



Rodrigo Pereira Duarte

Licenciatura em Bioquímica

Otimização e validação de um método SPE-HPLC-DAD para quantificação do glifosato em águas superficiais

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: João Rodrigues, Investigador, LAB-EPAL

Co-orientadora: Ana Lourenço, Professora, FCT-UNL

Setembro, 2019



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Ao meu orientador Doutor João Rodrigues, pelo fornecimento do tema enquadrado nas necessidades da EPAL S.A., pela orientação científica, por tudo o que me ensinou, pela total disponibilidade, apoio e paciência que sempre mostrou, guiando-me no caminho certo. Por toda a preocupação e ajuda certa nas alturas em que eu mais precisava.

À Professora Ana Lourenço, pelo enorme voto de confiança que depositou em mim, por todo o acompanhamento, disponibilidade constante, ajuda, simpatia e exímio espírito de liderança. Agradeço-lhe também por permitir desenvolver este projeto nas instalações do Laboratório de Análises que coordena, pois só assim este foi possível.

À Professora Paula Branco por aceitar a minha candidatura ao mestrado de química bioorgânica que coordena.

Aos coordenadores do laboratório de orgânica pela permissão do uso do HPLC-DAD durante o último ano.

Aos coordenadores do laboratório de ambiente, que me permitiram usar o manifold de SPE.

Ao Vítor Cardoso e à sua equipa de química orgânica do laboratório da EPAL.

Aos meus colegas de laboratório e amigos, Carla Rodrigues, Nuno Costa, e Luz Fernandes, que não só me ensinaram inúmeros valores profissionais como me acompanharam no processo de integração, sempre com espírito aberto e compreensão. Agradeço pelos momentos que passamos juntos, conselhos que humildemente me oferecem, e pelo apoio durante o último ano. É um gosto trabalhar ao vosso lado.

Aos técnicos e bolsiros do departamento de química.

Aos meus colegas de mestrado, pela camaradagem e amizade.

Aos meus amigos, pelos desabafos, conselhos, força e momentos de descontração.

À minha família, Margarida, António e Rafael, que foram os impulsionadores desta jornada, por me apoiarem incondicionalmente, por me darem tantas alegrias e força nos momentos menos bons.

À minha namorada Ana Carvalho, por todo o apoio, ajuda, paciência, compreensão e força que me transmite, por me manter focado no objetivo final, por ser o meu pilar quando preciso, pelos desabafos, conselhos, por aceitar novos desafios comigo e por cuidar de mim.

Espero ter retribuído de alguma forma a todos aqueles que me ajudaram neste percurso,

A todos um Muito Obrigado.

Rodrigo Duarte

Resumo

O glifosato é um herbicida organofosforado pós-emergência de amplo espectro utilizado para controlo de crescimento de plantas. É considerado praticamente não tóxico e não carcinogénico, apesar de vários estudos científicos apontarem o contrário. Graças a esta chamada de atenção por parte da comunidade científica, a comissão europeia pediu uma reavaliação do glifosato, cujos resultados serão conhecidos no fim do ano de 2022. Desta avaliação poderá ser acordado o controlo mais rigoroso deste herbicida em águas.

O objetivo principal do presente trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização e validação de uma metodologia analítica capaz de quantificar glifosato em águas superficiais.

A metodologia desenvolvida e otimizada envolveu o uso da técnica de extração em fase sólida como passo de concentração e de limpeza da amostra, da técnica de cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa, acoplada a um detetor DAD, recorrendo à derivatização do glifosato com FMOC-Cl para aumentar a sua absorção de radiação ultra-violeta.

O método validado permite a quantificação de glifosato a partir de 126 ng/L em amostra de captação de rio, tendo-se obtido recuperações entre 71% e 118% para a gama de linearidade estudada (20-100 µg/L).

Palavras-chave: Águas de superfície, Glifosato, SPE, HPLC-DAD, Derivatização

Abstract

Glyphosate is an organo-phosphorated post-emergence broad spectrum herbicide used for plant growth control. It is considered practically not toxic and not carcinogenic, although the scientific literature disagrees. Thanks to the call from the scientific community, the European commission asked for a revaluation of glyphosate, whose results will be disclosed by the end of the year 2022. From this evaluation, a new directive can introduce a more strict control of glyphosate in water.

The main goal of this work was the development, optimization and validation of a methodology able to quantify glyphosate in surface waters.

The methodology developed and optimized involved the use of solid phase extraction as a concentration and cleaning step, as well as high pressure liquid chromatography in reverse phase and a diode-array detector, relying on FMOC-Cl for derivatization, increasing this molecule's absorption in the ultra-violet region.

The validated method allows the quantification of glyphosate from 126 ng/L in river sample, with recoveries between 71% and 118% for the working range in study (20-100 µg/L).

Key words: Environmental waters, Glyphosate, SPE, HPLC-DAD, Derivatization

Índice

Agradecimentos	III
Resumo/ Abstract	V
Índice de figuras	XI
Índice de tabelas	XIII
Índice de abreviaturas	XV
1.- Introdução	1
1.1 -Glifosato: Ambiente, Saúde e Legislação.....	1
1.1.1 Modo de ação do glifosato	1
1.1.2 Propriedades físico-químicas do glifosato	2
1.1.3 – Introdução no mercado e implicações de risco para a saúde e ambiente	3
1.1.4 Impacte e qualidade da água	5
1.1.5 - Diretivas da união europeia e leis portuguesas para água de consumo	6
1.2 – Metodologia analítica.....	7
1.2.1 Cromatografia	7
1.2.1.1 Cromatografia gasosa	8
1.2.1.2 Cromatografia líquida de alta pressão	8
1.2.1.3 Equipamento de HPLC.....	9
1.2.2 – Detetores	10
1.2.3 –Método de preparação de amostra.....	11
1.2.3.1 Extração em fase sólida (SPE)	12
1.2.3.2 Derivatização.....	13
1.2.4– Estado da arte.....	14
1.3 – Validação de métodos.....	17
1.3.1 - Curvas de calibração	17
1.3.2 - Linearidade	18
1.3.3 - Limiares Analíticos	18
1.3.4 – Precisão.....	19
1.3.5 – Exatidão	20
1.3.6 – Seletividade	21
1.3.7 – Robustez	21
2. Materiais e Métodos.....	23
2.1. Aparelhos/ Equipamentos	23

2.2 Material	23
2.3 Reagentes	23
2.4 Amostras/ pontos de amostragem	24
2.5 Procedimento experimental para análise de glifosato por HPLC-DAD com derivatização	24
2.5.1 Preparação da solução padrão de glifosato 500 mg/L	24
2.5.2 Preparação das soluções necessárias para o passo de derivatização	24
2.5.3 Preparação das soluções necessárias para o passo de cromatografia líquida - eluente	25
2.6 Otimização das condições de derivatização	25
2.6.1 Concentração de borato	25
2.6.2 Concentração de Fmoc-Cl	25
2.6.3 Degradação do glifosato-FMOC (gli-Fmoc).....	25
2.7 Condições de derivatização em amostra	26
2.8 Concentração/extração de amostra por extração em fase sólida, SPE	26
2.9 Condições cromatográficas, HPLC	27
2.10 Ensaio de recuperação	29
2.11 Ensaio de efeito matriz	29
2.12 Determinação da eficiência do processo	30
3. Apresentação e discussão de resultados	31
3.1 Escolha do método	31
3.2. Validação do método de quantificação do glifosato	34
3.2.1. Estudos de linearidade.....	34
3.2.2. Limiares analíticos: limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	43
3.2.3. Precisão instrumental	44
3.3 Validação do método global para a quantificação do glifosato em águas superficiais	46
3.3.1 Seleção das condições de extração em fase sólida (SPE)	46
3.3.2 Derivatização em amostras de águas superficiais	47
3.3.1.1 Tempo de reação	48
3.3.1.2 Avaliação da derivatização	49
3.3.3. Efeito matriz do método cromatográfico	50
3.3.4. Testes de recuperação	50
3.3.4.1. Influência do volume de acetonitrilo na derivatização e no passo de SPE	50

3.3.4.2 Volume de <i>breakthrough</i> e excesso de produto secundário – Fmoc-OH ...	51
3.3.5. Efeito matriz no passo SPE.....	52
3.3.6 Implementação do método - amostras de água de captação	53
4. Conclusões e limitações.....	55
5. Bibliografia.....	57
Anexo I – Espectro UV do gli-Fmoc.....	65
Anexo II – Testes – condições de derivatização.....	66
Anexo III – Cálculos dos limiares analíticos	70
Anexo IV – Gráficos de controlo das curvas de calibração	72
Anexo V – Curva de calibração do gli-Fmoc (100-20 µg/L)	73

Índice de Figuras

Figura 1 – Via metabólica do xiquimato (ácido xiquímico)	1
Figura 2 – Principais produtos de degradação do Glifosato	2
Figura 3 – Constantes de dissociação ácida do glifosato (pKa ₁ 0,8 Fosfónico, pKa ₂ 2,3 Ácido carboxílico, pKa ₃ 5,57 Fosfónico, pKa ₄ 10,3 Amina).....	3
Figura 4 – Preço médio e Kg em aplicações de glifosato em milho e soja nos EUA (1992-2014)	3
Figura 5 –Métodos cromatográficos	7
Figura 6 – Imagem esquemática dos componentes de um HPLC.....	10
Figura 7 – Etapas da técnica de extração em fase sólida (SPE).....	13
Figura 8 – Derivatização de amostra, seguida de concentração/limpeza e cromatografia.	15
Figura 9 – Concentração/limpeza de amostra, seguida de derivatização e cromatografia.	15
Figura 10 – Aparato SPE	27
Figura 11 – Aparelho HPLC Waters Alliance 2695 acoplado ao detetor DAD 2996 Photodiode array detector.	28
Figura 12 – Reação de derivatização.....	33
Figura 13 – Curva de calibração nº3 R ² =0,9998	41
Figura 14 – Análise de resíduos da curva nº3.....	41
Figura 15 – Teste das áreas normalizadas para a curva nº3	41
Figura 16 –Ajuste linear da curva de calibração nº3.....	42
Figura 17 – Ajuste polinomial da curva nº 3.	42
Figura 18 –Estrutura molecular dos enchimentos poliméricos de SPE, Waters Oasis HLB e Phenomenex Strata-X	46
Figura 19 –Resultado da injeção da primeira amostra. Demonstra o desvio do tempo de retenção do pico do glifosato, e co-eluição.....	49
Figura 20 –Esquema de derivatização com fortificação de glifosato e gli-Fmoc	49

Figura 21 – Sobreposição do cromatograma de um padrão de 10 µg/L (preto) com um cromatograma de uma amostra real com fortificação de 10 µg/L (azul). A Seta indica o pico correspondente ao Gli-Fmoc (8,95 min).....**54**

Índice de tabelas

Tabela 1 – Propriedades e características do glifosato.....	2
Tabela 2 – Valor paramétrico para pesticidas individuais e especificações técnicas para a análise e monitorização químicas do estado da água.	7
Tabela 3 – Métodos de análise do glifosato em águas superficiais por cromatografia líquida recorrendo a derivatização.....	16
Tabela 4 – Procedimento de SPE adaptado	27
Tabela 5 – Coluna, caudal, temperatura e programa de gradiente utilizados	28
Tabela 6 – Gama de linearidade, coeficientes de determinação (r^2), declives, ordenada na origem, coeficientes de variação da curva (CVm), análises das áreas normalizadas e resíduos, e os testes de Rikilt e Mandel das 5 curvas de calibração avaliadas.	40
Tabela 7 – Limiares analíticos calculados através dos desvios padrão das curvas de calibração e do desvio padrão de repetibilidade	44
Tabela 8 – Resultados de RSD (%) de três níveis de concentração, avaliados por estudos de repetibilidade e precisão intermédia.....	45
Tabela 9 – Resultados de recuperação do tempo de reação.....	48
Tabela 10 – Resultados do teste da influência da % de acetonitrilo na derivatização e recuperação.....	51
Tabela 11 – <i>Resultados do teste de breakthrough e excesso de FMOC-OH</i>	51
Tabela 12 – <i>Recuperações obtidas nas 3 gamas de concentração (%) e respetivos RSD (%)</i>	52
Tabela 13 – <i>Implementação do método – resultados de derivatização de amostra com e sem partículas, e com fortificação na presença de partículas</i>	53

Índice de abreviaturas

AMPA: Ácido aminometilfosfónico

b: Ordenada na origem da curva de calibração

DAD: Detetor de varrimento por díodos

DCM: Diclorometano

EFSA: Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

EM: Efeito matriz

EP: Eficiência do processo

EPA: Agência de Proteção Ambiental

EPSPS: 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato sintase

GC/MS: Cromatografia gasosa – Espectrometria de massa

HDPP: Polipropileno de alta densidade

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IARC: Agência Internacional de Pesquisa em Cancro

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

LC/MS: Cromatografia líquida – Espectrometria de massa

LD: Limite de deteção

LQ: Limite de quantificação

m: Declive da curva de calibração

MeOH: Metanol

MRC: Material de referência certificado

PP: Polipropileno

PTFE: Politetrafluoretileno

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

REC: Recuperação

RSD: Desvio padrão relativo

S: Desvio padrão dos valores do padrão mais baixo

SPE: Extração em fase sólida

UPLC: Cromatografia líquida de ultra *performance*

UV: Radiação Ultra-Violeta

UV-Vis: Radiação Ultra-Violeta/Visível

X0: média aritmética do teor medido numa série de brancos

σ_0 : Desvio padrão associado a X0

\bar{X} : Média dos valores obtidos

1. Introdução

1.1 -Glifosato: Ambiente, Saúde e Legislação

1.1.1 – Modo de ação do glifosato

Os herbicidas são um grupo de pesticidas especificamente criados para eliminar plantas e a sua aplicação destina-se a zonas onde o crescimento destas é indesejado. Na agricultura, a presença de plantas infestantes compete com os produtos agrícolas, havendo como solução uma grande variedade de herbicidas específicos, bem como de amplo espectro. O herbicida mais utilizado mundialmente é o glifosato^[1] N-(fosfometil)glicina, um herbicida organofosforado pós-emergência, isto é, aplicado sobre as folhas da planta infestante desenvolvida para eliminação e controlo da propagação.

Em termos de modo de ação, o glifosato bloqueia a atividade da enzima 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que catalisa a reação do xiquimato 3-fosfato e fosfoenol piruvato para formar 5-enolpiruvil-xiquimato-3-fosfato, sendo que as reações seguintes formam aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano). A semelhança estrutural do glifosato e do fosfoenol piruvato permite estabelecer com a enzima EPSPS e com o xiquimato-3-fosfato um intermediário, inibindo assim a enzima^[2-4]. De forma a ser usado no controlo de colheitas, foram desenvolvidas plantas resistentes a este herbicida^[1]. Desta forma as colheitas resistentes a glifosato, ou colheitas geneticamente modificadas foram desenvolvidas com a adição do gene CP4-EPSPS, permitindo que a via metabólica do xiquimato funcione, tornando a planta capaz de sobreviver ao glifosato^[3].

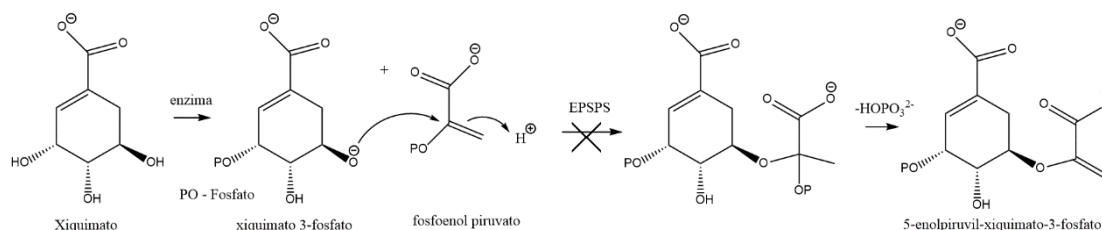


Figura 1 – Via metabólica do xiquimato (ácido xiquímico)^[2].

1.1.2 Propriedades físico-químicas do glifosato

O ácido 2-(fosfonometilamino) acético, conhecido como glifosato é um aminoácido sintético fosforilado, análogo da glicina. Não se degrada fotoquimicamente e é estável ao ar. As suas propriedades encontram-se na Tabela 1. Algumas plantas conseguem degradá-lo a ácido aminometilfosfónico (AMPA), sendo este o seu principal produto de degradação (Figura 2). O AMPA é uma fitotoxina, sendo que a sua ocorrência com o glifosato pode alterar a fisiologia da planta, como afetar a fotossíntese e induzir stress oxidativo^[5].

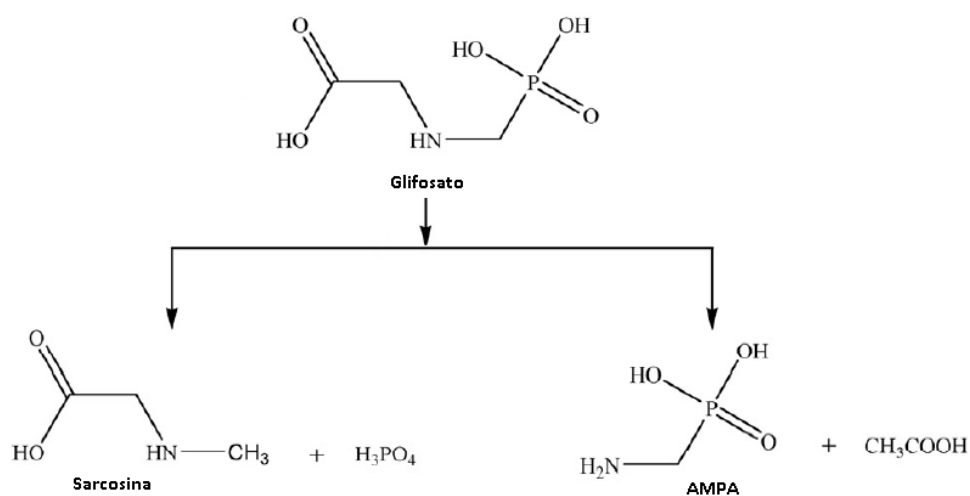


Figura 2 – Principais produtos de degradação do Glifosato^[6].

Tabela 1 – Propriedades e características do glifosato^[7].

Propriedades	Características
Nome IUPAC	Ácido 2-(fosfonometilamino) acético
Aparência	Pó branco
Massa molar	169,07 g/mol
Ponto de fusão	189,5 °C
Solubilidade em água	10,5 g/L
Pressão de vapor	Negligenciável a 20°C

O glifosato é uma molécula zwitteriônica. O grau de protonação da estrutura do glifosato depende do valor de pH em função dos vários valores de pK_a dos grupos com protões acídicos da molécula. Desta forma pode existir com diferentes cargas totais tal como representado na Figura 3.

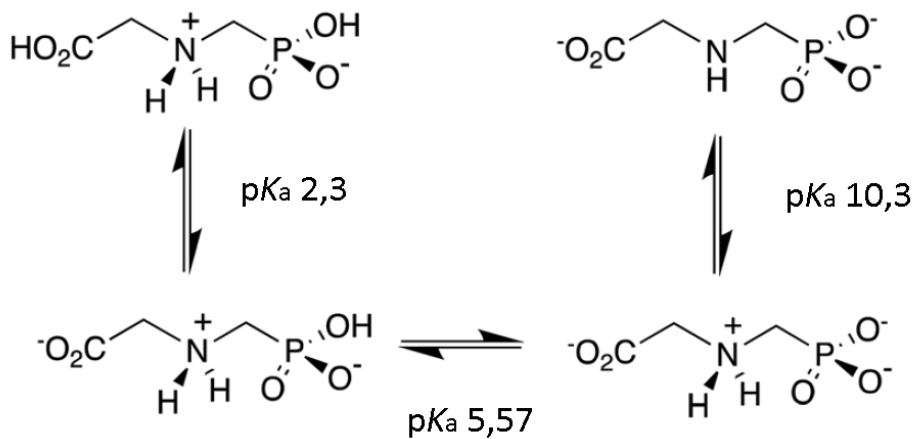


Figura 3 - Constantes de dissociação ácida do glifosato (pK_{a1} 0,8 Fosfónico, pK_{a2} 2,3 Ácido carboxílico, pK_{a3} 5,57 Fosfónico, pK_{a4} 10,3 Amina^[8]).

