de um HPLC.[43] Adaptado	17
Figura 11- Esquema representativo da preparação de uma reta de calibração.....	23
Figura 12- Esquema do procedimento experimental de derivatização.	24
Figura 13- Reação de derivatização do glifosato e do AMPA usando o FMOC-Cl. [51]	26
Figura 14- Cromatogramas referentes à metodologia A testado a partir padrões de concentração de 200 µg/L, em que A) Branco; B) Glifosato com tempo de retenção igual a 6.185 min; C) AMPA com tempo de retenção igual a 2.751 min;	28
Figura 15- Curvas de calibração do glifosato e AMPA em concentrações de 1 a 20 µg/L nas condições experimentais da figura 12. 1) $y = (0,9 \pm 0,1) x - (0 \pm 1)$ – Glifosato; 2) $y = (1,7 \pm 0,1) x - (0,3 \pm 0,7)$ – AMPA;.....	29
Figura 16- Curvas de calibração do glifosato e AMPA em concentrações de 0,05 a 1 µg/L nas condições experimentais da figura 12; 1) $y = (4 \pm 1) x 10 - (3 \pm 7)$ – Glifosato; 2) $y = (7 \pm 2) x 10 - (0 \pm 1) x 10$ – AMPA;	29
Figura 17- Tubos de ensaio de polipropileno (PP).....	31
Figura 18- Cromatogramas referente à metodologia B testado a partir padrões de concentração de 200 µg/L, em que A) Branco; B) Glifosato com tempo de retenção igual a 2.600 min; C) AMPA com tempo de retenção igual a 7.007 min;	32
Figura 19- Curvas de calibração do glifosato e AMPA em concentrações de 1 a 15 ppb e 40 µg/L nas condições experimentais da figura 12; 1) $y = (2,8 \pm 0,2) x - (2 \pm 3)$ – Glifosato; 2) $y = (19 \pm 2) x + (3 \pm 4)$ – AMPA;.....	32
Figura 20- Curvas de calibração do glifosato e AMPA em concentrações de 1, 10, 20 µg/L numa amostra de água subterrânea I nas condições experimentais da figura 12; 1) $y = (2,6 \pm 0,4) x + (1 \pm 5)$ - Glifosato; 2) $y = (18,8 \pm 0,2) x + (1 \pm 4)$ - AMPA	33
Figura 21- Curvas de calibração do glifosato e AMPA em concentrações de 1, 10, 20 µg/L numa amostra de água da torneira nas condições experimentais da figura 12; 1) $y = (16,1 \pm 0,3) x - (1 \pm 1)$ - Glifosato; 2) $y = (3,8 \pm 0,1) x 10^2 x - (2 \pm 3) x 10$ - AMPA	34
Figura 22- Representação gráfica da análise de resíduos do glifosato e do AMPA efetuada a partir da gama de trabalho da Metodologia A.	54

Figura 23- Representação gráfica da análise de resíduos do glifosato e do AMPA efetuada a partir da gama de trabalho da Metodologia B.	54
Figura 24- Representação gráfica da função obtida por ajuste linear e polinomial do glifosato efetuadas a partir da Metodologia A.	54
Figura 25- Representação gráfica da função obtida por ajuste linear e polinomial do AMPA efetuadas a partir da Metodologia A.	55
Figura 26- Representação gráfica da função obtida por ajuste linear e polinomial do Glifosato efetuadas a partir da Metodologia B.	55
Figura 27- Representação gráfica da função obtida por ajuste linear e polinomial do AMPA efetuadas a partir da Metodologia B.	55
Figura 28- Representação gráfica do teste de Rikilt em relação ao glifosato e AMPA efetuadas a partir da Metodologia A.	56
Figura 29- Representação gráfica do teste de Rikilt em relação ao glifosato e AMPA efetuadas a partir da Metodologia B.	56
Figura 30- Espectro de emissão do produto de derivatização do glifosato variando o comprimento de onda de excitação na gama 310 a 318 nm.	57
Figura 31- Espectro de emissão do produto de derivatização do AMPA variando o comprimento de onda de excitação na gama 310 a 318 nm.	57
Figura 32- Curvas de calibração do glifosato e AMPA com padrões de concentração de 1 a 10 µg/L, usadas para o cálculo dos ensaios de recuperação para a água da torneira na metodologia A.	58
Figura 33- Curvas de calibração do glifosato e AMPA com padrões de concentração de 1 a 10 µg/L, usadas para o cálculo dos ensaios de recuperação para as amostras água subterrânea II, água da torneira II e água superficial na metodologia B.	58

Índice de tabelas

Tabela 1- Propriedades físico-químicas do Glifosato e AMPA [9]	6
Tabela 2- Valores paramétricos para pesticidas individuais e especificações técnicas para a análise e monitorização química do estado da água. [32,33]	11
Tabela 3- Métodos para análise do glifosato e AMPA.[34] Adaptado	13
Tabela 4- Designação, tamanho da coluna, gama de pH, tamanho da partícula e limite de temperatura (°C) das colunas usadas no trabalho.	17
Tabela 5- Condições operatórias do HPLC para análise do Glifosato e AMPA na coluna NH ₂ APS-2 HYPERSIL	25
Tabela 6- Condições operatórias do HPLC para análise do Glifosato e AMPA na coluna C8 Zorbax RX.	25
Tabela 7- Áreas dos cromatogramas relativas ao glifosato e AMPA para os ensaios replicados em função do volume de FMOC-Cl e diferentes tempos de reação, usando padrões de concentração 1 µg/L e de acordo com a metodologia A.....	30
Tabela 8- Áreas dos cromatogramas relativas ao glifosato e AMPA para os ensaios de recuperação realizados em água da torneira segundo a metodologia A, com 50 µl de FMOC-Cl e 60 min de tempo de reação.....	31
Tabela 9- Condutividades (µs/cm) e pH dos diferentes tipos de água usados neste teste	33
Tabela 10- Resultados obtidos para os ensaios de recuperação do glifosato e AMPA na amostra água subterrânea I realizados segundo a metodologia B.....	34
Tabela 11- Resultados obtidos para os ensaios de recuperação do glifosato e AMPA na amostra água da torneira realizados segundo a metodologia B	34
Tabela 12- Resultados obtidos para os ensaios de recuperação do glifosato e AMPA na amostra de água da subterrânea II realizados segundo a metodologia B.....	35
Tabela 13- Resultados obtidos para os ensaios de recuperação do glifosato e AMPA na amostra água da torneira realizados segundo a metodologia B	35
Tabela 14- Resultados obtidos para os ensaios de recuperação do glifosato e AMPA na amostra de água superficial realizados segundo a metodologia B	35
Tabela 15- Coeficiente de correlação (R^2), declive (a) e ordenada na origem (b) obtida para cada curva de calibração tendo em conta a gama de trabalho adotada.	37
Tabela 16- Resumo dos resultados obtidos para os testes de linearidade para as duas metodologias de trabalho.....	37
Tabela 17- Valores obtidos para o LQ e LD com base nas CC's	38
Tabela 18- Resultados obtidos para o estudo de exatidão nas matrizes água de consumo para a metodologia B.....	38
Tabela 19- Comparação de resultados obtidos pelas metodologias A e B	39
Tabela 20- Áreas dos cromatogramas relativas ao glifosato e AMPA para os testes em função do volume de FMOC-Cl, para concentrações 0,05 a 2 µg/L.....	58

Lista de abreviaturas

ACN: Acetonitrilo

AMPA: Ácido aminometilfónico

CC: Curva de calibração

DCM: Diclorometano

DS²: Diferença de variância

EFSA: European Food Safety Authority

EPA: Agência de Proteção Ambiental

FLD: Detecção por Fluorescência

FMOC-Cl: 9-Fluorenilmetilcloroformato

GC/MS: Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa

GMP: Good Manufacturing Practices

HPLC: Cromatografia Líquida de alta Eficiência

HPLC-MS/MS: Cromatografia Líquida de alta Eficiência com detenção por Espectrometria de massa tandem

IARC: Agência Internacional de Pesquisa em Cancro

INT: Intermédia

IPAC: Instituto Português de Acreditação

ISO: International Standard Organization

IST: Instituto Superior Técnico

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

LAIST: Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico

LC-MS: Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa

LD: Limite de Detenção

LQ: Limite de Qualificação

MEOH: Metanol

PMT: Tubo Fotomultiplicador

PMRA: Pest Management Regulatory Agency

PP: Polipropileno

S: Desvio Padrão

SPE: Extração em fase sólida

R²: Coeficiente de Correlação

Rec: Recuperação

UPLC: Cromatografia Líquida de ultra Eficiência

UV-Vis: Radiação Ultra - Violeta /Visível

VT: Valor Teste

%RSD: Desvio Padrão Relativo

1. Âmbito de trabalho

1.1. Enquadramento

O glifosato é o herbicida mais ativo em mais de 750 herbicidas diferentes, com aplicação ao nível da agricultura, silvicultura, usos urbanos e domésticos. Representam as formulações comerciais de pesticidas mais vendidas em todo mundo, e os produtos que contém glifosato têm como nomes comerciais, *Roudup*, *Spasor* e *Pondmaster*. [1]

Por sua vez, é classificado como um pesticida organofosforado, mais especificamente, um fosfonato. É um herbicida sistémico não seletivo, muito utilizado para combater as plantas infestantes e o seu uso aumentou exponencialmente a partir de 1996, com a introdução das culturas chamadas *Roudup Ready*, geneticamente modificadas de maneira a resistirem a este herbicida. O glifosato pode ser aplicado diretamente sobre as plantas para eliminar as ervas daninhas que competem com as culturas, e tem vindo a ser aplicado em zonas urbanas para erradicar as ervas de berma de estrada, passeios entre outras. [1]

Atualmente, o elevado uso do herbicida glifosato, tem estado envolto de polémicas, sobretudo devido ao debate científico não consensual sobre os seus efeitos na saúde humana e no ambiente. Face à recente decisão de o seu uso não ser proibido durante os próximos anos, continua atual necessidade da sua monitorização/determinação, em particular na matriz água, visto que o glifosato é altamente solúvel em água e através de lixiviação dos solos pode conduzir à contaminação das massas de água.

É no âmbito desta problemática que surgiu o presente trabalho, no qual foram realizados ensaios nas matrizes água, de forma a otimizar e validar uma metodologia analítica capaz de quantificar o glifosato em águas de consumo. Quando se analisa o glifosato, principalmente em matriz de água, é importante analisar também o seu produto de degradação, pois existem determinadas situações em que não é possível observar-se o glifosato, mas somente o ácido (aminometil) fosfónico, AMPA.

1.2. Objetivo

O objetivo desta dissertação consistiu em desenvolver um método analítico para a determinação do glifosato e o seu produto de degradação, ácido (aminometil) fosfónico AMPA na matriz água.

Para tal, otimizou-se uma metodologia analítica suficientemente sensível (a cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por fluorescência – HPLC-FLD), de forma a garantir a deteção e medição fiáveis dos valores de concentração do glifosato e AMPA.

Procedeu-se, assim, à implementação e validação deste método no Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico (LAIST).

2. Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico (LAIST)

No final do século XIX foi criado o Laboratório de Análises, ainda no Instituto Industrial e Comercial de Lisboa, pelos Professores Charles LePierre e Herculano de Carvalho.

O LAIST (Figura 1), está dividido em 5 núcleos analíticos definidos de acordo com as suas principais áreas de atividade (Análises Gerais aplicadas em Água; Análise de Compostos Orgânicos; Metais e Preparação de Amostras; Microbiologia (Clássica e Novas Tecnologias); Gestão de Colheitas, Ambiente, Saúde e Segurança) e uma Área Administrativa, sob orientação de técnicos qualificados. O LAIST depende diretamente do Presidente e Vice-Presidente para a Gestão Administrativa e Financeira do IST, sendo dirigido por um Diretor Adjunto coadjuvado pelo Coordenador Técnico do laboratório [2].



Este Laboratório encontra-se acreditado pela norma NP EN ISO/IEC 17025, de acordo com Instituto Português de Qualidade (IPAC). Devido a aposta na qualidade e rigor das análises efetuadas, permite-lhe manter-se como um dos laboratórios de referência do país [2].

Um dos grandes objetivos do LAIST, é contribuir para o melhoramento da qualidade das águas através da monitorização, quer a nível dos parâmetros legislativos obrigatórios, quer através das análises de outros não obrigatórios, mas que têm uma elevada relevância para a saúde pública. O mesmo, possui uma forte componente na análise de águas, mas estende-se a outras matrizes, tais como matrizes sólidas (resíduos, sedimentos), alimentos (moluscos, frutas, água engarrafada, alimentos embalados), detergentes, gasóleo entre outras [2].

O presente trabalho de mestrado foi desenvolvido e realizado no núcleo de Análises de Compostos Orgânicos.



Figura 1- Aspeto exterior do LAIST [2]

3. Pesticidas

Os pesticidas podem ser definidos como substâncias ou misturas, de origem química ou biológica, destinadas a matar ou controlar quaisquer espécies indesejadas designadas "pragas", incluindo ervas daninhas, insetos, roedores, fungos, bactérias ou outros organismos. Os pesticidas são potencialmente tóxicos para os organismos não-alvo, incluindo os seres humanos, e precisam ser usados com segurança e descartados corretamente [3]. Devido à grande diversidade de produtos os pesticidas podem ser classificados sob diversos aspectos, tais como inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, acaricidas, hematicidas, bactericidas, vermífugos. Deste modo, o trabalho vai se focar apenas na categoria dos herbicidas.

3.1. Herbicidas

Os herbicidas são um grupo de pesticidas especificamente criados para eliminar ervas daninhas em zonas onde o crescimento destas é indesejado. Na agricultura, a presença de plantas infetantes permite que haja uma grande variedade de herbicidas específicos. O herbicida mais utilizado a nível mundial na agricultura é o glifosato devido as suas características e eficiência.

3.1.1. Glifosato

O glifosato, quimicamente conhecido por ácido 2-(fosfometilamino acético) (Figura 2) é o herbicida mais utilizado mundialmente [4], como herbicida organofosforado pós-emergência, isto é, aplicado sobre as folhas da planta infestante para sua eliminação e controlo da propagação. Juntamente com o seu produto de degradação, ácido (aminometil) fosfónico (AMPA) (Figura 3), são as substâncias mais detetadas nas águas naturais em muitos países desenvolvidos [5]. Na maioria dos casos, é importante analisar-se também AMPA, pois existem situações em que não é possível observar-se o glifosato, mas somente o seu produto de degradação.

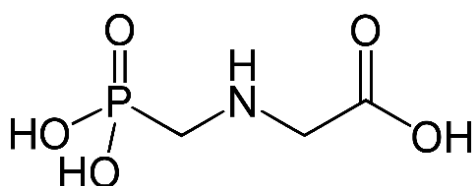


Figura 2- Estrutura molecular do Glifosato

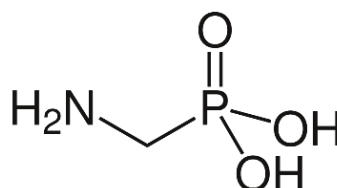


Figura 3- Estrutura molecular do AMPA

Em termos de modo de ação, o glifosato tem a capacidade de bloquear a atividade da enzima 5-enolpiruvilquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), relacionada à biossíntese de aminoácidos essenciais (aminoácidos aromáticos, como a fenilamina, triptofano e tirosina). Na ausência destes aminoácidos o crescimento da planta é inibido até que ela morra [4].

De forma a haver um controle de colheitas, foram desenvolvidas plantas resistentes a este pesticida geneticamente modificadas com a adição do gene CP4-EPSPS, permitindo que a via metabólica do xiquimato (Figura 4) funcione e que as plantas sobrevivam à aplicação do glifosato [6].

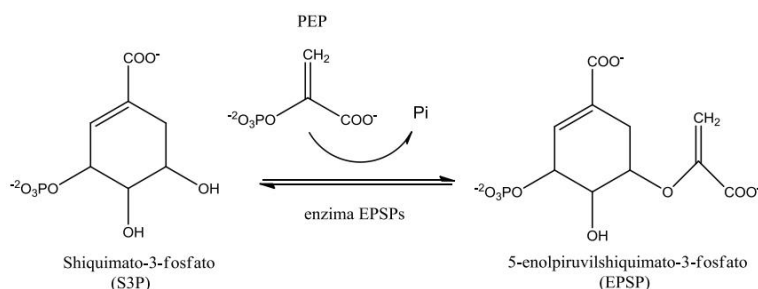


Figura 4- Via metabólica do xiquimato [7]

3.1.1.1. Propriedades Físico-químicas

O glifosato é um aminoácido sintético análogo da glicina. É estável ao ar e não se degrada fotoquimicamente. A sua degradação, feita por algumas plantas conduz à sarcosina e ao AMPA, sendo este último o produto principal da degradação (Figura 5). O AMPA, é uma fitoxina, e a sua ocorrência com o glifosato pode modificar a fisiologia da planta, de modo a afetar a fotossíntese, bem como induzir stress oxidativo [8]. As propriedades destes compostos encontram-se na tabela 1.

Tabela 1- Propriedades físico-químicas do Glifosato e AMPA [9]

Propriedades	Características do Glifosato	Características do AMPA
Aparência	Pó branco	Pó branco
Nome IUPAC	ácido 2-(fosfometilamino) acético	ácido (aminometil) fosfónico
Fórmula molecular	C ₃ H ₈ NO ₅ P	CH ₆ NO ₃ P
Massa molecular	169.07 g/mol	111,04 g/mol
Ponto de fusão	189.5 °C	189.5 °C
Solubilidade em água	10.5 g/L	-
Densidade	1.7 g/cm ³	-

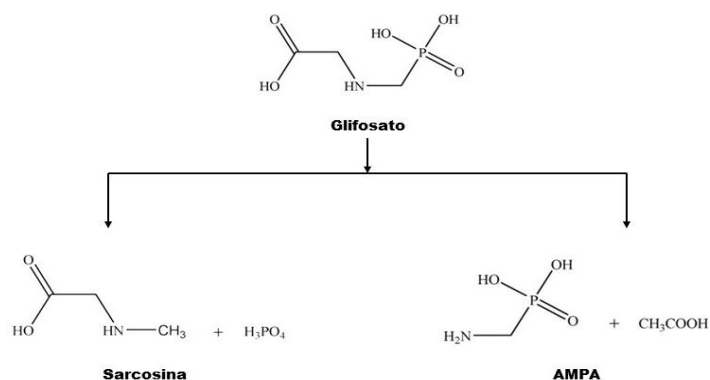


Figura 5- Representação esquemática da degradação do Glifosato [10]

O glifosato apresenta um comportamento zwitteriônica, dependendo do pH em função dos vários valores de pKa dos grupos com prótons ácidos da molécula, diversas formas protonadas podem existir em solução como se pode observar na figura 6.

