



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESTUDO DE DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO
E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO(AMPA) EM AMOSTRAS
DE SOJA E ÁGUA USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM *TANDEM*
COM IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY*(LC-ESI/MS/MS)**

HELIO ALVES MARTINS JÚNIOR

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

Orientador:
Dr. José Oscar Vega Bustillos

**São Paulo
2005**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

ESTUDO DE DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE
GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA)
EM AMOSTRAS DE SOJA E ÁGUA USANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM *TANDEM* COM
IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY* (LC-ESI/MS/MS).

HELIO ALVES MARTINS JÚNIOR



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

Orientador:

Dr. José Oscar Vega Bustillos

São Paulo

2005

Dedico todo o mérito deste trabalho à Deus e às pessoas que sempre me apoiaram na realização dos meus sonhos: minha mãe Ana Zélia, meu irmão Daniel Martins e minha noiva Flavia de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Oscar Vega Bustillos pela paciência, amizade e compreensão durante o tempo em que estivemos trabalhando juntos e, por ser um grande incentivador da espectrometria de massas.

Ao meu co-orientador e amigo Daniel Temponi Lebre (“Jota”) pelo aprendizado, companheirismo, paciência e por ter sido um dos responsáveis pelo meu envolvimento com a espectrometria de massas.

Ao amigo André Sassine “McLafferty” (*in memoriam*) pela amizade e aprendizagem durante discussões sobre espectrometria de massas.

A Dra. Maria Aparecida Faustino Pires pelo apoio e contribuição fundamental para que este trabalho pudesse ter sido realizado.

A todos do Centro de Química e Meio Ambiente, sem exceção, pela colaboração e pelo convívio agradável de todos os dias.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), por me fornecer toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

A Applied Biosystems do Brasil por financiar este trabalho, apoiar a pesquisa no Brasil e, por oferecer-me oportunidades muito valiosas.

À todos os profissionais da Applied Biosystems do Brasil, em especial ao “time de massas”: Roberto Braga, Ana Paula Fernandes, Francisco, Cláudia Stringher, Alessandro Paris, Daniel Lebre, Alexandre Wang, Patrícia Braga, Mateus Campos, Sandro Miranda, Célio Buganza, Fábio Nano, Antônio Brugnolo, Alex Saga, Cláudia Moura e Marcos Azevedo.

A minha mãe Ana Zélia Maia Bezerra, por ser a base da minha vida e personalidade.

Ao meu irmão Daniel David Alves Martins por ser o meu braço direito.

A minha noiva Flavia Chiarion Marques de Oliveira por esperar pacientemente e me apoiar na realização deste meu sonho.

A Cleide de Oliveira pelo fornecimento de material bibliográfico e discussões.

Aos colegas da BASF de Rezende/RJ, em especial, à Carla Stelling e à Roberta Leite pela colaboração.

Ao pesquisador Helio Ferreto do IPEN pela ajuda na formatação da dissertação.

A CAPES pelo suporte financeiro.

A todos que me suportaram falando de espectrometria de massas aos sábados, domingos e feriados, os meus sinceros agradecimentos.

“Nós aprendemos como fazer os elefantes voarem”

John Beneth Fenn

ESTUDO DE DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) EM AMOSTRAS DE SOJA E ÁGUA USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM *TANDEM* COM IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY* (LC-ESI/MS/MS).

Helio Alves Martins Júnior

RESUMO

Neste trabalho desenvolveu-se uma metodologia analítica para a determinação do herbicida Glifosato e seu principal produto de degradação, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), em amostras de soja e água. Para esta finalidade foi empregada a técnica de cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massas em *tandem* com ionização por *electrospray* (LC-ESI/MS/MS), operada em modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). Diferentes aditivos em soluções de metanol/água e acetonitrila/água foram testados para o estudo da ionização por *electrospray* dos compostos, nos modos de íons positivos e negativos e para a avaliação da eluição em colunas de fase reversa. Os íons precursores foram isolados e fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), para obtenção de espectros de massas MS/MS, com o objetivo de otimização e caracterização estrutural dos principais íons produto e dos seus mecanismos de fragmentação. As amostras de soja foram fortificadas com os analitos para a validação do método de acordo com a norma EC 657/2002 da Comunidade Européia. O tratamento dos dados foi realizado com o *software Analyst*[®] versão 1.4.1 e a estatística com o *software ResVal* versão 2. Estudos de recuperação também foram conduzidos em amostras de água superficial e tratada para a determinação direta e simultânea de Glifosato, AMPA e mais dois analitos, o herbicida Glufosinato e o seu principal produto de degradação, o ácido metilfosfínico (MPPA).

ESTUDO DE DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) EM AMOSTRAS DE SOJA E ÁGUA USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM *TANDEM* COM IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY* (LC-ESI/MS/MS).

Helio Alves Martins Júnior

RESUMO

Neste trabalho desenvolveu-se uma metodologia analítica para a determinação do herbicida Glifosato e seu principal produto de degradação, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), em amostras de soja e água. Para esta finalidade foi empregada a técnica de cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massas em *tandem* com ionização por *electrospray* (LC-ESI/MS/MS), operada em modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). Diferentes aditivos em soluções de metanol/água e acetonitrila/água foram testados para o estudo da ionização por *electrospray* dos compostos, nos modos de íons positivos e negativos e para a avaliação da eluição em colunas de fase reversa. Os íons precursores foram isolados e fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), para obtenção de espectros de massas MS/MS, com o objetivo de otimização e caracterização estrutural dos principais íons produto e dos seus mecanismos de fragmentação. As amostras de soja foram fortificadas com os analitos para a validação do método de acordo com a norma EC 657/2002 da Comunidade Européia. O tratamento dos dados foi realizado com o *software Analyst*[®] versão 1.4.1 e a estatística com o *software ResVal* versão 2. Estudos de recuperação também foram conduzidos em amostras de água superficial e tratada para a determinação direta e simultânea de Glifosato, AMPA e mais dois analitos, o herbicida Glufosinato e o seu principal produto de degradação, o ácido metilfosfínico (MPPA).

**RESIDUES DETERMINATION STUDY OF GLYPHOSATE AND
AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID (AMPA) IN SOYBEAN AND WATER
SAMPLES USING LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED ELECTROSPRAY
IONIZATION TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-ESI/MS/MS).**

Helio Alves Martins Júnior

ABSTRACT

This work shows the development of a methodology for determination of herbicide glyphosate and its major metabolite, the aminomethylphosphonic acid (AMPA), in soybean samples. This purpose was reached using the reversed phase liquid chromatography coupled electrospray ionization tandem mass spectrometry technique (LC-ESI/MS/MS) in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Several additives in methanol/water and acetonitrile/water were evaluated for the compounds ionization in both positive and negative electrospray ion mode and chromatographic behavior in reversed phase columns. The precursor ions were isolated and the product ion scans (MS/MS) were obtained by collision-induced dissociation (CID), for the purpose of optimization and structural elucidation of the fragmentation pathway. The soybean samples were fortified with the analytes and the method was validated according to European Community directive EC 657/2002. The results were processed with the *Analyst*[®] software version 1.4.1 and the statistic evaluation was performed by *ResVal* software version 2. Recovery studies in surface and drinking water were performed by the direct and simultaneous analysis of Glyphosate, AMPA and the herbicide Glufosinate and its metabolite, the methylphosphinicopropionic acid (MPPA).