1.1.3 – Introdução no mercado e implicações de risco para a saúde e ambiente

Em 1970 o herbicida glifosato foi patenteado pela empresa Monsanto, e a formulação de nome *Roundup* começou a ser comercializada nos Estados Unidos da América (EUA), tendo a sua patente expirado em 2000.

O facto de ser um herbicida de amplo espectro, aliado com o desenvolvimento de técnicas de manipulação genética de plantas, permitiu que o volume de mercado do glifosato a nível mundial em 2014 fosse de 826 mil toneladas^[9] (Figura 4) e que em 2019 as colheitas resistentes a glifosato ultrapassassem as 100 espécies^[10].



Figura 4 – Preço médio e Kg em aplicações de glifosato em milho e soja nos EUA (1992-2014)^[9].

A *Environmental Protection Agency* (EPA), em abril de 2019 não apontou riscos para a saúde quando o glifosato é usado de acordo com as instruções, tendo sido considerado praticamente não tóxico, não irritante e não carcinogénico^[11,12]. No entanto indicam que o consumo durante vários anos, pode causar problemas de rins ou dificuldades na reprodução para o consumidor^[13], tendo fixado o nível máximo de contaminação em água de consumo em 0,7 mg/L.

O grupo de trabalho da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) na avaliação do risco do glifosato, concluiu também que é improvável que o glifosato tenha risco carcinogénico para humanos. Foram avaliados dados acerca da toxicologia em mamíferos, destino e comportamento ambiental e ecotoxicologia. Pelos dados recolhidos concluiu-se que o glifosato induz *stress* oxidativo. Este facto, contudo, não é considerado suficiente para classificar o glifosato com potencial carcinogénico de acordo com o regulamento (CE) No 1272/2008^[14].

No entanto o grupo de trabalho da Agência Internacional de Pesquisa em Cancro (IARC) avaliou o risco carcinogénico do glifosato, tendo concluído pela informação recolhida que é provavelmente carcinogénico em humanos. Recolheram provas que indicam danos no ADN em sangue humano, efeitos carcinogénicos significativos em animais de laboratório para tumores nefrológicos raros, forte evidência de genotoxicidade e *stress* oxidativo, e forte evidência de dois mecanismos carcinogénicos^[15].

Discordam da EFSA, assinalando a sua falta de transparência, por estes utilizarem estudos dos quais não se conhecem os autores, por ignorarem indícios mecanísticos importantes e provas de 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.

Van Bruggen *et al.*^[16], na revisão de literatura que publicaram acerca dos efeitos ambientais e na saúde do herbicida glifosato, referem que os problemas associados com o uso em larga escala deste herbicida são mais abrangentes do que o previsto pela EPA. Recomendam pesquisas sobre associações entre exposição a glifosato e distorções em comunidades microbianas, expansão da resistência a antibióticos e surgimento de

doenças animais, humanas e de plantas, para poder elaborar um plano de resposta, envolvendo uma revisão dos limites de tolerância de glifosato na água e em alimentos e o desenvolvimento de estratégias para combater o agravamento dos problemas associados ao seu uso.

Têm sido publicados vários artigos de revisão nos últimos cinco anos que chamam a atenção sobre os níveis de toxicidade hepática, nefrática, reprodutória do glifosato e também quanto à sua neurotoxicidade e carcinogênese^[12,16-19].

A controvérsia sobre a utilização do glifosato envolve por um lado os reguladores e por outros investigadores que buscam entender e esclarecer as implicações da sua utilização como herbicida nos humanos e animais, e no ambiente^[20-25]. São pois necessários estudos mais aprofundados e abrangentes de modo a definir sem dúvidas quais as implicações de risco para a saúde e ambiente da utilização do glifosato.

1.1.4 Impacte e qualidade da água

A aplicação de herbicidas e outros compostos utilizados em agricultura e urbanizações podem ter como destino final águas superficiais e subterrâneas, causando um possível perigo para o ambiente e saúde pública. Este herbicida é usado em florestas, crescimento de zonas relvadas, em zonas urbanas^[26] e em áreas aquáticas para controlo do crescimento de espécies indesejadas^[11].

O glifosato presente no solo tem três formas de dispersão: percolação, ligação ou mineralização.

Percolação:

A percolação consiste no arrastamento do glifosato para a água, sendo, portanto, o processo mais importante em relação ao risco de contaminação do ambiente aquático, extremamente potenciado pela água das chuvas^[26,27]. O pH do solo influencia a percolação, pois uma diminuição do pH resulta num aumento da adsorção do glifosato. Fatores como carbono orgânico não mostraram ter qualquer efeito na adsorção do glifosato^[28].

Ligação:

Esta forma de dispersão consiste na ligação do grupo fosfonato do glifosato a superfícies que contenham óxidos de alumínio ou ferro^[28] por ligações Al–O–P e Fe–O–P. Estas ligações formam superfícies complexas, por coordenação mono ou bidentada^[29,30], e ainda ligação a matéria orgânica por pontes de hidrogénio^[31,32].

Visto que a maioria dos solos contém óxidos bem como silicatos, podem ocorrer adsorções competitivas entre o glifosato e fosfato^[28]. Logo, aplicação de glifosato em solos ricos em fosfato pode comprometer a capacidade do solo para se ligar ao glifosato^[33,34].

Mineralização:

A mineralização consiste na degradação da molécula para dióxido de carbono, amónia, água e sais inorgânicos^[35] que Fornali *et al.*^[36] indicou como possibilidade de esta se dar por atividade microbiana^[35]. Mais tarde Gimsing *et al.* indicou que haveria degradação bacteriana, isolando a estirpe um ano depois^[37].

O tratamento e controlo da água são por essa razão vitais de forma a mitigar a propagação de doenças ou complicações, confirmando que se assegura a distribuição de água apropriada para consumo, satisfazendo as normas de qualidade estabelecidas.

1.1.5 - Diretivas da união europeia e leis portuguesas para água de consumo

A Diretiva (UE) 2015/1787 da Comissão, de 6 de outubro de 2015, que altera os anexos II e III da Diretiva 98/83/CE do Conselho relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano definiu um limite de 0,1 µg/L para pesticidas individuais. Mais tarde, por apreciação parlamentar deu origem ao Decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de dezembro no qual foi definido o valor paramétrico de 0,1 µg/L, 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). Até 31 de dezembro de 2019, os laboratórios devem adaptar-se às características de desempenho dos métodos analíticos, podendo continuar com os métodos acreditados atuais, utilizando exatidão, precisão e limite de deteção como conjunto alternativo de características de desempenho ao limite de quantificação e à incerteza do método^[38,39].

Tabela 2 - Valor paramétrico para pesticidas individuais e especificações técnicas para a análise e monitorização químicas do estado da água.^[38,39]

Parâmetro	Valor paramétrico (µg/L)	Exatidão (% do VP)	Precisão (%do VP)	LOD (% do VP)
Pesticidas individuais	0,1	25	25	25

A comissão europeia apontou quatro membros para fazerem a avaliação ao glifosato, no que toca ao impacte na saúde e no ambiente, sendo eles a França, Hungria, Holanda e Suécia, devendo estes chegar a um consenso durante a avaliação^[40].

Desta forma o glifosato pode ser usado como substância ativa em produtos de proteção de plantas até 15 de dezembro de 2022 sendo que as empresas que querem manter a aprovação para vender, terão de submeter um requerimento até ao fim deste ano^[11].

1.2 – Metodologia analítica

1.2.1 Cromatografia

A cromatografia pode ser definida como o método físico de separação no qual os componentes a ser separados estão distribuídos entre duas fases, em que uma é estacionária (fase estacionária) e a outra (fase móvel) móvel numa direção definida^[41]. A cromatografia pode ser separada em dois métodos, cromatografia planar e por coluna (Figura 5).

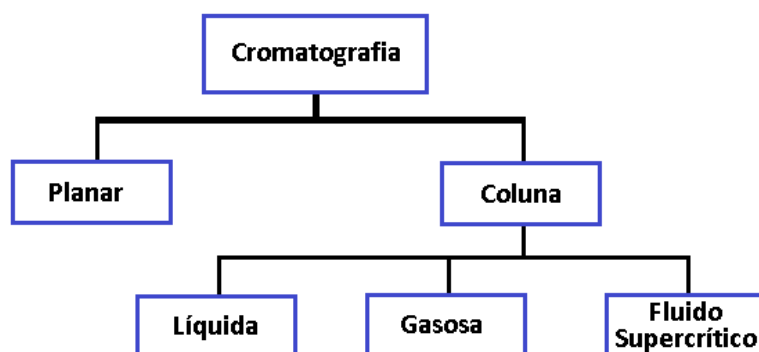


Figura 5 – Métodos cromatográficos^[42].

Na cromatografia planar, a fase estacionária é suportada numa superfície lisa ou em papel, pela qual o eluente se move por ação capilar ou por influência da gravidade^[42].

Na cromatografia por coluna, a capacidade de separar dois analitos dá-se por eluição. Este processo envolve a eluição do analito através da coluna pela introdução contínua de fase móvel. Após injeção da amostra na coluna, os analitos distribuem-se entre as duas fases, e são continuamente arrastados ao longo da coluna de acordo com as suas taxas de partição (razão entre a concentração do analito presente na fase estacionária e a concentração de analito na fase móvel). As diferenças de taxas levam à separação dos analitos em bandas dentro da coluna, que com a contínua adição de fase móvel, são eluídas até ao final da coluna, originando um tempo de retenção de acordo com as condições cromatográficas ^[42].

1.2.1.1 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa é usada para a separação e análise de compostos termicamente estáveis e voláteis. A amostra é vaporizada e injetada na coluna, e a sua eluição é feita por um caudal de gás inerte, transportando-o pela coluna (fase estacionária) na qual ocorre a separação dos analitos. As fases estacionárias podem ser sólidas, nas quais a separação é consequência de adsorção física, e líquidas, na qual a separação se baseia em partição do analito entre a fase móvel gasosa e o líquido imobilizado numa superfície sólida (fase estacionária). Ao saírem da coluna, os analitos dissolvidos na fase móvel são conduzidos ao detetor, que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de analito eluído, sendo este sinal registado em função do tempo^[42,43].

1.2.1.2 Cromatografia líquida de alta pressão

Dentro da cromatografia por coluna, destaca-se a cromatografia líquida, que engloba vários modos. Entre eles está a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) e cromatografia líquida nano (nanoLC). UPLC e nanoLC, comparativamente com HPLC, utilizam colunas com partículas de sílica menores, menos volume de fase móvel, e permitem uma maior rapidez de análise, com melhor resolução e sensibilidade^[44]. Neste projeto é usado o modo de HPLC, que

continua a ser o mais utilizado, devido ao seu baixo custo e manutenção quando comparado com os outros modos.

As vantagens da utilização desta técnica são a sua sensibilidade, adaptabilidade a determinações quantitativas precisas e aptidão para separar compostos não voláteis ou termicamente instáveis. Esta técnica pode conter vários tipos de fases estacionárias (resinas/sílicas) funcionalizadas, que permitem a retenção de compostos por partição, adsorção, exclusão iónica e exclusão molecular^[43].

Tendo sido usada a cromatografia de partição, esta pode ser dividida em dois tipos, cromatografia líquido-líquido na qual a fase estacionária é líquida, retida na superfície do enchimento por adsorção física e *bonded-phase* na qual a fase estacionária está quimicamente ligada à superfície do suporte, sendo a última a mais utilizada. A maioria dos enchimentos da cromatografia de partição são preparados a partir de partículas rígidas de sílica, preferencialmente esféricas, porosas, com diâmetros entre 2 e 10 μm , cuja superfície hidrolisada é composta por grupos silanol (Si-OH), funcionalizados em siloxanos, através da reação dos grupos silanol livres com organoclorosilanos, que contêm uma cadeia R, que varia consoante o tipo de coluna desejado. Ainda na cromatografia de partição, existe a fase normal, na qual a fase estacionária é mais polar que o eluente utilizado (fase móvel), e fase reversa na qual a fase estacionária é menos polar que a fase móvel. Em fase reversa, as fases estacionárias mais comuns são amino, fenilo, ciano, C4, C8, C18 (por ordem decrescente de polaridade/crescente de hidrofobicidade) ^[43].

1.2.1.3 Equipamento de HPLC

O HPLC é equipado com uma bomba binária, misturador de eluente, degaseificador, injetor automático, forno de coluna e detetor DAD. O controlo é feito a partir do computador acoplado, recorrendo ao *Software Empower 4*. (Figura 6).

O aparelho de HPLC tem de estar equipado com recipientes de eluente. O eluente passa por um degaseificador (capaz de remover gases dissolvidos que podem causar problemas dentro da coluna e detetor), seguindo para um sistema de mistura, que no caso de uma análise em gradiente, ajusta as proporções dos eluentes ao longo do tempo, ou isocrático, no qual a composição do eluente se mantém constante do

início ao fim do processo cromatográfico, e é movido por uma bomba capaz de criar altas pressões. De seguida, o sistema de injeção de amostra, coloca a amostra dentro do *loop* (que pode ser variável) e a rotação da válvula de injeção coloca o *loop* dentro da corrente de eluente, sendo esta arrastada pelo mesmo para o interior da coluna onde ocorre a separação (a temperatura da coluna por ser controlada com recurso a um forno). Os analitos saem da coluna de acordo com o seu tempo de retenção e o caudal é direcionado para o detetor, que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de analito. Esse sinal é traduzido num cromatograma, no qual são traçadas as respostas do detetor ao longo do tempo^[42].

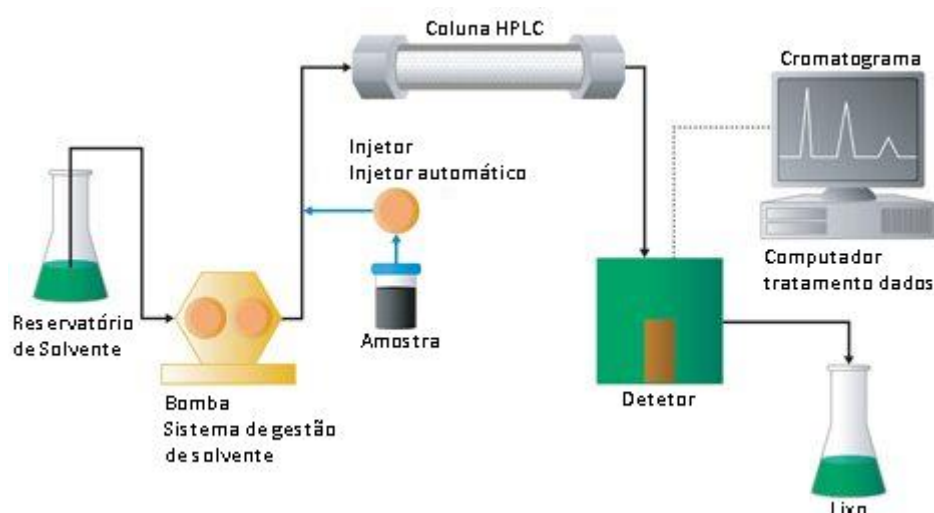


Figura 6 - Imagem esquemática dos componentes de um HPLC^[45].

1.2.2 Detetores

Existem diferentes detetores, com limites de deteção e aplicações determinadas. Entre eles estão, detetores UV-DAD, fluorescência, infra-vermelho, índice de refração, *evaporative light scattering*, eletroquímicos, e detetores de massa (MS)^[43].

Os métodos de deteção para gli-Fmoc reportados na literatura envolvem UV-Vis, fluorescência e MS por ordem decrescente de limite de deteção (Tabela 3).

A técnica de MS é caracterizada pela formação de iões em fase gasosa, com ou sem fragmentação, que são posteriormente identificados de acordo com o seu rácio massa/carga (m/z) e intensidades relativas, sob a forma de espectro de massas^[42]. O

maior desafio deste detetor é a transferência do analito da fase líquida para a fase gasosa em vácuo. Esta transferência é conseguida pelas interfaces de nebulização ou interfaces de enriquecimento de analito^[45].

O detetor de fluorescência é bastante sensível, mas é também seletivo. Visto que se baseia na medição de luz emitida, apenas algumas moléculas conseguem emitir parte da luz absorvida num comprimento de onda superior^[45]. A metodologia apresentada pode ser facilmente adaptada para o uso deste detetor.

O detetor UV-DAD utilizado neste trabalho, permite a obtenção do espectro de todos os picos do cromatograma, permitindo esta característica a verificação do analito, caso este tenha um espectro UV característico. A pureza do pico pode ser determinada pela comparação dos espectros do início e fim do pico. A maior desvantagem deste tipo de detetores é a sua falta de seletividade quando se analisam extratos de matrizes complexas^[46], tendo como mais valia o seu baixo custo e baixa manutenção.

1.2.3 – Método de preparação de amostra

A etapa de preparação de amostras é determinante para a precisão do método, sendo de extrema importância a escolha de uma técnica que seja capaz de produzir recuperações reprodutíveis do analito e dessa forma garantir a qualidade dos resultados analíticos.

O passo de limpeza deve ser utilizado no caso de a amostra ter impurezas que resultem em co-eluições ou efeito matriz, ou ainda para retirar produtos secundários de derivatização que possam competir com o analito na adsorção ao cartucho de extração em fase sólida (SPE), influenciando a recuperação.

O passo de concentração deve ser utilizado no caso de os limites de deteção serem demasiado elevados para o efeito do desenvolvimento do método. Estes dois podem ser concretizado por extrações líquido-líquido, SPE ou SPE em linha.

A extração líquido-líquido é um processo de separação que envolve a transferência de um analito de um solvente para o outro, utilizando dois líquidos imiscíveis. O analito tem maior solubilidade num deles enquanto o outro retém possíveis impurezas.

A concentração/limpeza de uma amostra utilizando a técnica SPE em linha, assenta na passagem da amostra injetada pelo aparelho cromatográfico dentro de um

cartucho com invólucro metálico montado antes da coluna. No caso de ser usado para concentração necessita de um aparelho capaz de rejeitar o eluente do passo de lavagem, sendo depois eluído para dentro da coluna com a fase móvel do método cromatográfico.

Nos capítulos seguintes descrevem-se técnicas de preparação de amostras aplicadas no presente trabalho, a extração em fase sólida (SPE), com o objetivo de concentração do analito e limpeza da amostra, de forma a reduzir o efeito matriz no método cromatográfico e diminuir os limiares analíticos do método, e a derivatização, que permite uma melhor absorção tendo em conta o detetor utilizado.

1.2.3.1 Extração em fase sólida (SPE)

Esta técnica permite adsorver o analito enquanto outras impurezas de polaridades diferentes são eluídas, para então se dessorvê-lo para um volume mais pequeno, permitindo a limpeza de contaminantes (simplificando a matriz) e aumentando a concentração do analito^[47].

Assentando esta técnica em princípios de cromatografia, destacam-se três categorias:

Fase normal – O mecanismo de retenção do analito dá-se por pontes de hidrogénio, ligações π - π e dipolo-dipolo.

Troca iónica – O mecanismo de retenção dá-se por interações eletro-estáticas entre o analito e o grupo iónico do adsorvente.

Fase reversa – O mecanismo de retenção do analito dá-se por interações hidrofóbicas (Van der Waals)^[48,49].