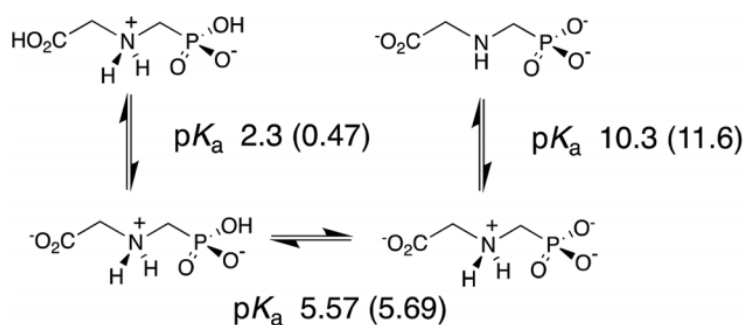


Figura 6- Constantes de dissociação do glifosato (pKa1 0,8 Fosfônico, pKa2 2,3 Ácido carboxílico, pKa3 5,57 Fosfônico, pKa4 10,3 Amina [11])

Dependendo do pH do meio o AMPA ocorre sob diversas formas protonadas que se podem observar na figura 7.

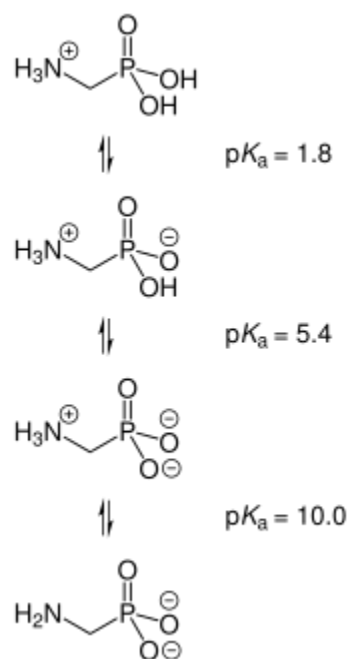


Figura 7- Constantes de dissociação do AMPA ($pK_{a1} = 1,8$; $pK_{a2} = 5,4$; $pK_{a3} = 10,0$ [52];

3.1.1.2. Histórico e uso mundial

Em 1950 o glifosato foi inventado pelo químico suíço Dr. Henri Martin. Na altura, Martin trabalhava na companhia farmacêutica Cilag e o mesmo ainda não tinha sido aplicado na indústria, nem mencionado na literatura. Posteriormente em 1959, a companhia farmacêutica Cilag vendeu as amostras de Martin incluindo a pesquisa do glifosato para Aldrich Chemical (Jonhson e Jonhson).

Através de um programa de pesquisa realizado pela Monsanto, de forma a encontrar um herbicida sintético, descobriu-se a atividade herbicida do glifosato, uma vez que, os responsáveis por esta descoberta foram Dr. Phil Hamm e o Dr. Fraz nos Estados Unidos da América (EUA). No seguimento desta descoberta, a empresa Monsanto em 1970, patenteou o herbicida glifosato por “Round up”, que começou a ser comercializado nos, tendo a sua patente expirada em 2000.

Na década de 70 o glifosato começou a ser usada com fins agrícolas nos EUA, com o seu direcionado para vinhedos, florestas e seringueiras que eram mercados novos. Em meados dos anos 80 o glifosato já havia sido utilizado na presença de plantas geneticamente modificadas com grande sucesso, e em 1996 a Monsanto lançou a soja tolerante ao glifosato (soja *Roundup Ready*), dando início ao controle de plantas daninhas por este herbicida.

Uma vez que o glifosato elimina todas as plantas sem haver seletividade e a sua atividade é lenta, pois demora cerca de 15 dias até obterem resultados, não foi simples demonstrar a importância desta molécula naquela época. No entanto certos fatores desta nova molécula como, a forte adsorção ao solo e a elevada eficácia, não deixaram este herbicida passar por despercebido o que permitiu o aumento do volume no mercado à nível mundial, de modo que em 2014 atingisse as 826 mil toneladas [12], e em 2019 as colheitas resistentes ao glifosato ultrapassaram as 100 espécies [13]. A título de

exemplo apresenta-se na figura 8 os consumos de glifosato usados na produção de milho e soja e o preço médio por kg nos EUA no período 1992-2014.



Figura 8- Preço médio nas aplicações do glifosato para o milho e a soja nos EUA em Kg (1992-2014) [14]

Em Portugal, o glifosato é um dos pesticidas mais utilizado e cabe a Direção Geral de Alimentação e Veterinária controlar os pesticidas e os períodos mais adequados para a sua pesquisa pelas entidades gestoras. Embora o glifosato não preencha a totalidade de critérios estabelecidos para a seleção de pesticidas a pesquisar em águas destinadas a consumo recomenda-se a sua pesquisa, pelo menos uma vez por ano. [15]

3.1.1.3. Toxicologia

De acordo com Environmental Protection Agency, EPA, em janeiro de 2020 o glifosato não apresenta riscos para a saúde humana quando usado de acordo com as instruções recomendadas [16]. Contudo a exposição durante vários anos pode causar problemas renais e de reprodução ao consumidor.

Outras agências como a PMRA (*Pest Management Regulatory Agency*) e a EFSA (*European Food Safety Authority*), avaliaram o risco do glifosato e concluíram que é improvável o glifosato ser um agente cancerígeno. No entanto, a Agência Internacional de Pesquisa em Cancro (IARC), considera o glifosato provavelmente cancerígeno em humanos. A partir de estudos em laboratório, a IARC verificou efeitos cancerígenos significativos nos animais testados para tumores renais raros, danos no ADN humano, forte evidência de genotoxicidade e stress oxidativo. [17]

Desta forma, IARC acusa EFSA por falta de transparência relativamente ao desconhecimento dos autores face aos seus estudos, pelo facto de ignorarem indícios importantes e a genotoxicidade em laboratório e humanos. Discordam também do facto de estudos publicados em jornais internacionais revistos por pares tenham menos peso na tomada de decisão por não se guiarem pelas normas GMP (Good Manufacturing Practices).

Na realidade, existem diversos artigos publicados durante os últimos anos que chamam atenção sobre o nível de toxicidade hepática, reprodutório, nefrática do glifosato, bem como a sua carcinogénese e neurotoxicidade. [18]

Devido toda a controvérsia que envolve a utilização do glifosato, são necessários estudos mais profundos de modo a definir quais as implicações de risco para a saúde humana e o seu impacto no ambiente. Segundo a comissão europeia, os quatro países indicados para a avaliar o glifosato, em relação ao impacto no ambiente e na saúde, são França, Holanda, Suécia e Hungria, de maneira a que estes cheguem a um consenso durante a avaliação. Desta forma, a União Europeia (UE) pretende banir a utilização do glifosato a partir de 15 de dezembro de 2022 e as empresas que pretendem manter a aprovação de venda, tinham que submeter um requerimento até final do ano de 2019.

3.1.1.4. Impacte Ambiental

A utilização de herbicidas e outros compostos utilizados em agricultura e urbanizações constitui um risco para as águas superficiais e subterrâneas, causando um possível perigo para o ambiente e saúde pública. O herbicida é usado na agricultura e também em florestas, zonas urbanas [20] e áreas aquáticas para controlo do crescimento de espécies indesejadas [19]. Desta maneira, o glifosato presente no solo tem três formas de dispersão: percolação, ligação ou mineralização.

A percolação consiste no arrastamento do glifosato para a água. É o processo mais importante em relação ao risco de contaminação do ambiente aquático, potenciado pela água das chuvas [20,21]. Por consequência, o pH do solo influencia a percolação, visto que, a diminuição do pH resulta num aumento da adsorção do glifosato. Já os fatores como carbono orgânico não apresentam qualquer efeito na adsorção do glifosato [22].

A ligação, segunda forma de dispersão, baseia-se na ligação do grupo fosfonato do glifosato a superfícies que contenham óxidos de alumínio ou ferro [22] por ligações Al–O–P e Fe–O–P. Estas ligações formam superfícies complexas, por coordenação mona ou bidentada [23,24], e ainda ligação a matéria orgânica por pontes de hidrogénio [25,26]. Dado que a maioria dos solos inclui óxidos bem como silicatos, podem ocorrer adsorções competitivas entre o glifosato e fosfato [22]. Por isso, aplicação de glifosato em solos ricos em fosfato é capaz de comprometer a capacidade do solo para se ligar ao glifosato [27,28].

A última forma, a mineralização, consiste na degradação da molécula para dióxido de carbono, amónia, água e sais inorgânicos [29] que pode ocorrer devido a atividade microbiana como demonstrado por Fornali *et al.* [30][29] e posteriormente por Gimsing *et al.* [31].

O tratamento e controlo da água são as razões vitais de forma a mitigar a propagação de doenças ou complicações, ao confirmar e assegurar a distribuição de água apropriada para consumo, satisfazendo as normas de qualidade estabelecidas.

3.1.1.5. Legislação

A pesquisa de pesticidas em águas destinadas a consumo humano está, presentemente, regulada pelo Decreto-Lei n.º 152/2017, de 7 de dezembro, que veio alterar o Decreto-Lei n.º 306/2007,

de 27 de agosto, o qual estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano e procede à transposição para o ordenamento jurídico interno da Diretiva 98/83/CE, do Conselho de 3 de novembro e a Diretiva (UE) 2015/1787, da Comissão de 6 de outubro. Tem por objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da contaminação da água para consumo humano e assegurar a disponibilização, tendencialmente universal de água salubre, limpa e, desejavelmente, equilibrada na sua composição. [15]

De acordo com o Decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de dezembro, foi definido o valor paramétrico de 0,1 µg/L para pesticidas individuais, com incertezas de medição menores que 30 % do valor paramétrico e os valores de exatidão, precisão e limiares analíticos de 25% do valor paramétrico (valores apresentados na tabela 2). Cabe aos laboratórios adaptarem-se às características de desempenho dos métodos analíticos, de forma a continuarem com os métodos acreditados atuais, utilizando exatidão, precisão e limite de deteção como conjunto alternativo de desempenho ao limite de quantificação e à incerteza do método. [32,33]

Tabela 2- Valores paramétricos para pesticidas individuais e especificações técnicas para a análise e monitorização química do estado da água. [32,33]

Parâmetro	Valor paramétrico (µg/L)	Exatidão (% do valor paramétrico)	Precisão (% do valor paramétrico)	Limite de deteção (% do valor paramétrico)
Pesticida individual	0,1	25	25	25

4. Metodologia Analítica

4.1. Estado da Arte

Existem várias técnicas e métodos para a análise do glifosato e o seu metabolito (AMPA), em várias matrizes tais como, ar, água, urina e sêrum que se resumem na tabela 3.

A maioria dos métodos são cromatográficos, estando em desenvolvimento técnicas cromatográficas que não requerem derivatização e ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). [34]

Tabela 3- Métodos para análise do glifosato e AMPA.[34] Adaptado

Matriz da Amostra	Método	Limite de deteção	
		Glifosato	AMPA
Água	SPE-HPLC/MS	0,08 µg/L	-
	*ELISA	0,05 µg/L	-
	LC-LC-FD	0,02 µg/L	-
	HPLC-FD	6,0 µg/L	-
	Espectrometria ultra-visível	1,1 µg/L	-
Solo	LC-MS/MS com triplo quadrupolo	0,02 mg/kg	-
Poeira	GC-MS-MID	0,0007 mg/kg	-
Ar	SPE-HPLC/ MS	0,01 ng/m ³	-
Frutas e vegetais	*HILIC/WAX com ESI-MS/MS	1,2 µg/kg	-
Culturas (arroz, milho e soja)	LC-ESI-MS/MS	0,007-0,12 mg/kg	-
Vegetação	HPLC com colunas poliméricas de amina	0,03 mg/kg	-
Sêrum	*LC-MS/MS	0,03 µg / mL	0,02 µg / mL
Urina	HPLC-FD	1 µg/L	-
	*ELISA	0,9 µg/L	-

**ELISA: (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática); HPLC/ MS: (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com deteção por espectrometria de massa); LC-LC: (Cromatografia Líquida de coluna acoplada); FD: (Deteção por fluorescência); LC-MS/MS: (Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem); GC-MS: (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa); HILIC/Wax: (Interação hidrofílica/troca aniónica fraca cromatografia líquida); ESI-MS/MS: (Espectrometria de massa em tandem com ionização por eletrospray); SPE: (Solid Phase Microextraction);*

4.1.1. Métodos cromatográficos

Como referido, os métodos de análise de uso mais generalizado na determinação do glifosato e do AMPA são os cromatográficos, cromatografias gasosa (GC – Gas Chromatography) e líquida (LC – Liquid Chromatography) com recurso a diferentes tipos de detetor. Na maioria das aplicações há que

recorrer a reações de derivatização para conferir ao glifosato propriedades que melhorem a sua análise cromatográfica.

O glifosato é uma molécula polar, não volátil, e de baixa solubilidade em solventes orgânicos.[35] Em GC, a análise do glifosato só é possível após a derivatização com compostos apolares que o tornam termicamente estável e mais volátil. Existem alguns métodos para GC com detector de massa (GC-MS) usando vários agentes de derivatização. Porém, estas derivatizações envolvem diversos passos de lavagens e extrações com solventes orgânicos. Adicionalmente, o facto de a água ser um componente indesejado na análise GC (danifica a fase estacionária), faz com que esta metodologia seja menos adequada para análise do glifosato comparada com a LC. [36]

Devido as características químicas do glifosato as técnicas de cromatografia líquida são mais indicadas para a sua identificação e quantificação. Não obstante, a sua análise enfrenta alguns problemas, entre elas, a facilidade do glifosato em formar complexos com metais, a sua adsorção nos recipientes de recolha de amostra (vidro), a complexidade das matrizes e as e concentrações residuais em amostras ambientais. [37]

Devido às suas características *zwiteriônicas*, o glifosato pode ser analisado por cromatografia líquida de permuta iónica sem qualquer tipo de extração, limpeza, passo de concentração ou derivatização, recorrendo a detetores amperométrico ou MS/MS [38]. No que diz respeito a utilização da CL de permuta iónica, Patsias et al.[39] mostram que os compostos iónicos presentes nas amostras ambientais afetam a eficácia das resinas iónicas, sugerindo a adição de um passo de limpeza envolvendo solventes orgânicos. É também possível utilizar um detetor de absorção molecular simples ou tipo diode array (DAD) ao comprimento de onda (λ) de 195nm. No entanto, a absorvância medida pode ser afetada pela absorção de alguns solventes utilizados que absorvem na mesma gama do espectro eletromagnético. Como consequência obtém-se limites de deteção mais altos, e para cumprir com os requisitos para a análise do glifosato há que introduzir um passo de derivatização ou em alternativa concentrar da amostra.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) de partição e de fase reversa é a que melhor se adequa à determinação de glifosato na matriz água. Esta cromatografia em que a fase estacionária é menos polar que a fase móvel, é frequentemente usada na análise de compostos polares, de baixo peso molecular como é o caso do glifosato. Na grande maioria das aplicações é necessário proceder à derivatização do analito de modo a melhorar a sua análise cromatográfica, facilitando a sua retenção e deteção [40]. No entanto os produtos secundários da derivatização podem interferir com o analito, tornando necessário adicionar um passo de limpeza recorrendo a solventes orgânicos.

Devido às semelhanças químicas entre o glifosato e o AMPA, este tem requerimentos semelhantes para ser detetado nos sistemas cromatográficos. No entanto as diferenças que existem entre as duas moléculas são suficientes para que sejam facilmente separados.

4.2. Cromatografia Líquida

A técnica de cromatografia em coluna ganhou importância pela primeira vez, no início do século XX devido aos trabalhos do botânico *Mikhail Tswett* sobre a pigmentação das plantas, nos quais usou uma coluna com uma fase estacionária polar, carbonato de cálcio, e como fase móvel apolar formada por misturas de solventes orgânicos.

Nos anos 60 foi introduzido o conceito da HPLC usando colunas com enchimento de partículas rígidas de 40-50 μm , eficiências na ordem dos 66 pratos teóricos. Nos anos 70, o uso de partículas porosas de diâmetro à volta de 10 μm conduziram a um ganho de eficiente, de cerca de 400 pratos/cm. À medida que foram sendo usadas partículas de menores de dimensões as eficiências foram aumentadas e nos anos 90, com partículas esféricas porosas de 3-3,5 μm , as eficiências obtidas foram de 1500 pratos/cm.

Recentemente surgiram as partículas esféricas porosas de diâmetro inferior a 2 μm que permitem melhores resoluções e altas eficiências. Deste modo, nasce a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC), uma técnica já amplamente utilizada a nível laboratorial em que o equipamento permite o uso de pressões elevadas (até 1000 bar) dando resposta à necessidade imposta pelas partículas de diâmetro inferior a 2 μm e que apresenta um menor consumo de solventes, eficiências mais elevadas, uma maior resolução e rapidez de análise [41].

4.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Neste trabalho é usado o método HPLC. A utilização desta técnica tem como vantagem a sua sensibilidade, adaptabilidade a determinações quantitativas precisas e aptidão para separar compostos não voláteis ou termicamente instáveis. A HPLC é caracterizada pelo uso de colunas tipicamente com 15-25 cm de comprimento, com diâmetro interno de 2-5 mm, e cheias com partículas porosas esféricas com diâmetros de ordem de 3-10 μm (fase estacionária). A fase móvel atravessa a coluna continuamente a pressões elevadas e com fluxo controlado e os fenómenos de transferência de massa ao longo da eluição são favorecidos pelo aumento da área de contacto entre as fases móvel e estacionária o que se traduz numa diminuição da altura equivalente a um prato teórico. Obtém-se uma maior eficiência na análise, ou seja, um aumento do número de pratos teóricos por unidade de comprimento da coluna.