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Espectrometria de massas	14
3.1.1 Analisador de massas quadrupolar.....	15
3.2 Espectrometria de massas em <i>tandem</i> – MS/MS.....	18
3.3 Ionização por <i>electrospray</i>	22
3.3.1 Fonte de <i>electrospray</i> : uma célula eletroquímica.....	24
3.3.2 Formação de íons na fase gasosa.....	26
3.3.2.1 Produção das gotas carregadas.....	26
3.3.2.2 Dessolvatação das gotas carregadas.....	28
3.3.2.3 Mecanismos de formação dos íons	30
3.3.2.4 Intensidade do sinal no <i>electrospray</i>	32
3.4 Herbicida glifosato: uma breve introdução.....	34
3.4.1 Propriedades físico-químicas e classificações.....	36
3.4.2 Legislação.....	37
3.4.3 Métodos analíticos	40
3.4.3.1 Cromatografia gasosa / espectrometria de massas ...	40
3.4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	41
3.4.3.3 Cromatografia líquida / espectrometria de massas	42
3.4.3.3.1 Derivação com FMOC-Cl.....	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Amostragem	44
4.1.1 Amostras de água.....	44
4.1.2 Amostras de soja	44
4.2 Reagentes	44

4.3	Soluções padrão.....	45
4.4	Preparação das amostras.....	45
4.4.1	Amostras de água.....	45
4.4.2	Amostras de soja	45
4.5	Determinação	47
4.5.1	Espectrometria de Massas.....	47
4.5.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	49
5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	51
5.1	Ionização dos analitos: efeito dos solventes e aditivos	51
5.2	Caracterização dos compostos: experimentos de CID.....	59
5.2.1	GLIF – Fragmentação	59
5.2.2	AMPA – Fragmentação.....	62
5.2.3	GLUF – Fragmentação	64
5.2.4	MPPA – Fragmentação.....	66
5.3	Seleção da fase móvel e tampão	69
5.4	Derivação com FMOC-Cl.....	71
5.5	Determinação em Soja	72
5.5.1	Avaliação do efeito de matriz	72
5.5.2	Sensibilidade e linearidade	78
5.5.3	Estudos de Recuperação em amostras de soja.....	84
5.6	Determinação em Água	89
5.6.1	Sensibilidade e linearidade	89
5.6.2	Estudo de recuperação em amostras de água	91
6	CONCLUSÕES	98
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido pela ANVISA.	38
Tabela 2. Valor Máximo Permitido (VMP) de resíduos de agrotóxicos em água de acordo com a Portaria 518.	39
Tabela 3. Parâmetros otimizados para análise em modo MRM de glifosato e AMPA em amostras de soja.	48
Tabela 4. Parâmetros otimizados para análise em modo MRM de glifosato, AMPA, glufosinato e MPPA em amostras de água.	48
Tabela 5. Parâmetros da fonte de ionização <i>TurbolonSpray</i> [®] e do gás de colisão empregados nas análises de soja.	49
Tabela 6. Parâmetros da fonte de ionização <i>TurbolonSpray</i> [®] e do gás de colisão empregados nas análises de água.	49
Tabela 7. Programação dos gradientes de eluição utilizados nas análises das amostras de soja (acima) e de água (abaixo).	50
Tabela 8. Algumas propriedades físicas dos solventes orgânicos empregados na preparação das soluções utilizadas no estudo de formação dos íons.	55
Tabela 9. Sensibilidade da técnica de LC-MS/MS.	78
Tabela 10. Dados das curvas analíticas de glifosato e AMPA.	82
Tabela 11. Linearidade das curvas de recuperação das amostras fortificadas. ...	84

Tabela 12. Níveis críticos de acordo com EC/657/2002.....	85
Tabela 13. Resultados dos estudos de recuperação de Glifosato e AMPA em amostras de soja fortificadas.....	86
Tabela 14. Resultados de acordo com ISO 5725-2.....	88
Tabela 15. Dados da linearidade das curvas analíticas em ESI negativo.....	90
Tabela 16. Dados da linearidade das curvas analíticas em ESI positivo.....	91
Tabela 17. Dados da recuperação de GLIF em amostras água.....	93
Tabela 18. Dados da recuperação de AMPA em amostras água.....	94
Tabela 19. Dados da recuperação de GLUF em amostras água.....	95
Tabela 20. Dados da recuperação de MPPA em amostras água.....	96

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema ilustrativo de um analisador de massas quadrupolar.	16
Figura 2. Diagrama de estabilidade dos íons em analisadores quadrupolares. ..	17
Figura 3. Esquema de um espectrômetro de massas triploquadrupolar modelo API 4000 TM com fonte de ionização Turbo V.....	19
Figura 4. Esquema de análise realizada no modo MRM em um espectrômetro de massas do tipo triploquadrupolo.....	22
Figura 5. Esquema de uma fonte de <i>electrospray</i> como cela eletroquímica.	24
Figura 6. Formação do cone de Taylor na ponta do capilar do <i>electrospray</i>	27
Figura 7. Influência do campo eletrostático sobre a gota carregada com a formação do cone de Taylor.	27
Figura 8. Esquema do processo de fissão das gotas carregadas em uma fonte <i>electrospray</i> observado e proposto por Kebarle e Tang ³⁹	29
Figura 9. Esquema de degradação do herbicida glifosato.....	35
Figura 10. Esquema de degradação do herbicida glufosinato.....	36
Figura 11. Constantes de ionização do glifosato.....	37
Figure 12. Fluxograma das etapas de preparação das amostras de soja para análise de Glifosato e AMPA por LC-ESI/MS/MS.....	46

Figura 13. Intensidade média do sinal obtido em ionização por <i>electrospray</i> para os íons precursores do GLIF empregando-se diferentes solventes e aditivos.	51
Figura 14. Intensidade média do sinal obtido em ionização por <i>electrospray</i> para os íons precursores do AMPA empregando-se diferentes solventes e aditivos. ...	52
Figura 15. Intensidade média do sinal obtido em ionização por <i>electrospray</i> para os íons precursores do GLUF empregando-se diferentes solventes e aditivos....	52
Figura 16. Intensidade média do sinal obtido em ionização por <i>electrospray</i> para os íons precursores do MPPA empregando-se diferentes solventes e aditivos. ..	52
Figura 17. Espectros de massas MS dos íons precursores obtidos com ESI positivo para soluções preparadas em acetonitrila/água com diferentes aditivos.	56
Figura 18. Espectros de massas MS dos íons precursores obtidos com ESI negativo para soluções preparadas em acetonitrila/água com diferentes aditivos.	56
Figura 19. Espectros de massas MS dos íons precursores obtidos com ESI positivo para soluções preparadas em metanol/água com diferentes aditivos.	57
Figura 20. Espectros de massas MS dos íons precursores obtidos com ESI negativo para soluções preparadas em metanol/água com diferentes aditivos....	57
Figura 21. Intensidade média de sinal obtida para o íon precursor do glifosato com a variação da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	58
Figura 22. Intensidade média de sinal obtida para o íon precursor do AMPA com a variação da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	58
Figura 23. Espectros de massas MS/MS do composto GLIF ionizado em <i>electrospray</i> positivo (acima) e negativo (abaixo).....	60
Figura 24. Estruturas sugeridas para íons produto do GLIF em ESI positivo.	61