Existem vários tipos suportes de SPE nomeadamente, cartucho, on-line, disco, e barras magnéticas de agitação^[50]. O uso de cartuchos, pode ser implementado usando um equipamento automatizado, bem como através de um *manifold* com recurso a uma bomba de vácuo permitindo efetuar múltiplas extrações num curto espaço de tempo.

Etapas do procedimento geral de SPE (Figura 7):

- Condicionamento: Ativar a fase estacionária permitindo interações consistentes entre analito e adsorvente. Limpeza de impurezas possivelmente presentes no cartucho;

- Equilíbrio: Introdução de um solvente com características similares à amostra, garantindo máxima retenção;
- Introdução da amostra: Introdução da amostra no adsorvente de forma a permitir máxima retenção de analito - De notar que o volume de amostra introduzido no cartucho deve ser adequado à quantidade de fase estacionária, sendo que a partir de um certo volume de amostra passada pelo cartucho, podem-se começar a observar perdas de analito. A este volume máximo de amostra dá-se o nome de volume de *breakthrough*^[51].
- Lavagem: Remover interferentes de matriz do adsorvente;
- Eluição: Aplicação de um solvente que permita a eluição completa dos analitos (Dependente do tipo de enchimento, pode haver um passo de secagem anterior à eluição)

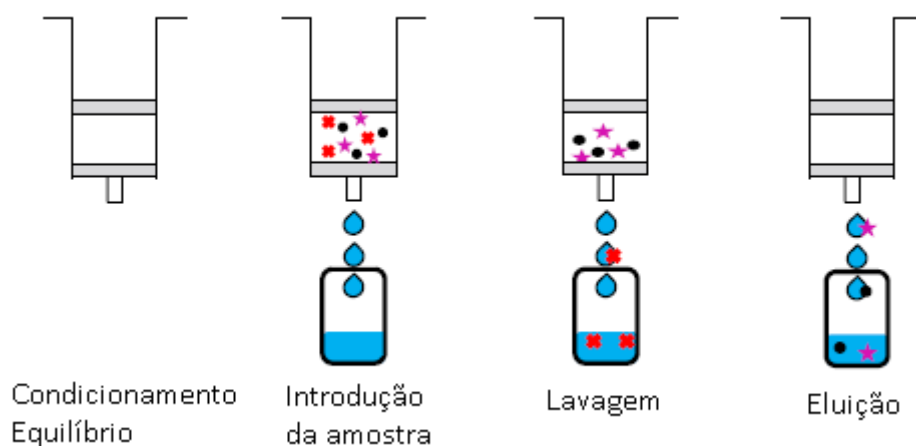


Figura 7 – Etapas da técnica de extração em fase sólida (SPE)

A amostra recolhida pode ser injetada diretamente, ou seca e reconstituída num solvente apropriado^[48].

1.2.3.2 Derivatização

A derivatização consiste na reação entre o analito e um agente derivatizante que lhe confira um aumento de detetabilidade (conferindo por exemplo um cromóforo a uma molécula que não absorva radiação UV-Vis), ou uma propriedade que permita que seja cromatografável num determinado método. É importante confirmar que a derivatização é completa, de forma a não quantificar o analito abaixo da quantidade

presente numa amostra. A derivatização pré-coluna é realizada antes de ser injetada na coluna, e a derivatização pós-coluna^[52] é realizada após a separação cromatográfica.

1.2.4– Estado da arte

Este sub-capítulo tem como propósito o levantamento das técnicas de preparação de amostra e métodos para análise de glifosato em água descritos na literatura. É apresentada primeiramente a técnica de cromatografia gasosa, e posteriormente a técnica de cromatografia líquida juntamente com as técnicas de derivatização e SPE.

Sendo o glifosato uma molécula polar, não volátil, e de baixa solubilidade em solventes orgânicos^[53-55] a sua análise por cromatografia gasosa (GC) só é possível após a derivatização com compostos apolares que a tornem mais volátil e termicamente estável. Métodos para GC com detetor de massa (GC-MS) foram publicados usando vários agentes de derivatização que conferem ao glifosato as características necessárias para que a análise seja possível^[56-59]. Contudo, uma vez que estas derivatizações necessitam de passar por diversos passos de lavagens e extrações com solventes orgânicos, e adicionando o facto de a água ser um componente indesejado na análise por GC (visto que pode danificar a fase estacionária), a metodologia de preparação de amostra para a cromatografia gasosa é mais morosa e menos adequada para a análise do glifosato, quando comparada com cromatografia líquida^[60].

Dadas as características do glifosato, a técnica de HPLC é a mais indicada para a sua identificação e quantificação. Ainda assim, a sua purificação, concentração e análise por cromatografia líquida (Tabela 3) enfrentam algumas dificuldades, entre elas, devido à facilidade do glifosato em formar complexos com metais, adsorção nos materiais de recolha de amostra (vidro), concentrações residuais em amostras ambientais, e matrizes complexas^[52-55].

De seguida são descritas diferentes abordagens de preparação de amostra (concentração, limpeza e derivatização) e estratégias cromatográficas para determinação de glifosato em água por HPLC.

É possível detetar glifosato recorrendo a colunas cromatográficas de troca iónica sem qualquer tipo de extração, limpeza, passo de concentração ou derivatização,

podendo usar como métodos de detecção, detetor amperométrico e detetor MS/MS^[54]. É também possível utilizar um detetor UV ou DAD a 195 nm^[61], no entanto a absorção no UV a este comprimento de onda é afetada por alguns solventes utilizados, que também absorvem nesta gama, fazendo com que os limite de detecção sejam altos, não cumprindo o requisito para a análise residual deste analito, sem que se adicione um passo de derivatização ou concentração da amostra.

Pode-se concentrar o glifosato e limpar a matriz recorrendo a SPE com resinas de troca iónica (Amberlite IRA-900) (Figura 8). Patsias *et al.*^[52] indica que os compostos iónicos presentes nas amostras ambientais afetam a eficácia das resinas iónicas, propondo a adição de um passo de limpeza recorrendo a solventes orgânicos anterior ao SPE. Após concentração e/ou limpeza o extrato pode ser derivatizado e posteriormente analisado^[49,62].

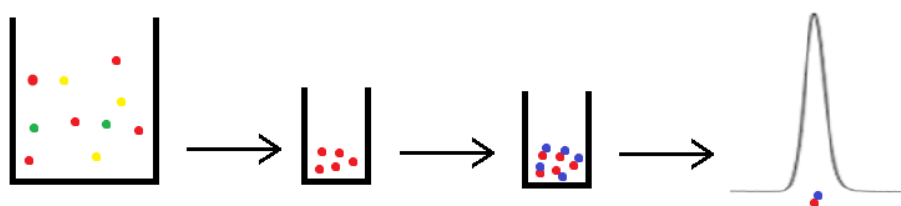


Figura 8 – Esquema da primeira abordagem, concentração, seguida de derivatização do extrato.

Outra abordagem é a utilização da derivatização para conferir ao glifosato propriedades que melhorem a sua análise cromatográfica, podendo também esta característica ser usada para facilitar a sua retenção quando recorrendo a SPE de fase reversa^[63,34] (Figura 9). Os produtos secundários da derivatização podem também interferir na concentração do analito por SPE, podendo-se adicionar um passo de limpeza recorrendo a solventes como éter dietílico, acetato de etilo ou diclorometano^[49,65-67]. Após derivatização, em alternativa também se pode recorrer a SPE em linha^[31,68,69].

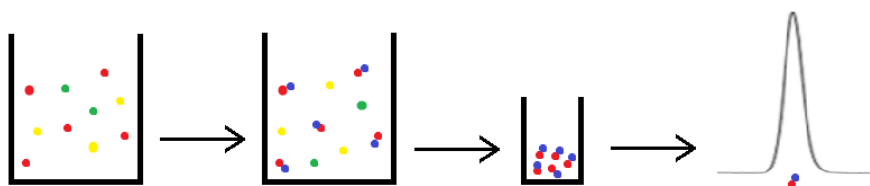


Figura 9 – Esquema da segunda abordagem, derivatização, seguida de concentração da amostra.

Adicionalmente, as técnicas de eletroforese capilar acoplada a um detector UV^[70,71] e espectroscopia de fluorescência^[72,73] também têm sido utilizadas na detecção de glifosato em água.

Tabela 3 - Métodos de análise do glifosato em águas superficiais por cromatografia líquida recorrendo a derivatização.

Ref.	Agente derivatizante	Coluna HPLC	Detetor	LOD/LOQ	SPE	Limpeza	Recup. (%)
[52]	Pós coluna OPA-MCE	Troca iónica	Fluorescência	LD 0,02ug/L - 100 mL	Online AESPE	-	-
[74]	CNBF	Fase reversa – C18	UV 360 nm	LD 0,009 mg/L	-	-	-
[75]	DMOSC	Fase reversa – C18	UV 220 nm	LD 0,067 mg/L.	-	-	-
[76]	FMOC	Fase reversa – NH ₂	UV 230 nm	LQ 30 ug/L	-	Éter dietílico	95-97
[77]	FMOC	Fase reversa – C18	UV 206 nm	LQ 0,1 mg/L LD 0,04 mg/L	-	-	86
[78]	FMOC	Fase reversa – C18	Fluorescência	LD 0.60 µg/L LQ 2 µg/L	-	-	80–120
[66]	FMOC	Fase reversa – NH ₂	Fluorescência	LD 0.025 ug /L LQ 0,04ug/L	-	Éter dietílico	-
[49]	FMOC	Fase reversa – NH ₂	Fluorescência	LD 0.1 ug/L – 100 mL água	Amberlite IRA-900	Acetato de etilo	90-100
[62]	FMOC	Fase reversa 1- C18 2 – NH ₂	Fluorescência	LD 0,02 ug/L – 50 mL água	Amberlite IRA-900	-	94–105
[63]	FMOC	Fase reversa – C18	ESI MS/MS	LD 0,2ng/L LQ 0,7ng/L	Strata-X	-	97
[67]	FMOC	Fase reversa – C18	UHPLC-MS/MS	LD 0,2 ug/L LQ 0,6 ug/L	-	DCM	70-105
[68]	FMOC	Fase reversa – C18	ESI-MS	LD 0.084 ug/L	Online SPE HLB	-	97-102
[69]	FMOC	Fase reversa – C18	ESI-MS/MS	LD 0,03 mg/L	Online SPE	-	94
(31)	FMOC	Fase reversa – C18	ESI-MS/MS	LQ 50 ng/L LD 5 ng/L	Online SPE HLB	-	91
[54]	-	Fase reversa – C18	ESI-MS/MS	LQ 0,1 ug/L	-	-	70-120
[62]	FMOC	Fase reversa – C18	ESI-MS/MS	LD 0.12 µg/L	Strata-X	-	94

1.3 – Validação de métodos

A validação assegura que os métodos realizados conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida através de exame e apresentação de evidência objetiva, confirmando que os critérios estão de acordo com o propósito da validação e são cumpridos^[79-82]. A validação inclui a especificação dos requisitos, a determinação das características do método, a verificação de que os requisitos podem ser satisfeitos utilizando o método em causa e uma declaração de validade.

Nesta dissertação, o objetivo principal é o de identificar e quantificar teores residuais do herbicida glifosato em águas de captação. É então necessário avaliar os seguintes parâmetros: garantir a linearidade na gama de trabalho para o caso da curva de calibração seja de 1º grau calculando os limites de deteção e quantificação; assegurar a precisão através da reprodutibilidade e precisão intermédia; garantir sensibilidade do método; calcular a exatidão; avaliar a robustez do método.

1.3.1 - Curvas de calibração

Num método quantitativo, a calibração efetuada é uma correlação entre a concentração de uma amostra e a resposta de um equipamento. Como referência para calibrações analíticas, nomeadamente regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados, deve-se utilizar a norma ISO 8466-1.

O analista prepara uma série de padrões do analito, com uma concentração conhecida e de seguida essas soluções são medidas pelo aparelho construindo-se então uma curva do sinal do equipamento (y) em função da concentração (x), do qual se infere a concentração de amostras por interpolação.

A forma algébrica da equação dessa reta, criada através do método dos mínimos quadrados por um conjunto de pares ordenados e independentes é

$$Y = mX + b$$

Sendo que 'm' descreve o declive e 'b' a ordenada na origem.

1.3.2 - Linearidade

A linearidade deve ser avaliada através de testes estatísticos, sendo que a sua avaliação deve ser feita em conjunto com uma análise de resíduos. Assim sendo, o teste de homogeneidade das variâncias, teste de Mandel, teste de RIKILT, análise de resíduos e teste das áreas normalizadas são aplicados para avaliar a linearidade na gama de concentrações selecionada para estudo (norma ISO 8466-1).

Teste da homogeneidade das variâncias – São injetados o padrão mais e menos concentrado da gama de linearidade selecionada, a partir de preparações independentes. De forma a ser verificada homogeneidade das variâncias (S^2_M e S^2_m), é calculada a razão das variâncias (>1), sendo que este valor tem de ser menor que o valor tabelado na tabela de Fisher/Snedecor, garantindo homogeneidade de variâncias na gama de trabalho.

Teste da Mandel – Através de um modelo estatístico, é possível avaliar a linearidade. A partir das concentrações e respetivas leituras do equipamento, calcula-se a função de calibração linear, a função de calibração não linear (2º grau) e os desvios-padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y^2} .

Teste de Rikilt – Este teste avalia o desvio da razão área/concentração da gama de trabalho, com a média das razões.

Análise de resíduos – A análise de resíduos calcula os desvios da área experimental obtida com a área de pico estimada pela curva de calibração.

Teste das áreas normalizadas – À semelhança da análise de resíduos, é calculada a razão área experimental/área estimada, e os valores são normalizados recorrendo aos valores obtidos para o que obteve a razão mais próxima de 1.

1.3.3 - Limiares Analíticos

O limite de deteção é o teor mínimo a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística aceitável. Concentração mínima que é possível distinguir do branco da amostra.

O limite de quantificação é o início da gama em que o coeficiente de variação do sinal se reduziu a valores razoáveis para se poder efetuar uma deteção quantitativa. Início da zona em que se reportam valores numéricos.

Estes limites podem ser calculados de várias formas.

Baseado no sinal-ruído:

$$LD = X_0 + 3. \sigma_0 \qquad LQ = X_0 + 10. \sigma_0$$

Sendo X_0 a média aritmética do teor medido numa série de brancos ou padrões vestígio, reproduzindo condições de rotina ao longo do tempo, e σ_0 desvio padrão associado a X_0 .

Baseado na curva de calibração:

$$LD = 3. \frac{S_y}{m} \qquad LQ = 10. \frac{S_y}{m}$$

Onde S_y é o desvio padrão residual da curva de calibração.

Baseado no padrão de concentração mais baixa:

$$LD=3.S \qquad LQ=10.S$$

Sendo S o desvio padrão dos valores do padrão mais baixo calculados pela curva de calibração, obtidos em condições de repetibilidade ou precisão intermédia.

Os limiares analíticos apresentados são os fatores limitantes no limite inferior da gama de trabalho, sendo esta o intervalo entre os níveis inferior e superior da concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, linearidade e exatidão exigidas, de acordo com o ensaio em questão.

1.3.4 – Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes repetidos com uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, nas mesmas condições. Sendo que a precisão pode variar com a gama de concentrações, o estudo deve ser feito com vários níveis de concentração. A precisão é expressa pela seguinte fórmula:

$$\%RSD = 100 * \frac{S}{\bar{X}}$$

Onde S é o desvio padrão, e \bar{X} a média dos valores obtidos

A precisão pode ser avaliada de três condições, repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia.

A repetibilidade é determinada por 6 a 10, ou mais medições sucessivas da mesma amostra ou padrão, exprimindo a precisão do método efetuado nas mesmas condições e em curtos intervalos de tempo.

Sendo que o desvio padrão de repetibilidade varia dependendo da média de valores para cada nível de concentração, convém conhecer o tipo de relação entre esses desvios de forma a conseguir relacionar qualquer média de resultados com o desvio padrão.

A reprodutibilidade é determinada pela análise da mesma amostra no mesmo método de ensaio em diferentes laboratórios e deve ser considerada em caso de normalização de um procedimento analítico.

A precisão intermédia é a concordância dos resultados obtidos no mesmo laboratório, nas mesmas condições, aplicando o mesmo método, em ensaios espaçados no tempo. (esta situação é mais representativa da variabilidade de resultados em condições normais de trabalho).

A Precisão intermédia é determinada pela análise da mesma amostra no mesmo método de ensaio variando condições de análise, sendo elas o analista, o aparelho ou dias diferentes.

1.3.5 – Exatidão

A exatidão consiste na aproximação entre resultado da medição num ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro. Quando aplicado a uma série de resultados,

implica a combinação dos componentes de erros aleatórios e componentes dos erros sistemáticos.

Pode ser determinado pelo estudo de materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais e comparação com métodos de referência.

Um material de referência certificado (MRC) possui um valor de concentração e uma incerteza associada. O resultado obtido na análise de um MRC deve ser comparado com o valor certificado, determinando-se o erro e a exatidão da análise. Se o valor obtido não se encontrar dentro do intervalo de incerteza do valor do MRC, deve-se tentar apurar as causas do desvio ou aceitá-las.

Qualquer medição acarreta um erro, caracterizado pela diferença entre o valor obtido e o valor aceite como verdadeiro, sendo classificado como erro sistemático ou aleatório.

Os erros sistemáticos afetam a exatidão, introduzindo um viés no resultado.

Os erros aleatórios afetam a precisão, influenciando o desvio padrão.

Incerteza é o parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão de valores que se atribui à grandeza medida. É indicado em peso/volume.

1.3.6 – Seletividade

A seletividade consiste em identificar e distinguir um determinado analito numa mistura complexa sem interferências.

É demonstrada como o desvio dos resultados obtidos pela análise do analito em amostras fortificadas com todos os potenciais interferentes com resultados obtidos com amostras não fortificadas. Quando se desconhece os interferentes, a seletividade do método pode ser investigada comparando os resultados obtidos por outros métodos.

1.3.7 – Robustez

Capacidade do método de resistir a pequenas variações experimentais durante a sua execução. Revela as etapas do método em que o rigor é crítico e aquelas em que há alguma tolerância.

Pode ser usado o teste de Youden. A realização de um número de ensaios sobre uma amostra segundo um plano de controlo de fatores suscetíveis de influenciar o resultado permite avaliar o efeito de cada fator em estudo pela análise dos resultados.