Existem vários tipos de fases estacionárias que permitem a retenção de compostos por partição, adsorção, exclusão molecular e iónica [42]. Uma das cromatografias de uso mais generalizado é cromatografia de partição, que é dividida em dois tipos, cromatografia líquida-líquida na qual a fase estacionária é líquida, retida na superfície do enchimento por adsorção física, e líquida – líquida de fase ligada, na qual a fase estacionária está quimicamente ligada às superfícies de suporte. A maioria dos enchimentos da cromatografia de partição, são preparados a partir de partículas rígidas de sílica, preferencialmente uniformes, porosas, mecanicamente resistentes e com diâmetros entre a 3 a 10 μm , cuja superfície hidrolisada é composta por grupos silanol funcionalizados em siloxanos, através da

reação dos grupos silanol livres com organoclorosilanos. Ainda na cromatografia de partição existe a cromatografia de fase normal, na qual a fase estacionária é mais polar em relação ao eluente utilizado na fase móvel, e a cromatografia de fase reversa, a utilizada e já referida neste trabalho, na qual a fase estacionária é menos polar que a fase móvel. As fases estacionárias mais comuns na fase reversa são amino, fenilo, ciano, C4, C8, C18 (por ordem decrescente de polaridade/crescente de hidrofobicidade) [42].

- Instrumentos de HPLC

Um equipamento de HPLC, é constituído por vários componentes que permite a quantificação e identificação dos compostos a analisar. O sistema está sempre acoplado a um computador onde é feita a tradução/leitura dos analitos que foram detetados no detetor [42]. Na figura 9 apresenta-se o equipamento usado no presente trabalho. Muito resumidamente é composto por um reservatório de solventes, uma bomba binária, degaseificador, injetor automático, coluna cromatográfica, e o detetor.

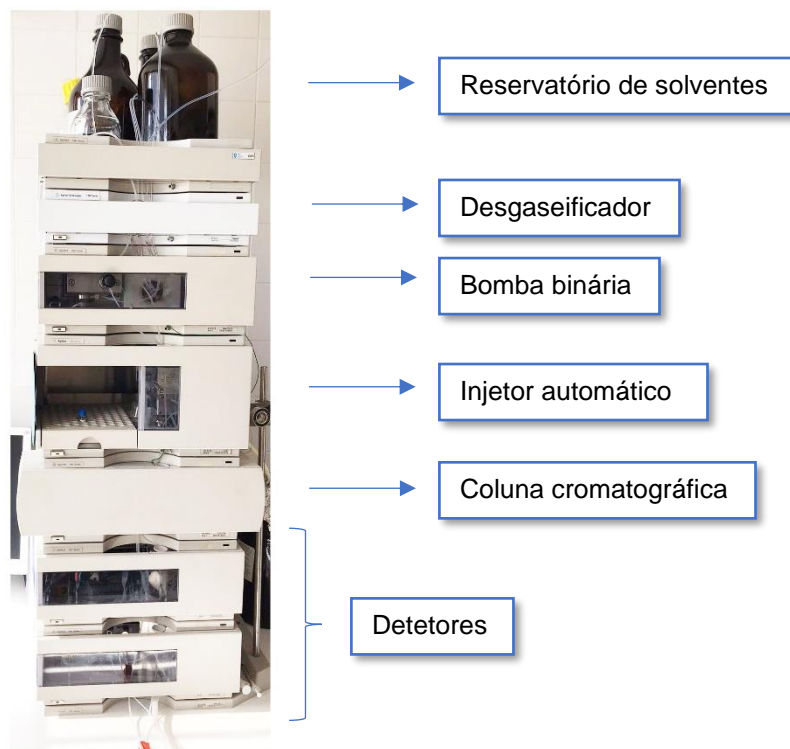


Figura 9- HPLC Agilent, usado no presente trabalho

No aparelho HPLC, que se esquematiza na figura 10 os eluentes que se encontram em recipientes, passam por um degaseificador (capaz de remover gases dissolvidos, que causam problemas dentro da coluna e detetor), seguido de um sistema de mistura, que no caso de uma análise isocrática, emprega um único solvente ou uma mistura de solventes de composição constante do início até ao fim do processo cromatográfico, ou gradiente, ajuste das proporções dos solventes ao longo do tempo. A fase móvel é movida por uma bomba capaz de impor altas pressões e manter constantes os caudais de solventes (até 10 mL/min). Segue-se o sistema de injeção da amostra, onde esta é colocada

dentro do loop de volume variável. Os analitos saem da coluna de acordo com o seu tempo de retenção e passam pelo detetor, que por sua vez gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de analito. Obtém-se assim um cromatograma que permite a análise qualitativa e quantitativa dos compostos eluídos [42].

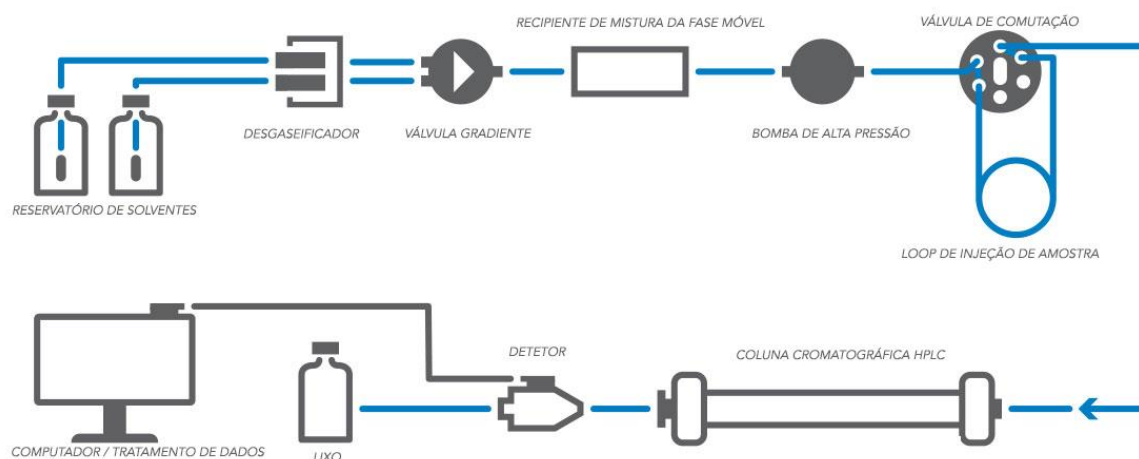


Figura 10- Esquema dos componentes de um HPLC.[43] Adaptado

- Colunas Cromatográficas

É essencial a escolha da coluna a usar na separação dos compostos em estudo. No mercado existem diversas colunas com características diferentes, onde uma das principais diferenças recai no tipo de partícula de enchimento. Atualmente as fases estacionárias usadas são quimicamente ligadas a um suporte pela reação dos grupos silanóis da sílica com compostos apolares (Fase Reversa) ou compostos polares (Fase Normal). Na Tabela 4 apresentam-se algumas propriedades das colunas usadas neste trabalho.

Tabela 4- Designação, tamanho da coluna, gama de pH, tamanho da partícula e limite de temperatura (°C) das colunas usadas no trabalho.

Nome	Tamanho da coluna	Gama do pH	Tamanho da partícula	Limite de Temperatura
HYPERSIL NH₂ APS-2	150x4,6 mm	2 - 8	3 µm	60°C
AGILENT ZORBAX RX -C8	150x4,6 mm	1 - 8	5 µm	80°C

- Colunas Hypersil APS-2

As colunas Hypersil APS-2 são bem reconhecidas e referenciadas em métodos de HPLC. São ideias para análises de carboidratos e oferecem uma seletividade à sílica quando usados em fase

normal [44]. Podem ser usadas com tampões tradicionais e aditivos orgânicos como um permutador aniônico fraco, para a análise de aniões e ácidos orgânicos. [45]

- Colunas Agilent ZORBAX C8

Zorbax Rx C8 são colunas de micropartículas usadas em fase reversa em amostras básicas, neutras ou ácidas. O suporte especial de sílica destas colunas de baixa actividade tem como propósito eliminar ou reduzir compostos básicos de forte absorção. Contudo, são quimicamente estáveis a pH's baixos, pois oferece maior período de vida à coluna.[46]

4.3. Detecção por Fluorescência (FLD)

Existem diferentes detetores com limites de detecção e aplicações determinadas, entre eles estão de absorção no UV-DAD, fluorescência, índice de refração, electroquímicas, e detetores de massa (MS).[42] O detetor tem a capacidade de detetar a presença de um composto e enviar um sinal eléctrico correspondente, de forma a que os dados sejam analisados no computador. A escolha entre os vários tipos de detetores, dependendo das características e concentrações dos compostos que precisam ser separados e analisados.[47]

O detetor fluorescência, utilizado neste trabalho é de alta sensibilidade tipicamente uma ordem de grandeza superior em relação à detecção baseada na absorvância e mais seletivo uma vez que a fluorescência molecular é um fenómeno menos comum que a absorção molecular só ocorrendo para determinadas moléculas em determinadas condições.[42]

4.4. Derivatização

A derivatização consiste na reacção entre o analito e um agente derivatizante, de modo a conferir um aumento de seletividade e sensibilidade, ou uma propriedade no analito derivatizado que melhore a sua separação e/ou detecção.

Neste trabalho a derivatização foi fundamental para a detecção do glifosato e do seu produto de degradação.

Na maioria dos casos é utilizada a derivatização pré-coluna seguida por FLD. No que diz respeito ao glifosato e AMPA, o reagente de derivatização mais comum é o 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC-Cl), que reage com ambos os grupos (primário e secundário) de amina, para produzir derivados estáveis e com elevada fluorescência.

A derivatização pré- coluna com FMOC-Cl foi proposta inicialmente por Moye e Boning e desde então existem várias modificações e melhorias a fim de melhorar o desempenho do método, adicionando etapas de limpeza e concentração.

Uma das desvantagens da derivatização é na preparação da amostra, pois este procedimento exige várias etapas e requer o uso de reagentes que podem causar a perda do analito. Estes factores contribuem para a diminuição da precisão do procedimento e aumento no custo do processo. [48]

5. Validação

Atualmente existe a necessidade por parte dos laboratórios de análises químicas de assegurar a qualidade dos resultados obtidos.

O objetivo da validação de um método analítico passa, assim, por demonstrar que este é adequado para a determinação do analito na respetiva matriz, fazendo-o de forma exata, precisa e garantindo um elevado grau de fiabilidade nos resultados obtidos [49][50].

Como referido anteriormente, o Laboratório de Análises encontra-se acreditado segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, de acordo com a qual se define que, para que uma dada metodologia analítica esteja validada é preciso:

- definir a sua gama de trabalho;
- verificar a linearidade das curvas de calibração;
- determinar os seus limiares analíticos;
- avaliar a precisão e exatidão;
- estudar a robustez e sensibilidade;
- estimar as incertezas associadas aos seus resultados.

Todos estes critérios de validação encontram-se explicados em detalhe no Anexo A

6. Parte Experimental

6.1. Equipamento

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Modelo *Agilent 1100 Series*;
 - Coluna NH₂ APS-2 HYPERSIL, 150×4,6 mm de partícula 3 μm;
 - Coluna C8 Zorbax RX, 4,6×150 mm de partícula 5μm;
- Software Instrument 1 (online)
- Sistema de obtenção de água ultrapura (*Milli Q*);
- Balança analítica, *Mettler Toledo*;
- Banho Ultrassônico, *Elma*;
- Vórtex, *Genie 2*;

6.2. Material

- Balões volumétricos de 10 mL, 200 mL e 250 mL;
- Vials de 2mL com tampa para a injeção automática;
- Seringas de vidros de 250μL e 1mL;
- Micropipetas de 10 – 100 μl, 20 – 200 μl e 100 – 1000 μl;
- Filtro de seringa MS® PTFE, 0,22 μm de porosidade;
- Seringas esterilizadas de uso único de 5 mL, Latex Free Romed Holland;
- Material corrente de laboratório;

6.3. Reagentes

- Glifosato (Pestanal analytical standart ≥ 99,7 %, C₃H₈NO₅P, Sigma-Aldrich);
- AMPA (analytical standard ≥ 99,0 %, CH₆NO₃P, Sigma-Aldrich);
- FMOC-Cl (derivatização HPLC ≥ 99,0 %, C₁₅H₁₁ClO₂, Sigma-Aldrich);
- Acetato de amônia (≥ 98 %, C₂H₇NO₂, Sigma-Aldrich);
- Dihidrogenofosfato potássio (≥ 99,5 %, KH₂PO₄, Merck);
- Tetraborato de sódio hidratado (≥ 99,5 %, Na₂B₄O₇, Merck);
- Ácido bórico (≥ 99,8 %, H₃BO₃, Fluka);
- O-Fosfo-L-Serina (≥ 99,8 %, C₃H₈NO₆P, Sigma-Aldrich);
- Acetonitrilo (para HPLC- GOLD- Ultragradient);
- Diclorometano (PESTIPUR para análises pesticidas);
- Metanol p.a.;

6.4. Interferências e contaminações

Foram tidas em consideração todas as preocupações relacionadas com os solventes, reagentes e interferentes de matriz. Deu-se especial atenção ao uso adequado do material devido à possível adsorção do Glifosato. Por último, realizaram-se brancos, frequentemente, de modo a testar possíveis contaminações.

6.5. Descontaminação de Material

Todo o material utilizado neste trabalho experimental foi devidamente descontaminado de acordo com o procedimento interno do LAIST.

6.6. Segurança

Durante todo o trabalho desenvolvido foram respeitadas as regras pela qual o LAIST se rege, nomeadamente, a proteção do técnico de laboratório (uso de bata, luvas e óculos), e tendo sempre o cuidado ao manusear os reagentes em locais apropriados e ventilados (*hottes*).

6.7. Soluções

6.7.1. Tampões

Solução tampão Borato 200 mM de pH=8.98: pesaram-se aproximadamente 3,07 g de tetraborato de sódio hidratado e 0,49 g de ácido bórico que se dissolveram em água e a solução resultante foi levada ao volume final de 200 mL num balão volumétrico.

Acetato de Amónia 5mM: pesou-se 0,1927 g de acetato de amónia que se dissolveram em água e a solução resultante foi levada ao volume final de 250 mL num balão volumétrico. A partir desta solução fez-se uma diluição $\frac{1}{2}$ para obter uma concentração de 5 mM. O pH desta solução foi ajustado a 8,91 com a adição de amónio.

Solução tampão Fostato 50 mM: pesou-se 1,36 g de dihidrogenofosfato potássio que se dissolveram em água e a solução resultante foi levada ao volume final de 50 mL num balão volumétrico. O pH desta solução foi ajustado a 5,37 com a adição de hidróxido de sódio-

Uma vez preparadas, as soluções foram colocadas durante três minutos em banho ultra-som de forma a serem desgaseificadas.

6.7.2. Derivatizante (FMOC-Cl)

Solução FMOC-CL 1,59 g/L: pesaram-se cerca de 15,9 mg de FMOC-CL, que se dissolveram em acetonitrilo (ACN) e a solução resultante foi levada ao volume final de 10 ml num balão volumétrico.

A solução FMOC-CL foi preparada de novo cada 2 semanas e armazenada no frigorífico a 4 °C.

6.7.3. Padrões

Foram preparadas soluções padrão mãe de Glifosato e AMPA, de concentração 1 g/L. A partir da solução mãe, preparou-se uma solução intermédia de concentração 10 mg/L – Intermédia 1. Preparou-se outra solução intermédia a partir da solução “intermédia 1”, com concentração igual a 1 mg/L – Intermédia 2.

Por fim, para traçar as curvas de calibração foram feitas soluções padrão com base nas soluções intermédias preparadas anteriormente. As concentrações para os 5 padrões da reta de calibração variam entre 1 a 20 µg/L.

As soluções foram preparadas em água, em balões volumétricos de 10 mL e armazenadas no frigorífico a 4°C.

Na figura 11 apresenta-se um esquema que resume as soluções necessárias para traçar a reta de calibração, tanto para o glifosato como para o AMPA.

- Solução padrão mãe Glifosato / AMPA (1 g/L);
- Solução intermédia 1 (10 mg/L) e Solução intermédia 2 (1 mg/L);
- Soluções – Curva de Calibração
 1. $\approx 1 \mu\text{g/L}$
 2. $\approx 2,5 \mu\text{g/L}$
 3. $\approx 5 \mu\text{g/L}$
 4. $\approx 10 \mu\text{g/L}$
 5. $\approx 20 \mu\text{g/L}$

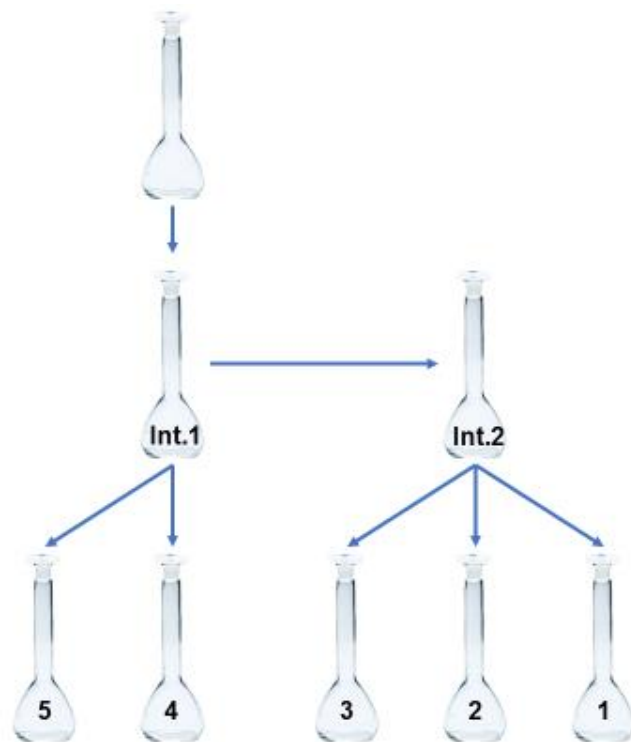


Figura 11- Esquema representativo da preparação de uma reta de calibração.

