

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE N-(FOSFONOMETIL)GLICINA (GLIFOSATO) E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) POR HPLC E DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA EM CULTURAS

R. B. Abakerli, E. F. Fay

Embrapa Meio Ambiente – Rodovia SP-340, km 127,5, Caixa Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil abakerli@cnpma.embrapa.br

RESUMO

O método de determinação de resíduos de glifosato e AMPA por cromatografia líquida e detecção por fluorescência após derivação pós-coluna (Cowell, 1986), foi revalidado para 20 culturas, para ser utilizado no Laboratório de Resíduos de Pesticidas da Embrapa Meio Ambiente. Os dois compostos podem ser isolados de várias matrizes com solução ácida aquosa sendo os extratos limpos por cromatografia de complexação e de troca aniônica. Após concentração a vácuo dos extratos obtidos, as amostras são analisadas por cromatografia de troca catiônica em cromatógrafo líquido equipado com um sistema de reação pós-coluna com orto-ftalaldeído/2-mercaptoetanol (OPA/MERC) e detector de fluorescência. O sistema analítico é montado de modo a permitir a análise contínua das amostras. Os dados de resíduos são calculados por regressão linear de curvas de calibração obtidas com soluções de padrão de glifosato e AMPA versus a resposta em área ou altura de pico obtida no cromatograma.

Foram estabelecidos para o sistema analítico os limites de detecção, a linearidade de resposta para a faixa de concentração de interesse, como também foram estabelecidos os limites de quantificação para as diferentes culturas e testes de recuperações analíticas. Os resultados indicaram que o método preenche os critérios de aceitabilidade para determinação de resíduos de glifosato e AMPA nas matrizes testadas. Recuperações analíticas foram efetuadas para concentrações na faixa de 0,01 até 20mg kg⁻¹.

Nas condições do sistema descrito acima, tanto o glifosato quanto o AMPA podem ser detectados em concentrações de 0,0075µg ml⁻¹. A resposta do equipamento foi linear na faixa de concentração de 0,01-10,0µg ml⁻¹ com um coeficiente de correlação de 0,99. O limite de quantificação do método para 25g de amostra varia dependendo da cultura e cai entre 0,01-0,20mg kg⁻¹ para o glifosato e 0,01-0,8mg kg⁻¹ para o ácido aminometilfosfônico.

INTRODUÇÃO

O glifosato é o herbicida de maior utilização mundial e no Brasil é usado em numerosas culturas para o controle de plantas infestantes. É sistêmico e não seletivo, bloqueando o crescimento da planta pela inibição da produção de alguns aminoácidos aromáticos essenciais à biossíntese de proteínas. O metabólito principal na planta e no solo é o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (Franz et al., 1997; Tomlim, 2000).

Vários métodos têm sido propostos para analisar o glifosato e AMPA. A cromatografia líquida tem sido a técnica mais popular com derivatização pré ou pós-

coluna, transformando-os em derivados fluorescentes. A derivatização pós-coluna utilizando orto-ftalaldeído após separação em coluna de troca catiônica foi primeiramente proposta por Moye et al., (1983), e modificações deste método foram reportadas por vários autores (Wigfield & Lanouette, (1991); Wigfield et al. (1994)).

Neste trabalho foi validado o método analítico para a determinação de resíduos de glifosato e AMPA em 20 culturas expressivas da agricultura brasileira, variando entre frutas, grãos, sementes, forragem, vegetais e legumes.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Amostras das diferentes culturas utilizadas para este trabalho, não expostas ao herbicida glifosato, foram coletadas em campo e utilizadas como testemunhas e para fortificações na validação do método.