Figura 25. Estruturas sugeridas para íons produto do GLIF em ESI negativo.....	61
Figura 26. Espectros de massas MS/MS do composto AMPA ionizado em <i>electrospray</i> positivo (acima) e negativo (abaixo).....	62
Figura 27. Estruturas sugeridas para íons produto do AMPA em ESI positivo....	63
Figura 28. Estruturas sugeridas para íons produto do AMPA em ESI negativo. .	63
Figura 29. Espectros de massas MS/MS do composto GLUF ionizado em <i>electrospray</i> positivo (acima) e negativo (abaixo).....	64
Figura 30. Estruturas sugeridas para íons produto do GLUF em ESI positivo. ...	65
Figura 31. Estruturas sugeridas para íons produto do GLUF em ESI negativo...	66
Figura 32. Espectros de massas MS/MS do composto MPPA ionizado em <i>electrospray</i> positivo (acima) e negativo (abaixo).....	67
Figura 33. Estruturas sugeridas para íons produto do MPPA em ESI positivo....	68
Figura 34. Estruturas sugeridas para íons produto do MPPA em ESI negativo. .	68
Figura 35. Cromatogramas obtidos para o composto glifosato nos modos positivo e negativo após eluição com diferentes aditivos.	69
Figura 36. Cromatograma de solução padrão dos analitos empregando derivação pré-coluna com FMOC-Cl.....	71
Figura 37. Cromatogramas dos analitos usando o método de infusão pós-coluna.	73
Figure 38. Representação esquemática da avaliação do efeito de matrix usando o método de infusão pós-coluna.....	74

Figure 39. Cromatogramas de solução padrão de GLIF e AMPA de 0,2 ng mL ⁻¹	80
Figure 40. Cromatogramas de solução padrão de GLIF e AMPA de 0,5 ng mL ⁻¹	80
Figure 41. Cromatogramas dos íons extraídos do composto GLIF.	81
Figure 42. Cromatogramas dos íons extraídos do composto AMPA.	81
Figure 43. Curva analítica da transição de quantificação do GLIF.	83
Figure 44. Curva analítica da transição de quantificação do AMPA.	83
Figure 45. Cromatogramas dos íons extraídos para os analitos usando ionização por <i>electrospray</i> nos modos positivo (esquerda) e negativo (direita).	89
Figura 46. Gráfico da recuperação média dos analitos em amostras de água superficial e tratada que foram analisadas usando ionização por <i>electrospray</i> nos modos positivo e negativo.	92

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio ocupa no Brasil uma posição de destaque na economia com expressivos 33% do Produto Interno Bruto (PIB). Este mercado que movimenta bilhões de dólares anualmente trazendo divisas e contribuindo para o crescimento da economia é um setor fundamental de negócios do país.

No cenário mundial, o Brasil ocupa a primeira posição no ranking dos exportadores de carne bovina, carne de frango, tabaco, couro, calçados de couro, e, especialmente de soja. Como maior exportador mundial de soja, o Brasil perde em volume de produção apenas para os Estados Unidos, seguido por Argentina, China e Índia. A safra de grãos no Brasil apresentou um crescimento de 131% desde o ano de 1990, com produção relatada em 2002/2003 de cinquenta e dois milhões de toneladas de grãos contra pouco mais de quinze milhões de toneladas produzidas em 1990/1991.

Neste contexto, que enquadra o Brasil como um país com grande potencial e dependência da agricultura, uma especial atenção deve ser destinada à produção e ao desenvolvimento desta área de negócios. O crescimento da economia do país nos últimos anos está diretamente ligado à produtividade em larga escala dos nossos principais *comodities*. No caso específico da soja, a alta produtividade desta semente oleaginosa movimenta anualmente um outro grande mercado destinado ao emprego dos agrotóxicos.

Dentre os diversos agrotóxicos empregados em toda agricultura brasileira e mundial, o herbicida glifosato possui uma posição de destaque. Desenvolvido no começo da década de 70, este herbicida é o mais utilizado mundialmente por alguns motivos de considerável importância. O glifosato é um herbicida de amplo espectro de aplicação e muito eficiente no combate às ervas daninhas em campos de cultivo. Quando comparado a outros herbicidas, além de

apresentar maior eficiência, o glifosato é um composto de baixa toxicidade à mamíferos e apresenta um menor custo de aquisição.

Embora existam vantagens na utilização do glifosato como herbicida, este composto é aplicado no preparo do solo e como pós-emergente das plantas infestantes. O glifosato, entretanto, não pode ser aplicado após o aparecimento da soja, pois este herbicida não é seletivo e possui ação contra a própria cultura. Comumente, quando a aplicação do glifosato não é suficiente como pós-emergente das ervas daninhas, herbicidas de outras classes químicas precisam ser aplicados, aumentando assim o custo de produção e a exposição e utilização de compostos mais tóxicos. Em geral, estes outros herbicidas, além de mais tóxicos são menos eficientes e requerem a aplicação de uma quantidade maior.

No caso da soja transgênica, a modificação genética das sementes confere à cultura uma resistência ao herbicida glifosato. Desta maneira, o custo de produção da cultura geneticamente modificada é consideravelmente reduzido entretanto, implica na utilização de maiores quantidades do herbicida. Embora a permissão de utilização de níveis maiores de glifosato seja baseada em dados toxicologicamente seguros do ponto de vista da segurança alimentar, existe uma preocupação com o monitoramento e controle destes resíduos no ambiente e nos alimentos. A principal dificuldade no monitoramento de resíduos de glifosato e do seu principal produto de degradação, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), é a ausência de metodologias analíticas rápidas e relativamente simples. O glifosato e o AMPA são geralmente determinados por cromatografia de troca iônica com detecção por fluorescência, em um método analítico complexo e de exaustiva etapa de preparação da amostra.

Com a consolidação da técnica de LC-MS/MS, a maioria dos laboratórios de referência em análise de resíduos têm empregado esta tecnologia como uma ferramenta poderosa no desenvolvimento de métodos rápidos, baratos e confiáveis. Apesar disso, nestes laboratórios as análises de glifosato e AMPA continuam sendo realizadas pela técnica convencional por não haver um método de determinação por LC-MS/MS. Esta dificuldade existe devido à elevada

polaridade destes compostos que faz com que os mesmos não possuam retenção em colunas de fase reversa.

Com a grande demanda por análises de glifosato e AMPA referente à elevada produtividade de grãos como a soja, o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a quantificação destes compostos com rapidez e elevado grau de confiança é de extrema importância. O monitoramento dos resíduos destes compostos permite garantir a qualidade dos alimentos para exportação e para consumo no mercado interno. Além disso, o controle dos resíduos de agrotóxicos no meio ambiente, principalmente na água e no solo, é fundamental. Por estes motivos, o desenvolvimento de metodologia analítica para determinação destes compostos neste estudo, pode trazer uma significativa contribuição na produtividade e na qualidade dos alimentos e do meio ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação do herbicida glifosato (GLIF) e seu principal produto de degradação, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), em amostras de grãos de soja utilizando a técnica de LC-MS/MS.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1) Avaliar o efeito de diferentes solventes e aditivos na ionização por *electrospray* dos analitos nos modos de íons positivos e negativos.

2) Caracterizar os compostos nos modos MS e MS/MS para interpretação do padrão de fragmentação observado em espectros de massas de baixa resolução, obtidos em um espectrômetro de massas triploquadrupolo com ionização por *electrospray* nos modos positivo e negativo.

3) Verificar o comportamento dos analitos em colunas cromatográficas de fase reversa C₈ e C₁₈ empregando variações de tampões e solventes.