6.7.4. Fase Móvel

Utilizaram-se duas fases móveis: a primeira fase móvel consistiu na mistura da solução tampão de fosfato 50mM com pH de 5,4 e acetonitrilo com proporções (55:45) e a segunda fase móvel consistiu também na mistura da solução de acetato de amónia 5mM a pH 8,9 e metanol com proporções (80:20).

6.8. Procedimento experimental

6.8.1. Condições de derivatização das amostras

As amostras são retiradas do frio até atingirem a temperatura ambiente. Em frascos próprios para o procedimento, adicionou-se primeiramente 1 mL da amostra e em seguida é adicionado 0,2 mL de tampão borato. Depois de aguardar 10 minutos, adicionou-se 0,2 mL de água e posteriormente foram adicionados 50 µL de acetonitrilo e 150 µL da solução de FMOC-Cl. As amostras repousaram cerca de 60 minutos.

Em seguida, fez-se um processo de lavagem, onde adicionou-se 1 mL de diclorometano (DCM) as amostras, levou-se a agitar no vortex durante 1 min e aguardou-se a separação das fases. Retirou-se o DCM cuidadosamente e voltou-se a repetir o procedimento mais uma vez.

Por fim, a fase aquosa é retirada para um vial e posteriormente analisada. Este processo está exemplificado no esquema a seguir, figura 12.

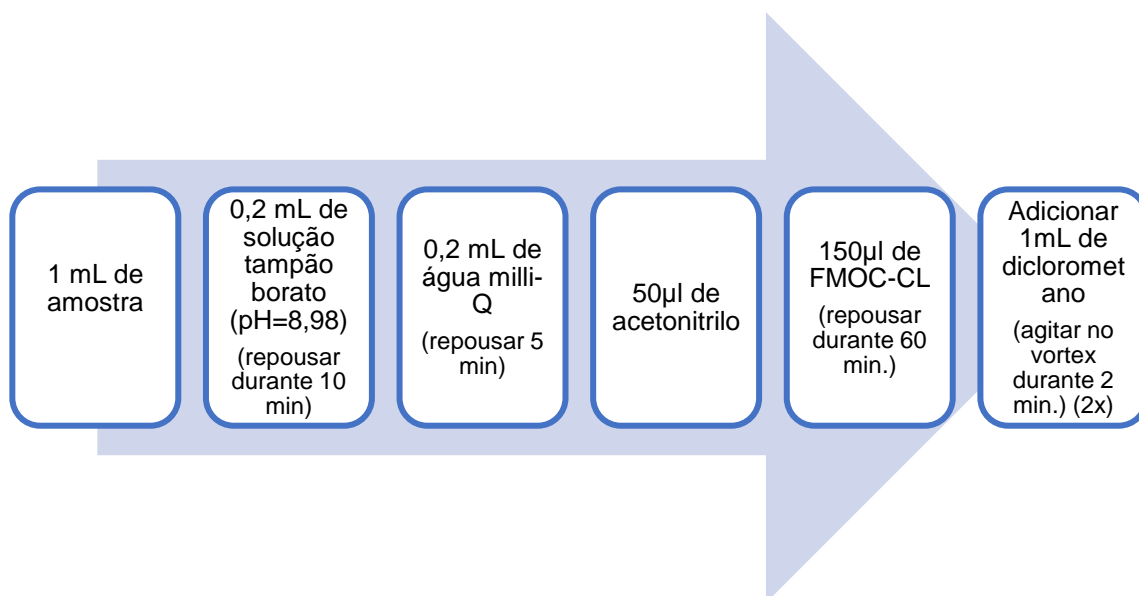


Figura 12- Esquema do procedimento experimental de derivatização.

6.8.2. Condições operatórias

Para o presente trabalho utilizaram-se as condições operatórias discriminadas nas tabelas 5 e 6 para a coluna NH₂ APS-2 HYPERSIL e coluna C8 Zorbax RX, respectivamente.

Tabela 5- Condições operatórias do HPLC para análise do Glifosato e AMPA na coluna NH₂ APS-2 HYPERSIL.

Temperatura da coluna (°C)	25°C	
Volume de injeção (µl)	30	
Caudal da Fase Móvel (mL/min); Método Isocrático	1	
Fase Móvel	A – 50 mM tampão fosfato 55%; B – acetonitrilo 45%	
Tempo (min)	10	
Detetor - FLD	PMT	15
	$\lambda_{\text{Excitação}}$ (nm)	265
	$\lambda_{\text{Emissão}}$ (nm)	315

Tabela 6- Condições operatórias do HPLC para análise do Glifosato e AMPA na coluna C8 Zorbax RX.

Temperatura da coluna (°C)	25°C		
Volume de injeção (µl)	30		
Caudal da Fase Móvel (mL/min)	1		
Gradiente	t (min)	% A	% B
	0	80	20
	3	80	20
	6	30	70
	18	30	70
	23	80	20
	26	80	20
Fase Móvel	A - 5 mM Acetato de amônia; B - metanol		
Detetor - FLD	PMT	15	
	$\lambda_{\text{Excitação}}$ (nm)	265	
	$\lambda_{\text{Emissão}}$ (nm)	315	

*PMT: Tubo fotomultiplicador;

7. Apresentação e Discussão de Resultados

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um método cromatográfico para a determinação do glifosato e o seu produto de degradação, ácido (aminometil) fosfónico (AMPA) na matriz água. Consultada a literatura e dadas as características do composto, em particular a sua polaridade e logo solubilidade em água, optou-se por selecionar a cromatografia líquida de partição de fase reversa como a metodologia mais adequada a ser otimizada. As características químicas do glifosato no que diz respeito à ausência de um grupo cromóforo na molécula impõem alguns problemas na sua deteção, sendo necessário recorrer a uma reação de derivatização de modo a desenvolver um método suficientemente sensível com deteção por fluorescência molecular para a sua determinação e respetivo metabolito em águas.

7.1. Metodologias Testadas

Durante a implementação da metodologia otimizaram-se as condições do processo de derivatização e procedeu-se à otimização do processo cromatográfico variando, a escolha da coluna, a composição do eluente assim como o seu pH, o volume de injeção e o processo de limpeza, as condições de deteção em FLD no que diz respeito aos comprimentos de onda de excitação, $\lambda_{\text{excitação}}$ e emissão, $\lambda_{\text{emissão}}$, e o uso do padrão interno.

No que diz respeito ao processo de derivatização é importante realçar que no procedimento experimental é utilizada a metodologia mais conhecida que é a reação com FMOC-Cl, pois para além de conferir um cromóforo à molécula, permite que seja utilizado um método de cromatografia por fase reversa. Adicionalmente, tem ainda como vantagem a dispensabilidade do uso de solventes orgânicos clorados. Na figura 13 é possível observar as reações de derivatização do Glifosato e do AMPA usando o FMOC-Cl e os respetivos produtos finais.

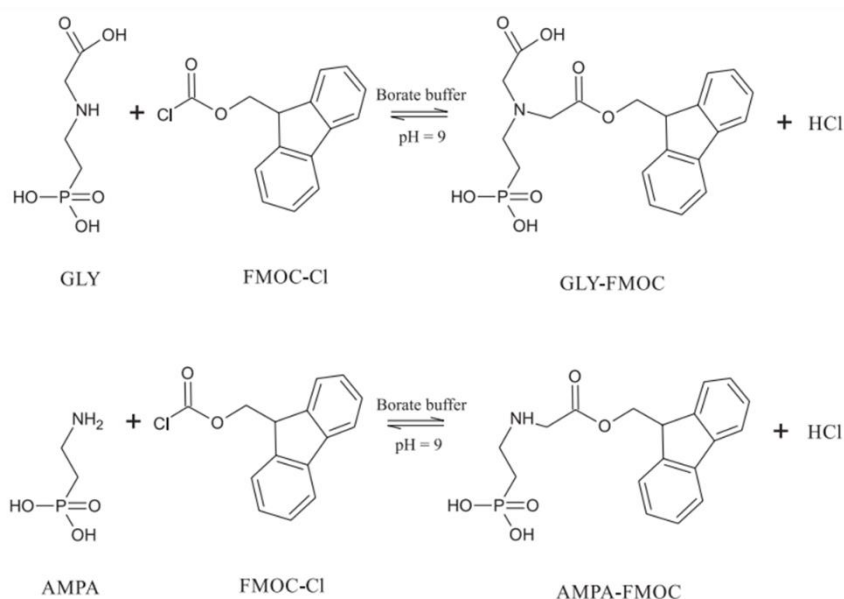


Figura 13- Reação de derivatização do glifosato e do AMPA usando o FMOC-Cl. [51]

Neste mesmo processo, testou-se o volume adequado do solvente orgânico, DCM, necessário para o passo de limpeza, de modo a que o FMOC-Cl não interferisse na análise.

Seguidamente, testou-se a otimização da coluna e o eluente apropriado. Inicialmente foi testada a coluna C8 Zorbax RX, e como eluentes a solução tampão acetato de amónia 5 mM e MeOH em proporções 80:20 com eluição em gradiente. Na mesma coluna, mas com eluentes diferentes, neste caso, solução tampão fosfato e ACN testou-se diferentes proporções dos eluentes, tais como: 70% tampão fosfato + 30% ACN em eluição com gradiente; 55% tampão fosfato + 45% ACN em eluição isocrática. Estes testes foram importantes na identificação dos tempos de retenção dos compostos em estudo e na obtenção de uma boa área dos picos.

Uma vez que o laboratório disponha de uma outra coluna, na qual era possível a identificação do glifosato e do seu metabolito, procederam-se a novos ensaios com a coluna NH₂ APS-2 HYPERSIL. Com a solução tampão fosfato, voltaram-se a testar proporções de eluentes como: 55% tampão fosfato +45% ACN em eluição isocrática; 70% tampão fosfato + 30% ACN em eluição isocrática.

Com a fase móvel, solução tampão fosfato e ACN (55:45) em eluição isocrática, realizaram-se testes complementares tais como:

- Volumes de injeção: Variou-se o volume injetado de amostra (15 µL, 20 µL, 30 µL);
- Condições de fluorescência: Testaram-se as condições de fluorescência fixando o comprimento de onda de emissão, mas variando o comprimento de onda de excitação na gama de 310 a 318 nm. No anexo C é possível ver os espectros que mostram os efeitos desta variação para o glifosato e para o AMPA.
- Volume de FMOC-Cl: Variou-se o volume de FMOC utilizado na reação ,200 µL, 100 µL e 50 µL, adicionando acetonitrilo as últimas situações para perfazer o volume pretendido de 200 µL, em padrões de concentrações 0,05 à 2 µg/L. Estes testes tiveram como objetivo minimizar o volume de FMOC a usar, uma vez que este reagente favorece a degradação das colunas. Os resultados das respetivas áreas para cada volume de FMOC testado encontram-se na tabela 20 em anexo C.
- Padrão Interno: Foram realizados testes de acordo com a ISO 21458:2008 (E) utilizando padrão interno O-Fosfo-L-Serina com o objetivo de corrigir variações no sinal analítico.

Do conjunto de ensaios realizados resultaram duas metodologias, tendo em comum o procedimento experimental da derivatização esquematizado na figura 12, e que diferem na coluna e no eluente:

- Metodologia A na qual uma vez terminado o processo de derivatização as amostras foram lidas na coluna NH₂ APS-2 HYPERSIL usando como fase móvel tampão fosfato e acetonitrilo (55% Solução Tampão Fosfato + 45% ACN) e eluição isocrática.

- Metodologia B na qual uma vez terminado o processo de derivatização as amostras foram lidas na coluna C8 Zorbax RX usando como a fase móvel acetato de amônio e metanol (80% solução acetato de amônia + 20% MeOH) e eluição com gradiente.

Nos pontos seguintes apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos para a separação e quantificação do glifosato e do seu metabolito recorrendo a cada metodologia.

7.1.1. Metodologia A

De forma a testar a metodologia A, inicialmente recorreu-se a preparação de padrões de concentração 200 µg/L para o glifosato e o AMPA de forma a observar-se os compostos e os respetivos tempos de retenção. Na figura 14 apresenta-se um cromatograma típico usando a coluna NH2 APS-2 HYPERSIL e como eluente a mistura 55% Solução Tampão Fosfato + 45% ACN. Como se pode verificar o tempo de retenção do glifosato é de 6.185 minutos e do seu metabolito de 2.751 minutos.

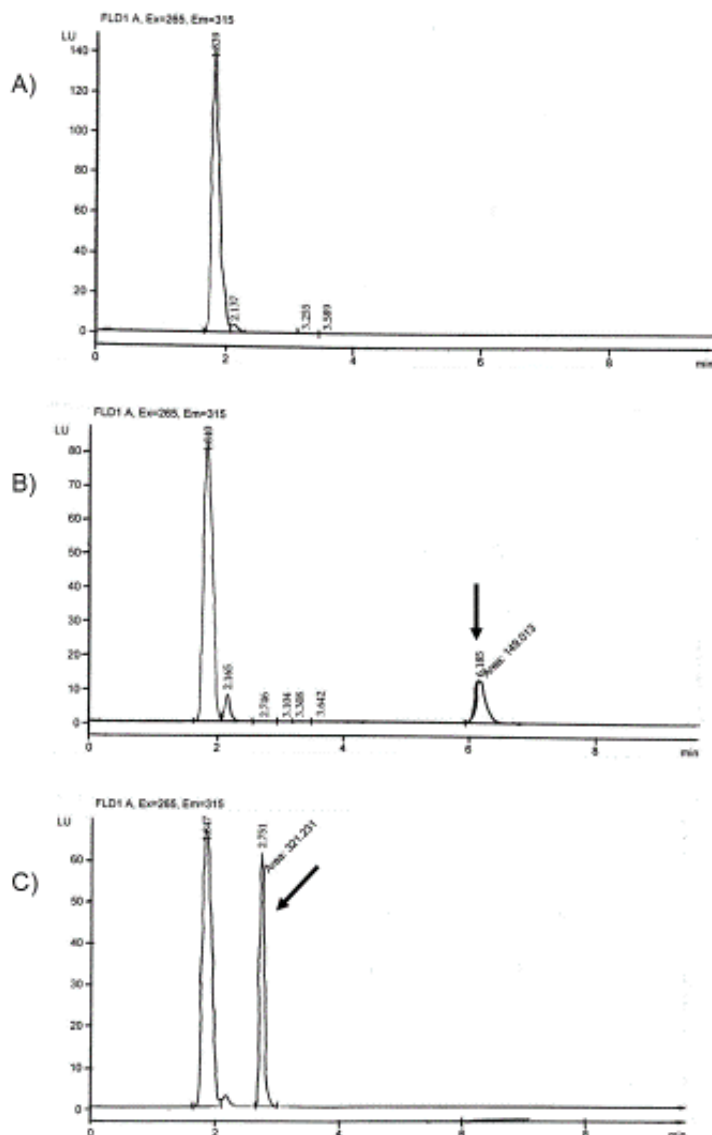


Figura 14- Cromatogramas referentes à metodologia A testado a partir padrões de concentração de 200 µg/L, em que A) Branco; B) Glifosato com tempo de retenção igual a 6.185 min; C) AMPA com tempo de retenção igual a 2.751 min;

Usando padrões de na gama de concentrações 1 – 20 µg/L e a partir das áreas dos cromatogramas, obtiveram-se as curvas de calibração que se apresentam na figura 15 para o glifosato e para o AMPA. A sensibilidade obtida para o AMPA é cerca do dobro da do glifosato como se pode concluir através dos declives das curvas de calibração.

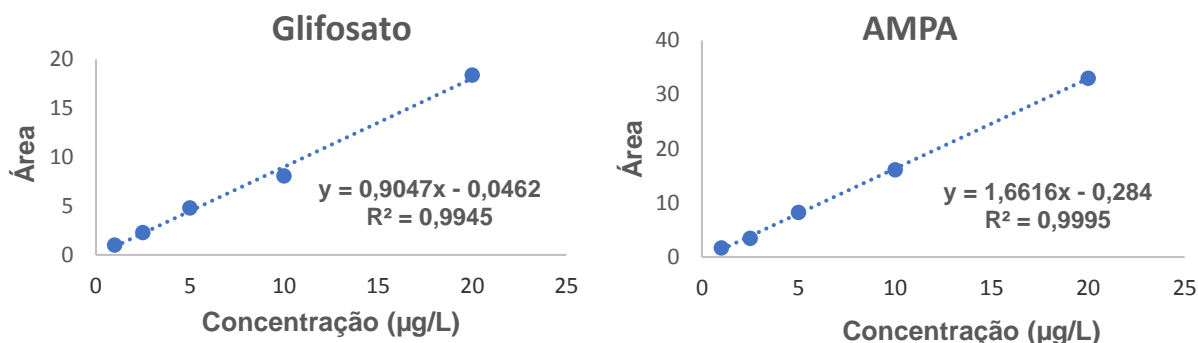


Figura 15- Curvas de calibração do glifosato e AMPA em concentrações de 1 a 20 µg/L nas condições experimentais da figura 12. 1) $y = (0,9 \pm 0,1)x - (0 \pm 1)$ – Glifosato; 2) $y = (1,7 \pm 0,1)x - (0,3 \pm 0,7)$ – AMPA;

Uma vez que se obtiveram bons cromatogramas para a gama de concentrações 1 – 20 µg/L, testaram-se nas mesmas condições experimentais, padrões de concentração mais baixos na gama 0,05 – 1 µg/L de forma a obter-se um LQ menor. Na figura 16 apresentam-se as retas de calibração obtidas.