2. Materiais e Métodos

2.1. Aparelhos/ Equipamentos

- Balança analítica XSBL224 touch, XS Balance
- Balança analítica / comparador, Mettler-Toledo
- Vortex, RSLab
- Ultrapurificador de água Tipo I, 18,3 oms, Diwer
- Ultrasons, Selecta
- HPLC Waters alliance 2695 e Detetor DAD (Figura 10), Waters
- Manifold SPE (Figura 9), Supelco
- Medidor de pH, HANNA Instruments

2.2 Material

- Tampas de vial PTFE, ALWSCI Technologies
- Vial de vidro 32x11,6 mm
- Inserts cónicos, ALWSCI Technologies
- Tubos de ensaio PP 10 mL/ 5 mL, Aptaca
- Tubos Falcon PP 50 mL, ABDOS
- Filtrador de eluente, Sartorius Stedim Biotech
- Micropipetas de ponta descartável (5 mL, 1 mL, 100 µl), VWR
- Filtro de eluente Nylon 0,22 µm, Filter-Lab, Lote 140707010
- Filtros de seringa PTFE 13m 0,45 µm, Waters, Lote 21913968
- Cartuchos SPE 6 mL Oasis HLB 200mg, Waters, Lote 157A38080A
- Seringas 1 e 5 mL, Brown
- Frascos polipropileno de alta densidade (HDPP) 100 mL
- Balões Volumétricos

2.3 Reagentes

- Padrões pH, Crison, Lote 946399
- Acetato de amónia >99%, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ Sigma-aldrich, Lote BCBT2624
- Formato de amónia >99%, NH_4HCO_2 , Sigma-aldrich, Lote BCBX5107
- Glifosato Pestanal analytical standard 99,7%, $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$, Sigma-Aldrich, Lote BCBV0664
- Metanol LC-MS grade, CH_3OH , Fisher Scientific, Lote 1861329
- Acetonitrilo LC-MS grade, $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$, Fisher Scientific, Lote 1852355
- Ácido Fórmico ~98%, CH_2O_2 , Fluka, Lote BCBF8669V
- Cloreto de FMOC Derivatização HPLC >99%, $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClO}_2$, Sigma-Aldrich, Lote BCBV3437
- Tetraborato de sódio decahidratado 99,5%, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, Lote SZE93000
- EDTA Purified grade >98,5%, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$, Sigma-Aldrich, Lote BCBV5775
- Hidróxido de potássio ~45% para HPLC, KOH , Fluka, Lote BCBK4538V
- Ácido clorídrico 36,5 – 38%, HCl , Sharlau, Lote 14874810

- Ácido fosfórico para HPLC 85-90%, H₃PO₄, Fluka, Lote STBG1111V
- Ácido acético glacial 99,5%, CH₃COOH, Carlo Erba, Lote P7H0061471

2.4 Amostras/ pontos de amostragem

A amostragem foi feita pela EPAL, S.A. em frascos de HDPP tendo sido o presente método desenvolvido para a identificação do glifosato em águas do rio Tejo. As amostras são representativas de águas de captação do rio Tejo (CAPTJ). São recolhidos 2,5 L de águas de captação, sendo armazenadas a 4 °C até análise.

2.5 Procedimento experimental para análise de glifosato por HPLC-DAD com derivatização

2.5.1 Preparação da solução padrão de glifosato 500 mg/L

Pesar 5 mg de glifosato (Sigma-Aldrich) para um tubo de polipropileno (5mL) no comparador analítico. O conteúdo é diluído em 10 mL de água ultrapura. Resultando numa solução de 500 mg/L de glifosato. É tido cuidado para que a solução não toque em vidro.

2.5.2 Preparação das soluções necessárias para o passo de derivatização

Solução Borato 26 mM: pesar aproximadamente 1,9 g de tetraborato de sódio decahidratado (Sigma-Aldrich) num tubo de polipropileno (5mL), cujo conteúdo é despejado num balão de 100mL, cheio com água. A solução é agitada e colocada no banho de ultrassons durante 2 minutos.

Solução FMOC-Cl: pesar num frasco de polipropileno (5 mL) 10 mg de FMOC-Cl (Sigma-Aldrich), que são transferidos para um balão de vidro de 10 mL, sendo cheio com acetonitrilo, resultando numa concentração de 3,8 mM. No caso de preparação de solução para derivatização de amostras, são pesadas 17 mg por cada 10 mL, seguindo o mesmo procedimento, resultando numa concentração de 6,6 mM.

Todas as soluções são preparadas semanalmente e armazenadas a 4 °C.

Solução de derivatização: pipetar para um frasco Falcon 50 mL polipropileno 3 mL da solução de borato 26 mM e 500 µl da solução de glifosato 500 mg/L. Posteriormente, adicionar 1,5 mL da solução de FMOC-Cl. O frasco é agitado durante 1 min. Após 90 minutos a 21 °C, adicionar 100µl da solução de HCl (5,2 M) de forma a parar a reação. A

solução final é filtrada por seringa com um filtro de seringa PTFE acrodisc, sendo depois diluída em 3 pontos para a construção da curva de calibração.

2.5.3 Preparação das soluções necessárias para o passo de cromatografia líquida - eluente

Formato de amónia 5mM: pesar 0,32 g de formato de amónia. O conteúdo é vertido para um balão de 1 L, que é então preenchido com água ultrapura. A solução é agitada, o pH é ajustado com ácido fórmico ~98% (Fluka) para 3,8. A solução é filtrada sob pressão com um filtro de nylon 0,22 µm (Filter Lab).

O eluente acima descrito tem a validade de dois dias. Para períodos de tempo superiores a um dia, o sistema é lavado com uma solução 70/30 (Acetonitrilo/Água).

2.6 Otimização das condições de derivatização

2.6.1 Concentração de borato

O procedimento seguido neste teste foi o mesmo descrito no passo da 'Solução de derivatização', na qual as concentrações de borato utilizadas foram 16 mM, 21 mM e 26 mM, obtidas por diluição da solução mãe de borato 26 mM. Foram feitas 3 soluções para cada concentração. As amostras foram diluídas adicionando 1 mL da solução derivatizada num balão de 50 mL preenchido com água ultrapura.

2.6.2 Concentração de FMOC-Cl

O procedimento deste teste foi o mesmo descrito no passo da 'Solução de derivatização', na qual as concentrações de FMOC foram preparadas individualmente. Neste teste foram utilizadas 3 diferentes concentrações, com valores de 1,7 g/L, 1 g/L e 0,5 g/L. Foram pesados 17 mg, 10 mg e 5 mg respetivamente, e diluídos com acetonitrilo num balão de 10 mL.

2.6.3 Degradação do glifosato-FMOC (gli-Fmoc)

De modo a aferir a degradação do gli-Fmoc, dividiu-se uma solução de gli-Fmoc de concentração conhecida (100 µg/L) em duas partes. A primeira foi armazenada a 4 °C e a outra foi sujeita a uma temperatura de 50 °C durante 5h. Ambas foram injetadas sequencialmente.

2.7 Condições de derivatização em amostra

A amostra é retirada do frio até atingir a temperatura ambiente. A amostra é então homogeneizada e 80 mL são retirados e acidificados para pH 1 durante 30 min com 0,2 mL de HCl 5,2 M. É adicionado glifosato para fortificação. A amostra é basificada para pH 8,5 com 120 µl com KOH 45%. São adicionados 10 mL de borato 26 mM, e 10 mL de FMOC 1,7 g/L. A amostra é homogeneizada e agitada durante 2 h com recurso a um agitador magnético. A reação é parada acidificando a amostra com 1 mL de ácido fórmico e são adicionados 4 mL de EDTA 1 M (o EDTA foi adicionado de forma a complexar os metais em solução, apesar de nem toda a literatura introduzir este passo). A amostra derivatizada segue de imediato para o passo de concentração [63].

Para medição de recuperações o procedimento seguido foi o mesmo apresentado no início deste ponto, sendo que se adiciona gli-Fmoc à solução em substituição do glifosato.

2.8 Concentração/extração de amostra por extração em fase sólida, SPE

Resumindo, foram selecionados para este estudo os cartuchos de SPE 6 mL Oasis HLB 200 mg (Waters). Os cartuchos HLB foram ativados com 5 mL de MeOH e 5 mL de ácido fórmico (Figura 10). Os 105,32 mL de amostra são passados pelo cartucho com uma velocidade de fluxo de 1-2 mL/min. Após a passagem da amostra, são adicionados 10 mL de H₂O ultrapura como lavagem. O cartucho é seco por vácuo durante 30 minutos. Idealmente este passo de secagem deveria ser feito com recurso a um fluxo de azoto, de forma a criar pressão que ajudaria na remoção da água, contudo devido às condições laboratoriais não foi possível fazer esta adaptação.

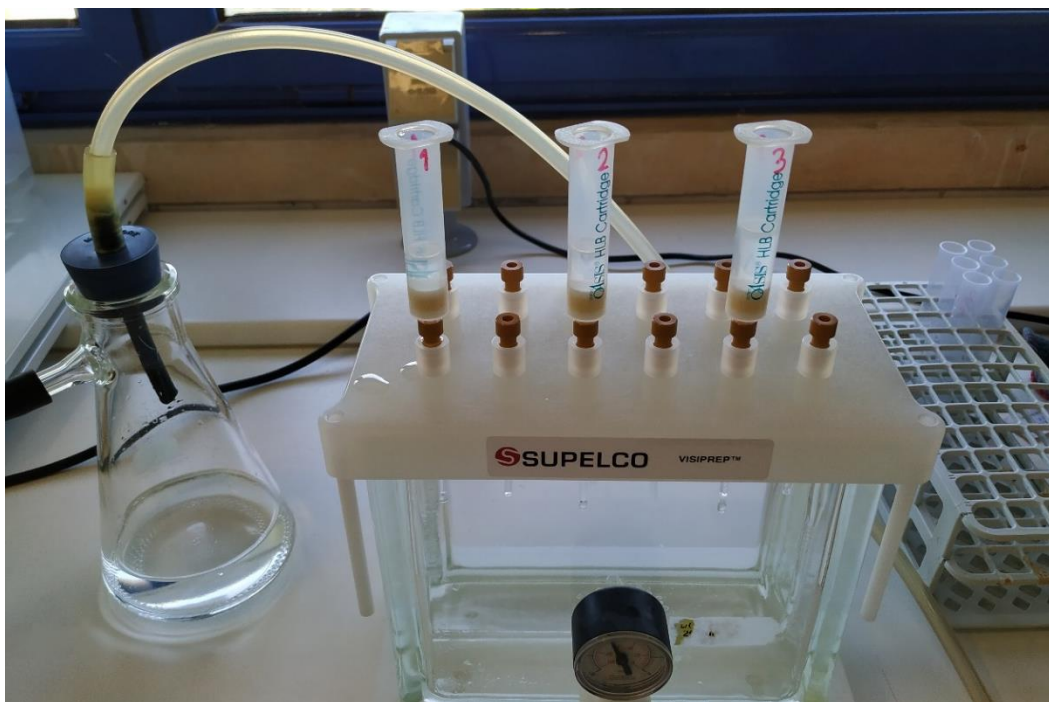


Figura 10 – Aparato SPE

Por fim, o composto alvo é eluído do cartucho, com 10 mL de MeOH para tubos de polipropileno (10 mL). O procedimento de SPE está resumido na Tabela 4. Os extratos metanólicos (10 mL) são evaporados com recurso a um caudal constante de azoto (24 °C) até à secura. O extrato é reconstituído com 0,5 mL de H₂O ultrapura e filtrado por filtros PVDF de seringa (Filter-Lab), seguindo para análise.

Tabela 4 – Procedimento de SPE adaptado ^[83]

Volume / Solvente	Passo
5 mL MeOH	Condicionamento
5 mL ácido fórmico 1%	Equilíbrio
105,32 mL Amostra	Introdução da amostra
10 mL H ₂ O	Lavagem
30 min ar	Secagem
10 mL MeOH	Eluição

2.9 Condições cromatográficas, HPLC

Após otimização, as condições cromatográficas selecionadas para a análise de glifosato consistiram na utilização de uma coluna Waters BEH technology XBridge C18, 3,5 µm, 4,6x150 mm, à temperatura de 40 °C, com um caudal de 0,6 mL/min e um método cromatográfico com um programa de gradiente. Para a separação cromatográfica utilizaram-se dois eluentes: solução A de 5 mM de formato de amónia

(linha A do HPLC), pH 3,8, e acetonitrilo (linha B do HPLC). As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 5. De referir que, antes de cada utilização, a coluna é lavada com uma solução 1% de ácido fosfórico^[54].



Figura 11 – Aparelho HPLC Waters Alliance 2695 acoplado ao detetor DAD 2996 Photodiode array detector.

Tabela 5 – Coluna, caudal, temperatura e programa de gradiente utilizados

Coluna HPLC	Waters BEH technology XBridge C18 3,5 µm 4,6x150mm, Lote 0197382492	
Caudal	0,6 mL/min	
Temperatura	40 °C	
Programa Gradiente		
Tempo (min)	%A – 5mM formato amónia	%B - Acetonitrilo
0	90	10
1	75	25
2	75	25
11	10	90
14	10	90
15	90	10
23	90	10

2.10 Ensaios de recuperação

A recuperação (%REC) foi calculada pela fortificação com gli-Fmoc (100, 50 e 20 µg/L) após o passo de SPE de três amostras branco e três fortificações com gli-Fmoc (100, 50 e 20 µg/L) pré SPE numa de forma a ambas conterem concentração finais iguais. A recuperação foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\%REC = 100 * \frac{\text{área fortificação pré SPE}}{\text{área fortificação branco pós SPE}}$$

Se for feita uma fortificação a partir de uma amostra da qual se conhece a concentração, a recuperação pode ser calculada por^[82]:

$$\%REC = 100 * \frac{C1 - C2}{C3}$$

Onde:

C1 – Concentração determinada na amostra fortificada

C2 – Concentração determinada na amostra não fortificada

C3 – Concentração da fortificação

2.11 Ensaios de efeito matriz

O efeito matriz (%EM) pode ser causado por interferências da matriz causando diminuição do sinal instrumental, tendo sido calculado pela fortificação com gli-Fmoc (100 µg/L e 20 µg/L) pós SPE de três amostras branco (10 µl padrão + 90 µl branco), e um padrão de 100 µg/L e 20 µg/L. Para calcular o efeito matriz são usadas amostras de água de captação (amostra real) e comparadas com H₂O ultrapura nas mesmas condições. O efeito matriz foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\%EM = 100 * \left(\frac{\text{área fortificação branco pós SPE}}{\text{área padrão}} - 1 \right)$$

O efeito matriz também pode ser avaliado pela comparação entre o declive da curva de calibração em água com a construção de uma curva de calibração em matriz de amostra ^[54].

2.12 Determinação da eficiência do processo

A eficiência do processo (%EP) tem em conta as influências do efeito matriz e da recuperação. Foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\%EP = \frac{\%REC * (1 - \%EM)}{100}$$

3. Apresentação e discussão de resultados

O desenvolvimento de métodos para o controle de substâncias a nível residual é por si só um enorme desafio. No caso particular do herbicida glifosato, acrescenta alguns problemas adicionais. O facto do glifosato ser extremamente polar, zwitteriónico, complexar-se com metais e vidro e não ter cromóforo, eleva a dificuldade e o nível de cuidados a ter de forma a desenvolver um método sensível e capaz de servir o propósito de quantificação do glifosato em águas.

3.1 Escolha do método

Para a utilização do método de deteção UV-Vis na identificação e quantificação do composto glifosato, há a necessidade de conferir uma característica à molécula de glifosato que a permita absorver no espectro UV-Vis. A metodologia amplamente mais conhecida e utilizada para tal é reação com FMOC-Cl, que não só confere um cromóforo à molécula, mas também permite que seja utilizado um método de cromatografia por fase reversa (C18), menos dispendiosa que fases iónicas.

Com recurso ao detetor DAD, é possível em qualquer ponto do cromatograma verificar o espectro do analito que produz sinal. Inicialmente foi feito um espectro UV para o agente derivatizante, de forma a verificar qual dos picos é o do analito em questão. De acordo com o espectro obtido, o FMOC-Cl tem um máximo de absorção a 210 e um máximo relativo a 265 nm. Foi escolhido o máximo relativo de 265 nm. Apesar da absorção aos 210 nm ser maior, um grande número de compostos absorve neste comprimento de onda, impossibilitando a deteção do gli-Fmoc pois a linha de base é instável. Outra razão para não se usar este comprimento de onda é porque alguns solventes também absorvem a 210 nm.

Após a seleção do agente derivatizante, o próximo passo é a escolha de uma coluna cromatográfica capaz de separar o gli-Fmoc com a maior sensibilidade, resolução, seletividade e eficiência.

Desta forma, foram testadas 3 colunas cromatográficas com características semelhantes: Xterra RP18 4,6x150 mm 3,5 µm (Waters), Discovery HS C18 4,6x150 mm 3 µm (Sigma-Aldrich) e Xbridge C18 150x4,6 mm 3,5 µm (Waters). Através da análise dos

resultados da injeção de curvas de calibração em replicado concluiu-se que a coluna que permitia melhor resolução é a XBridge C18. Foram testadas colunas com um tamanho de partícula <3,5 µm, visto que a eficiência da cromatografia aumenta drasticamente à medida que o tamanho de partícula diminui, diminuindo a altura do prato teórico.

Caudal de 0,6 mL/min foi escolhido depois de testados os caudais de 0,6 mL/min, 0,8 mL/min e 1 mL/min de forma a obter uma análise rápida, mas suficientemente lenta para impedir co-eluições e mantendo a pressão dentro dos limites aceitáveis da coluna e aparelho.

Antes de ter sido usado o formato de amónia 5 mM (pH 3,8) como modificador de eluente juntamente com acetonitrilo, foi tido como referência inicial a fase móvel do método publicado por^[63, 78] (A - Acetato de amónia 5mM pH9; B - Metanol), foram testados diferentes valores de pH, nomeadamente pH's 9 e 4,7. Estes valores foram escolhidos em concordância com os pka's do modificador de eluente utilizado, o acetato de amónia 5mM (amónia pka 9, ácido acético pka 4,7).

Apesar de a pH 9 os grupos livres de silanol (pka 3,5) da fase estacionária estarem na forma iónica tal como os grupos O⁻ do fosfato (pka 5,6) presente no Gli-Fmoc, assegurando a repulsão entre ambos^[84], ainda se verificou algum arrastamento do pico, possivelmente devido à ponte de hidrogénio entre a amina protonada e o grupo iónico do silanol, que provoca um alargamento de banda. Com o eluente a pH 9 obteve-se um tempo de retenção maior e menor área, não se tendo verificado uma diferença significativa entre o pH 9 e pH 4,6 no que toca ao arrastamento de pico. Tendo em consideração que o uso de pH's altos com colunas de sílica pode ter um efeito negativo na coluna, foi escolhido o pH de 4,6.

Após estudos de linearidade, nos quais foram identificadas oscilações da linha de base no tempo de retenção do pico em água ultrapura, foram testadas 6 alterações ao programa de gradiente. Os resultados obtidos não foram satisfatórios, verificando-se que o problema persistia. Foi então alterada a fase móvel B, passando a ser usado acetonitrilo em substituição do metanol. A polaridade reduzida do acetonitrilo traduziu-se na obtenção de tempos de retenção menores para o composto alvo e um menor alargamento de banda. Esta alteração por si só não resultou na solução completa do

problema tendo sido ainda alterado o modificador (solução A da fase móvel) para formato de amónia a pH 3,8. Esta alteração em conjugação com um gradiente inicial lento permitiu a resolução do problema, possibilitando a integração correta dos picos de menor concentração na gama baixa.

Foram realizados testes para avaliação da concentração de formato de amónia a utilizar, tendo sido testadas concentrações de 5 mM e 10 mM. A concentração de formato de amónia que permitiu uma melhor intensidade e forma de pico foi de 5 mM.

Em relação à temperatura da coluna, foram testadas 3 temperaturas, 30 °C, 40 °C e 50 °C. A temperatura que permitiu a obtenção de tempos de retenção reduzidos e boa resolução foi a de 40 °C. De referir que temperaturas mais altas podem levar a uma diminuição do tempo de vida da coluna. Foi também feita uma adaptação do programa de gradiente descrito por Hanke *et al.*^[63], reduzindo os tempos de cada passo de gradiente, aumentando assim os declives de gradiente, de forma a obter uma corrida curta, linha de base estável, e com boa resolução.

Foi escolhido como agente derivatizante o cloreto de FMOC (FMOC-Cl) devido ao seu extenso uso na literatura, baixo custo e alta sensibilidade na região UV^[85]. Adicionalmente tem ainda como vantagem a dispensabilidade do uso de solventes orgânicos clorados.

A amina secundária nucleófila do glifosato ataca o cloreto de acilo do FMOC, formando uma amida. Os produtos finais são gli-Fmoc e ácido clorídrico (Figura 12).