4) Avaliar a possibilidade de determinação direta dos analitos e a determinação empregando derivação pré-coluna com cloroformato de 9-fluorenil-metoxicarbonil (FMOC-Cl).

5) Desenvolver uma metodologia analítica rápida para a determinação simultânea de glifosato (GLIF), ácido aminometilfosfônico (AMPA) e do herbicida glufosinato (GLUF) e seu principal produto de degradação, o ácido

metilfosfínicopropiônico (MPPA), nos modos de íons positivo e negativo por injeção direta de amostras de água superficial e tratada.

6) Avaliar o efeito de matriz na resposta dos analitos em ambas polaridades de ionização.

7) Validar o método de determinação de GLIF e AMPA em amostras de grãos de soja segundo a norma EC/2002/657 da Comunidade Européia empregando o *software ResVal* (versão 2.0).

3 REVISÃO DA LITERATURA

O objetivo deste capítulo é oferecer noções básicas da técnica de espectrometria de massas em *tandem* com ionização por *electrospray*, empregada na etapa experimental deste trabalho e foco do estudo.

3.1 Espectrometria de massas

Um espectrômetro de massas é um instrumento composto basicamente por três unidades fundamentais: uma fonte de íons, um analisador ou filtro de massas e um sistema de detecção. A fonte de íons tem a finalidade de gerar os íons a serem analisados na fase gasosa a partir das amostras de interesse. O analisador de massas emprega combinações entre campos elétricos e magnéticos para separar os íons gerados na fonte de ionização de acordo com as suas razões massa/carga (m/z). O detector tem a finalidade de quantificar os íons provenientes do analisador de massas¹.

Como fontes de ionização, diferentes técnicas podem ser empregadas em virtude do estado físico da amostra, sendo que as mesmas são escolhidas levando-se em consideração algumas propriedades da amostra a ser analisada, tais como a polaridade, a estabilidade térmica e o peso molecular. São exemplos de modos de ionização já desenvolvidos em espectrometria de massas a ionização por elétrons (EI), ionização química (CI), ionização por átomos/íons rápidos (FAB/FIB), ionização por *termospray* (TSP), ionização por *electrospray* (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI), fotoionização à pressão atmosférica (APPI)², ionização por dessorção à laser assistida pela matriz (MALDI), ionização por dessorção à laser assistida pela matriz à pressão atmosférica (APMALDI)^{3,4}, *Desorption Electrospray* (DESI)^{5,6,7,8} e a dessorção por ionização química à pressão atmosférica (DAPCI)⁹, Análise Direta em Tempo Real (DART)¹⁰, Ionização por *Sonic Spray* (SSI)^{11,12,13,14}, Ionização por *Electrosonic Spray* (ESSI)¹⁵, Bombardeamento com Átomos Metaestáveis

(MAB)¹⁶, *Liquid Surface Penning Ionization* (LPI)^{17,18,19}, *Atmospheric Pressure Penning Ionization* (APPI)²⁰, *Atmospheric Sampling Glow Discharge Ionization* (ASGDI)²¹, etc.

Os analisadores de massas, responsáveis pela separação ou resolução dos íons de acordo com a relação m/z , são disponíveis em virtude da resolução de massas necessária e da compatibilidade com a interface ou o sistema de ionização empregado. São exemplos de analisadores de massas, o quadrupolo, setor magnético, tempo de voo (TOF), etc.

Os sistemas de detecção, responsáveis pela quantificação dos íons e conversão destes íons em sinais eletrônicos, podem ser classificados como detectores com ou sem multiplicação de elétrons. No primeiro grupo encontram-se os multiplicadores de elétrons, dinodos contínuos e fotomultiplicadoras e no segundo grupo estão incluídos os copos de Faraday (*Faraday cups*) que são dispositivos metálicos que geram uma corrente elétrica capturando o feixe de íons²².

Diferentes estratégias e configurações podem ser empregadas em cada uma destas partes constituintes dos espectrômetros de massas de acordo com a aplicação específica. Neste trabalho, serão abordados apenas a ionização por *electrospray* e o analisador quadrupolar em virtude dos mesmos terem sido empregados na parte experimental deste estudo.

3.1.1 Analisador de massas quadrupolar

Os analisadores de massas quadrupolares consistem de quatro eletrodos cilíndricos metálicos dispostos paralelamente, como ilustrado no esquema da Figura 1. Cada par de eletrodos opostos é conectado a geradores de radio frequência (*RF*) e de corrente contínua (*DC*) que variam em magnitude, produzindo um campo elétrico e de rádio frequência combinados, durante a passagem dos íons pelo quadrupolo. A energia *RF* aplicada no analisador quadrupolar, trata-se de uma energia na região de radio frequência do espectro eletromagnético, que descreve a forma de uma onda com amplitude variável V ,

mas com frequência ω fixa. A energia *DC*, entretanto, trata-se de uma corrente contínua que varia de positiva $(+U)$ a negativa $(-U)$ ²³.

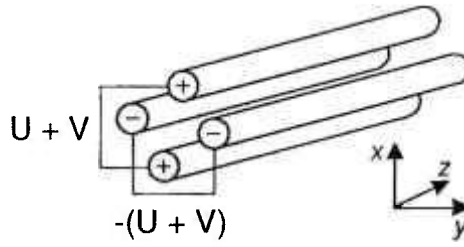


Figura 1. Esquema ilustrativo de um analisador de massas quadrupolar.

A combinação dos eletrodos do quadrupolo estabelece um campo quadrupolar bidimensional no plano $x - y$, enquanto que a trajetória dos íons é dada na direção z . Durante a trajetória dos íons no eixo z , a ação do campo quadrupolar faz com que os íons oscilem e que apenas determinados íons tenham uma trajetória estável em virtude dos valores de RF e DC aplicados²³.

A derivação de equações que descrevem o movimento dos íons em campos elétricos e eletromagnéticos envolve soluções de equações diferenciais. Esta derivação gera duas variáveis a e q (equações 1 e 2) que estão relacionadas à trajetória estável dos íons em campos quadrupolares sob determinados valores de U e V ²⁴.

$$a = \frac{8zU}{mr_0^2\omega^2} \quad (1)$$

$$q = \frac{4zV}{mr_0^2\omega^2} \quad (2)$$

onde:

U = potencial *DC*

V = potencial *RF*

r = raio entre os quadrupolos

ω = frequência fixa

z = carga do íon

m = massa do íon

Os parâmetros a e q estão relacionados a U e V conforme a equação 3

$$\frac{a}{q} = \frac{2U}{V} \quad (3)$$

O emprego de valores específicos de a e q , que descrevem a trajetória estável dos íons de determinadas razões massa/carga em campos quadrupolares, permite a criação de diagramas de estabilidade de a versus q ou U versus V . (Figura 2).

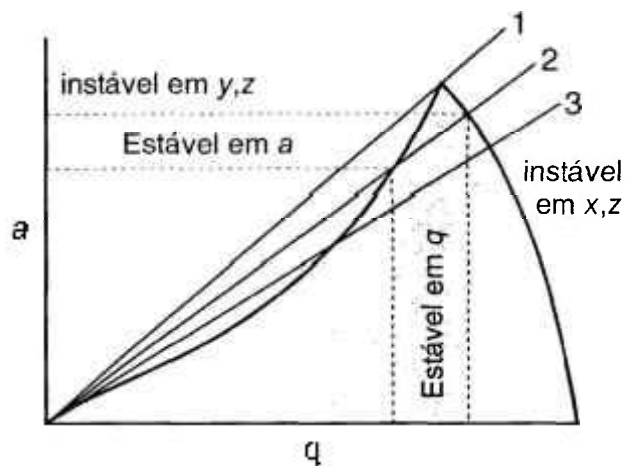


Figura 2. Diagrama de estabilidade dos íons em analisadores quadrupolares.