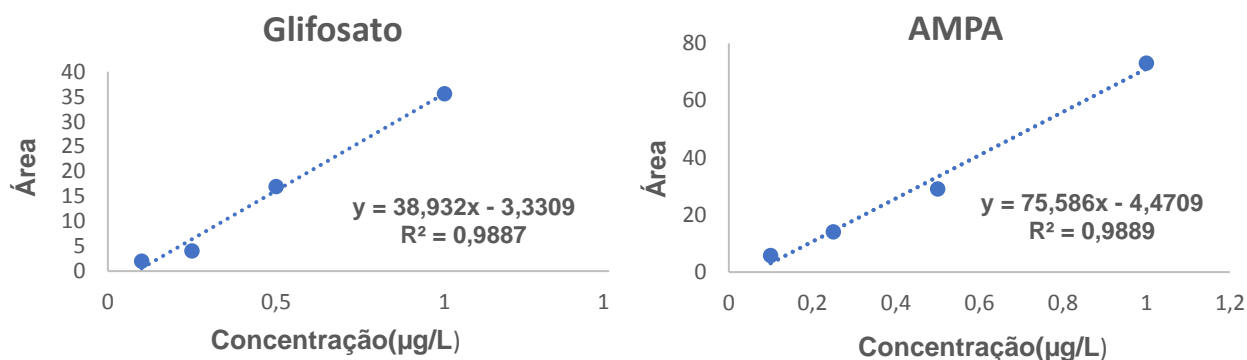


Figura 16- Curvas de calibração do glifosato e AMPA em concentrações de 0,05 a 1 µg/L nas condições experimentais da figura 12; 1) $y = (4 \pm 1)x10 - (3 \pm 7)$ – Glifosato; 2) $y = (7 \pm 2)x10 - (0 \pm 1)x10$ – AMPA;

No entanto não se observam picos para concentrações $\leq 0,1$ µg/L.

- Ensaios Replicados

Com objetivo de melhorar os resultados para os padrões com concentração ≤ 1 µg/L, repetiram-se os ensaios de derivatização aumentando o volume de FMOC e aumentando o tempo de reação no

processo de derivatização. Na tabela 7 é possível observar as áreas dos cromatogramas obtidos em função do volume de FMOC-Cl e diferentes tempos de reação.

Tabela 7- Áreas dos cromatogramas relativas ao glifosato e AMPA para os ensaios replicados em função do volume de FMOC-Cl e diferentes tempos de reação, usando padrões de concentração 1 µg/L e de acordo com a metodologia A.

Tempo de reação	Concentração (µg/L)	200 µL de FMOC-Cl		100 µL de FMOC-Cl		50 µL de FMOC-Cl	
		Glifosato	AMPA	Glifosato	AMPA	Glifosato	AMPA
30 minutos	1	40,4	105,7	21,9	77,0	19,4	84
		45,7	76,8	25	79,8	18,6	70,9
		45,8	98,4	27,8	97,1	-	-
60 minutos	1	60,15	114,8	48,1	122,1	43,7	110,6
				52,5	115,7	43,1	107,5
				53,9	119,8	35,4	105,5

De acordo com os resultados deste ensaio foi possível observar que o aumento do volume do agente derivatizante tem menos influencia nas áreas dos cromatogramas, do que o aumento do tempo de reação. Para 60 minutos de reação as áreas dos picos relativas ao AMPA são praticamente independentes da quantidade de FMOC usada, mas maiores do que as correspondentes para tempos de reação de 30 minutos. No que diz respeito ao glifosato embora as áreas variem com a concentração de FMOC, aumentando com esta, a variação é mais significativa com o tempo de reação, duplicando quando se usam 100 ou 50 µL de FMOC. Deste modo, optou-se por aumentar o tempo de reação nos ensaios seguintes para 60 minutos e utilizando um volume de FMOC-Cl de 50 µL.

Repetiram-se alguns ensaios com base nos dados bibliográficos nas mesmas condições de derivatização da figura 9 com padrão de concentração de 1 µg/L, mas adicionando o padrão interno O-Fosfo-L-Serina conforme a ISO 21458 de modo a corrigir as variações no sinal analítico devido as mudanças nas condições de análise. Este ensaio não correu como previsto, pois as áreas dos compostos analisados não variaram como esperado, ou seja, obtiveram-se áreas como 47,6 para o glifosato e 16,7 para o AMPA que comparativamente com os valores da tabela 8 não houve grandes variações, tendo em conta que a área observada do AMPA desceu consideravelmente.

- Ensaio de Recuperação

No âmbito desta metodologia foram realizados ensaios de recuperação para as amostras de água da torneira para padrões de concentração de 1 e 5 µg/L. As recuperações obtidas foram calculadas a partir da curva de calibração que se encontra no anexo C na figura 32. Na tabela 8 apresentam-se organizados os resultados deste ensaio.

Tabela 8- Áreas dos cromatogramas relativas ao glifosato e AMPA para os ensaios de recuperação realizados em água da torneira segundo a metodologia A, com 50 µl de FMOC-Cl e 60 min de tempo de reação.

Concentrações (µg/L)	Glifosato	Rec (%)	AMPA	Rec (%)
1	14,8	15	72,1	1,5
	22,4	40	128	62
5	65	36	156	18
	100,4	60	145,8	16

No geral, obtiveram-se baixas recuperações e adicionalmente não reprodutíveis com esta metodologia mesmo com alterações feitas no procedimento e ao longo dos vários testes verificou-se que a coluna cromatográfica utilizada na metodologia A, já não respondia da mesma maneira que os primeiros ensaios realizados. Considerou-se que a coluna não estava em condições de ser usada muito provavelmente deteriorada devido a utilização do FMOC-Cl.

7.1.2. Metodologia B

Face aos resultados descritos no ponto anterior optou-se por recorrer à metodologia B que consistiu basicamente na troca da coluna cromatográfica de amina (NH₂ APS-2 HYPERSIL) para a coluna C8 (C8 Zorbax RX). Nesta metodologia, o procedimento de derivatização utilizado nas amostras foi o mesmo que o da metodologia A (esquematizado na figura 12). No entanto decidiu-se trocar os frascos de vidro usados anteriormente para tubos de ensaio de polipropileno utilizados em microbiologia como se pode observar na figura 17, para a obter melhores resultados experimentais relativamente ao sinal.



Figura 17- Tubos de ensaio de polipropileno (PP)

Nos primeiros ensaios procedeu-se à preparação de padrões com concentrações 1 a 15 µg/L e optou-se por preparar um padrão de maior concentração de 40 µg/L.

Na figura 18, apresenta-se um cromatograma típico usando a coluna C8 Zorbax RX e como eluente a mistura 80% Solução Tampão Acetato de amônia + 20% MeOH com eluição gradiente. Como se pode verificar o tempo de retenção do glifosato é de 2.600 minutos e do seu metabolito de 7.007 minutos.

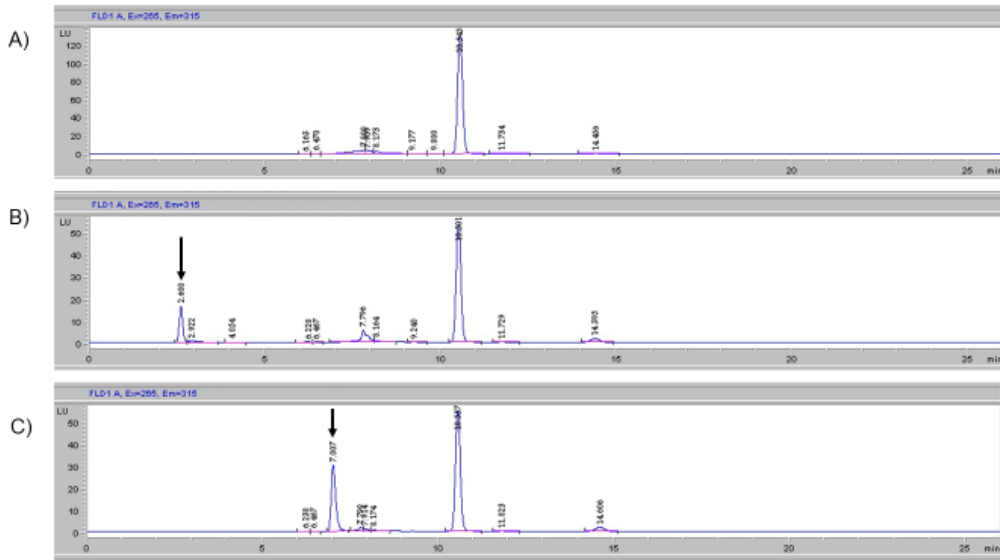


Figura 18- Cromatogramas referente à metodologia B testado a partir padrões de concentração de 200 µg/L, em que A) Branco; B) Glifosato com tempo de retenção igual a 2.600 min; C) AMPA com tempo de retenção igual a 7.007 min;

Na figura 19 ilustram-se as curvas de calibração obtidas na coluna C8 Zorbax RX e usando como eluente a solução acetato de amônia e metanol (80:20) com eluição com gradiente. A sensibilidade obtida para o AMPA é cerca de 6 vezes superior à obtida para o glifosato.

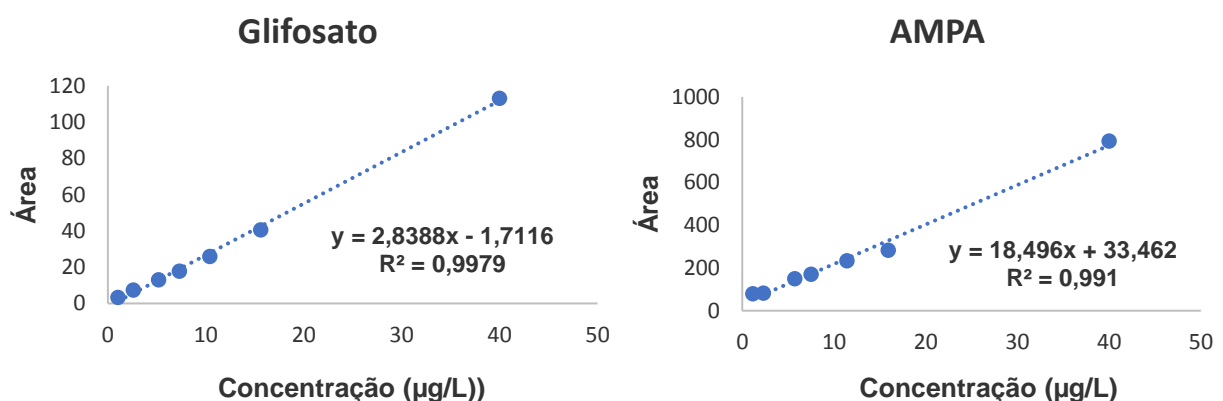


Figura 19- Curvas de calibração do glifosato e AMPA em concentrações de 1 a 15 ppb e 40 µg/L nas condições experimentais da figura 12; 1) $y = (2,8 \pm 0,2) x - (2 \pm 3)$ – Glifosato; 2) $y = (19 \pm 2) x + (3 \pm 4)$ – AMPA;

Tendo obtido resultados quantitativos na detecção dos compostos em estudo usando a metodologia B, optou-se por testar este método em amostras reais, tais como água subterrânea,

torneira e superficial. Na tabela 9, encontram-se as condutividades e pH para cada amostra que permitiu evidenciar a respectiva influência nos resultados.

Tabela 9- Condutividades ($\mu\text{s}/\text{cm}$) e pH dos diferentes tipos de água usados neste teste

Tipo de Água	Condutividade ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	pH
Torneira	200	7 - 8
Subterrânea I	39,1	6,1
Subterrânea II	206	7,3
Superficial	260 – 270	7,6 – 7,7

- Ensaios de Recuperação

No âmbito desta metodologia foram realizados ensaios de recuperação para amostras de água subterrânea I e da torneira. Nas figuras 17 e 18 apresentam-se as retas de calibração de cada composto para padrões de concentrações 1, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{L}$.

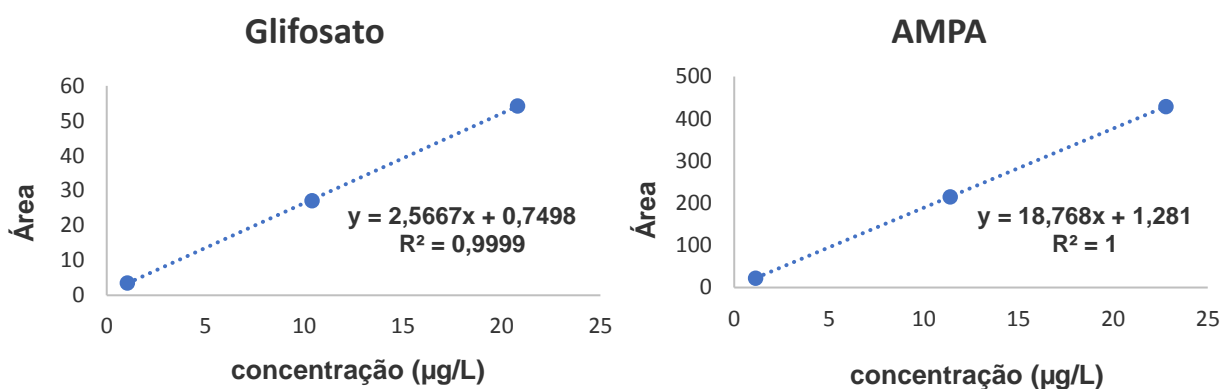


Figura 20- Curvas de calibração do glifosato e AMPA em concentrações de 1, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ numa amostra de água subterrânea I nas condições experimentais da figura 12; 1) $y = (2,6 \pm 0,4) x + (1 \pm 5)$ - Glifosato; 2) $y = (18,8 \pm 0,2) x + (1 \pm 4)$ - AMPA

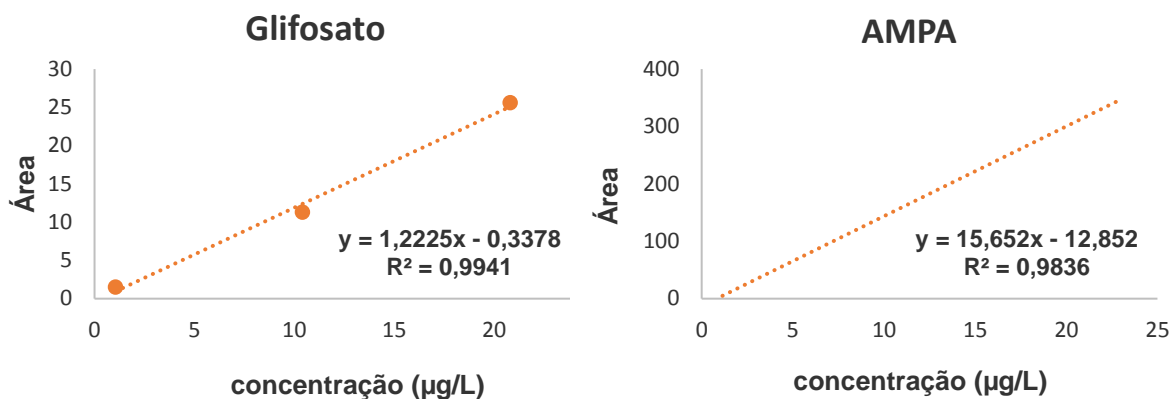


Figura 21- Curvas de calibração do glifosato e AMPA em concentrações de 1, 10, 20 µg/L numa amostra de água da torneira nas condições experimentais da figura 12; 1) $y = (16,1 \pm 0,3) x - (1 \pm 1)$ - Glifosato; 2) $y = (3,8 \pm 0,1) \times 10^2 x - (2 \pm 3) \times 10$ - AMPA

Nas tabelas 10 e 11, apresentam-se os resultados obtidos para este tipo de ensaios. As recuperações foram calculadas a partir das equações da reta presente na figura 19. Para a amostra de água subterrânea I obtiveram-se recuperações de $96\% \pm 2$ para o glifosato e $99\% \pm 6$ para o AMPA. Em relação a água da toneira as recuperações foram de $45\% \pm 2$ para o glifosato e $64\% \pm 18$ para o AMPA.

Tabela 10- Resultados obtidos para os ensaios de recuperação do glifosato e AMPA na amostra água subterrânea I realizados segundo a metodologia B

	Amostra	Concentração (µg/L)	Áreas	Rec (%)
Glifosato	79314	10,4	27,1	98
		20,8	54,3	95
AMPA		11,4	215	94
		22,8	429,3	103

Tabela 11- Resultados obtidos para os ensaios de recuperação do glifosato e AMPA na amostra água da torneira realizados segundo a metodologia B

	Amostra	Concentração (µg/L)	Áreas	Rec (%)
Glifosato	Água torneira	10,4	27,1	44
		20,8	54,3	46
AMPA		11,4	215	51
		22,8	429,3	76

Tendo em conta aos resultados anteriores, é possível verificar que com a amostra de água subterrânea I obtiveram-se recuperações reprodutíveis e no intervalo de 96% a 99% para as

concentrações em estudo. O mesmo não se verificou para amostra de água da torneira que se voltaram a fazer novos ensaios de recuperação não só com este tipo de amostra como também para uma nova amostra de água subterrânea (amostra II). Usou-se também uma amostra de água superficial que passou por um processo de filtração utilizando filtros de seringa MS® PTFE, 0,22 µm de porosidade e seringas esterilizadas de 5 mL e seguidamente utilizou-se condições experimentais dos ensaios anteriores.

Nas tabelas 12, 13 e 14 apresentam-se os novos resultados dos ensaios de recuperação para as amostras de água subterrânea II, da torneira e superficial, respetivamente. As recuperações foram calculadas a partir da equação da reta que se encontra no Anexo C.