2. Equipamentos e condições cromatográficas

As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido marca Shimadzu com amostrador automático, SIL-10 A; bomba para HPLC, LC-10AD; forno para coluna cromatográfica, CTO-10A; bombas para reação pós-coluna, Eldex; forno para reação pós-coluna; detector de fluorescência, RF-535; processador Class- LC 10. Coluna para HPLC: Aminex A-9, forma potássica, 300 x 4,6 mm d.i. e 150 x 4,6 mm d.i., Bio Rad Laboratories. Ao sistema estava acoplada uma válvula de 6 vias desviadora de fluxo, Valco. Tubos de aço em espirais para reação (solução oxidante 3.0m de comp. X 0.02" d.i. x 1/16" d.e.; solução de OPA/MERC, 3.0m comp. x 0.02" d.i. x 1/16" d.e.).

Temperatura das colunas: 50°C; temperatura da espiral de reação com oxidante: 38°C; fluxo da fase móvel: 0,5mL min⁻¹; fluxo da solução oxidante: 0,2mL min⁻¹; fluxo da solução de OPA: 0,4mL min⁻¹; volume injetado: 100µL; detector: comprimento de onda de excitação: 350nm; comprimento de onda de emissão: 440nm.

3. Reagentes

Padrões analíticos de glifosato e AMPA, pureza 99,9%, cedidos pela Monsanto do Brasil. Resina Chelex®-100, 100-200mesh forma sódica; resina AG1- X8, 200-400mesh, forma cloreto, lavada três vezes com água deionizada; ácido clorídrico concentrado; ácido fosfórico 85%; cloreto de sódio; hidróxido de potássio; hidróxido de sódio e ácido bórico foram grau analítico; cloreto férrico hexahidratado; 2-mercaptoetanol; 1,2- dicarboxaldeído ftálico foram grau reagente; clorofórmio, grau resíduos; dihidrogênio fosfato de potássio 99,99%, e metanol grau HPLC; hipoclorito de cálcio com 65% de cloro disponível; água deionizada e soluções de ácido clorídrico 6N, 0,2N, 0,1N e 0,02N.

Soluções padrão de glifosato e AMPA, para cromatografia e para as fortificações, foram preparadas em água deionizada a partir de diluições de uma solução estoque de 1000µg mL⁻¹. Foram pesadas diretamente em frascos de boca larga, de 20mL, 0,0100g

de glifosato e 0,0100g de AMPA e adicionados 10mL de água deionizada com ajuda de uma pipeta volumétrica.

Resina Chelex® na forma férrica: 500g da resina Chelex®-100, forma sódica, suspensa em 1L de água deionizada, sendo então adicionados 25mL de ácido clorídrico 6N e 500mL de solução de cloreto férrico 0,1N. Após agitação e sedimentação da resina a fase aquosa foi decantada. Esta operação foi repetida por mais duas vezes e a resina foi lavada com água deionizada e armazenada em frasco âmbar.

Fase móvel para HPLC: 0,005M de dihidrogênio fosfato de potássio, 4,0% de metanol em água deionizada, pH 2,1, ajustado com ácido fosfórico concentrado.

Solução oxidante de hipoclorito de cálcio: Foram pesados 1,36g de dihidrogênio fosfato de potássio, 11,6g de cloreto de sódio e 0,4g de hidróxido de sódio e dissolvidos em 500mL de água deionizada. A essa solução foram adicionadas 20,0mg de hipoclorito de cálcio dissolvido em 50mL de água deionizada. O volume foi acertado para 1,0L com água deionizada e a solução filtrada por membrana de nylon de 0,45µm.

Solução de OPA/MERC: Foi preparado 1L de uma solução de ácido bórico 0,4M e o pH ajustado para $10,40 \pm 0,02$ usando solução de hidróxido de potássio 45%. A solução foi filtrada em membrana de 0,45µm e cerca de 700mL dessa solução foram transferidos para um frasco volumétrico de 1L. A esta foi adicionada uma solução de 800,0mg de 1,2-dicarboxaldeído ftálico dissolvido em 10mL de metanol e 2mL de 2-mercaptopetanol, o volume do balão foi completado com ácido bórico 0,4M.