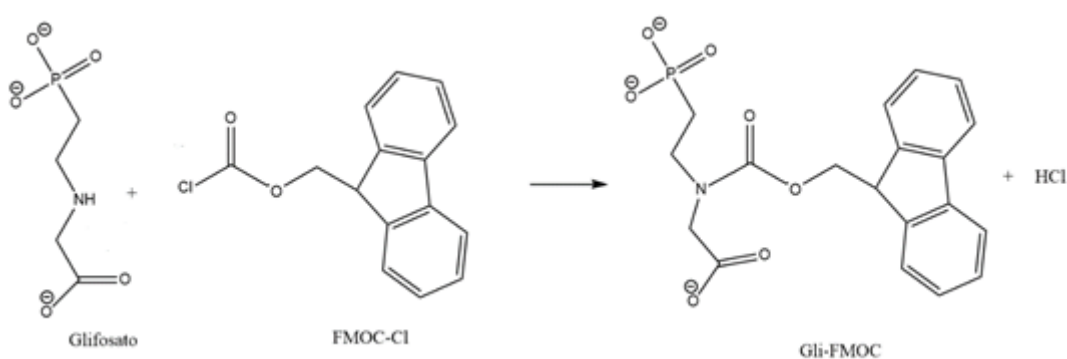


Figura 12 – Reação de derivatização

Todos os testes foram feitos usando o glifosato derivatizado. Não foi adquirido gli-Fmoc comercial, assumindo-se que a derivatização seria próxima de 100 %. Através de vários testes descritos em anexo, foi escolhido o método de derivatização que maior área e intensidade auferia.

3.2. Validação do método de quantificação do glifosato

3.2.1. Estudos de linearidade

Existem critérios de aceitação/rejeição da qualidade dos resultados, pelo estabelecimento de sub-critérios de aceitação nas diferentes fases de obtenção de resultados, juntamente com medidas a tomar no caso de rejeição. Estes critérios devem ser estabelecidos de acordo com o propósito da validação. Neste estudo, a linearidade foi avaliada pelo coeficiente de determinação ($\geq 0,995$) e pelo coeficiente de variação do método ($CV_m \leq 5\%$). Foram também aplicados testes estatísticos para verificar a linearidade na gama de concentrações selecionada, nomeadamente, análise de resíduos ($\pm 15\%$), Teste de Mandel ($PG \leq F(1; N-3; 95\%)$), Teste de Rikilt ($\pm 10\%$) teste das áreas normalizadas ($\pm 15\%$). A gama de trabalho é estabelecida após a avaliação dos testes indicados, sendo que os resultados obtidos têm de se localizar dentro dos limites de aceitação^[79,86,87].

Linearidade pelo método dos mínimos quadrados

A forma algébrica de uma reta é dada por:

$$y = mx + b$$

onde b corresponde à ordenada na origem e m corresponde ao declive da curva

Esta reta é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes, $(x_1, y_1); \dots; (x_n, y_n)$ onde n deverá corresponder ao número de pontos marcados na curva. A média dos valores de x (concentração dos padrões utilizados) representa-se por \bar{x} e a média dos valores de y (sinal instrumental) representa-se por \bar{y} .

O cálculo do coeficiente de correlação, r , pode ser usado como um dos parâmetros para avaliar uma calibração analítica:

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2] \cdot \sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$$

O valor do coeficiente de correlação pode tomar valores entre -1 e $+1$ ($-1 \leq r \leq +1$). Um valor de $r = +1$ representa uma correlação positiva (curva de declive positivo) e um valor de $r = -1$ representa uma correlação negativa (declive negativo). O coeficiente de correlação indica a correlação dos pontos mas não indica linearidade^[88]. Assumindo que existe uma relação linear entre o sinal analítico, y , e a concentração do analito, x , é possível calcular a curva que melhor se ajusta ao conjunto de pontos experimentais. Assume-se ainda, que todos os erros estão associados aos valores de y e deste modo procura-se a linha que minimiza os desvios na direção dos yy (residuais de y) entre os valores experimentais e os calculados. Por este método demonstra-se que os coeficientes b (ordenada na origem) e m (declive) da reta de regressão de y em x , $y = mx + b$, são dados por:

$$m = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

onde x_i corresponde aos valores individuais de concentração e y_i aos valores individuais de sinal instrumental.

Os coeficientes m e b dão uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ($S_{y/x}$) da curva de regressão:

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (b + mx_i)]^2}{N-2}}$$

Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração.

O parâmetro de coeficiente de variação do método (CVm %) é relevante para a avaliação da linearidade da gama em estudo uma vez que permite comparar diferentes calibrações e métodos analíticos e é expresso pela equação:

$$CVm = \frac{S_{\frac{y}{x}}}{\bar{x}} \times 100$$

Após se ter determinado o declive (m) e ordenada na origem (b) de uma curva de regressão, pode calcular-se um valor de concentração x_i correspondente a um valor medido de y_i . A quantificação de uma amostra por interpolação da curva de calibração é calculada pela seguinte equação:

$$x_i = (y_i - b)/m$$

O desvio padrão relativo (RSD %) permite a medição da percentagem do desvio dos valores quando comparados com a média dos mesmos valores, sendo calculado pela seguinte fórmula

$$RSD = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

Teste das Áreas Normalizadas

Com a equação da curva obtida através da linearização, estimam-se as áreas dos picos obtidas para as concentrações usadas. Para cada concentração usada, faz-se a razão entre o valor da área experimental e o valor da área estimada através da regressão linear. Determina-se a concentração (C_x) para a qual o valor da razão efetuada

anteriormente se aproxima mais de 1. Aplica-se então a seguinte fórmula para cada concentração (p):

$$\text{Normalização} = \frac{A_p C_x}{C_p A_x}$$

onde A_p corresponde à área do pico a uma determinada concentração; C_p corresponde à concentração da solução padrão em causa; e A_x corresponde à área do pico correspondente a C_x . Por fim, traça-se um gráfico dos valores normalizados obtidos para cada concentração, em função da concentração.

Para admitir a existência de linearidade numa determinada gama de concentração, os valores devem estar compreendidos entre 85 e 115%. Sempre que existirem valores normalizados que apresentem um desvio superior aos 15%, é porque não existe linearidade nessa gama de concentrações. Nesse caso, reduz-se a gama de concentrações e aplica-se novamente o teste até que se satisfaçam os requisitos.

Teste de Mandel

A partir de um conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração linear (ISO 8466-1) e a função de calibração não linear (ISO 8466-2), bem como os respetivos desvios padrão residuais, $S_{y/x}$ e $S_{y/x(2^\circ)}$ do seguinte modo:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}}$$

$$S_{y/x(2^\circ)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_{i(2^\circ)})^2}{N - 3}}$$

sendo N o número de padrões de calibração; y_i o sinal obtido para um padrão de determinada concentração; \hat{y}_i o sinal estimado pela função de calibração linear para um

padrão da mesma concentração; e $\hat{y}_i(2^\circ)$ o sinal estimado pela função de calibração polinomial do 2º grau, do padrão da mesma concentração.

A diferença das variâncias (DS^2) é calculada pela seguinte equação:

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

em que N é o número de padrões de calibração. Calcula-se então o valor teste, VT:

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y/x(2^\circ)}^2}$$

O valor teste VT é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, de acordo com o número de graus de liberdade envolvidos, do nível de significância e do tipo de teste realizado (unilateral ou bilateral). Se $VT \leq F$ a função de calibração é linear. No entanto, se $VT > F$, a função de calibração é não linear, devendo-se avaliar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho de forma a obedecer à primeira condição, ou seguir um modelo polinomial de segundo grau.

Teste da homogeneidade de variâncias

A gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias, quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração. Para curvas lineares, o primeiro e o último padrão são analisados em seis réplicas independentes. O teste de homogeneidade de variâncias avalia se a gama de trabalho está bem ajustada, por análise das variâncias dos padrões que delimitam a curva de calibração. O valor da variância de cada padrão é determinado do seguinte modo:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^6 (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^6 y_{i,j}}{n_i}$$

As variâncias dos limites da gama de trabalho são testadas para examinar se existem diferenças significativas, efetuando o cálculo do valor teste PG:

$$1) PG = \frac{S_2^2}{S_1^2}$$

$$2) PG = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Aplica-se a situação 1) quando $S_2^2 > S_1^2$ e a situação 2) quando $S_1^2 > S_2^2$.

Compara-se então este valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Fisher/Snedecor de acordo com o número de graus de liberdade, do nível de significância e do tipo de teste realizado (unilateral ou bilateral).

Se $PG \leq F$ considera-se que as diferenças das variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.

Se $PG > F$ considera-se que as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao primeiro e último padrão, permitam obter $PG \leq F$.

Assim sendo, de forma a quantificar o glifosato em águas residuais, foram construídas curvas de calibração, a partir da derivatização de glifosato com FMOC-Cl, assumindo uma derivatização de 100%. O estudo da gama de linearidade para a deteção do glifosato em águas iniciou-se com a seleção de duas gamas de concentração variando entre 0,1 mg/L e 1,0 mg/L (gama média) e entre 1 µg/L e 100 µg/L (gama baixa). As curvas de calibração foram obtidas com a aplicação da análise de regressão dos mínimos quadrados para os valores medidos.

Na gama média obteve-se linearidade e coeficientes de determinação $\geq 0,995$, mas visto que o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um método focado na deteção de glifosato o qual se encontra em quantidades residuais em águas, optou-se por estudar apenas a gama baixa (1 µg/L - 100 µg/L). Após a avaliação inicial da gama selecionada verificou-se que a gama de linearidade ótima é entre 20 µg/L - 100 µg/L.

Numa primeira abordagem, para a gama entre 20 µg/L a 100 µg/L, verificou-se o não cumprimento do critério de aceitação do teste de homogeneidade das variâncias.

Isto resulta duma oscilação da linha de base no tempo de retenção do pico devido à excessiva recolha de pontos por segundo, o que por sua vez, afeta a quantificação da área dos picos de menor concentração.

O problema foi corrigido baixando a velocidade de aquisição (pontos/segundo). Para definir corretamente um pico este deve ser descrito por 15 a 20 pontos. O pico de 5 µg/L é construído ao longo de 10 segundos. Tomando o valor de 20 pontos e dividindo pelos 10 segundos ficamos com uma velocidade de aquisição de 2 pontos por segundo, tendo sido esta a taxa escolhida. Esta correção diminuiu a variância das áreas dos picos de mais baixa intensidade e tornou o seu tempo de retenção menos disperso.

Após a alteração da velocidade de aquisição, pelos testes aplicados, verificou-se que a gama escolhida é adequada pelo cumprimento de todos os testes estatísticos de linearidade em todas as curvas obtidas em 5 dias distintos (Tabela 6).

Tabela 6- Gama de linearidade, coeficientes de determinação (R^2), declives, ordenada na origem, coeficientes de variação da curva (CVm), análises das áreas normalizadas e resíduos, e os testes de Rikilt e Mandel das 5 curvas de calibração avaliadas.

Curva Calibração	N	Gama de conc. µg/L	Coef. de determ. $R^2 \geq 0,995$	Declive	Ordenada na origem	CVm $\leq 5\%$ (%)	Área normalizadas (%) [85-115]	Resíduos (%) [85-115]	Rikilt (%) [90-110]	Teste de Mandel $PG \leq F(0,05;1;N-3)$
1	9	99-21	0,9999	185,6	-302,16	0,58	[98-105]	[99- 101]	[96-102]	$0,72 \leq 5,99$
2	9	101-20	0,9995	187,97	-481,76	1,47	[96,3-106,2]	[98- 103]	[95-105]	$3,2 \leq 5,99$
3	9	100-20	0,9998	188,79	-341,21	0,67	[98,4-102,3]	[98- 102]	[97-102]	$0,02 \leq 5,99$
4	9	100-20	0,9995	188,73	160,1	1,56	[94,4-100,6]	[98- 103]	[98-104]	$0,14 \leq 5,99$
5	9	100-20	0,9997	182,09	218,37	1,13	[95,7-102,1]	[98- 104]	[98-105]	$-0,11 \leq 5,99$

A variação do declive e área do primeiro e último padrão foram regularmente controlados com recurso a cartas de controlo (Anexo IV). A variação relativa (%RSD) destes valores foi de 2% para o declive e 5% para a área do primeiro padrão da curva de calibração (20 µg/L). Como se pode observar na Tabela 6, os coeficientes de determinação foram sempre superiores a 0,995 e os coeficientes de variação do método estão consistentemente abaixo dos 2%. Os resíduos entre [98%-104%], dentro dos

limites -15% e 15%. O teste das áreas normalizadas obteve valores entre [95%-107%] dentro da variação permitida de 15%. O teste de Rikilt obteve valores entre os [95%-105%] e o teste de Mandel obteve valores mais baixos do valor de F=5,99.

De seguida, apresentam-se como exemplo os resultados dos estudos de linearidade para a curva 3. Como se pode verificar, os pontos experimentais conduzem a um ajuste linear da curva de calibração (Figura 13).

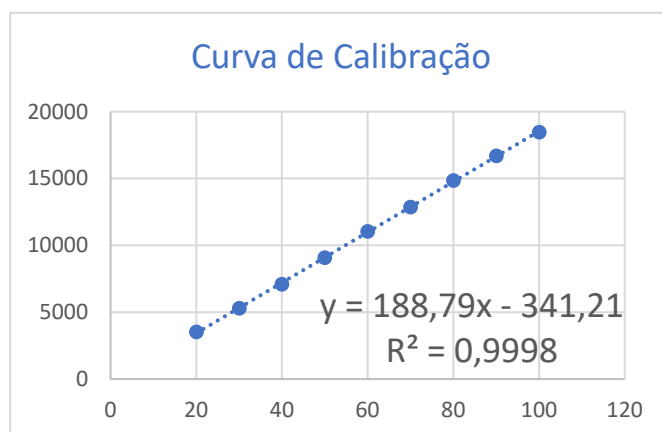


Figura 13 – Curva de calibração nº 3, $R^2=0,9998$.

A Figura 14, apresenta a análise de resíduos, calculada pela percentagem do desvio da razão área experimental/ área estimada pelos valores da curva de calibração. A Figura 15, demonstra graficamente a percentagem dos valores normalizados das áreas, calculados pelos valores da concentração e área que teve o menor desvio na análise de resíduos. Foram obtidos valores entre 98,4% e 102,3%, dentro dos limites aceitáveis.

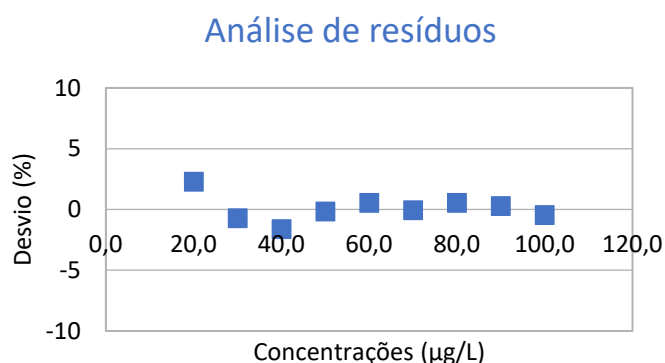


Figura 14 - Análise de resíduos da curva nº3.

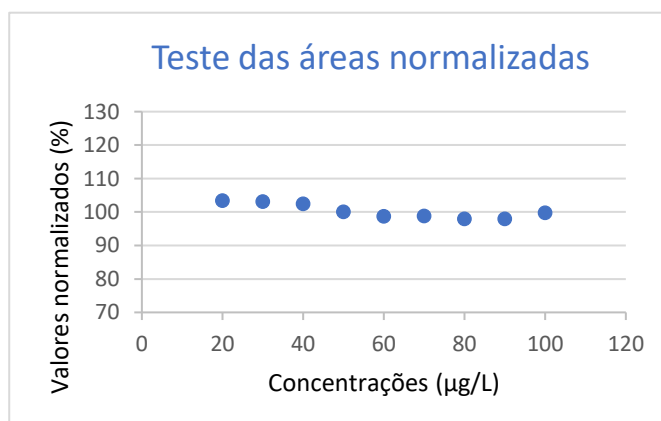


Figura 15 – Teste das áreas normalizadas para a curva nº3.

Teste de Mandel

Foi feito um ajuste linear (Figura 16), com os valores de área estimados com uma curva de calibração linear, e um ajuste polinomial (Figura 17) com os valores de área estimados com uma curva de calibração polinomial de 2º grau. De seguida foram calculados os respetivos desvios padrão residuais ($S_{y/x}$ e $S_{y/x(2^a)}$), e a diferença das variâncias DS^2 . É então calculado o valor teste VT e comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher.

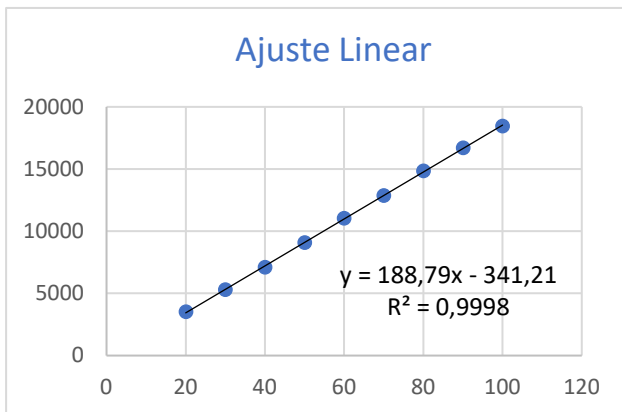


Figura 16 – Ajuste linear da curva de calibração n.º3

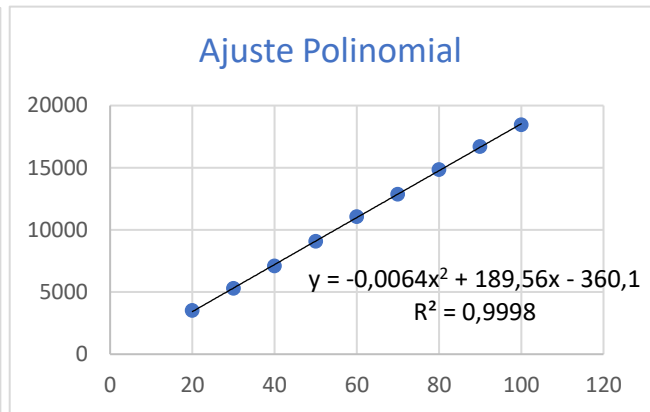


Figura 17 – Ajuste polinomial da curva n.º 3

Ajuste Linear

$(y-y_i)^2$
7,105E+03
2,076E+03
6,306E+03
5,989E+01
3,494E+03
2,572E+02
1,350E+04
1,470E+03
6,164E+03

Soma =	4,043E+04
N-2 =	7
$S_{y/x}$ =	7,600E+01

Ajuste Polinomial

$(y-y_i)^2$
6,225E+03
2,166E+03
5,969E+03
1,378E+02
2,975E+03
3,960E+02
1,394E+04
1,365E+03
7,133E+03

Soma =	4,030E+04
N-3 =	6
$S_{y/x(2^a)}$ =	8,196E+01

$$DS^2 = (N - 2) S_{y/x}^2 - (N - 3) S_{y/x(2^a)}^2$$

$$DS^2 = 1,266E+02$$

$$VT = DS^2 / S_{y/x(2^a)}^2$$

$$VT = 0,02$$

$$F_{(1,6)95\%} = 5,99$$

$VT < F$, logo a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

Teste da Homogeneidade de Variâncias (Teste F)

O teste da homogeneidade de variâncias é dado pela análise das variâncias dos padrões que delimitam a curva de calibração, verificando se existem diferenças significativas nas suas variâncias. O valor PG é calculado, e comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher/Snedecor.

Concentração inferior: 20 µg/L

Concentração superior: 100 µg/L

Área
3532
3563
3559
3412
3535
3634

Área
19698
19632
20056
19573
19878
19751

N-1 =	5
Média =	3539,166667
Desvio Padrão =	72,3807065
Desvio Relativo =	2,05 (%)
Variância =	5,2390E+03

N-1 =	5
Média =	19764,666667
Desvio Padrão =	177,0239155
Desvio Relativo =	0,90 (%)
Variância =	3,1337E+04

O valor de $F_{99\%} = 10,97$, e o valor PG obtido é 5,98.