A região sob as curvas da Figura 2 representa a região de estabilidade da trajetória dos íons dentro do quadrupolo na direção z . Para valores de a e q diferentes da região de estabilidade, os íons se movimentam muito afastados do eixo z e conseqüentemente colidem com os quadrupolos.

As linhas 1, 2 e 3 representam a resolução na qual o quadrupolo está sendo operado. Analisadores quadrupolares não são sistemas de alta resolução como os analisadores de tempo de voo, por exemplo. Os quadrupolos possuem capacidade de resolução unitária, ou seja, $\Delta M \sim 1$ Dalton. Desta maneira, quando a resolução empregada no quadrupolo é comparada à curva 3, não é possível identificar o valor de m/z dos íons individualmente. Entretanto, quando o sistema é operado em resolução que tende ao ápice do diagrama de estabilidade (linha 1), íons com diferenças de uma unidade de m/z podem ser claramente identificados, devido aos valores específicos de U e V para um único íon de m/z específica²³.

3.2 Espectrometria de massas em *tandem* – MS/MS

A espectrometria de massas em *tandem* é a área da espectrometria de massas interessada em estudar a geração de íons produtos formados por ativação (usualmente por uma ou mais colisões) de um íon precursor, previamente selecionado²⁵. Este processo de fragmentação de um íon de m/z específica requer o isolamento deste íon, seguido da fragmentação do mesmo e da análise dos íons produtos formados por um outro analisador de massas.

Os sistemas de *tandem* no espaço são compostos por analisadores de massas dispostos em série podendo ser estes analisadores iguais ou até mesmo sistemas híbridos disponíveis comercialmente. Neste texto serão abordados de forma sucinta apenas os sistemas em *tandem* formados por quadrupolos (triploquadrupolos), uma vez que este tipo de equipamento foi utilizado na etapa experimental deste trabalho.

Um sistema triploquadrupolar é composto por três analisadores quadrupolares dispostos em série (Figura 3). Neste sistema, o primeiro quadrupolo (Q1) e o terceiro quadrupolo (Q3) funcionam como filtro de massas. O segundo quadrupolo (Q2) é operado como cela de colisão, onde, reações de dissociação de íons de interesse são realizadas. O quadrupolo Q0 não atua como filtro de massas e possui como única função a focalização dos íons provenientes da interface para o primeiro analisador de massas (Q1).

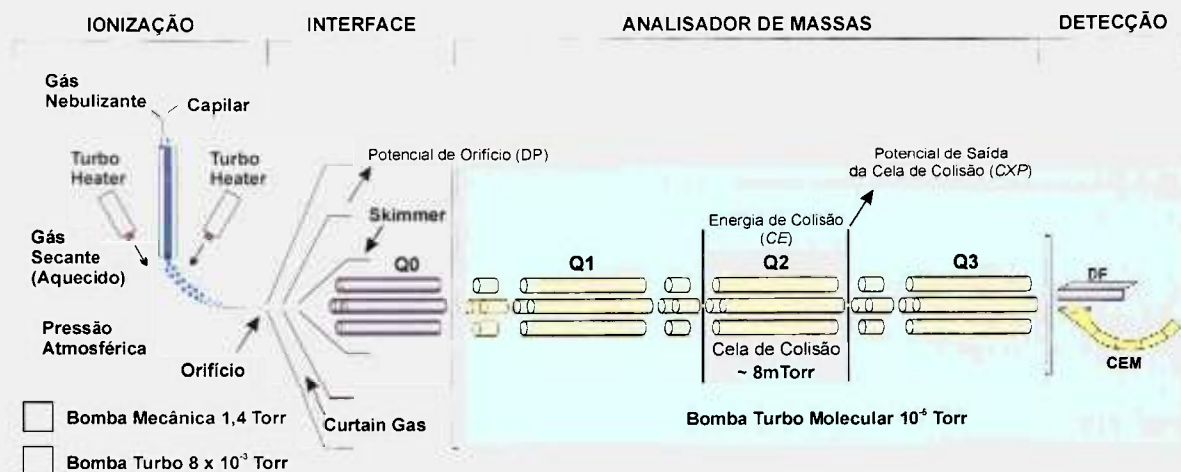


Figura 3. Esquema de um espectrômetro de massas triploquadrupolar modelo API 4000TM com fonte de ionização Turbo V.

Basicamente, quando os íons são formados na fonte de ionização, estes precisam ser acelerados até o analisador de massas. Enquanto existem sistemas que aceleram os íons com energia cinética da ordem de milhares de elétrons-Volt (keV), os sistemas quadrupolares operam na faixa de poucos a dezenas de elétrons-Volt (eV). A energia cinética de um íon acelerado da fonte de ionização para o analisador de massas, assumindo que o íon foi formado com energia cinética negligenciável, é calculada de acordo com a equação 4²⁶.

$$\frac{m v^2}{2} = z V \quad (4)$$

onde:

m = massa do íon em kg

v = velocidade do íon em m/s

z = carga do íon em C

V = diferença de potencial para aceleração do íon em Volts

Como a massa do íon e a voltagem de aceleração podem ser conhecidas, a velocidade do íon (v) em m s^{-1} pode ser calculada de acordo com a equação 5²⁶:

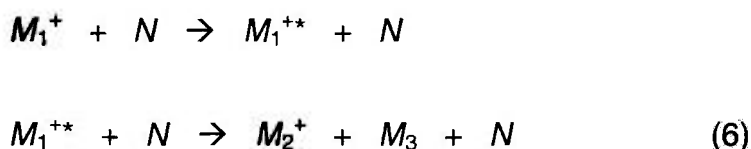
$$v = (2 d z V / m)^{1/2} \quad (5)$$

Na equação 5, d é a constante $9,64 \times 10^7$ (que é o produto da carga do elétron pelo número de Avogadro em kmol^{-1} : $1,6 \times 10^{-19} \times 6,023 \times 10^{26}$)²⁶.

Como os sistemas triploquadrupolares operam em faixa de baixa energia cinética, os experimentos em MS/MS são conduzidos por colisões de baixa energia. Quando um processo de colisões simples ou poucas colisões, com moléculas de um determinado gás é empregado para a dissociação dos íons, este processo é denominado como dissociação induzida por colisão (CID).

O processo de CID é essencial em estudos fundamentais e aplicações em espectrometria de massas. Sua operação é relativamente simples em termos de aplicação mas, extremamente complexa em termos de transferência de energia e mecanismos de dissociação.

A dissociação induzida por colisão é geralmente abordada como um processo de duas etapas. Na primeira etapa, denominada etapa de excitação ou ativação, uma fração da energia cinética do íon (M_1^+) é convertida em energia interna, devido às colisões com as moléculas de gás (N) presentes na cela de colisão (gás de colisão). A etapa seguinte ao processo de excitação é a dissociação unimolecular do íon excitado, como ilustrado na equação 6²⁷.