Tabela 12- Resultados obtidos para os ensaios de recuperação do glifosato e AMPA na amostra de água da subterrânea II realizados segundo a metodologia B

	Amostra	Concentração (µg/L)	Áreas	Rec (%)
Glifosato	85091	1,04	29,7	115
		5,2	141,4	109
		10,4	231,8	89
AMPA		1,14	92	86
		5,7	505	103
		11,4	1022,1	105

Tabela 13- Resultados obtidos para os ensaios de recuperação do glifosato e AMPA na amostra água da torneira realizados segundo a metodologia B

	Amostra	Concentração (µg/L)	Áreas	Rec (%)
Glifosato	Água torneira	1,04	21,9	85
		5,2	113,3	87
		10,4	279,5	107
AMPA		1,14	79,5	73
		5,7	466,3	95
		11,4	879,1	90

Tabela 14- Resultados obtidos para os ensaios de recuperação do glifosato e AMPA na amostra de água superficial realizados segundo a metodologia B

	Amostra	Concentração (µg/L)	Áreas	Rec (%)
Glifosato	5324	1,04	-	-
		5,2	23,1	18
		10,4	50,1	19

AMPA		1,14	92,6	86
		5,7	-	-
		11,4	273,9	27

No caso da água subterrânea II as recuperações para o glifosato e para o AMPA são reprodutíveis e na gama de $104\% \pm 14$ para o glifosato e $98\% \pm 10$ para o AMPA. São também semelhantes, dentro do erro experimental, aos determinados para a amostra de água subterrânea I.

As recuperações obtidas para a água da torneira na tabela 13 podem considerar-se aceitáveis em comparação aos resultados da tabela 11 em particular para o glifosato, uma vez que neste ensaio foi adicionado tiosulfato de sódio para remover a ação do cloro na água, tendo que se obteve uma recuperação média de $93\% \pm 12$.

Os valores da condutividade da água superficial referentes a tabela 9 são valores plausíveis. No caso da água superficial os resultados não são aceitáveis, pois é difícil de detetar o porque dos resultados das recuperações não serem satisfatórios. Neste caso, as baixas recuperações obtidas podem vir nomeadamente do seguinte fator: No Processo de filtração, ou seja, o filtro utilizado (Filtro de seringa MS® PTFE, 0,22 μm de porosidade) poderia não ser o mais adequado o que levaria a amostra a conter certos contaminantes que dificultaram a quantificação dos analitos no HPLC.[40][53]

7.1.3. Validação do Método

A validação do método baseou-se nos critérios referidos no capítulo 5 que se encontram explicados em detalhe no Anexo A.

7.1.3.1. Gama de Trabalho

Definiu-se como gama de trabalho para as metodologias A e B as concentrações de 1 a 20 $\mu\text{g/L}$, pelo que se procedeu à sua verificação através dos respetivos estudos de linearidade e dos cálculos de exatidão associados ao método.

7.1.3.2. Calibração Analítica

As curvas de calibração foram traçadas com base na concentração das soluções padrão e na resposta dada pelo instrumento de medição (área), recorrendo para tal ao método dos mínimos quadrados.

Para cada metodologia foi realizada uma curva de calibração. Na tabela 15, encontram-se os valores da reta que mais se adequaram para cada metodologia.

Tabela 15- Coeficiente de correlação (R^2), declive (a) e ordenada na origem (b) obtida para cada curva de calibração tendo em conta a gama de trabalho adotada.

Sessão de Trabalho	Compostos	Coef. de Correlação (r^2)	Declive (a)	Ordenada na Origem (b)
Metodologia A	Glifosato	0,996	(0,9 ± 0,1)	(0 ± 1)
	AMPA	0,999	(1,7 ± 0,1)	(-0,3 ± 0,7)
Metodologia B	Glifosato	0,998	(2,8 ± 0,2)	(-2 ± 3)
	AMPA	0,991	19 ± 2	(3 ± 4)

Quanto ao coeficiente de correlação, obteve-se para estas sessões de trabalho um valor $\geq 0,995$, com exceção da calibração do AMPA pela metodologia B.

- Análise de resíduos

O teste de análise de resíduos consiste em calcular a diferença entre o valor observado e o valor estimado pela equação de regressão obtida. Os resultados obtidos deverão distribuir-se aleatoriamente em torno da linha de ordenado zero.

- Teste de Mandel

O teste de Mandel é realizado para um intervalo de concentrações de 1 - 20 $\mu\text{g/L}$, permitiu obter as funções de calibração linear e não linear. Calculou-se os desvios padrão do glifosato e do AMPA para o ajuste linear ($S_{y/x}$) e polinomial. Desta maneira determinou-se a diferença de variâncias (DS^2) e o valor teste, respetivamente.

- Teste de Rikilt

Este teste permite a análise da linearidade em cada ponto da reta de calibração. Para tal traça-se um gráfico da linearidade de modo a avaliar o seu comportamento linear. Os valores obtidos não deverão exceder um desvio superior a 10% para que se possa admitir linearidade.

As respostas lineares foram avaliadas em termos dos testes (análises de resíduos, teste de Mandel e teste de Rikilt) e os resultados resumem-se na tabela 16, mais detalhes são dados no anexo B.

Tabela 16- Resumo dos resultados obtidos para os testes de linearidade para as duas metodologias de trabalho.

		Metodologia A		Metodologia B	
		Glifosato	AMPA	Glifosato	AMPA
Análise de Resíduos (< 20 %)		-10,01;16,48	-10,08;21,95	-1,8;4,6	-2,1;1,4
Teste de Mandel (VT<F)	DS ²	0,57	0,05	0,29	1,57
	VT	2,35	0,32	5,94	0,28
	F	18,513	18,513	18,513	10,128
Teste de Rikilt (90 – 110 %)		97-105	98-102	95-107	90-116

7.1.3.3. Limiares Analíticos

Para o presente trabalho determinou-se o LQ e LD com base nas curvas de calibração (CCs) das metodologias testadas recorrendo para tal às equações (8) e (9) do Anexo A. Os valores obtidos para estes limites encontram-se agrupados na tabela 17.

Tabela 17- Valores obtidos para o LQ e LD com base nas CC's

	LD (µg/L)		LQ (µg/L)	
	Glifosato	AMPA	Glifosato	AMPA
Metodologia A	0,4	0,5	1,2	1,6
Metodologia B	0,5	0,5	1,4	1,4

Para ambas metodologias se assumiu que o LQ é o primeiro ponto da reta (1 µg/L) o que permitiu um LD de 0,30 µg/L.

7.1.3.4. Exatidão

A exatidão foi estudada com base em ensaios de recuperação das amostras reais. Foram realizados ensaios de recuperação para as amostras, água da torneira, águas subterrâneas, os resultados obtidos encontram-se na tabela 18.

Tabela 18- Resultados obtidos para o estudo de exatidão nas matrizes água de consumo para a metodologia B.

Metodologia B	Água subterrânea I		Água da torneira (1)		Água subterrânea II		Água da torneira (2)
	GLI	AMPA	GLI	AMPA	GLI	AMPA	GLI
n	2	2	2	2	3	3	3
Méd Rec (%)	96	99	45	64	104	98	93
Desvio Padrão	2	6	2	18	14	10	12
% RSD	2	6	4	28	13	10	13

Verifica-se que no caso das amostras de águas subterrâneas (I e II) e água da torneira (2) as recuperações médias são superiores a 80%. No caso da água da torneira (1) obteve-se recuperações baixas. Relativamente aos desvios padrão estes foram inferiores a 20%.

7.2. Comparação entre as metodologias A e B

Na tabela 19 comparam-se as metodologias A e B em termos dos tempos de retenção, LD, LQ, números de pratos teóricos (N_T), H e as percentagens de recuperação nos vários tipos de água testados.

Tabela 19- Comparação de resultados obtidos pelas metodologias A e B

		Metodologia A		Metodologia B	
		Glifosato	AMPA	Glifosato	AMPA
Tempo de retenção (min.)		6,185	2,751	2,600	7,007
N_T (nº de pratos teóricos)		(3,4±0,9) x10 ³	(3,9±0,6) x10 ³	(3,1±0,1) x10 ³	(3,8±0,6) x10 ³
H (cm)		4,34x10 ⁻³	3,81x10 ⁻³	4,77x10 ⁻³	4,00x10 ⁻³
LD		0,4	0,5	0,5	0,5
LQ		1,2	1,6	1,4	1,4
% Recuperação	Água da torneira I	<hr style="width: 10%; margin: auto;"/>		45	64
	Água da torneira II			93	86
	Água subterrânea I			96	99
	Água subterrânea II			104	98
	Água superficial			-	-

É de destacar que os tempos de retenção observados para o glifosato e o AMPA nas duas metodologias são diferentes (tabela 19 e cromatogramas apresentados nas figuras 14 e 18). Isto deve-se ao facto de serem diferentes as fases estacionárias (colunas) e móveis usadas em cada metodologia e da diferente afinidade dos analitos para cada uma das fases envolvidas.

Com base nos resultados da tabela 19, pode-se concluir que de entre as metodologias utilizadas, a metodologia A é mais sensível que a metodologia B, isto deve-se facto de a coluna utilizada neste processo (coluna NH₂), apresentar um número de pratos teóricos superior em relação a coluna C8 utilizada na metodologia B, ou seja, as duas colunas por mais que tenham um tamanho idêntico, como mostra na tabela 4, o facto de possuírem tamanhos da partícula diferentes consegue-se ter uma melhor percepção da sensibilidade entre elas.

Em relação aos ensaios de recuperação, estes foram testados a partir da metodologia B, pois a coluna utilizada na metodologia A acabou por deteriorar ao longo dos ensaios. No entanto, se obteve recuperações aceitáveis para as águas em estudo com uma única particularidade na água superficial, que não se obteve resultados de recuperação plausíveis nomeadamente pela existência de interferentes na água que resultou na dificuldade da quantificação dos analitos.

Em suma, devido aos motivos explicados anteriormente a metodologia A revelou-se ser a mais indicada para a quantificação do glifosato e do AMPA.

8. Conclusões e Perspetivas Futuras

O trabalho realizado consistiu no desenvolvimento, otimização e validação de um método analítico de quantificação do glifosato e AMPA em águas de consumo, baseado na utilização de HPLC-FLD combinado com uma derivatização inicial para tornar o analito alvo detetável no espectro de fluorescência.

Na validação do método analítico teve-se em conta a necessidade de satisfazer os requisitos mínimos impostos pelo Decreto-Lei nº 152/2017 de 7 de dezembro. O limite de quantificação do método HPLC-FLD para a análise do glifosato e o seu metabolito, foi de 1 µg/L, sendo um valor superior ao limite imposto por lei de 0,1 µg/L.

Relativamente a validação do método, a linearidade foi um parâmetro a ser estudado e como gama de trabalho optou-se pela utilização da gama compreendida entre 1-20 µg/L. Esta gama de linearidade foi estudada cumprindo os requisitos dos testes estatísticos estudados, tais como o teste de Mandel, teste de Rikilt e análise de resíduos. A exatidão foi também estudada, tendo-se obtido desvios padrão entre 2-18 %.

Na validação do método global para a quantificação do glifosato e o AMPA em águas de consumo, foram otimizadas duas metodologias A e B, em que se assegurou como recurso a derivatização utilizando como reagente FMOC-Cl.

Entre as duas metodologias estudadas, a metodologia A utilizando a coluna NH₂ foi a mais adequada para este método pois conseguiu-se alcançar concentrações menores, de 0,1 µg/L mas o facto de a coluna ter deteriorado ao fim de alguns testes, impossibilitou o tratamento de mais ensaios na mesma e deste modo deu-se continuidade aos estudos na coluna C8.

Com o confinamento gerado pela pandemia – COVID-19, que se vive atualmente, não foi possível realizar mais ensaios em prol de novos conhecimentos pois a dificuldade em arranjar material para novas experiências foi maior.

Uma vez que, o laboratório providencia do aparelho UPLC para estudos internos seria bom continuar a elaborar mais testes relacionados ao glifosato de modo a comparar com os testes feitos anteriormente no HPLC mas devido a situação atual, não foi possível.

É necessário frisar que a utilização do FMOC-Cl no processo de derivatização possui alguns problemas no tempo de vida da coluna cromatográfica deteriorando-a mais facilmente. Deste modo penso que seria benéfico o desenvolvimento de uma nova técnica de nanofiltração centrífuga, em que consiste obter fatores de concentração superiores a 20, reduzindo o volume das amostras para 100 µL de concentrado.

Visto que, esta técnica poderá ser utilizada para substituir a utilização do FMOC-Cl e proporcionar um maior tempo de utilização da coluna em relação aos ensaios dos analitos estudados.

Neste caso, por mais poucos testes realizados para a detetar e otimizar o glifosato e o AMPA, com base neste projeto foi possível adquirir novos conhecimentos de cromatografia líquida mesmo não tendo experiência nesta área.

Contudo, foram conhecimentos enriquecedores e de mais valia para o meu futuro e deu-me muito gosto em trabalhar mesmo com todas as advertências no percurso.

Referências

- [1] GLIFOSATO, SAÚDE E AMBIENTE - uma revisão Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina. [site] Disponível em: <https://repositorioaberto.up.pt/bitstream/10216/110203/2/243909.pdf>
- [2] LAIST, “O Labortório,” [Online]. Disponível em: https://la.tecnico.ulisboa.pt/O_Laboratorio.html [site]. [Acedido no dia 2 de fevereiro de 2020].
- [3] Uso sustentável de pesticidas. Análise comparativa entre a União Europeia e o Brasil. [site]. Disponível em: https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/23971/1/ulsd072867_td_Marcia_Goncalves.pdf [Acedido em fevereiro de 2020].
- [4] ALS [site]. Disponível em: alsenvironmental.co.uk. [Acedido no dia 8 de março de 2020].
- [5] Monografia sobre el Glifosato. [site]. Disponível em: www.conacyt.gob.mx/cibiogem [Acedido em fevereiro de 2020].
- [6] Dill GM, Cajacob CA, Padgett SR. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Manag Sci*. 2008;64(4):326-31).
- [7] Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N., & Kabsch, W. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1376-1380.
- [8] Gomes MP, Smedbol E, Chalifour A, Henault-Ethier L, Labrecque M, Lepage L, et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *J Exp Bot*. 2014;65(17):4691-703.
- [9] National Center for Biotechnology Information. [site]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate> . [Acedido no dia 19 de março de 2020].
- [10] Chen, Y., Wu, F., Lin, Y., Deng, N., Bazhin, N., & Glebov, E. (2007). *Photodegradation of glyphosate in the ferrioxalate system*. *Journal of Hazardous Materials*, 148(1-2), 360–365.
- [11] Jennings LB, Shuvaev S, Fox MA, Pal R, Parker D. Selective signalling of glyphosate in water using europium luminescence. *Dalton Trans*. 2018;47(45):16145-54.
- [12] Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur*. 2016;28(1):3.
- [13] Ph.D JAH. Drinking Water Assessment for the Registration Review of Glyphosate. In: AGENCY USEP, editor. 2017.
- [14] Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur*. 2016;28(1):3.

- [15] Lista de pesticidas a pesquisar em água destinada ao consumo humano ERSAR.PT. [site]. Disponível em: http://www.ersar.pt/pt/site-o-que-fazemos/site-consultas-publicas/Paginas/Lista_de_Pesticidas_Portugal%20continental_2019_2020_2021.pdf. [Acedido dia 19 de maio de 2020].
- [16] Ingredients Used in Pesticide Products. [site]. Disponível em: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/glyphosate>. [Acedido no dia 25 de março de 2020].
- [17] Glyphosate in Review Midpeninsula Regional Open Space District. [site]. Disponível em: <https://www.glyphosate.eu/>. [Acedido dia 26 de março de 2020].
- [18] Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ.* 2018;616-617:255-68; Gress S, Lemoine S, Seralini GE, Puddu PE. Glyphosate-based herbicides potently affect cardiovascular system in mammals: review of the literature. *Cardiovasc Toxicol.* 2015;15(2):117.
- [19] EPA Takes Next Step in Review Process for Herbicide Glyphosate, Reaffirms No Risk to Public Health. [site]. Disponível em: <https://www.epa.gov/newsreleases/epa-takes-next-step-review-process-herbicideglyphosate-reaffirms-no-risk-public-health>. [Acedido no dia 19 de agosto de 2020].
- [20] Tang T, Boenne W, Desmet N, Seuntjens P, Bronders J, van Griensven A. Quantification and characterization of glyphosate use and loss in a residential area. *Sci Total Environ.* 2015;517:207-14.
- [21] Kjær J OP, Ullum M, Grant R. Leaching of Glyphosate and Amino-Methylphosphonic Acid from Danish Agricultural Field Sites: *J. Environ. Qual.* 34:608–620 (2005); 2005.
- [22] Munira S, Farenhorst A, Flaten D, Grant C. Phosphate fertilizer impacts on glyphosate sorption by soil. *Chemosphere.* 2016;153:471-7.
- [23] Borggaard OK, Gimsing AL. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Manag Sci.* 2008;64(4):441-56.
- [24] Dideriksen K, Stipp SLS. The adsorption of glyphosate and phosphate to goethite: a molecular-scale atomic force microscopy study. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 2003;67(18):3313-27.
- [25] Ibanez M, Pozo OJ, Sancho JV, Lopez FJ, Hernandez F. Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2006;1134(1-2):51-5.
- [26] F. Veiga JMZ, M.L. Fernandez Marcos, E. Alvarez. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. 2001:135-44
- [27] Gimsing AL, Borggaard OK, Bang M. Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils. *European Journal of Soil Science.* 2004;55(1):183-91.