Uma vez que PG é inferior ao F, pode afirmar-se que existe homogeneidade de variâncias na gama de trabalho estudada (µg/L)

3.2.2. Limiares analíticos: limite de deteção (LD) e de quantificação (LQ)

Para determinar os limiares analíticos foi tido como base o desvio padrão residual (S_y) das curvas de calibração obtidas:

$$LD = 3 * \frac{S_y}{m} \quad LQ = 10 * \frac{S_y}{m}$$

Os limiares analíticos também podem ser determinados recorrendo à injeção de padrões correspondentes à concentração mais baixa da gama de linearidade em condições de repetibilidade e precisão intermédia (n=6), utilizando o desvio padrão associado (S), através da fórmula:

$$LD=3*S \quad LQ=10*S$$

Os valores calculados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Limiares analíticos calculados através dos desvios padrão das curvas de calibração e do desvio padrão de repetibilidade (n=6).

Concentração mais baixa	Curvas de calibração		Repetibilidade		Precisão intermédia	
	LD µg/L	LQ µg/L	LD µg/L	LQ µg/L	LD µg/L	LQ µg/L
20,0	4,3	14,4	1,1	3,8	4,8	16,0

Foram assumidos os valores de LD=4,3 µg/L e LQ= 14,4 µg/L obtidos pelo cálculo do desvio padrão da curva de calibração, sendo este método baseado no desvio padrão e declive de várias curvas, portanto mais representativo que os valores obtidos pela análise em condições de repetibilidade e precisão intermédia.

Os resultados obtidos de LQ=14,4 µg/L estão de acordo com o uso do último padrão de 20 µg/L. Foi injetado um padrão na mesma concentração do LD calculado, tendo-se obtido um pico distinguível da linha de base.

3.2.3. Precisão instrumental

A precisão foi avaliada por estudos de repetibilidade e de precisão intermédia em três diferentes níveis de concentração correspondentes ao menor, intermédio e maior valor de concentração da gama de trabalho. Os resultados encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados de RSD (%) de três níveis de concentração, avaliados por estudos de repetibilidade (n=6) e precisão intermédia (n=3).

Concentração baixa			Concentração intermédia			Concentração alta		
Conc. (µg/L)	Repet. (RSD%)	Prec. Interm. (RSD%)	Conc. (µg/L)	Repet. (RSD%)	Prec. Interm. (RSD%)	Conc. (µg/L)	Repet. (RSD%)	Prec. Interm. (RSD%)
20,00	0,03	8,51	50,00	0,20	-	100,00	0,58	6,23

As condições de repetibilidade foram avaliadas através da injeção repetida da mesma amostra num curto espaço de tempo, ao longo da gama de trabalho.

As condições de precisão intermédia foram avaliadas pela injeção de amostras ao longo de 3 dias.

Os resultados obtidos para os desvios padrão em condições de repetibilidade e precisão intermédia estão dentro dos limites aceitáveis de 10-15%, podendo concluir que o método é preciso. Como seria de esperar, os valores obtidos em condições de precisão intermédia têm um desvio maior, pois são o resultado da análise de amostras em dias diferentes.

Seletividade

A seletividade foi avaliada pela injeção de água ultrapura, branco de derivatização e matriz de amostras branco, verificando que não existiam contaminantes com o mesmo tempo de retenção do gli-Fmoc. Nas fortificações destas amostras o tempo de retenção manteve-se nos 8,95 minutos.

Exatidão

O método mais comum de avaliar a exatidão é através de recuperações recorrendo a um MRC (avaliação direta). Este passo é vital, especialmente quando existem derivatizações envolvidas, de forma a avaliar se o resultado se encontra ou não perto do valor verdadeiro. Caso seguidamente fosse necessário fazer a implementação do método, este parâmetro teria de ser avaliado.

3.3 Validação do método global para a quantificação do glifosato em águas superficiais

3.3.1 Seleção das condições de extração em fase solida (SPE)

Tendo por base as condições de análise descritos na literatura, os principais cartuchos utilizados na medição de gli-Fmoc são a fase C18, Strata-X (Phenomenex) e Oasis HLB (Waters) ^[31,63,64, 68,89,90]. O uso de um cartucho SPE com uma fase estacionária similar à da coluna faz com que certos contaminantes também sejam concentrados dificultando a separação no HPLC e consequente quantificação ^[62,64]. Desta forma, a hipótese do uso de uma fase C18 foi abandonada. Os cartuchos Strata-X (Phenomenex) e Oasis HLB (Waters) são similares (Figura 18), contendo ambos uma pirrolidona (hidrofílica), responsável pelas interações dipolo-dipolo e pontes de hidrogénio com a parte polar do gli-Fmoc, e anel aromático (lipofílica) capaz de ter interações hidrofóbicas

e ligações π - π com o lado apolar do gli-Fmoc, sendo que o cartucho Oasis HLB contém ainda cadeias alifáticas. Estes cartuchos têm a vantagem de se poderem secar antes da eluição, facilitando o processo de evaporação/reconstituição do extrato metanólico. Foram então eleitos os cartuchos Oasis HLB (200 mg) para otimização.

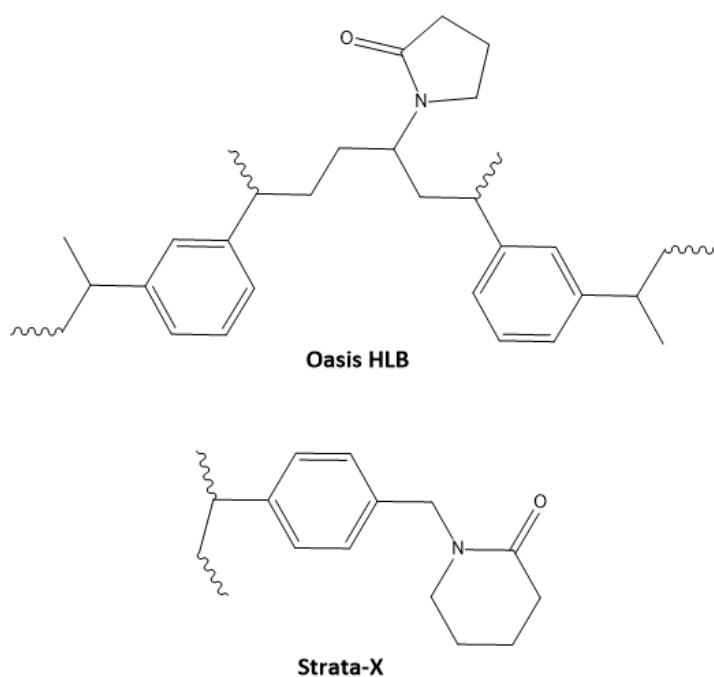


Figura 18 – Estrutura molecular dos enchimentos poliméricos de SPE, Waters Oasis HLB e Phenomenex Strata-X.

Dando início à otimização do processo de SPE, foram utilizados 100 mL de água aos quais se adicionou 1 mL de ácido fórmico e fortificou-se com 100 μ L de 1 g/L de gli-Fmoc, que resultaria numa concentração de 100 μ L/L na reconstituição do extrato com 1 mL caso a recuperação fosse de 100 %.

Numa primeira abordagem, o método utilizado para o processo de SPE foi adaptado de Oulkar *et al.*^[83], alterando os valores de caudal (para 1,5 a 2 mL/min), reduzindo a possibilidade de perda de analito, o volume da amostra (para 100 mL) e o volume de eluição (para 10 mL MeOH), confirmando que todo o analito era eluído. O procedimento adaptado foi o seguinte: 10 mL MeOH; 10 mL 1% ácido fórmico; amostra 100mL; 10 mL H₂O; 10 mL DCM; 10 min vácuo; 10 mL MeOH.

Este método não originou recuperações aceitáveis. As baixas recuperações obtidas podem advir dos três seguintes fatores: O volume de amostra eluída no cartucho (100 mL) levar a perdas de analito^[64]; o passo de lavagem com DCM que pode eluir analito^[67]; ou a insuficiência de volume de metanol no passo de eluição, fazendo com que o analito continue adsorvido no cartucho.

Foi então retirado o passo de lavagem com DCM, sugerido por Ghanem *et al.*^[90] e que Demonte *et al.*^[67] indicou como sendo um possível causador de baixa recuperação, tendo sido adaptado o seguinte método: 6 mL MeOH (condicionamento); 6 mL 1% ácido fórmico (equilíbrio); amostra 100mL; 10 mL H₂O (lavagem); 30 min vácuo (secagem); 10 mL MeOH (eluição). Foi construída uma curva de eluição, na qual se extraiu o analito com 4x 2,5 mL de metanol, confirmando ser suficiente para uma eluição total do gli-Fmoc.

O método alterado foi testado com uma fortificação de gli-Fmoc em 100 mL de água ultrapura, obtendo-se uma recuperação de 98 %.

3.3.2 Derivatização em amostras de águas superficiais

Foi necessário ajustar a quantidade mínima de amostra a concentrar para que os LQ do método desenvolvido se pudessem comparar aos valores de LQ descritos no Decreto-Lei n.º 152/2017 (<0,1 µg/L). Tendo em conta que o LQ calculado pela curva de calibração é de 14,4 µg/L, para chegar a 0,1 µg/L seria necessário derivatizar 80 mL reconstituindo o extrato em 0,5 mL. Este volume de amostra necessário para derivatização, foi anteriormente descrito por Hanke *et al.*^[63] tendo-se adotado o respetivo procedimento^[63] para prosseguir. Para a reconstituição após o passo SPE foi escolhido um volume de 0,5 mL.

Como indicado previamente o glifosato forma complexos com metais presentes em sedimentos de terra^[28-34]. Em análises de água de rio, é necessário destruir estes complexos. Alguns investigadores utilizam HCl^[31,63], de forma a colocar a amostra a pH 1 no início do procedimento, durante 30 minutos, suficiente para tornar o glifosato disponível^[31].

Foi dado início aos testes de derivatização com a amostra de captação (CAPTJ) do rio Tejo.

3.3.2.1 Tempo de reação

Na literatura o tempo de reação varia entre 5 minutos e 16 h, variando de acordo com as quantidades e concentrações de reagentes. Foram testadas 2h e 16h sendo que os resultados se encontram na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados de recuperação do tempo de reação (n=3).

Solução	Notas	Recuperação	%RSD (n=3)
5 µg/L Gli	2h, 5% ACN	68 %	9 %
5 µg/L Gli	16h, 5% ACN	36 %	13 %

A condição de 16 horas de tempo de reação apresentou um valor médio de recuperação de 36%, possivelmente devido à hidrólise da amida do gli-Fmoc a pH 9. Para o tempo de reação de 2 horas obteve-se uma recuperação média de 68%. Como os valores de recuperação foram aceitáveis e como o procedimento seguido sugeria o uso deste tempo de reação, por forma a manter o procedimento de preparação de amostra curto, foi escolhido as 2 horas para o passo de derivatização de amostra.

Nesta primeira injeção de amostra de água de rio verificou-se um ligeiro desvio do tempo de retenção do gli-Fmoc, juntamente com uma co-eluição (Figura 19), confirmado pela fortificação de gli-Fmoc na amostra. Foi alterado o método de gradiente tentando diminuir o tempo de retenção do gli-Fmoc, impedindo co-eluições. O declive de gradiente foi alterado, aumentando o declive da primeira curva de

gradiente (10-25 %B, 0-1 min), e diminuindo o declive da segunda curva de gradiente 25-90 %B, 2-11 min), acompanhando a intensidade de pico e o cálculo de efeito matriz.

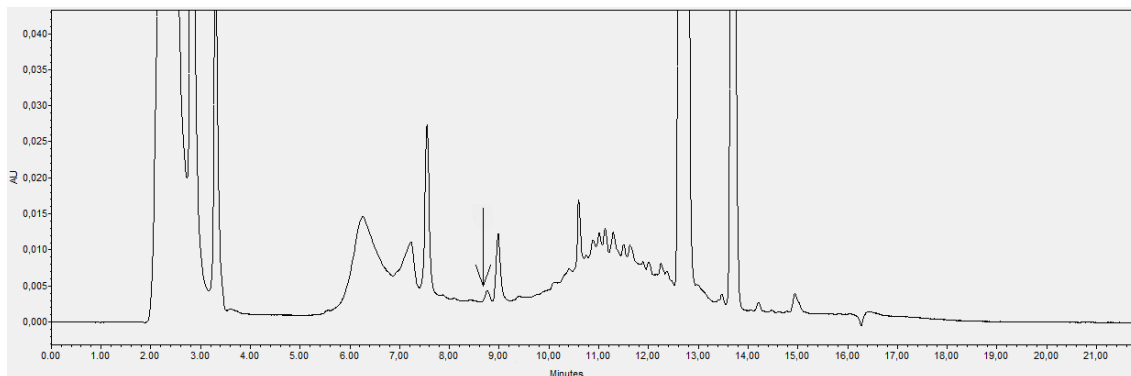


Figura 19 – Resultado da injeção da primeira amostra. Demonstra o desvio do tempo de retenção do pico do glifosato, e co-eluição.

3.3.2.2. Avaliação da derivatização

De forma a determinar se a derivatização em 80 mL de amostra é de 100%, foram derivatizadas seis amostras de acordo com o procedimento referido [63], sendo que em três delas foram adicionados 50 µL de uma solução de 1 mg/L de glifosato, e a três foram adicionados 50 µL de uma solução de 1 mg/L gli-Fmoc (Figura 20). Desta forma ambas as soluções teriam de ter a mesma recuperação caso a derivatização fosse completa (100 µg/L).

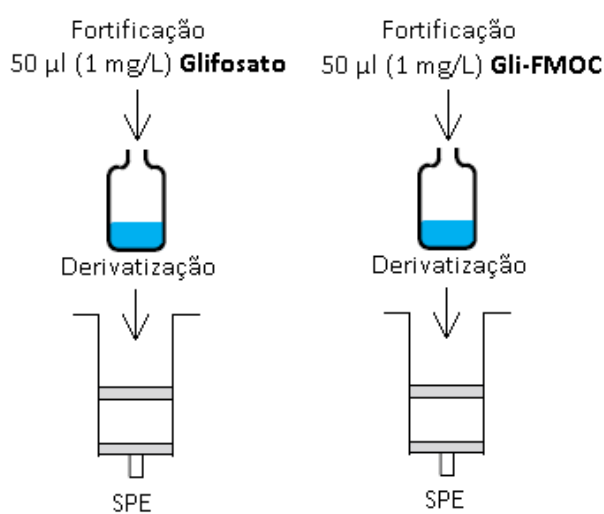


Figura 20 – Esquema de derivatização com fortificação de glifosato e gli-Fmoc

Após reconstituição do extrato com 0,5 mL de água ultrapura, foi calculada a eficiência do processo nas amostras. Obteve-se 71 % (RSD 7 %) para as amostras com fortificação de glifosato, e de 74 % (RSD 6 %) para as amostras com fortificação de gli-Fmoc. Demonstrando que a derivatização é quase completa para fortificações com concentração final de 100 µg/L.

3.3.3. Efeito matriz do método cromatográfico

De modo a identificar a causa das eficiências do processo na casa dos 70%, foi calculado o efeito matriz no método cromatográfico, que poderia estar a impedir uma quantificação correta do pico.

O efeito matriz foi calculado para as concentrações de 100 e 20 µg/L, fazendo a razão da área de fortificação de branco após o SPE/ área do padrão, tendo-se obtido os valores 4,9 % e 6 % respetivamente. Conclui-se então que o efeito matriz não é o único responsável pela eficiência do processo de 70%. Desta forma, este nível de eficiência de processo deve advir das condições nas quais o passo de derivatização é executado.

3.3.4. Testes de recuperação

Avaliado o método de derivatização de amostras na gama alta, obteve-se uma eficiência de processo na casa dos 70 %. Esta percentagem de eficiência de processo pode ter vários fatores de causa, indicados na literatura^[49, 63, 64, 83], sendo então avaliados individualmente nos passos seguintes.

3.3.4.1. Influência do volume de acetonitrilo na derivatização e no passo de SPE

Um parâmetro importante é a quantidade de acetonitrilo usada na derivatização. Uma percentagem muito baixa, <5 %, pode não garantir a derivatização total do glifosato^[63], e uma percentagem superior a 10 % pode influenciar negativamente o processo de SPE^[64,83,90].

De forma a confirmar a sua influência, e averiguar a percentagem de derivatização do glifosato, foram testados 10 % e 5 % de acetonitrilo (com a mesma concentração final de FMOC-Cl) resultando nos seguintes resultados (Tabela 10):

Tabela 10 – Resultados do teste da influência da % de acetonitrilo na derivatização e recuperação (n=3)

Solução	Notas	Recuperação	%RSD (n=3)
5 µg/L Gli	10% ACN	73 %	8%
5 µg/L Gli	5% ACN	68 %	10%

Estes resultados demonstram a adequabilidade da utilização de 10 % de acetonitrilo para que a derivatização seja completa como indicado por Hanke *et al.*^[63], demonstrando que uma concentração de 10 % de acetonitrilo não afeta a eficiência do processo.

3.3.4.2 Volume de *breakthrough* e excesso de produto secundário – FMOC-OH

Grandes volumes de amostra podem introduzir perdas no processo de concentração^[64]. De forma a avaliar o *breakthrough* foram fortificadas 9 amostras com gli-Fmoc de forma a se obter 1 mg/L após reconstituição, três com 40 mL, três com 80 mL e outras três com 160 mL sendo os seus volumes finais de 50 mL, 100 mL e 200 mL. O procedimento seguido foi o mesmo das derivatizações, no qual apenas não se adicionou o agente derivatizante FMOC-Cl.

Tabela 11 – Resultados do teste de *breakthrough* e excesso de FMOC-OH.(n=3 por condição)

Solução	Volume Total	Recuperação	%RSD (n=3)
2,5 µg/L Gli-Fmoc	200 mL	17 %	13%
5 µg/L Gli-Fmoc	100 mL	69 %	7%
10 µg/L Gli-Fmoc	50 mL	68 %	8%

Os resultados da Tabela 11 indicam que o volume de *breakthrough* está entre os 100 e os 200 mL.

Sem derivatização, obteve-se uma recuperação de 69% para um volume de 100 mL, o que confirma que o excesso de produto secundário FMOC-OH não tem qualquer influência na recuperação (não estando presente neste teste) na gama de concentração a que é adicionado.

3.3.5. Efeito matriz no passo SPE

O efeito matriz no SPE pode ser causado por compostos presentes na água de rio, que interferem na capacidade da metodologia global para a obtenção de recuperações superiores. De forma a obter uma maior recuperação sem a interferência dos contaminantes do rio, poder-se-ia introduzir um passo de lavagem da amostra pré SPE, recorrendo a acetato de etilo^[49] ou éter dietílico^[66, 76].

Visto que a eficiência de processo de 70% é aceitável, decidiu-se não introduzir o passo de lavagem, o qual obrigava um aumento do tempo de preparação de amostra bem como o uso de solventes orgânicos, prosseguindo-se para a avaliação da gama mais baixa seguida de implementação do método.

Verificando que as amostras contêm partículas sólidas em suspensão, o primeiro passo de acidificação foi alterado, tendo-se acidificado os 2,5 L de amostra de forma a colocar a amostra a pH 1 tornando possível a descomplexação do glifosato das partículas em suspensão, para então avaliar a recuperação.