4. Procedimento

25,0g da amostra, previamente homogeneizada foram pesadas diretamente em copos de liquidificador. Foram feitas fortificações nos níveis desejados partindo-se de soluções de glifosato de $10\mu\text{g mL}^{-1}$ ou $1\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram extraídas agitando-se por um minuto com 50,0mL de clorofórmio e 150,0mL de HCl 0,1N. Os conteúdos dos liquidificadores foram transferidos para frascos de centrifuga de 250mL, e centrifugados a 8.000rpm por 20 minutos. Foram decantados 110,0mL da fase aquosa, o pH acertado para 4,0 com solução de hidróxido de sódio 1N e centrifugados novamente a 11.000rpm por 10 minutos. Os extratos foram diluídos para 400mL com água deionizada e aplicados em colunas de vidro contendo 15ml de resina Chelex®-Fe(III). As amostras foram eluídas a um fluxo de 6mL min^{-1} e as colunas lavadas com 100,0mL de HCl 0,2N. O glifosato e o AMPA foram então eluídos com alíquotas de 3,0mL e 4,0mL de HCl 6N, e os volumes de eluição foram, até este ponto, todos descartados. Os eluatos subsequentes de três porções de 5,0mL de HCl 6N foram recolhidos e adicionados de 10,0mL de HCl concentrado. Os extratos homogeneizados foram aplicados em 8cm de resina AG1-X8, contida numa coluna de 1cm d.i. x 32cm de comprimento, previamente lavada com três porções de 5,0mL de HCl 6N. Os extratos foram recolhidos em balões de 125,0mL e a coluna foi lavada com porções extra de 2,0mL e de 8,0mL de HCl 6N. As amostras foram concentradas à secura sob vácuo em evaporador rotatório, à temperatura de 60°C e o resíduo dissolvido em 5,0mL de fase móvel. Após filtração por membrana de 0,45µm, as amostras foram analisadas por HPLC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o estabelecimento do limite de detecção (LODe) do equipamento foram feitas três a cinco injeções de soluções de padrão de glifosato e AMPA nas concentrações de 0,005 a 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para obtenção da curva de calibração através da qual foi calculado o LODe baseando-se no desvio padrão residual (DPr) da curva de regressão e no coeficiente angular (a) da curva de calibração, equação 1.

$$LODe = \frac{3,3 DP r}{a} \quad \text{eq.1}$$

As curvas de calibração obtidas para o glifosato e AMPA são mostradas na Figura 1

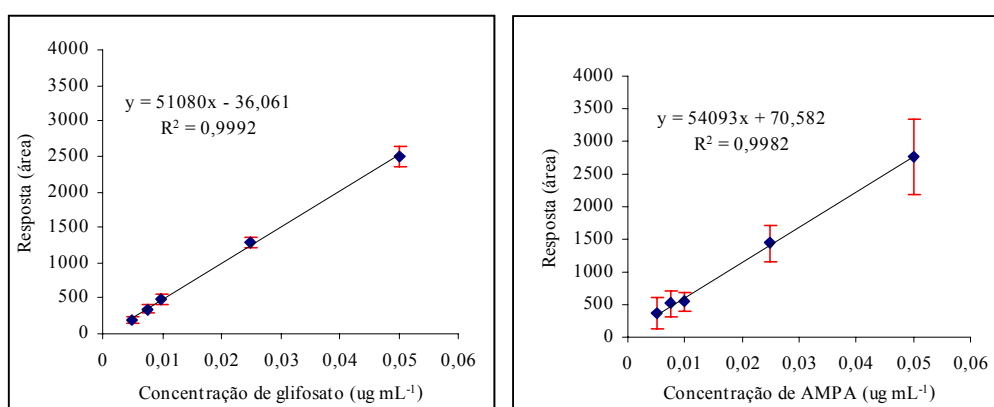


Figura 1. Curvas de calibração para glifosato e AMPA.