- [28] Siemens J, Ilg K, Lang F, Kaupenjohann M. Adsorption controls mobilization of colloids and leaching of dissolved phosphorus. *European Journal of Soil Science*. 2004;55(2):253-63.
- [29] Wang S, Seiwert B, Kastner M, Miltner A, Schaffer A, Reemtsma T, et al. (Bio)degradation of glyphosate in water-sediment microcosms - A stable isotope co-labeling approach. *Water Res*. 2016;99:91-100.
- [30] Forlani G, Mangiagalli A, Nielsen E, Suardi CM. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*. 1999;31(7):991-7.
- [31] Gimsing AL, Borggaard OK, Jacobsen OS, Aamand J, Sørensen J. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils. *Applied Soil Ecology*. 2004;27(3):233-42.
- [32] DIRETIVA (UE) 2015/1787 DA COMISSÃO de 6 de outubro de 2015. [Acedido em 11 de agosto de 2019].
- [33] Diário da República, 1.ª série — N.º 235 — 7 de dezembro de 2017. [Acedido em 11 de agosto de 2019]. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/114315242>
- [34] SOME ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDES AND HERBICIDES VOLUME 112; IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. [site]. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/> . [Acedido em maio de 2020].
- [35] Sanchis J, Kantiani L, Llorca M, Rubio F, Ginebreda A, Fraile J, et al. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2012;402(7):2335-45.
- [36] Ibanez M, Pozo OJ, Sancho JV, Lopez FJ, Hernandez F. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005;1081(2):145-55.
- [37] Sanchis J, Kantiani L, Llorca M, Rubio F, Ginebreda A, Fraile J, et al. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2012;402(7):2335-45. /fluorescence detection. *Open Chemistry*. 2015;13(1).
- [38] Guo H, Wang H, Zheng J, Liu W, Zhong J, Zhao Q. Sensitive and rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos and metabolites by UPLC-MS/MS using a modified Quick Polar Pesticides Extraction method. *Forensic Sci Int*. 2018;283:111-7.
- [39] J. Patsias AP, E. Papadopoulou-Mourkidou. Automated trace level determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by

- cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization. *Journal of Chromatography A*, 932 (2001) 83–90. 2001.
- [40] Hanke I, Singer H, Hollender J. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Anal Bioanal Chem*. 2008;391(6):2265-76.
- [41] I. Jardim e L. Maldaner, “O Estado da Arte da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência,” *Química Nova*, vol. 32, p. 1, 2008.
- [42] Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch - *Principles of Instrumental Analysis* 7th edition Skoog 40.8MB(2016, Cengage Learning).
- [43] HPLC and UHPLC Systems. [site]. Disponível em: <https://www.idex-hs.com/literature-tools/educational-materials/hplc-center/> .[Acedido em maio de 2020].
- [44] Hypersil™ APS-2 HPLC Columns, 5µm Particle Size [site]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/30705-102130#/30705-102130>. [Acedido em maio de 2020].
- [45] Hypersil. [site]. Disponível em: <https://www.hplc.eu/thermo.htm> . [Acedido em agosto de 2020].
- [46] Agilent Zorbax. [site]. Disponível em: <https://www.bgb-info.com/files/master/Agilent/880968-001f.pdf> . [Acedido em agosto de 2020].
- [47] How Does High Performance Liquid Chromatography Work? [site]. Disponível em: https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-HighPerformance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=en_US&cid=10049055 . [Acedido em 24 de abril de 2020].
- [48] Wang, S., Liu, B., Yuan, D., & Ma, J. (2016). A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Talanta*, 161, 700-706.
- [49] G. Sarmiento, “Manual de Métodos: Procedimento de Validação de Métodos Cromatográficos,” Laboratórios de Análises IST, Lisboa, 2015.
- [50] Relacre, “Guia Relacre 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química,” Relacre, Lisboa, 2000.
- [51] Catrinck, T. C., Dias, A., Aguiar, M. C. S., Silvério, F. O., Fidêncio, P. H., & Pinho, G. P. (2014). A simple and efficient method for derivatization of glyphosate and AMPA using 9-fluorenylmethyl chloroformate and spectrophotometric analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(7), 1194-1199.
- [52] Zuliang Chen, Wenxiang He, Michael Beer, Mallavarapu Megharaj, Ravendra Naidu (2009-05-15). "Speciation of glyphosate, phosphate and aminomethylphosphonic acid in soil extracts by ion

chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry with an octopole reaction system". *Talanta*. 78 (3): 852.

[53] Demonte LD, Michlig N, Gaggiotti M, Adam CG, Beldomenico HR, Repetti MR. Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. *Sci Total Environ*. 2018;645:34-43.

Anexo A

Critérios de Validação

Uma metodologia analítica para que seja validada, devem-se avaliar os seguintes pontos:

- Âmbito do Método

Neste momento deve ser feita uma descrição e caracterização do método, principalmente no tipo de amostras que se aplicam e nas espécies químicas que se pretende identificar e/ou quantificar. Para o presente trabalho pretende-se efetuar a determinação do Glifosato e AMPA em amostras de águas de consumo. [49][50]

- Gama de Trabalho

Neste ponto, a gama de trabalho pode ser obtida através de estudos de linearidade e estabelecida verificando a exatidão e a precisão nos seus extremos (ponto mínimo e máximo), uma vez que o seu intervalo deve corresponder à concentração exetável das amostras. O valor determinado para a concentração mais baixa deverão ser significativamente diferentes dos do branco. Se o valor obtido para a amostra supera, até cerca de 10%, o valor máximo imposto pela gama de trabalho poderá proceder-se à extrapolação de resultados (isso acontecerá, se se tiver comprovado a linearidade do método). De outra maneira, terá de se diluir a amostra de forma a que esta apresente um valor que se insira na gama de trabalho. [49][50]

- Calibração Analítica

A calibração é um processo que relaciona a resposta dada por um instrumento de medição com uma concentração ou quantidade de substância conhecida. Para tal recorre-se a padrões químicos e/ou materiais de referência. Primeiramente como regra geral, preparam-se uma serie de soluções padrão com concentrações conhecidas, as quais são analisadas num equipamento analítico nas mesmas condições que as amostras e permitem estabelecer uma reta ou curva de calibração (sinal do equipamento em função da concentração) que, posteriormente possibilita determinar as concentrações das amostras por interpolação do seu sinal determinado no equipamento. É utilizada a matriz para a preparação de padrões que deverá ser o mais parecida possível com as amostras.

Há diversos modelos de calibração, sendo o mais utilizado a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

As curvas de calibração no mínimo devem apresentar com 5 pontos de concentrações distribuídas ao longo de toda a gama de trabalho. No final obtém-se uma equação como a equação (1), na qual m corresponde ao declive e o b à ordenada na origem. A curva de calibração é aceite caso o coeficiente de correlação, r^2 , seja maior que 0,995.

$$y = m \cdot x + b \quad (1)$$

A linearidade para se avaliar podem-se aplicar diversos testes, tais como a avaliação visual, análise do coeficiente de correlação ou resíduos, teste de Mandel (ou teste de Fisher/Snedecor) ou teste de Rikilt.

- Análise de resíduos

Este teste consiste em calcular a diferença entre o valor observado e o valor estimado pela equação obtida por regressão linear. Acredita-se que a equação está bem ajustada aos valores experimentais se os resíduos se distribuírem de forma aleatória em torno da linha de ordenada zero e se estes desvios não forem superiores a 20%. Caso estes apresentem uma linha de tendência deve proceder-se a uma nova calibração e, se necessário, ajustar a gama de trabalho.

- Teste de Mandel

É outro teste para avaliar a linearidade realiza-se através de uma ferramenta estatística, de acordo com a norma ISO 8466-1. A partir dos resultados obtidos (pares ordenados, no qual as abcissas correspondem à concentração e as ordenadas ao sinal do equipamento), calcula-se a função de calibração linear e não linear (ISO 8466-1 e 8466-2, respetivamente). Para cada função de calibração calculam-se os respetivos desvios padrão residuais ($S_{y/x}$ e S_{y^2}) de acordo com as equações (2) e (3).

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{N - 2}} \quad (2)$$

$$S_{y^2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y}^2)^2}{N - 3}} \quad (3)$$

Onde N é o número de padrões de calibração, y_i o sinal obtido para um padrão de determinada concentração, \bar{y}_i o sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão de igual concentração e \bar{y}_i^2 o sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração.

De seguida, define-se o valor de teste (VT) através da equação (5), sendo que para chegar a esse valor é necessário calcular previamente a diferença de variâncias (DS²) através da equação (4).

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S_{y/x}^2 - (N - 3) \cdot S_{y^2}^2 \quad (4)$$

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad (5)$$

Por fim, este valor teste (VT) é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher/Snedecor, para um grau de confiança de 95%. Se o valor teste for inferior ou igual a F, então a

função é linear. Caso contrário trata-se de uma função de calibração não linear e, se possível, deve reduzir-se a gama de trabalho de forma a verificar-se a linearidade.

- Teste de Rikilt

O teste de Rikilt permite analisar a linearidade em cada ponto da reta de calibração recorrendo para tal ao método dos mínimos quadrados. Para cada concentração x_i e respetivo sinal y_i tem-se assim uma determinada razão R_i , equação (6).

$$R_i = \frac{y_i}{x_i} \quad (6)$$

Em seguida calcula-se o valor médio de todas as razões R_i e com este é possível determinar a percentagem das razões R_i de acordo com a equação (7).

$$\% = \frac{R_i}{R} \times 100 \quad (7)$$

Para se suceder a linearidade, os valores obtidos não podem apresentar um desvio superior a 10%, caso contrário a gama de trabalho deve ser reduzida até este requisito se verificar.

- **Limiares Analíticos**

A determinação dos limiares analíticos é de extrema importância, nem sempre um sinal instrumental pode ser transformado num resultado analítico.

- Limite de Detecção (LD)

O LD habitualmente corresponde ao início da gama de trabalho, do qual é possível detetar a presença do analito com uma dada confiança estatística (normalmente 95%), ou seja, é possível distinguir o sinal da amostra do sinal do branco. Trata-se assim, da mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra. Experimentalmente uma das formas mais utilizadas para calcular este limite encontra-se transcrita na equação (8).

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{m} \quad (8)$$

Onde $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e m ao declive.

- Limite de Quantificação (LQ)

Por outro lado, o LQ corresponde à menor concentração medida pelo equipamento analítico a partir da qual é possível efetuar uma avaliação quantitativa exata e precisa do analito. Habitualmente corresponde ao padrão de calibração de menor concentração, mas também pode ser calculado através da equação (9).

$$LQ = 3,3 \times LD \quad (9)$$

Este limite pode ainda ser calculado com base na curva de calibração linear e através das medições repetidas de uma solução padrão de acordo com as equações (10) e (11), respetivamente.

$$LQ = \left| \frac{10 \times S_{cc}}{m} \right| \quad (10)$$

$$LQ = |10 \times S_{rep}| \quad (11)$$

Sendo S_{cc} e S_{rep} , respetivamente, o desvio padrão da curva de calibração e o desvio para os ensaios de repetibilidade.

A forma de verificar o valor do limite de quantificação pode ser feita com base, por exemplo, em medições repetidas de uma solução com concentração igual ao LQ. Assim, o LQ está validado quando %RSD é inferior ou igual a 20%. A equação (12) apresenta a fórmula que permite calcular o %RSD, sendo S o desvio padrão e \bar{x} o valor médio obtido para as várias medições da solução.

$$\text{Desvio padrão relativo} = \%RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (12)$$

Precisão

A precisão (ou fidelidade) está relacionada com a dispersão de resultados entre ensaios independentes, realizados na mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições bem definidas. Como também está associada aos erros aleatórios.

A precisão pode ser avaliada pela repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas define-se o conceito de precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial. É destacar que, normalmente, a precisão é apresentada em termos de desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação).

- Repetibilidade

Neste ponto, a repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições semelhantes, nomeadamente no mesmo laboratório, mesmo equipamento, mesmo analista, mesmo tipo de reagentes, com o mesmo procedimento de medição, mesmas condições de trabalho e num curto intervalo de tempo. Por outro lado, a determinação (repetibilidade de um ensaio) é calculada através do desvio padrão de uma série de medições realizadas sobre uma mesma amostra ou sobre padrões independentes, em condições de repetibilidade. Este processo deverá ser repetido sobre uma série de amostras, em diversos níveis de concentração de forma a cobrir toda a gama de trabalho do método.

Assumindo uma distribuição normal de resultados e uma probabilidade de 95% tem-se:

$$\text{Repetibilidade} = r = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot s_r = 2,8 \cdot s_r \quad (13)$$

Sendo s_r o desvio padrão da repetibilidade.

O coeficiente de variação de repetibilidade (CVR), para uma determinada concentração é dado pela equação (14).

$$CV_r = \frac{s_r}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (14)$$

- Reprodutibilidade

A reprodutibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado na mesma amostra ou amostras semelhantes, mas em condições diferentes, as quais incluem diferentes laboratórios, operadores, equipamentos e/ou diferentes dias de análise.

Neste caso a reprodutibilidade é um método é determinada através de ensaios interlaboratoriais. Na equação (15) é possível observar como o desvio padrão de reprodutibilidade (s_R) se relaciona com o desvio padrão entre laboratórios (s_L) e de repetibilidade (s_r), dado que, estes desvios são vulgarmente disponibilizados nestes tipos de ensaios.

$$s_R = \sqrt{s_L^2 + s_r^2} \quad (15)$$

Esta medida pode ser determinada de modo semelhante à repetibilidade, como se comprova na equação (16).

$$\text{Reprodutibilidade} = R = 1,96 \cdot \sqrt{n} \cdot s_R \quad (16)$$

Sendo n o número de medições realizadas e s_R o desvio padrão de reprodutibilidade.

O coeficiente de variação de reprodutibilidade é calculado de acordo com a equação (14), substituindo s_r por s_R .

- Precisão intermédia

A precisão intermédia é determinada sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões independentes, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, sendo definidas as condições a variar. A precisão pode ser calculada através do desvio padrão relativo dos resultados obtidos para réplicas de uma amostra ou padrão de controlo, de acordo com a equação (14).

Exatidão

A Exatidão (ou Veracidade) é geralmente definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o resultado obtido para esta concentração através do método de análise. Está

relacionada com os erros associados a uma dada medição e pode ser avaliada com base em ensaios de recuperação, materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais e métodos de referência.

- Ensaios de Recuperação

Nos ensaios de recuperação adicionam-se quantidades conhecidas do analito em estudo a amostras reais, sendo que a concentração de analito a adicionar deve corresponder a diferentes pontos da gama de trabalho (LQ, ponto médio e máximo da gama de trabalho).

A amostra tal-e-qual é a amostra fortificada são então analisadas e com base nos seus resultados é calculada a taxa de recuperação através da equação (17).

$$\%Rec = \frac{C_s - C_r}{C_a} \quad (17)$$

Onde C_s , C_r e C_a são respetivamente a concentração de analito na amostra fortificada, a concentração de analito na amostra tal e qual e a concentração de analito que foi adicionada à amostra.

Estes ensaios são repetidos n vezes o que permite efetuar uma análise estatística da taxa de recuperação observada com a taxa de recuperação teórica (a qual se assume ser 100%). De destacar que a realização apenas de este tipo de ensaios leva a uma avaliação incompleta da exatidão do método.

Sensibilidade

A sensibilidade define-se como sendo o quociente entre a variação observada no valor lido (ΔL) e a correspondente variação da concentração (ΔC).

$$Sensibilidade = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (18)$$

Desta maneira, a sensibilidade é uma ferramenta que permite avaliar a capacidade que um método (ou equipamento) tem de distinguir pequenas diferenças de concentração do analito em estudo. Da equação (20) retira-se que a sensibilidade corresponde à derivada de primeira ordem da reta de calibração para uma determinada gama de concentrações.

Portanto, é possível afirmar que um método é mais sensível que outro se, para a mesma variação de concentração, a variação do sinal lido for maior.

Seletividade e Especificidade

A seletividade é a capacidade que o método de análise tem na presença de uma mistura complexa, identificar e distinguir um determinado analito sem apresentar interferências de outros compostos. A especificidade é a capacidade que um método tem de conseguir discriminar um determinado analito de outras substâncias presentes na amostra, ou seja, um método é específico se

garantir que o sinal lido provém apenas do analito. De modo a confirmar a existência, ou não, desses possíveis interferentes geralmente recorre-se a ensaios de recuperação ao longo de toda a gama de trabalho. Quando estas taxas de recuperação rondam os 100%, sobretudo diz-se que o método é específico e seletivo

Anexo B – Testes de Validação

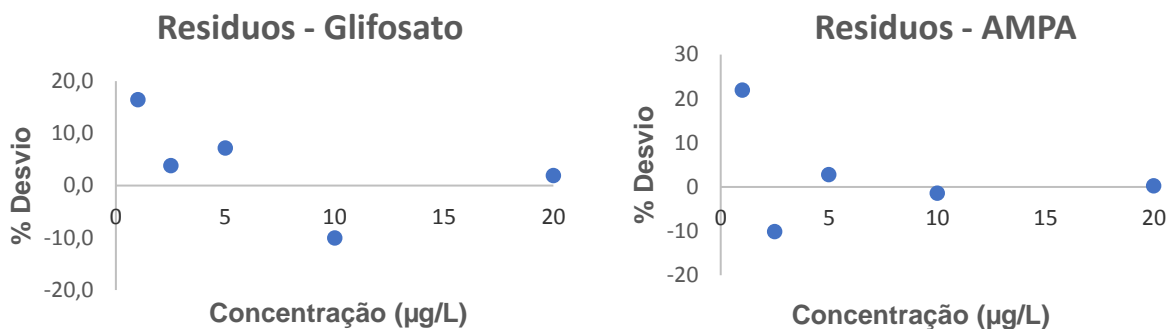


Figura 22- Representação gráfica da análise de resíduos do glifosato e do AMPA efetuada a partir da gama de trabalho da Metodologia A.

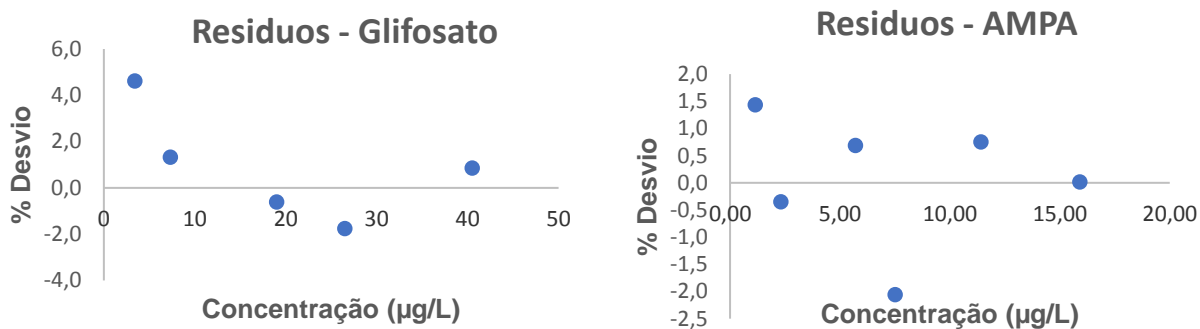


Figura 23- Representação gráfica da análise de resíduos do glifosato e do AMPA efetuada a partir da gama de trabalho da Metodologia B.