Foram feitos ensaios de recuperação para 3 gamas de concentração de gli-Fmoc: 20 µg/L (gama baixa), 50 µg/L (gama média) e 100 µg/L (gama alta) Os resultados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12– Recuperações obtidas nas 3 gamas de concentração (%) e respetivos RSD (%)

Concentração baixa			Concentração intermédia			Concentração alta		
Conc. (µg/L)	Recup. (%)	RSD (%)	Conc. (µg/L)	Recup. (%)	RSD (%)	Conc. (µg/L)	Recup. (%)	RSD (%)
20	112	9	50	75	7	100	71	7

Os valores médios de recuperação obtidos para a gama alta (71%) e média (75%) são semelhantes e estão de acordo com os resultados obtidos nos testes anteriores (Ver Tabela 9). Nas amostras com fortificação (20 µg/L), obteve-se uma recuperação de 112%, indicando a presença de glifosato. Baseado na literatura^[28-32], este resultado era expectável e deve-se à complexação do glifosato na água com óxidos de metais e matéria orgânica presentes nas partículas em suspensão.

A acidificação da amostra antes da medição do volume permitiu que o glifosato descomplexasse da matéria orgânica e óxidos de metais presentes nos 2,5 L de amostra. Desta forma, o glifosato quantificado poderia não estar em solução na altura da recolha, mas complexado com as partículas presentes na água.

Os desvios padrão relativos (RSD) obtidos nas recuperações estão consistentemente abaixo de 15%, o que indica que o método desenvolvido é preciso.

3.3.6. Implementação do método – amostras de água de captação

De forma a quantificar o glifosato avaliando a influência das partículas presentes em amostra, foi escolhida uma gama mais baixa (20 µg/L), utilizando outra amostra de captação do rio Tejo (CAPTJ).

Foram filtrados 80 mL de amostra, de forma a eliminar partículas em suspensão e foi derivatizada sem fortificação. O restante da amostra foi então acidificado, e foram fortificadas três amostras com 20 µg/L de glifosato e outras três amostras foram derivatizadas sem fortificação. Os resultados encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 – Implementação do método – Resultados de derivatização de amostra com e sem partículas, e com fortificação na presença de partículas

Sem partículas Sem fortificação	Com partículas Sem fortificação	Com partículas Com fortificação 20 µg/L	
Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
Não detetado	Detetado abaixo do LQ	118	8

Na amostra de água sem partículas e sem fortificação, não se detetou nenhum pico no tempo de retenção esperado. Uma fortificação pós SPE 20 µg/L foi realizada na mesma amostra, confirmando-se a ocorrência de um sinal cromatográfico no tempo de retenção específico e um valor de recuperação de 94%.

Nas amostras com partículas e sem fortificação foi detetada a presença de glifosato abaixo do LQ (14,4 µg/L), e para a amostra com fortificação foi obtida uma recuperação de 118% com RSD de 8%. Estes dados confirmam mais uma vez a presença de glifosato complexado nos sedimentos presentes em amostra, estando este resultado de acordo com a literatura.

De acordo com os resultados obtidos para a amostra filtrada, é provável que o glifosato não estivesse em solução, não sendo possível concluir que este valor detetado seja representativo da concentração de glifosato solubilizado em água de rio.

O método desenvolvido garante recuperações entre 71-118% em toda a gama de linearidade (20-100 µg/L). De referir que, uma vez que com o passo de SPE se atingiu uma concentração de amostra de 160 vezes (80 mL amostra para 0,5 mL de volume de reconstituição), o LQ do método é de 90 ng/L, cumprindo assim os requisitos impostos pelo Decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de dezembro.

Adicionalmente, como indicado anteriormente, de forma a aumentar a percentagem das recuperações, pode ainda ser introduzido passo de lavagem de pré SPE de forma a eliminar contaminações que influenciam negativamente o passo de concentração, visíveis na Figura 21.

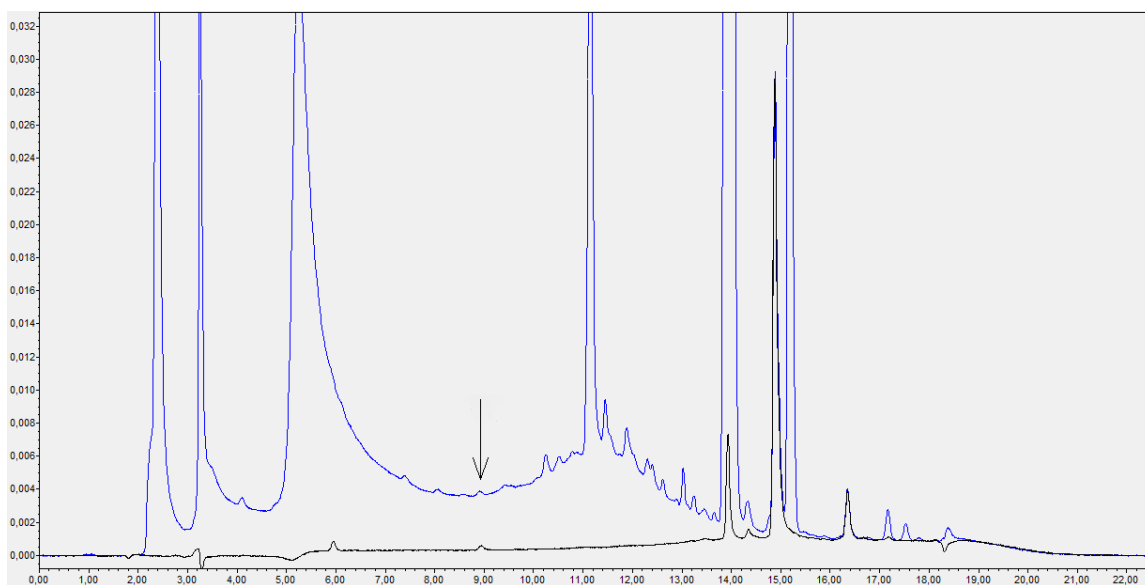


Figura 21 – Sobreposição do cromatograma de um padrão de 10 µg/L (preto) com um cromatograma de uma amostra real com fortificação de 10 µg/L (azul). A Seta indica o pico correspondente ao Gli-Fmoc (8,95 min).

4. Conclusões e limitações

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

Na validação do método analítico teve-se em conta a necessidade de satisfazer os requisitos mínimos impostos pelo Decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de dezembro. De facto, o limite de quantificação do método SPE-HPLC-DAD para a análise de glifosato foi de 90 ng/L, sendo inferior ao limite imposto por lei de 100 ng/L.

Na validação do método, a linearidade foi o primeiro parâmetro a ser estudado. Duas gamas de concentração foram estudadas, tendo-se comprovado a sua linearidade nas gamas selecionadas. Como gama de trabalho optou-se pela utilização da gama baixa, compreendida entre 20-100 µg/L, de modo atingir limiares analíticos similares aos impostos por lei. Esta gama de linearidade foi estudada independentemente 5 vezes cumprindo sempre os requisitos e comprovando a linearidade da gama estudada. Os testes estatísticos estudados foram o teste das áreas normalizadas, teste de RIKILT, teste Mandel, análise de resíduos e homogeneidade de variâncias.

A precisão foi também estudada por repetibilidade e precisão intermédia, tendo-se obtidos desvios padrão relativos inferiores a 10-15%, demonstrando a precisão do método.

Na validação do método global para a quantificação do glifosato em águas superficiais, foram otimizados os passos de concentração/limpeza da amostra por SPE e o passo de derivatização. Na otimização do SPE foi retirado o passo de lavagem com DCM, e o volume de *breakthrough* do método situa-se entre os 100 e 200 mL. Na derivatização foram usadas 2 horas e 10% de ACN, de acordo com a literatura.

A metodologia otimizada assegura a derivatização de glifosato a um nível de concentração residual em amostras de água superficial. Conclui-se que o método SPE-HPLC-DAD com recurso a derivatização com Fmoc-Cl proposto para análise de glifosato em águas superficiais é eficaz por cumprir os parâmetros de validação de métodos

cromatográficos para uma calibração linear, por se ter obtido valores de precisão do método dentro dos limites aceitáveis, e pela obtenção de recuperações entre 71-118%.

Após alterações ao método cromatográfico, não foi necessário mitigar o efeito matriz, visto que este é de 4-6%, tendo sido vantajosa a eliminação do passo de lavagem de cartucho SPE com DCM, eliminando o uso deste solvente.

O método de SPE-HPLC-DAD foi aplicado a uma campanha de água de captação do rio Tejo tendo-se observado a presença de glifosato complexado com partículas em suspensão, não sendo por isso representativo da concentração de glifosato na água.

Deve ser feita uma análise contínua de glifosato em água de rio, variando o ponto de recolha, bem como a profundidade de recolha. A análise de glifosato em água deve ser acompanhada pela análise das partículas presentes na água, tomando a decisão sobre qual das hipóteses é escolhida para controlo de glifosato em água.

O método pode ainda ser adaptado para um detetor de fluorescência, aumentando os limites de deteção comparativamente com os obtidos e não contém nenhuma característica que o impeça de ser compatível com o uso de MS, tendo a possibilidade de quantificar a um nível mais baixo.

A análise do glifosato na literatura é acompanhada da análise do produto de degradação AMPA. Apesar de este método não ter em conta o produto de degradação, pode ser adaptado, pois o processo de derivatização e concentração são similares. Neste projeto foi decidido validar e otimizar o método apenas para o glifosato.

5. Bibliografia

1. Dill GM, Cajacob CA, Padgett SR. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Manag Sci.* 2008;64(4):326-31.
2. Lobo AM LA. *Biossíntese de produtos naturais*. 1 ed: IST Press; 2008.
3. Siehl DL. *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*. Roe RM, Burton, J.D., Kuhr, R.J., editor: IOS Press; 1997.
4. Glyphosate: mechanism of action [site]. [Visitado no dia 8 de Agosto de 2019]. Disponível em: <https://www.glyphosate.eu/glyphosate-mechanism-action>
5. 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.
6. Chen Y, Wu F, Lin Y, Deng N, Bazhin N, Glebov E. Photodegradation of glyphosate in the ferrioxalate system. *J Hazard Mater.* 2007;148(1-2):360-5.
7. Compound summary glyphosate [site]. [Visitado no dia 8 de Agosto de 2019]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>
8. 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.
9. Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur.* 2016;28(1):3.
10. Ph.D JAH. Drinking Water Assessment for the Registration Review of Glyphosate. In: AGENCY USEP, editor. 2017.
11. EPA Takes Next Step in Review Process for Herbicide Glyphosate, Reaffirms No Risk to Public Health. [site]. [Visitado no dia 8 de Agosto de 2019]. Disponível em: <https://www.epa.gov/newsreleases/epa-takes-next-step-review-process-herbicide-glyphosate-reaffirms-no-risk-public-health>
12. Bai SH, Ogbourne SM. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016;23(19):18988-9001.
13. What are EPA's drinking water regulations for glyphosate [site]. [Visitado no dia 9 de Agosto de 2019] Disponível em: <https://safewater.zendesk.com/hc/en-us/articles/212076457-4-What-are-EPA-s-drinking-water-regulations-for-glyphosate->

14. EFSA (European Food Safety Authority), 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 2015;13(11):4302, 107 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4302
15. CJ P. Open letter: Review of the Carcinogenicity of Glyphosate by EFSA and BfR. In: Fund ED, editor. 2016.
16. 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.
17. Mesnage R, Defarge N, Spiroux de Vendomois J, Seralini GE. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem Toxicol.* 2015;84:133-53.
18. Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health.* 2016;15:19.
19. 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):117-26.
20. Armiliato N, Ammar D, Nezzi L, Stralioetto M, Muller YM, Nazari EM. Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of zebrafish *Danio rerio* exposed to glyphosate. *J Toxicol Environ Health A.* 2014;77(7):405-14.
21. Pandey A, Rudraiah M. Analysis of endocrine disruption effect of Roundup((R)) in adrenal gland of male rats. *Toxicol Rep.* 2015;2:1075-85.
22. Thongprakaisang S, Thiantanawat A, Rangkadilok N, Suriyo T, Satayavivad J. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem Toxicol.* 2013;59:129-36.
23. Olorunsogo OO BE, Bassir O. Effect of Glyphosate on Rat Liver Mitochondria In Vivo. *Bull Environrn Contam Toxicol* 22,357-364 (1979).
24. Burella PM, Simoniello MF, Poletta GL. Evaluation of Stage-Dependent Genotoxic Effect of Roundup((R)) (Glyphosate) on *Caiman latirostris* Embryos. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2017;72(1):50-7.
25. Cakmak I, Yazici A, Tutus Y, Ozturk L. Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. *European Journal of Agronomy.* 2009;31(3):114-9.
26. 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.

27. 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.
28. Munira S, Farenhorst A, Flaten D, Grant C. Phosphate fertilizer impacts on glyphosate sorption by soil. *Chemosphere.* 2016;153:471-7.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. DIRETIVA (UE) 2015/1787 DA COMISSÃO de 6 de outubro de 2015.
39. Diário da República, 1.ª série — N.º 235 — 7 de dezembro de 2017. [Visitado em 11 de Agosto de 2019]. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/114315242>
40. [Regulação de execução \(UE\) 2019/724 da comissão de 10 de maio de 2019 \[Visitado em 11 de Agosto de 2019\]. Disponível em: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0724&from=EN](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0724&from=EN)

41. LS E. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). Pure & Appl, Chem 1993.
42. Skoog DA HF, West DM Fundamentals Of Analytical Chemistry. 7 ed: Saunders College Publishing 1990; 513-539; 580-613.
43. Willard HH ML, Dean JA, Settle FA. Instrumental Methods of Analysis. 7 ed: Wadsworth, Inc; 1988.
44. Bora A. Lecture 7. Middle Atlantic Mass Spectrometry Laboratory. 2012.
45. How Does High Performance Liquid Chromatography Work? [site]. [Visitado em 13 de Agosto de 2019] Disponível em: https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=en_US&cid=10049055
46. Barceló D, Hennion M-C. Chromatographic and Related Techniques for the Analysis and Detection of Pesticides. Trace Determination of Pesticides and their Degradation Products in Water. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry 1997. p. 157-247.
47. Fundamentals of Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Practical Tips for Developing Sample Preparation Methods. Waters Corporation. 2013.
48. Smith S. Solid Phase Extraction (SPE): An introduction to basic theory, method development, and applications. 2016.
49. Corbera M, Hidalgo M, Salvadó V. Extraction and Preconcentration of the Herbicide Glyphosate and its Metabolite AMPA Using Anion-Exchange Solid Phases. Microchimica Acta. 2006;153(3-4):203-9.
50. Sample Preparation Solid Phase Extraction | Disks | Cartridges.
51. Bielicka-Daszkievicz K, Voelkel A. Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents. Talanta. 2009;80(2):614-21.
52. 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.
53. 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.
54. 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.

55. Kaczyński P, Łozowicka B. Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection. *Open Chemistry*. 2015;13(1).
56. Alferness PL IY. Determination of Glyphosate and (Aminomethyl)phosphonic Acid in Soil, Plant and Animal Matrices, and Water by Capillary Gas Chromatography with Mass-Selective Detection. *J Agric Food Chem* 1994, 42, 2751-2759.
57. Kataoka H RS, Sakiyama N, Makita M. Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 726 (1996) 253-258.
58. Natangelo M, Benfenati E, De Gregorio G, Fanelli R, Ciotti G. GC-MS analysis of n-phosphonomethylglycine (glyphosate) samples through derivatization with a perfluoroanhydride and trifluoroethanol: Identification of by-products. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 1993;38(3-4):225-32.
59. Tsunoda N. Simultaneous determination of the herbicides glyphosate, glufosinate and bialaphos and their metabolites by capillary gas chromatography-ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 637 (1993) 167-173.
60. 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
61. J. AOAC Int.80,464(1997). CAS-071-83-6 (glyphosate) N-(phosphonomethyl)glycine. Revised: March 2002.
62. Hidalgo C, Rios C, Hidalgo M, Salvado V, Sancho JV, Hernandez F. Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. *J Chromatogr A*. 2004;1035(1):153-7.
63. 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.
64. Toss V, Leito I, Yurchenko S, Freiberg R, Kruse A. Determination of glyphosate in surface water with high organic matter content. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(9):7880-8.
65. Catrinck TCPG, Dias A, Aguiar MCS, Silvério FO, Fidêncio PH, Pinho GP. A Simple and Efficient Method for Derivatization of Glyphosate and AMPA Using 9-Fluorenylmethyl

Chloroformate and Spectrophotometric Analysis. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2014.

66. Bot BL CK, Pelle D, Briens C, Seux R, Clérnent M. Optimization and Performance Evaluation of the Analysis of Glyphosate and AMPA in Water by HPLC with Fluorescence Detection. *Chromatographia* 2002, 56, August (No 3/4).

67. 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.

68. Methods of Analysis by the U.S. Geological Survey Organic Geochemistry Research Group— Determination of Glyphosate, Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate in Water Using Online Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry [Internet]. U.S. Department of the Interior. 2002.

69. Vreeken RJ SP, Bobeldijk-Pastorova I, Noij ThHM. Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 794 (1998) 187–199.

70. Corbera M, Hidalgo M, Salvadó V, Wieczorek PP. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in natural water using the capillary electrophoresis combined with enrichment step. *Analytica Chimica Acta.* 2005;540(1):3-7.

71. Hsu CC, Whang CW. Microscale solid phase extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and guava fruit extract using alumina-coated iron oxide nanoparticles followed by capillary electrophoresis and electrochemiluminescence detection. *J Chromatogr A.* 2009;1216(49):8575-80.

72. Merás ID, Díaz TG, Franco MA. Simultaneous fluorimetric determination of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in water, previous derivatization with NBD-Cl and by partial least squares calibration (PLS). *Talanta.* 2005;65(1):7-14.

73. Bhaskara BL NP. Direct Sensitive Spectrophotometric Determination of Glyphosate by Using Ninhydrin as a Chromogenic Reagent in Formulations and Environmental Water Samples. *Helvetica Chimica Acta – Vol 89* (2006).

74. Qian K, Tang T, Shi T, Wang F, Li J, Cao Y. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. *Anal Chim Acta.* 2009;635(2):222-226.