O valor calculado para o LODe do glifosato foi de 0,004 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e do AMPA foi de 0,015 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O sistema OPA-MERC não reage com aminoácidos secundários e portanto o glifosato deve ser oxidado a glicina com hipoclorito de cálcio antes da reação com OPA-MERC. No entanto a solução oxidante suprime a fluorescência e então o ajuste na relação dos fluxos dos reagentes pós-coluna deve ser rigorosamente controlados para se obter respostas equivalentes para os dois compostos. Essa relação é extremamente importante para que o glifosato seja quantificado sem prejuízo da sensibilidade. Assim foi estimado um LODe médio entre o valor do glifosato e AMPA para cobrir os dois compostos. Esse LODe calculado foi de 0,0095 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Uma alternativa prática e rápida para o estabelecimento do LODe é possível utilizando-se apenas uma solução de padrão, na concentração onde se observa uma resposta positiva para os analitos, conforme a equação 2 abaixo.

$$LODe = \frac{3 \times DP}{\bar{X}} \times \text{concentração} \quad \text{eq.2}$$

onde: \bar{X} é a média dos valores das respostas registradas para os padrões

DP é o desvio padrão das respostas das injeções

Utilizando essa abordagem, ilustrado na Tabela 1, obtivemos para o glifosato o

valor de $0,0067\mu\text{g mL}^{-1}$ e para o AMPA $0,0071\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 1. Estimativa de LODe para glifosato e AMPA utilizando concentração de $0,0075\mu\text{g mL}^{-1}$.

Nº injeção	Resposta (área)		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
	Glifosato	AMPA				
1	385	415				
2	417	487	319	96	375	118
3	246	387				
4	228	210				

Dessa forma ficou estabelecido que o limite de detecção de glifosato e AMPA nas nossas condições é de $0,0075\mu\text{g mL}^{-1}$.

A Figura 2 mostra a curva de calibração construída para determinar a linearidade de resposta x concentração na faixa de 0,025, 0,05, 0,1, 0,3, 1, 3 e $10\mu\text{g mL}^{-1}$. Os coeficientes de correlação foram de 1,0 e 0,9997 para o glifosato e AMPA respectivamente.

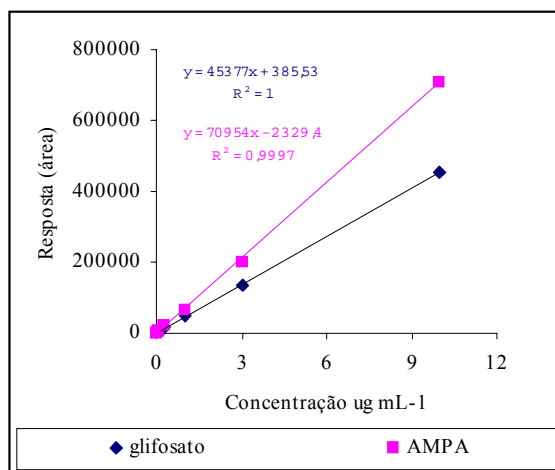


Figura 2. Curva de calibração de glifosato e AMPA na faixa de concentração de 0,025 a $10\mu\text{g mL}^{-1}$.

O limite de quantificação teórico (LOQ_t) calculado a partir da curva de regressão conforme a equação 3 fornece sob as condições operacionais do método os valores de $0,008\text{mg kg}^{-1}$.

$$LOQ_t = \frac{10 DP r}{a} \quad \text{eq.3}$$

Similarmente a estimativa prática do LODe o limite de quantificação teórico pode ser estimado com base no LODe estabelecido em $0,0075\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando a equação 5. Nesta abordagem sob as condições operacionais do método o LOQ_t é de $0,007\text{mg kg}^{-1}$ para glifosato e AMPA.

$$LOQ_t = \frac{10 \times DP}{\bar{X}} \times \text{concentração} \quad \text{eq.4}$$