Neste processo ocorre também o balanço de massa e de energia (equação 7):

$$q + M_1^+ + N = M_2^+ + M_3 + N' + T \quad (7)$$

onde:

q = endotermicidade da colisão

N' = estado pós-colisão das moléculas do gás

T = energia cinética liberada na dissociação unimolecular

O parâmetro q na equação 7 representa a quantidade de energia cinética convertida pelos participantes da colisão em energia interna. Contanto que não haja fotoemissão, a energia interna de M_1^{**} será a energia interna de M_2^+ e M_3 , mais a energia cinética liberada em T após a dissociação. Neste processo de duas etapas, o tempo de ativação dos íons é várias ordens de magnitude maior que o tempo de dissociação²⁷.

A dissociação induzida por colisão é a técnica de ativação mais empregada em aplicações analíticas da atualidade. Isto se deve à elevada probabilidade de ativação desta técnica, quando comparada a outras técnicas como a fotodissociação e à facilidade da variação da energia de colisão e da densidade do gás de colisão, sem haver comprometimento da análise subsequente dos íons produtos.

Em um triploquadrupolo, diferentes modos de operação MS/MS podem ser realizados empregando reações de CID. No modo *Product Ion Scan* (MS/MS), um íon de m/z específica, denominado íon precursor, é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1). Este íon precursor é fragmentado no segundo quadrupolo (Q2) por dissociação induzida por colisão. Os fragmentos ou íons produto gerados por CID em Q2 são separados de acordo com suas m/z no terceiro quadrupolo (Q3) e focalizados ao sistema de detecção. A Figura 4 esquematiza este processo de análise em um espectrômetro do tipo MS/MS.

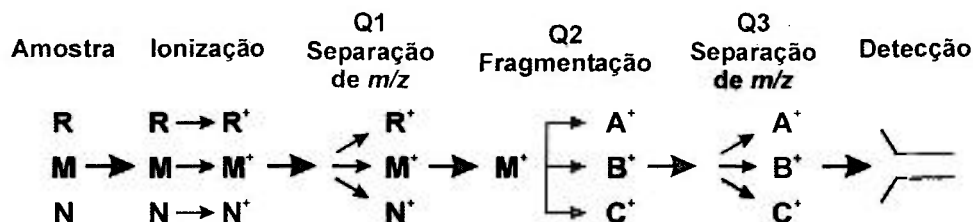


Figura 4. Esquema de análise realizada no modo MS/MS em um espectrômetro de massas do tipo triploquadrupolo.

O modo de operação empregado nas análises quantitativas deste trabalho foi o Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). Neste modo MS/MS o terceiro quadrupolo (Q3) é operado como Q1 no modo *Product Ion Scan*, ou seja, neste modo Q3 não trabalha como filtro de massas em função de varredura que permite filtrar íons de diferentes m/z em uma determinada faixa. Em modo MRM, o terceiro quadrupolo trabalha com o monitoramento de um ou mais íons produto de m/z específica provenientes da fragmentação de um íon precursor de interesse. Este modo é ideal para aplicações quantitativas, às quais requerem alta sensibilidade e seletividade.

Um sistema do tipo triploquadrupolo pode ser operado em diferentes modos MS e MS/MS. São exemplos destes modos o *Q1 Scan* (MS), *Q1 Multiple Ion* (Q1MI), *Q3 Scan* (MS) e *Q3 Multiple Ion* (Q3MI), *Product Ion Scan*, *Precursor Ion Scan*, *Neutral Loss Scan*, *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), dentre outros modos.

3.3 Ionização por *electrospray*

A técnica de ionização por *electrospray* é uma técnica de especial interesse da espectrometria de massas em tandem. Isto porque, na ionização por *electrospray* uma pequena quantidade de energia é transferida para o analito durante a ionização, permitindo a geração de espécies carregadas dos analitos com pequena ou nenhuma fragmentação da molécula a ser analisada.

A técnica de *electrospray* foi sugerida como modo de ionização para espectrometria de massas em 1968 por Malcolm Dole e colaboradores²⁸. Naquela ocasião, seus experimentos visavam determinar a massa de macromoléculas de poliestireno, as quais não estão ionizadas em fase líquida. Apesar dos estudos do grupo de Dole não terem sido suficientemente convincentes, eles definiram muitos parâmetros importantes do *electrospray*. Em 1984, entretanto, Masamichi Yamashita e John Beneth Fenn²⁹ demonstraram a aplicabilidade do *electrospray* como uma possível fonte de ionização para análise em espectrometria de massas de moléculas e macromoléculas orgânicas. Em 2002, o americano John Beneth Fenn foi laureado com o Prêmio Nobel de Química por sua contribuição no desenvolvimento da ionização por *electrospray*.

O *electrospray* é um processo de transferência de íons pré-existentes de analitos em solução líquida para a fase gasosa. Apesar de ser muitas vezes tratado como um modo de ionização, apenas na minoria dos casos o *electrospray* funciona como modo de ionização convertendo moléculas neutras em íons^{30,31}. De qualquer maneira, por se tratar de um modo de ionização suave, o *electrospray* ganhou destaque frente a outras técnicas de ionização em fase líquida em muito pouco tempo. Isto porque, a transferência de íons em fase líquida para a fase gasosa é um processo fortemente endotérmico e endoenergético devido à esfera de solvatação do íon constituída pelas moléculas de solvente. Como no *electrospray* a dessolvatação dos íons ocorre a baixas temperaturas e de forma gradual, não há fragmentação ou alteração dos íons presentes em solução. Este tipo de mecanismo permite que a estrutura dos íons observados na fase gasosa seja a mesma estrutura dos íons presentes na fase líquida, podendo ser aplicado à análise de espécies não voláteis e termolábeis.

As principais etapas do processo de *electrospray* na produção de íons na fase gasosa são: a produção de gotas carregadas na ponta do capilar do *electrospray*, a dessolvatação e fissão destas gotas em gotículas menores e a formação dos íons na fase gasosa a partir destas gotículas altamente carregadas.

Na ionização por *electrospray* há a formação de um spray eletrostático da solução eletrolítica bombeada a um fluxo de alguns microlitros por minuto em

um capilar metálico com uma tensão de alguns milhares de volts e cerca de 100 μm de diâmetro interno. A ponta do capilar do *electrospray* fica posicionada a cerca de 1 a 3 cm de um contra-eletródo que conduz através de um orifício ao sistema de amostragem do espectrômetro de massas. O alto campo elétrico na ponta do capilar gera um acúmulo de cargas na superfície do líquido devido à migração eletroforética, produzindo uma deformação na gota que recebe o nome de cone de Taylor. À medida que o solvente evapora com o auxílio de gases nebulizante e secante, há um aumento da densidade de cargas da gota e, no momento em que esta densidade de cargas é capaz de vencer a tensão superficial do líquido, há um colapso e fissão da gota. Esta fissão da gota ascendente produz gotas descendentes de tamanhos menores. As gotas descendentes sofrem o mesmo processo de dessolvatação e fissão da gota ascendente formando novas gotículas cada vez menores e com menor massa porém, com maior densidade de carga que as gotas ascendentes³².

3.3.1 Fonte de *electrospray*: uma célula eletroquímica

Considerando que a separação das cargas no *electrospray* é um processo eletroforético e que apenas elétrons possam fluir através de materiais metálicos, o balanço de cargas do sistema conduz à suposição que o processo de *electrospray* inclui a conversão eletroquímica de íons em elétrons³³ (Figura 5). Desta maneira, o *electrospray* pode ser tratado como um especial tipo de célula eletroquímica, na qual, o transporte dos íons não ocorre em fase líquida como na eletrólise mas, na fase gasosa. Neste tipo de célula, o capilar metálico do *electrospray* funciona como eletródo da célula e o orifício como o contra-eletródo.