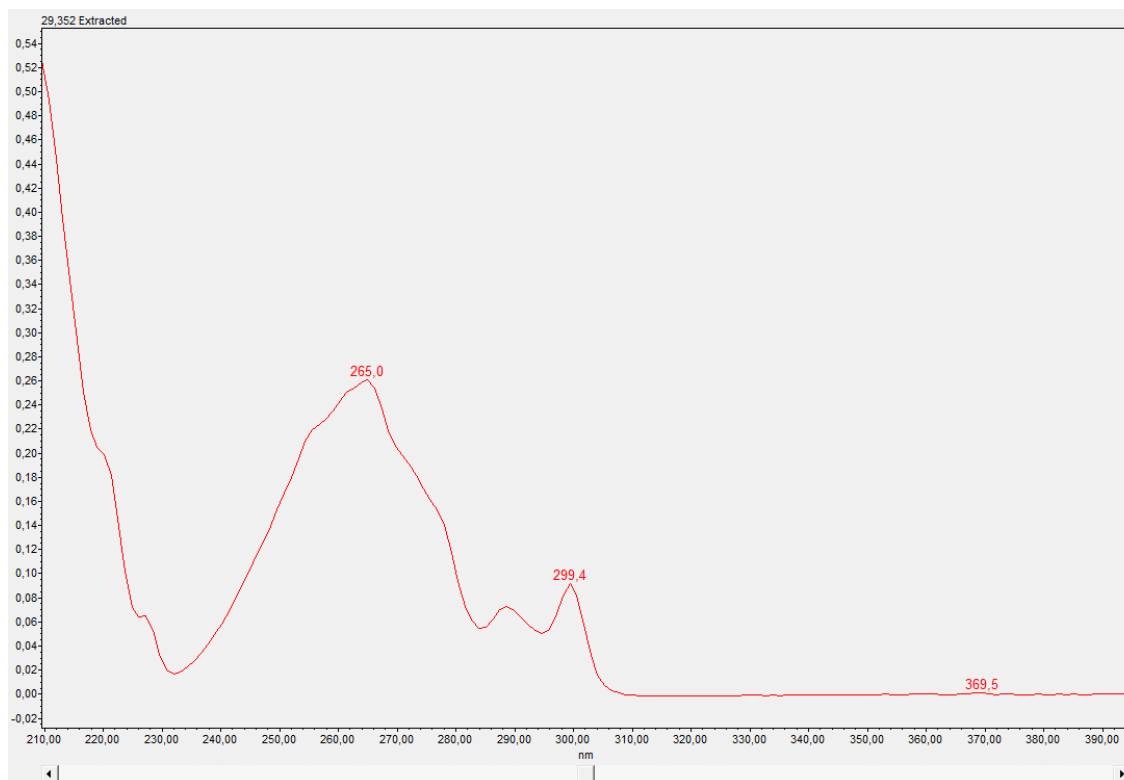
75. Fang F, Wei R, Liu X. Novel pre-column derivatisation reagent for glyphosate by high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2014;94(7):661-7.
76. Veena, Kaur P. Spectrofluorometric Determination of Glyphosate in Water. *Asian Journal of Chemistry*. 2017;29(4):792-6.
77. Peruzzo PJ, Porta AA, Ronco AE. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ Pollut*. 2008;156(1):61-6.
78. Wang S, Liu B, Yuan D, Ma J. A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Talanta*. 2016;161:700-6.
79. Guia Relacre 13 Validação De Métodos Internos De Ensaio Em Análise Química. Fevereiro 2000 ed.
80. Validation of Analytical Procedures: Definitions and methodology. European Medicines Agency. 1995.
81. Van Loco J, Elskens M, Croux C, Beernaert H. Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance*. 2002;7(7):281-5.
82. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008 Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; 03/2003.
83. Oulkar DP, Hingmire S, Goon A, Jadhav M, Ugare B, Thekkumpurath AS, et al. Optimization and Validation of a Residue Analysis Method for Glyphosate, Glufosinate, and Their Metabolites in Plant Matrixes by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *J AOAC Int*. 2017;100(3):631-9.
84. Ehling S, Reddy TM. Analysis of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Nutritional Ingredients and Milk by Derivatization with Fluorenylmethoxycarbonyl Chloride and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2015;63(48):10562-8.
85. Catrinck TCPG, Dias A, Aguiar MCS, Silvério FO, Fidêncio PH, Pinho GP. A Simple and Efficient Method for Derivatization of Glyphosate and AMPA Using 9-Fluorenylmethyl Chloroformate and Spectrophotometric Analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2014.
86. Van Triip J.M.P. RAH. RIKILT-DLO. Model for the calculation of calibration curves. RIKILT report 91.02. Wageningen; The Netherlands. 1991.
87. ISO 8466-1:1990 Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics — Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function

88. Van Loco J, Elskens M, Croux C, Beernaert H. Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance*. 2002;7(7):281-5.
89. Olivo VE, Tansini A, Carasek F, Cordenuzzi D, Fernandes S, Fiori MA, Fragoso A, Magro JD. Rapid method for determination of glyphosate in groundwater using high performance liquid chromatography and solid-phase extraction after derivatization. *Rev Ambient Água* vol 10 n 2 Taubaté – Apr / Jun 2015.
90. Ghanem A BP, Kerhoas L, Dubroca J, Einhorn J. Glyphosate and AMPA Analysis in Sewage Sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOC Derivatization on Strong Anion-Exchange Resin as Solid Support: *Analytical Chemistry*,; 2007;(79:)3794-3801.
91. Lisi Sun, Deyang Kong, Weidong Gu, Xinyan Guo, Wenqi Tao, Zhengjun Shan, Ying Wang, Na Wang, Determination of Glyphosate in soil/sludge by High Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*
Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.018

Anexos

Anexo I

Espetro UV do gli-Fmoc (210-400 nm)



Anexo II

Testes - Condições de derivatização

Tampão Borato

O passo de derivatização é feito em água, com o auxílio de borato de sódio como tampão, visto que o pH ótimo de reação é entre 8 e 10^[76]. O borato impede que o pH baixe durante a reação devido à formação de HCl^[67,76] como produto secundário.

As concentrações literatura valores de concentração final de Borato entre 4 a 40 mM. Desta forma foram testadas três concentrações, 16, 21 e 26 mM de tetraborato de sódio. Verificou-se um aumento de rendimento da reação com o aumento da concentração de borato. A concentração de borato escolhida foi de 26 mM.

Tabela 114 Condições usadas na derivatização do glifosato com FMOC-Cl

	Volume Glifosato	[Glifosato]	Volume FMOC-Cl (ACN)	[FMOC-Cl] Final	Volume Borato	[Tampão Borato]	Tempo /Temperatura
[76]	3 mL	0,1 mg/L	3mL	10 mg/L	1,5 mL	0,2 M	Ag 5 min, 2h 30°C
[65]	3,750 mL	500 mg/L	3,750 mL	500 mg/L	1,875	0,2 M	5 min
[32]	0,1 mL extrato pH 9	-	0,9 mL Acetona 0,1 mL FMOC	2,5 g/L Acetona	0,9 mL	0,025M	20 min
[77]	1 mL amostra	-	0,3 mL	0,5 g/L Clorofórmio	0,25 mL	0,25 M	24h, 40°C
[78]	0,5 mL amostra	-	0,1 mL FMOC + (0,2 mL MeOH)	1,5 g/L	0,2 mL	0,1 M	20 s Vortex, 30 min
[66]	3 mL amostra	-	0,5 mL	1 g/L	0,5 mL	0,05 M	T.a. 1h

[49]	0,2 mL amostra	-	2 mL	0,25 g/L	1,8 mL	0,025 M	T.a. agitar, 25 min
[62]	1,5 mL amostra	-	0,5 mL	2 g/L	0,5 mL	0,05 M	T.a. 30 min
[63]	80 mL amostra	-	10 mL	1,7 g/L	10 mL	0,04 M	2 h
[67]	3 mL	-	1 mL	3 g/L	0,5 mL	0,04 M	2 h
[68]	10 mL	-	1,5 mL	0,5 g/L	0,5 mL	0,25 M	24 h 40°C
[31]	10 mL	-	0,6 mL	12 g/L	0,6 mL	0,25	Overnight, T.a.
[64] (*volumes iguais /amostra)	* /25 mL	310 mg/L / -	* /3,14	30 g/L /1,32 g/L	* /2 mL	0,45 M	Overnight, T.a.
[91]	1 mL	-	0,2 mL	1 g/L	0,12 mL	0,05 M	4 h

FMOC-Cl

Foi verificado que não existe consenso na literatura em relação aos volumes e concentrações das soluções necessárias à derivatização (tabela 1).

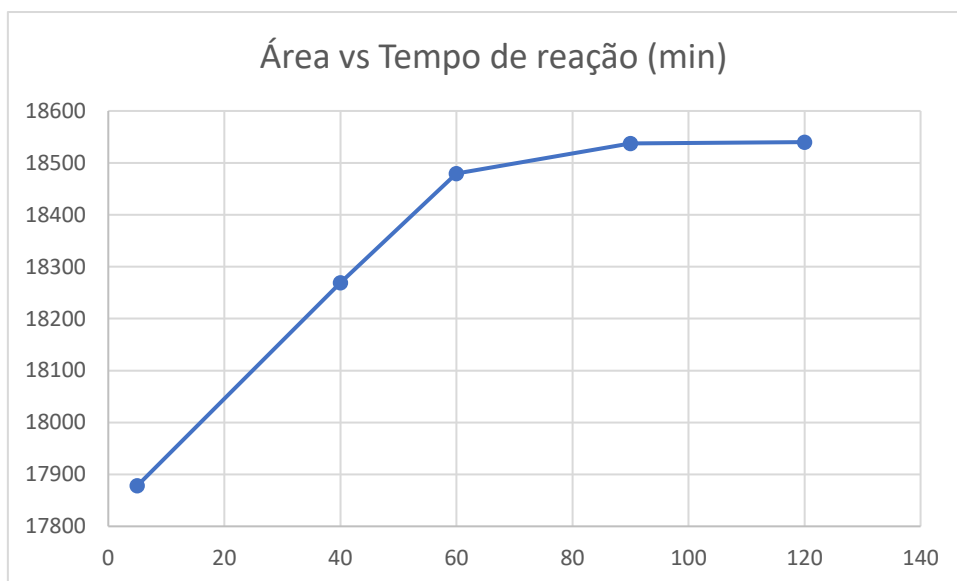
A literatura indica que é necessário um excesso molar de derivatizante, pois uma parte deste é hidrolisada^[65]. utiliza um excesso molar de 1:1.5, 1:65^[76], 1:63^[64] e para amostras reais^[66] 1:50000. A percentagem de acetonitrilo usado na derivatização varia de 5 a 50 %, tendo em conta os valores da Tabela 5. Este parâmetro parece não influenciar a derivatização, mas é tido em atenção caso a solução seja concentrada de seguida, pois pode causar perda de analito, influenciando negativamente a recuperação em amostras.

De modo a avaliar a influência da concentração de FMOC-Cl foram feitas derivatizações nas quais se variou a quantidade de FMOC-Cl. Foram usadas concentrações de 0,5 g/L, 1,0 g/L e 1,7 g/L. Foi escolhida a concentração de 1,0 g/L.

Tempo de reação

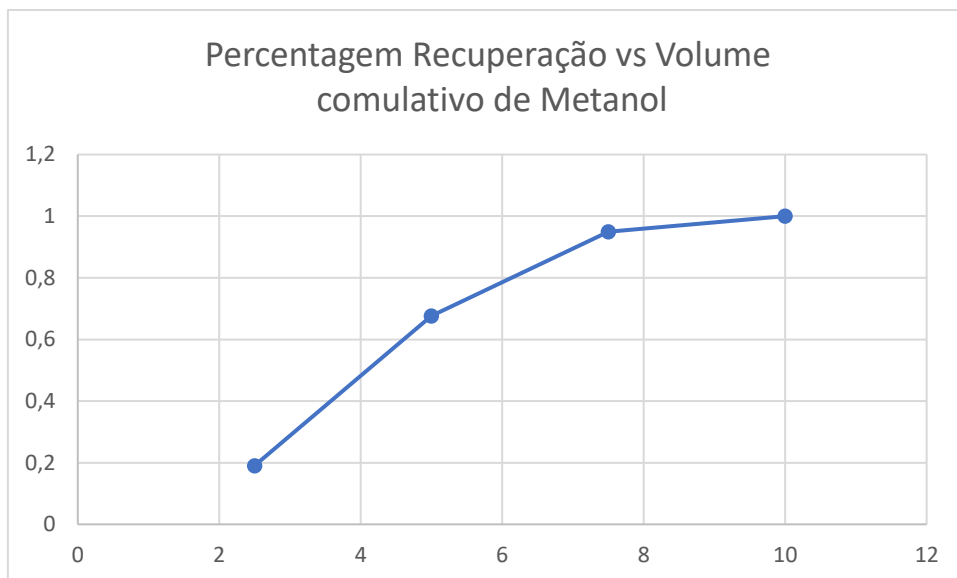
Em relação ao tempo de reação, a literatura descreve tempos entre 5 minutos e aproximadamente de 16 horas, variando de acordo com os volumes e concentrações utilizados.

Mantendo as mesmas condições de derivatização, foi feito um teste variando apenas o tempo de reação em 5, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos (Figura 13), tendo-se escolhido 90 minutos como tempo ótimo.



Passo de concentração SPE – Volume de eluição

O resultado da eluição com 4x2,5 mL MeOH no passo de eluição do SPE, confirmando a extração total do analito alvo.

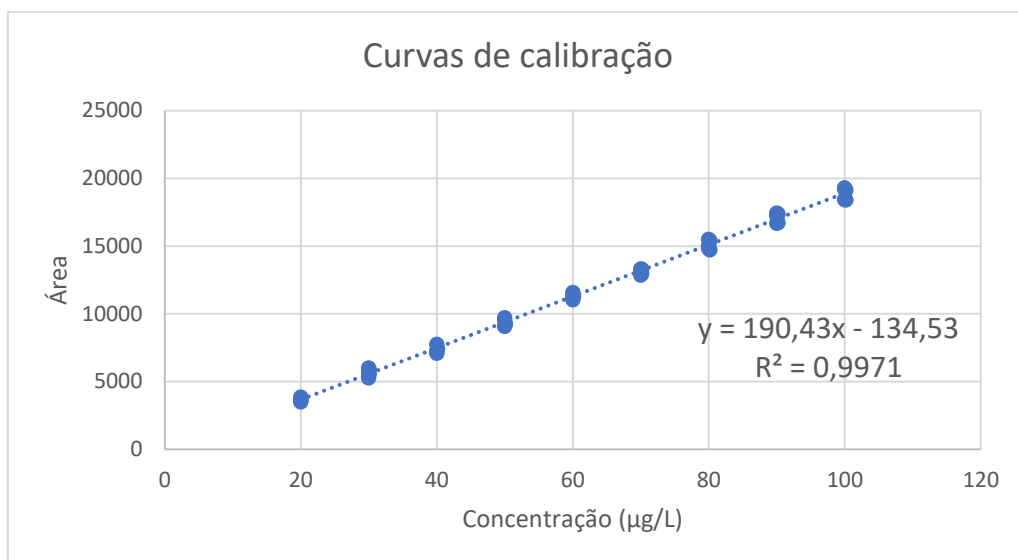


Solução de dissolução

Na literatura consultada, a solução utilizada para dissolução e construção da curva de calibração varia entre água ultrapura, tampão borato e eluente. Foi testada a dissolução da mesma solução em várias concentrações de borato, nomeadamente de 23 mM, 16 mM, 8 mM e 0,5 mM, mostrando que a concentração de borato não tem qualquer influência na área/altura de pico (As diferenças das áreas são de 1 %, logo negligenciáveis). Foram também testadas injeções em eluente e água, não se verificando melhorias, decidiu-se usar água ultrapura.

Anexo III

Cálculo dos limiares analíticos



Xmédio	60,03
Sy/x	273,3
Sm	1,4
CVm	2,4%

$$\text{LD} = 4,3 \text{ (}\mu\text{g/L)}$$

$$\text{LQ} = 14,4 \text{ (}\mu\text{g/L)}$$

Pelo desvio padrão do padrão de concentração mais baixa:

Área
3532
3563
3559
3412
3535
3634

Média =	3539,167
Desvio Padrão =	72,381
Desvio Relativo =	2,045 (%)

Declive	190,43
---------	--------

Ordenada na origem	-134,53
R ²	0,9971

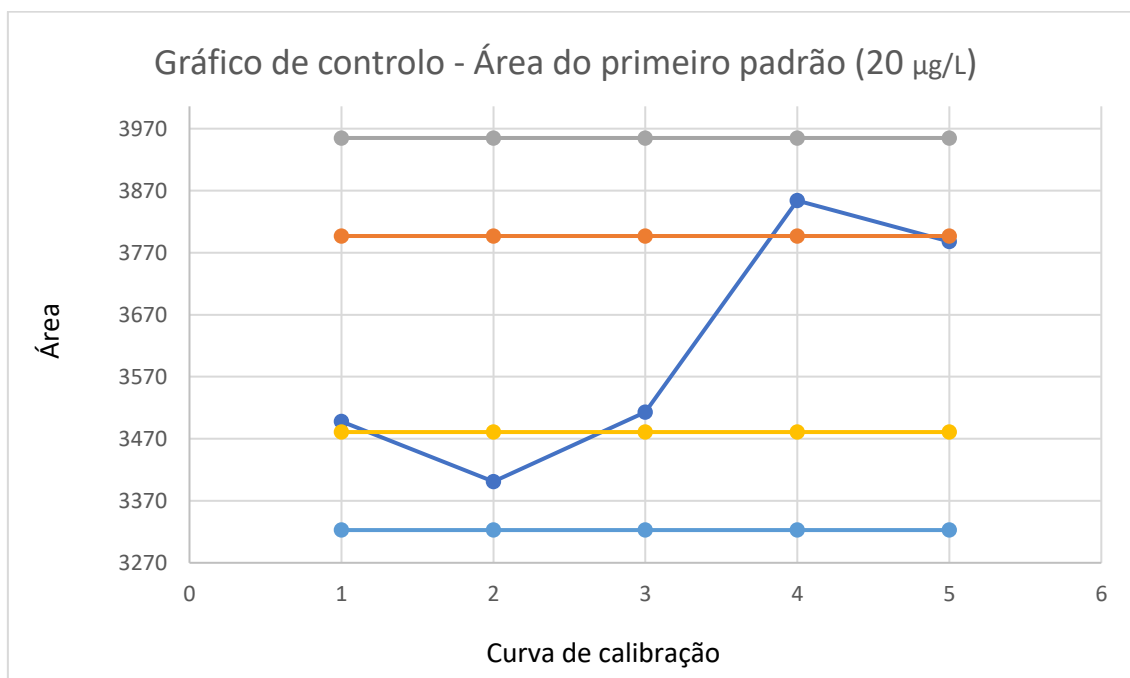
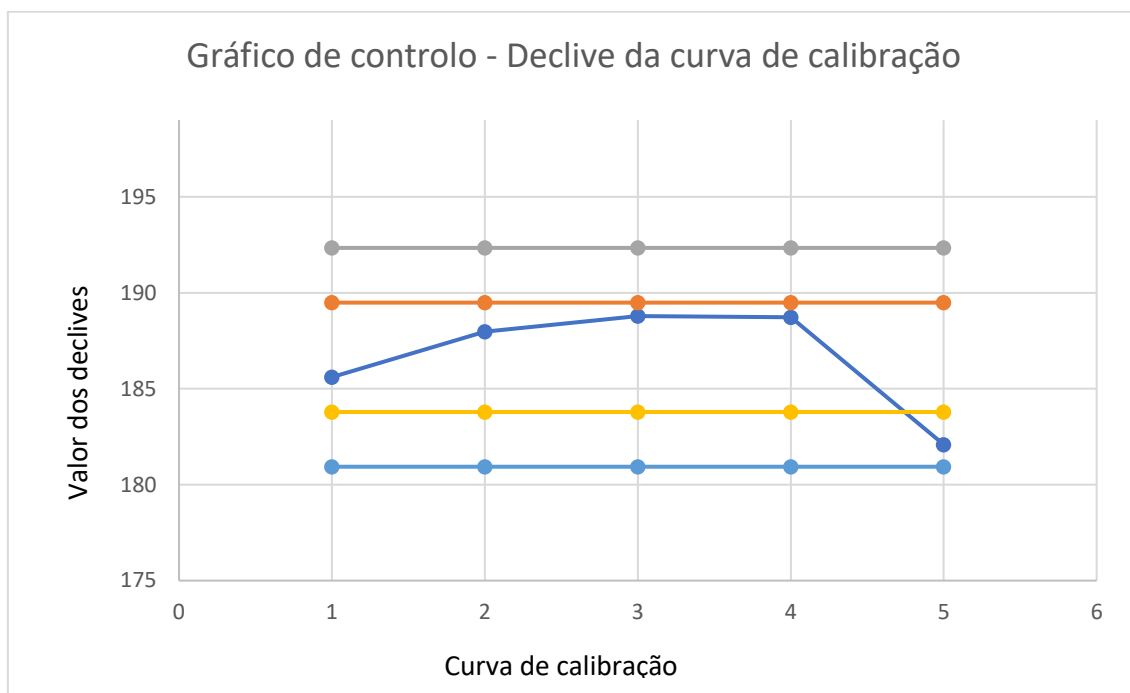
Foram determinadas as concentrações para cada área obtida

Concentração estimada (µg/L)	
19,25	
19,42	
19,40	Média = 19,29 (µg/L)
18,62	Desvio Padrão = 0,38 (µg/L)
19,27	
19,79	

LD =	1,14 (µg/L)
LQ =	3,80 (µg/L)

Anexo IV

Gráficos de controlo da curva de calibração



Anexo V

Curva de calibração de gli-Fmoc (100-20 $\mu\text{g/L}$)