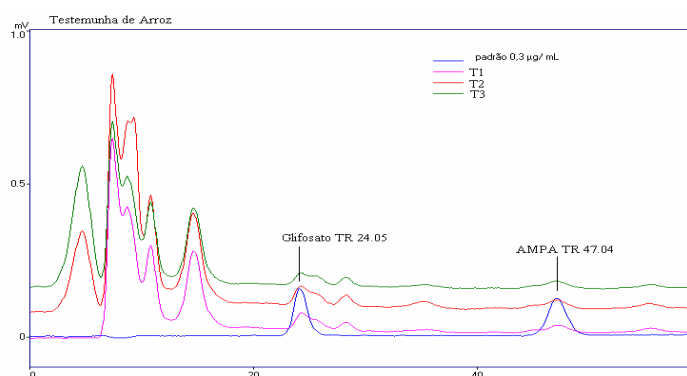
ou seja:

$$LOQ_t = \frac{10}{3} \times LOD_e \quad \text{eq.5}$$

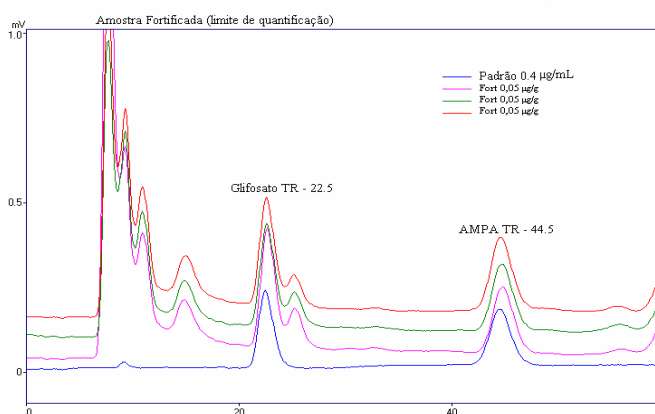
A verificação da aplicabilidade do LOQ_t do método para análise de amostras de culturas foi efetuada em amostras de testemunha de arroz fortificadas nos níveis descritos na Tabela 2. Foram calculadas as recuperações e verificado se estas estavam na faixa de aceitabilidade de 70 a 120%. Com os valores obtidos das recuperações o LOQ para 25g de amostra de arroz foi de $0,05\text{mg kg}^{-1}$. Amostras de testemunha de arroz apresentaram resposta positiva nos tempos de retenção do glifosato e AMPA que quantificados como os analitos forneceram o valor de $0,007\text{mg kg}^{-1}$, coincidente com o LOQ_t (Figura 3). Realmente, na Tabela 2 observa-se pelos valores de recuperação para os níveis até $0,01\text{mg kg}^{-1}$, que as recuperações estão acima de 120%.

Tabela 2. Verificação do LOQ de glifosato e AMPA para 25 g de amostra de arroz.

Nível de fortificação (mg kg^{-1})	Recuperação de glifosato (%)	Recuperação de AMPA (%)
0,002	412	225
0,005	235	152
0,010	122	96
0,020	92	112
0,050	89	97
0,060	101	96
0,100	86	95
0,500	73	76



A



B

Figura 3. Cromatogramas de testemunha de arroz (A) e amostra fortificada em $0,05\text{mg kg}^{-1}$ (B).

Para uma quantificação segura dos analitos, livre dos ruídos desses interferentes, sugerimos a utilização como critério prático o valor de cerca de 5x o nível basal observado com amostras testemunhas. Para o arroz ficou estabelecido o valor de 0,05mg kg⁻¹ para o limite de quantificação do método em amostras de 25g de amostra.

A repetibilidade do método é demonstrada para a matriz de arroz (Tabela 3) onde foram feitas análises com triplicatas de amostras fortificadas no limite de quantificação e em dez vezes esse limite.

Tabela 3. Repetibilidade do método para matriz de arroz.

Nível de fortificação (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)		Recuperação Média	
	glifosato	AMPA	glifosato	AMPA
0,05	95	93		
0,05	83	95	89±6,4	97,±5,7
0,05	88	104		
0,5	72	77		
0,5	75	76	72±2,1	76±0,9
0,5	70	75		

O critério de utilização de 5x o nível basal observado com amostras testemunhas foi aplicado para o estabelecimento do LOQ das culturas descritas na Tabela 4.