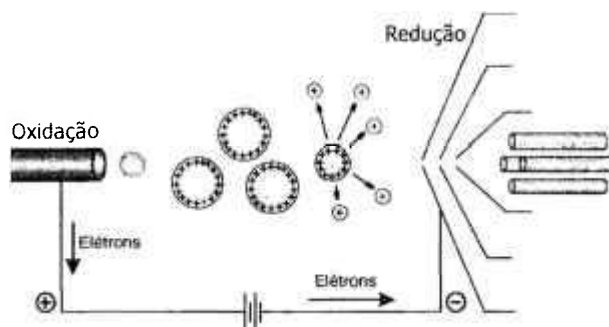
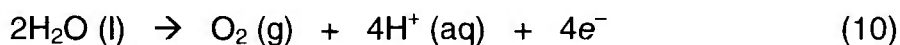
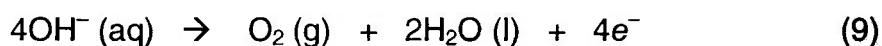
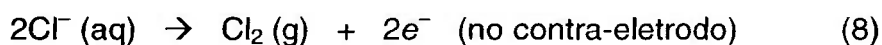


Figura 5. Esquema de uma fonte de *electrospray* como cela eletroquímica.

Quando um potencial positivo, por exemplo, é aplicado na ponta do capilar do *electrospray*, ocorre a formação do cone de Taylor com as cargas positivas migrando no sentido do contra-eletródo e prevalecendo na superfície da gota. Com este processo eletroforético, o balanço de cargas ocorre com a neutralização das cargas negativas por processos de oxidação eletroquímica no capilar (equações 8 e 9), com a formação dos íons positivos (equações 10 e 11), ou ambos processos. Se um potencial negativo for aplicado o balanço de cargas ocorrerá pela redução eletroquímica dos íons positivos, pela produção dos íons negativos ou ambos processos simultaneamente. No modo de íons positivos, processos de redução podem ocorrer no contra-eletródo assim como processos de oxidação no modo de íons negativos.



O grupo de Kebarle³³ demonstrou a natureza eletrolítica do *electrospray* através de estudos que empregaram um capilar com zinco depositado, onde, após processos de oxidação do capilar, íons Zn^{2+} foram detectados e quantificados em concentrações correspondentes à necessária para o balanço de cargas da célula, com base na lei de Faraday (equação 12).

$$i_{\text{ESI}} = i_{\text{F}} = \sum_i n_j A_j F v_j \quad (12)$$

onde:

i_{ESI} = corrente do *electrospray*

i_{F} = corrente faradaica

n_j = número de elétrons envolvidos na oxidação de uma molécula da espécie j

A_j = concentração da espécie j oxidada/reduzida

F = constante de Faraday ($9,648 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$)

v_f = fluxo da solução no capilar

Os estudos do grupo de Kebarle demonstraram que os processos de oxidação e de redução predominantes no *electrospray* são aqueles que apresentam menor potencial padrão de oxidação ou redução e, são dependentes de outros fatores como a natureza do capilar e do solvente³³.

3.3.2 Formação de íons na fase gasosa

O processo de ionização por *electrospray* envolve três grandes etapas: a) a produção da gota carregada na ponta do capilar, b) a dessolvatação da gota carregada seguida de repetidas desintegrações para a formação de gotas menores e, c) a formação dos íons na fase gasosa.

3.3.2.1 Produção das gotas carregadas

A intensidade do campo elétrico (E_c) formado em uma fonte de *electrospray* quando um alto potencial é aplicado na ponta do capilar pode ser calculada através da equação 13, dada por Loeb e colaboradores³⁴:

$$E_c = \frac{2V_c}{r_c \ln(4d / r_c)} \quad (13)$$

onde:

V_c = potencial aplicado

r_c = raio externo do capilar

d = distância da ponta do capilar ao contra-eletrodo

Como a ponta do capilar é muito fina, o campo elétrico produzido na fonte é da ordem de milhões de volts por metro quadrado. O intenso campo elétrico gerado faz com que os íons positivos e negativos presentes na solução sofram um processo de migração eletroforética. Com o acúmulo de cargas na superfície da gota, há um aumento da repulsão entre as cargas até o momento em que esta repulsão coulombiana supera a tensão superficial do solvente fazendo que a superfície do líquido se expanda. Esta expansão do líquido é conhecida como cone de Taylor³⁵ que, quando imersa em um campo eletrostático suficientemente elevado, produz um fino jato em sua ponta no qual pequenas gotículas são desprendidas (Figura 6).

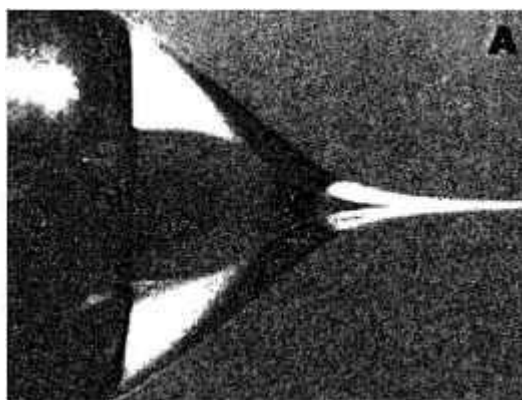


Figura 6. Formação do cone de Taylor na ponta do capilar do *electrospray*.

Cada gota desprendida do jato sofrerá a mesma influência do campo eletrostático e, portanto, o mesmo processo de deformação e formação do cone de Taylor, produzindo gotículas cada vez menores como mostrado na Figura 7.



Figura 7. Influência do campo eletrostático sobre a gota carregada com a formação do cone de Taylor.

Embora o trabalho realizado por Geoffrey Taylor tenha trazido uma grande contribuição com a explanação do formato cônico adquirido na superfície da gota, importantes contribuições já haviam sido dadas em estudos pioneiros de John Zeleny^{36,37}.

As primeiras fontes de ionização por *electrospray* produzidas comercialmente foram desenvolvidas para operação do sistema a baixos fluxos de amostra (de 5,0 a 20,0 $\mu\text{L min}^{-1}$). Atualmente, com o aprimoramento destas fontes, fluxos elevados (até 2,0 mL min^{-1}) podem ser empregados em sistemas pneumaticamente assistidos. Estes sistemas são incrementados com um gás nebulizante que auxilia na formação das gotas na região de ionização e com gases secantes que auxiliam na dessolvatação das gotas.

3.3.2.2 Dessolvatação das gotas carregadas

À medida que as gotas carregadas são produzidas na fonte de ionização por *electrospray* que está sob pressão atmosférica, estas começam a trocar energia térmica com as moléculas de ar presentes. Este processo de troca térmica, assistido por um fluxo de gás secante, faz com que o tamanho da gota e, conseqüentemente, a esfera de solvatação dos íons diminua pela evaporação das moléculas do solvente. Este processo de evaporação do solvente conduz ao aumento da densidade de carga das gotas até a sua fissão em gotículas menores.