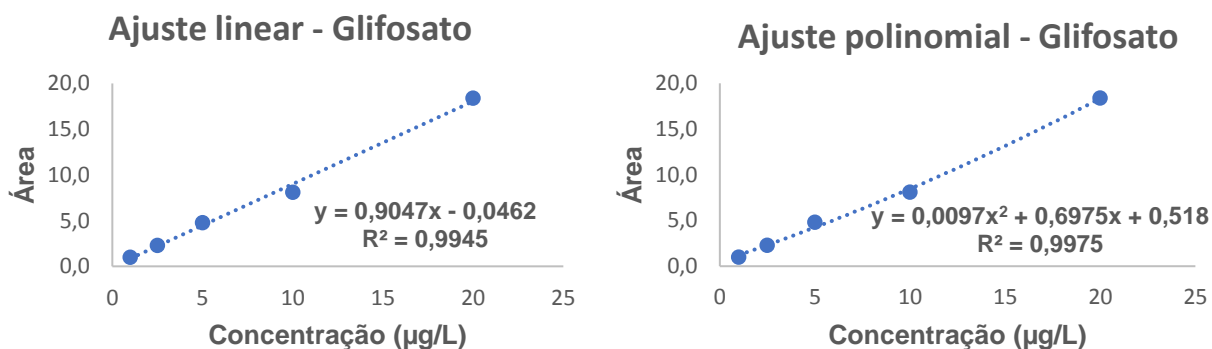


Figura 24- Representação gráfica da função obtida por ajuste linear e polinomial do glifosato efetuadas a partir da Metodologia A.

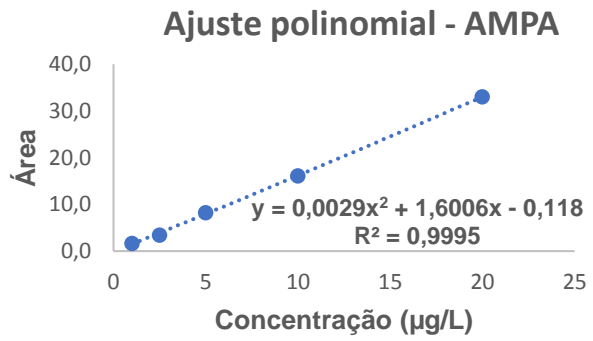
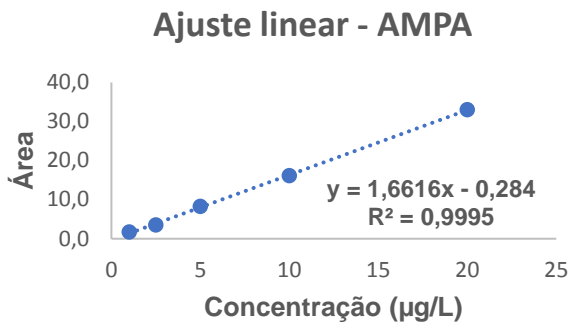


Figura 25- Representação gráfica da função obtida por ajuste linear e polinomial do AMPA efetuadas a partir da Metodologia A.

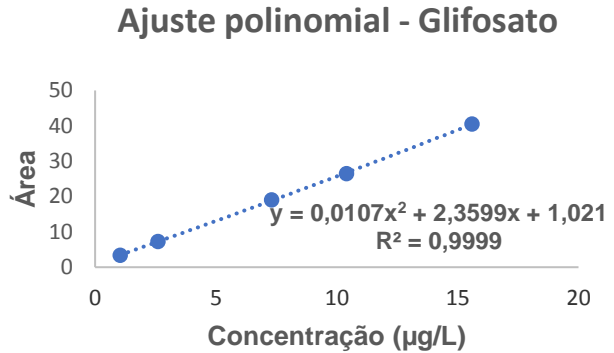
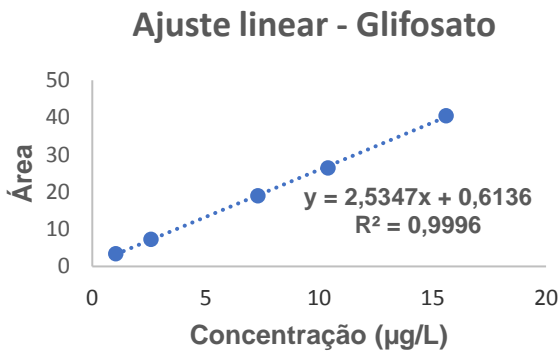


Figura 26- Representação gráfica da função obtida por ajuste linear e polinomial do Glifosato efetuadas a partir da Metodologia B.

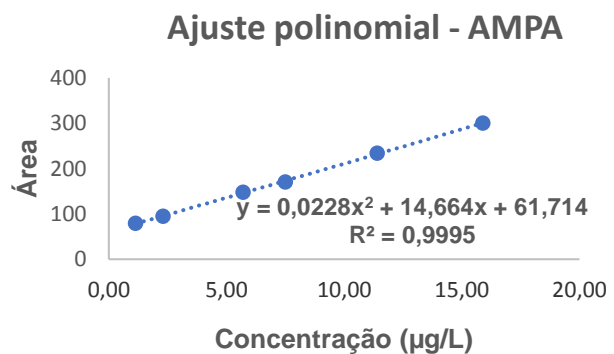
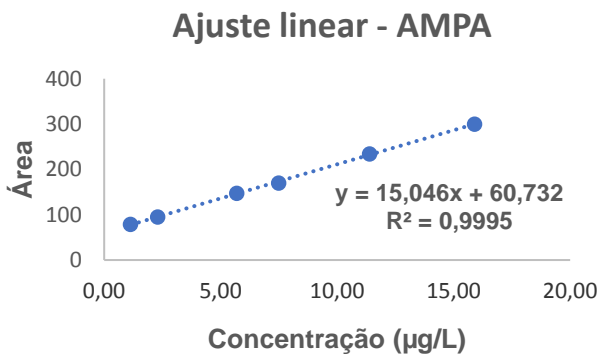


Figura 27- Representação gráfica da função obtida por ajuste linear e polinomial do AMPA efetuadas a partir da Metodologia B.

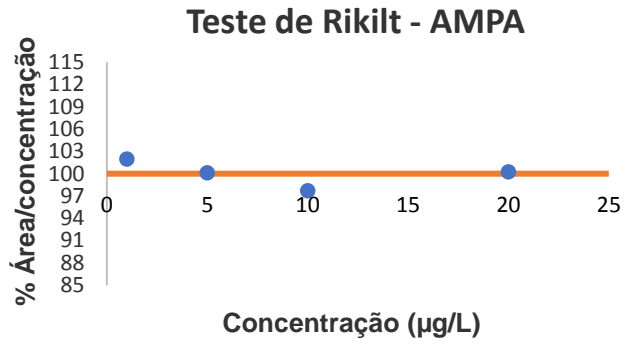
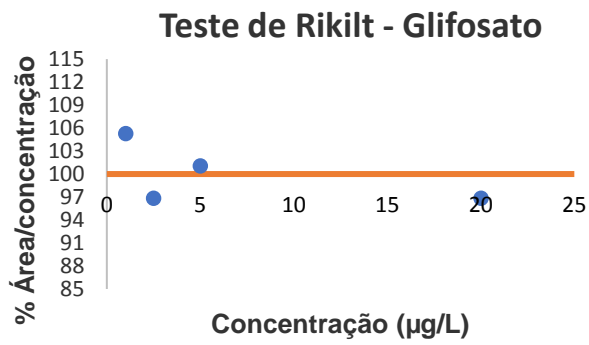


Figura 28- Representação gráfica do teste de Rikilt em relação ao glifosato e AMPA efetuadas a partir da Metodologia A.

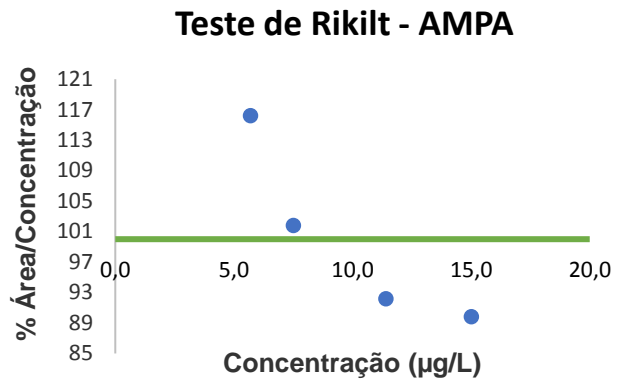
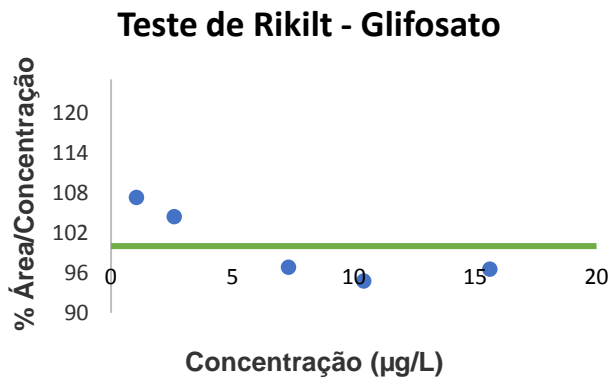


Figura 29- Representação gráfica do teste de Rikilt em relação ao glifosato e AMPA efetuadas a partir da Metodologia B.

Anexo C – Metodologias Testadas

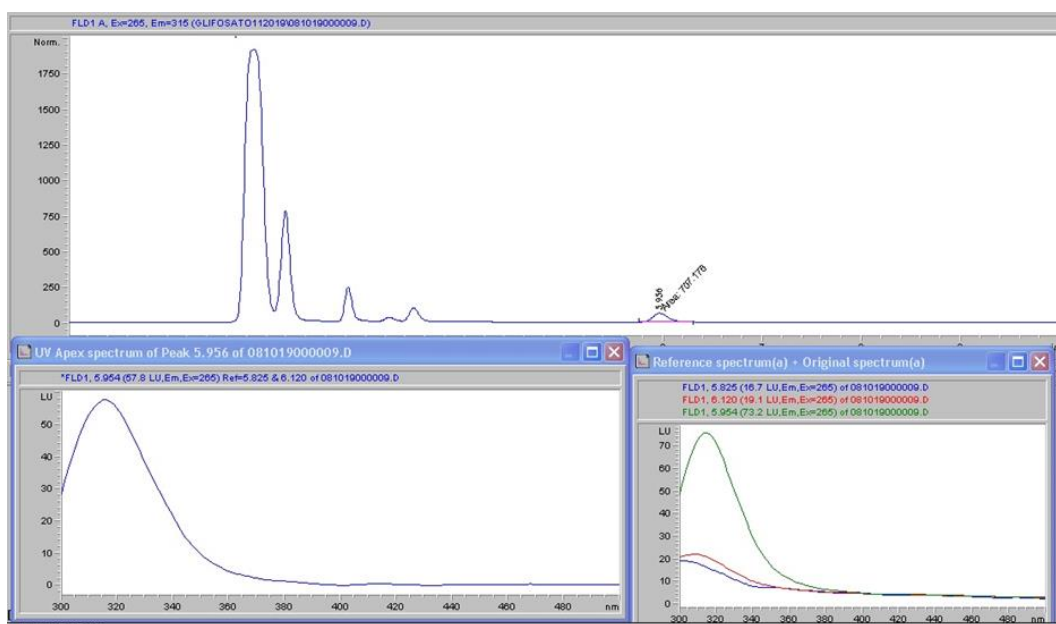


Figura 30- Espectro de emissão do produto de derivatização do glifosato variando o comprimento de onda de excitação na gama 310 a 318 nm.

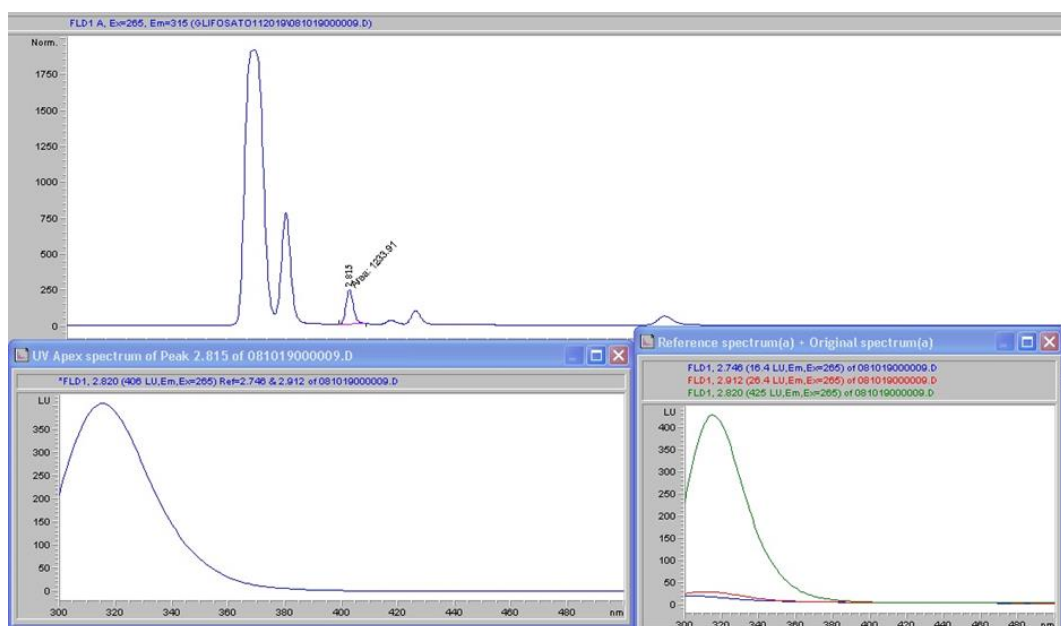


Figura 31- Espectro de emissão do produto de derivatização do AMPA variando o comprimento de onda de excitação na gama 310 a 318 nm.

Tabela 20- Áreas dos cromatogramas relativas ao glifosato e AMPA para os testes em função do volume de FMOC-Cl, para concentrações 0,05 a 2 µg/L.

Tempo de reação (min)	Concentração (µg/L)	200 µL de FMOC-Cl		100 µL de FMOC-Cl		50 µL de FMOC-Cl	
		Glifosato	AMPA	Glifosato	AMPA	Glifosato	AMPA
30	0,05	-	-	-	-	-	-
	0,1	8,53	4,56	3,19	5,34	1,76	4,46
	0,25	10,5	14,7	6,31	10,31	3,9	11,37
	0,5	21,81	45,15	8,42	26,16	8,89	29,16
	1	43,83	84,55	22,55	62,92	18,41	62,51
	2	33,55	196,8	22,26	131,11	28,57	135,76

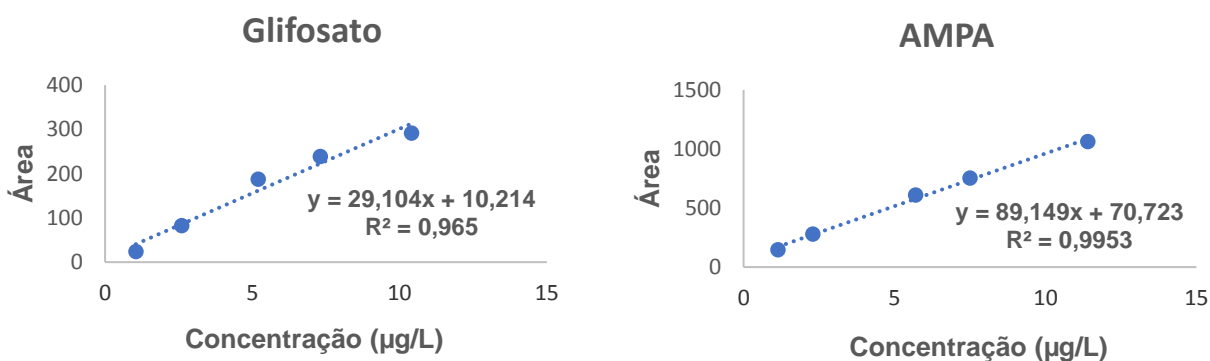


Figura 32- Curvas de calibração do glifosato e AMPA com padrões de concentração de 1 a 10 µg/L, usadas para o cálculo dos ensaios de recuperação para a água da torneira na metodologia A.

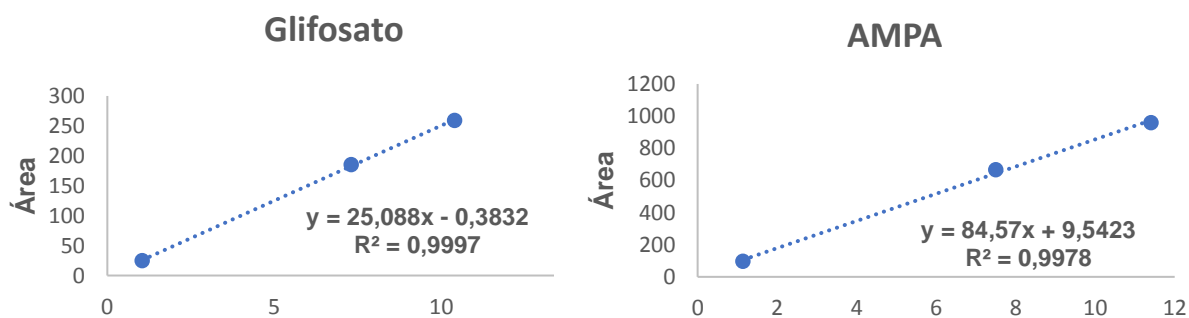


Figura 33- Curvas de calibração do glifosato e AMPA com padrões de concentração de 1 a 10 µg/L, usadas para o cálculo dos ensaios de recuperação para as amostras água subterrânea II, água da torneira II e água superficial na metodologia B.