Para a matriz de cacau houve a necessidade de redução do tamanho da amostra, compensando a competição de componentes da matriz por sítios de interação na resina de complexação, usada na limpeza do extrato.

Tabela 4. Limites de quantificação de glifosato e AMPA e recuperação média de amostras fortificadas.

Matriz	LOQ (mg kg ⁻¹)	Recuperação Média*(%)		Coeficiente de Variação (%)	
		glifosato	AMPA	glifosato	AMPA
Abobrinha	0,01	83±9,5	90±13,8	11,4	15,3
Alface	0,01	85±11,3	92±9,2	13,3	10,0
Algodão	0,05	87±6,3	78±2,0	7,2	2,5
Ameixa	0,05	81±6,5	77±3,6	8,0	4,7
Arroz	0,05	81±9,9	86±12,1	12	14
Aveia	0,05	96±6,5	92±6,9	6,7	7,5
Banana	0,05	74±2,6	77±7,7	3,5	10,0
Cacau**	0,1	91±16,8	77±5,7	18,5	7,4
Cana de açúcar	0,01	90±5,6	77±5,2	6,2	6,8
Cenoura	0,01	85±7,0	86±8,1	8,3	9,5
Cevada	0,05	96±9,4	78±5,7	9,8	7,3
Citrus	0,05	90±1,8	94±5,5	2,0	5,9
Feijão	0,04	93±5,1	87±8,1	5,5	9,3
Fumo	0,05	77±3,2	76±3,4	4,1	4,5
Milho	0,08 glifosato 0,8 AMPA	77±3,6	95±6,8	4,6	7,1
Nectarina	0,05	88±9,4	85±5,1	10,7	6,0
Soja	0,2	93±12,9	85±7,7	13,9	9,1
Sorgo	0,05 glifosato 0,8 AMPA	83±12,3	80±3,3	14,8	4,1
Trigo	0,05	78±6,5	97±8,3	8,3	8,6
Uva	0,05	82±11,5	79±7,8	14,0	9,8

*média de seis determinações ** 15g de amostra

O método analítico preenche os requisitos de validação e está apto para determinação de resíduos de glifosato e AMPA no laboratório de resíduos de pesticidas da EMBRAPA Meio Ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COWELL, J. E.; KUNSTMAN, J. L.; NORD, P. J.; STEINMETZ, J. R.; WILSON, G. R. Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite: An interlaboratory study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 34, p. 955-960, 1986.
2. FRANZ, J. E.; MAO, M. K ; SIKORSKI, J. A. *Glyphosate: A unique global herbicide*. Washington, DC: American Chemical Society, 1997. (ACS Monograph, 189).
3. MOYE, H. A.; MILES, C. J.; SCHERE, S.J. A simplified high-performance liquid chromatographic residue procedure for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in fruits and vegetables employing postcolumn fluorogenic labeling. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 31, p. 69-72, 1983.
4. SWARTZ, M. E; KRULL, I. S. Analytical method development and validation. IN: SWARTZ, M. E; KRULL, I. S.(ED.). New York: Marcel Dekker, Inc. 1997.
5. TOMLIN, C.D.S. (ed.) *The pesticide manual*. 12. ed. Farnham: The British Crop Protection Council, 2000. p. 488.
6. WIGFIELD, Y. Y.; DENEALU, F.; FILLION, J. Residues of glyphosate and its principle metabolite in certain cereals, oilseeds, and pulses grown in Canada, 1990-1992. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 53, p. 543-547, 1994.
7. WIGFIELD, Y. Y.; LANOUILLE, M. Residue analysis of glyphosate and its principal metabolite in certain cereals, oilseeds, and pulses by liquid chromatography and postcolumn fluorescence detection. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 74, p. 842-847, 1991.