Em 1882, Lord Rayleigh³⁸ propôs a equação 14, que permite calcular a estabilidade e resistência de uma gota carregada à repulsão eletrostática.

$$q_{\text{Ry}} = 8\pi (\epsilon_0 \gamma R^3)^{1/2} \quad (14)$$

onde:

q_{Ry} = carga máxima da gota

ϵ_0 = permissividade livre no espaço

γ = tensão superficial do solvente

R = raio da gota

A igualdade na equação, conhecida como limite de Rayleigh, representa o momento em que a repulsão coulombiana dentro da gota é igual à tensão superficial do solvente. Ao atingir este grau de repulsão entre as cargas, há a fissão da gota em gotículas menores que continuarão sofrendo sucessivos processos de evaporação seguidos de novas fissões.

Kebarle e Tang³⁹ demonstraram que estes processos de fissões das gotas ascendentes conduzem à formação de uma gota maior e outras gotículas de menor diâmetro (Figura 8). Os valores de N e R representam, respectivamente, o número de cargas da gota e o seu diâmetro em micrometros.

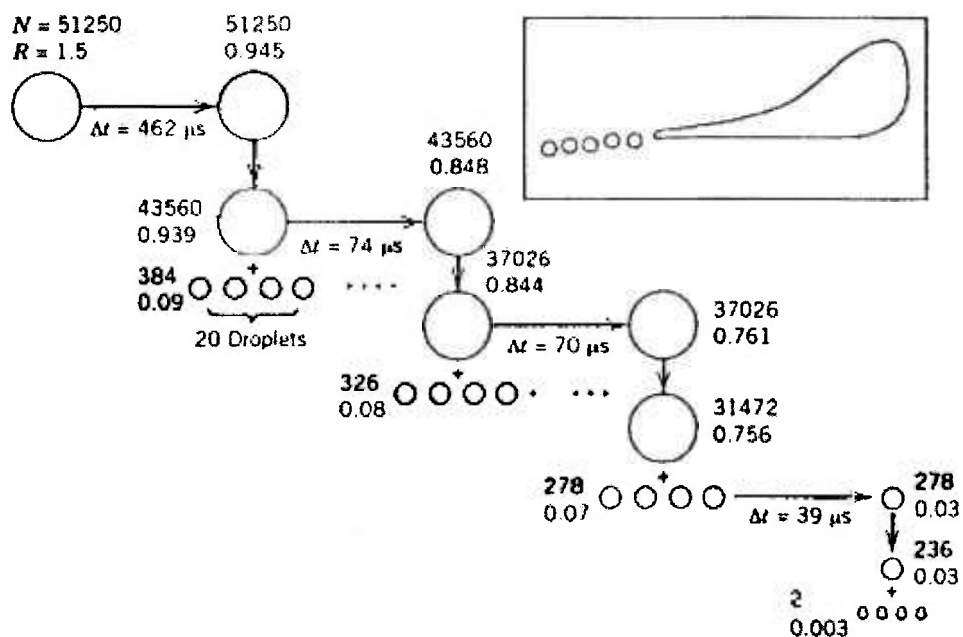


Figura 8. Esquema do processo de fissão das gotas carregadas em uma fonte *electrospray* observado e proposto por Kebarle e Tang³⁹.

É possível notar que o processo de dessolvatação e fissão das gotas depende do tamanho das gotas formadas e do número de cargas presentes. Desta forma, o fluxo e a condutividade da solução são parâmetros que irão determinar estas propriedades nas gotas formadas. As menores gotas são obtidas sob fluxos menores e condutividades maiores. Fatores como a temperatura e as propriedades do solvente como massa molar, pressão de vapor e densidade, também são determinantes neste processo⁴⁰.

3.3.2.3 Mecanismos de formação dos íons

Dois mecanismos de formação dos íons na fase gasosa foram propostos para explicar a geração dos íons em *electrospray* partindo-se de gotas altamente carregadas. O primeiro mecanismo foi proposto por Dole²⁸ em 1968 e foi denominado como modelo da carga residual (CRM, do inglês, *Charged Residue Model*). O outro mecanismo foi proposto por Iribarne e Thomson^{41,42} e é denominado como modelo da evaporação do íon (IEM, do inglês, *Ion Evaporation Model*).

O modelo CRM sugere que a evaporação das gotas carregadas conduz ao aumento da densidade de carga da superfície da gota até o ponto em que o limite de Rayleigh seja alcançado e a força de repulsão das cargas supere a tensão superficial. A repulsão coulombiana entre as cargas da superfície da gota conduz à fissão da gota ascendente em minúsculas gotículas descendentes. A sequência de sucessivas explosões coulombianas conduz à formação de gotas muito pequenas com raios de aproximadamente 1nm. Estas gotas, com a evaporação do solvente conteriam apenas o íon na fase gasosa ou uma molécula neutra ionizada pela sua associação a uma carga remanescente da gota, uma vez que as moléculas do solvente evaporaram⁴³.

Para simplificação do modelo CRM, entenda-se uma solução que contenha apenas um soluto, o eletrólito MX. Após a evaporação do solvente, o resíduo carregado será composto pelas espécies $(M^+)_x(MX)_n$ com ampla distribuição de cargas elementares x e valores de n que são dependentes do processo de dessolvatação das gotas. Considerando que o processo de fissões

coulombianas conduz à formação de gotas com diferentes distribuições de carga e massa, as primeiras gotas formadas nas fissões possuiriam elevados valores de carga (x) e de massa (n). Com as repetidas fissões, íons com baixos valores de n , inclusive o íon M^+ , seriam formados e poderiam ser detectados. Se o processo de fissão das gotas ocorrer muito rapidamente, em um fator de 20 com relação à gota ascendente para soluções onde a concentração inicial não é elevada (aproximadamente $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), a formação de íons de carga simples (M^+) pode dominar no espectro de massas⁴⁴.

O modelo proposto por Dole foi pouco explorado como um possível mecanismo de ionização ocorrido no *electrospray* até 1979, quando Iribarne e Thomson propuseram o modelo da evaporação do íon (IEM). De qualquer forma, os estudos realizados por Dole abriram o caminho para investigações quanto ao desenvolvimento da técnica de *electrospray*. Um dos problemas enfrentados por Dole foi a limitação instrumental da época. Os espectrômetros de massas de setor magnético disponíveis, não eram capazes de medir íons de carga simples carregados com massas maiores que dez mil daltons. Os íons de oligômeros de interesse para Dole poderiam ter pesos moleculares de até um milhão ou mais e a possibilidade de formação de íons de múltiplas cargas, até então, não havia sido descoberta⁴⁵.

Iribarne e Thomson propuseram o modelo IEM como proposta de interpretação das observações experimentais deles, uma vez que o modelo CRM apresentou-se inconsistente para isto. Ambos, meteorologistas da Universidade de Toronto, estavam interessados em verificar a possibilidade de gotas carregadas provenientes da água do mar, constituírem uma fonte íons para a atmosfera. Seus experimentos foram realizados com gotas produzidas em um sistema com nebulização pneumática da solução.

Em estudos realizados por Iribarne e Thomson^{41,42} com soluções de NaCl em metanol/água (50/50), apenas íons como Na^+ e $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ ($n = 3 - 7$) foram detectados. Caso o modelo CRM fosse adequado para interpretar suas observações experimentais, íons $\text{Na}_x(\text{NaCl})^{x+}_n$ deveriam ter sido observados. Boyd e colaboradores⁴⁶, entretanto, observaram íons como $\text{Na}(\text{NaI})^+_n$ de

espectros de massas de soluções de iodeto e sódio entre outros eletrólitos como KI, CsI e CsNO₃. Resultados diferentes também foram obtidos por Wang e Cole⁴⁷ em espectros de massas formados por *electrospray* de cloreto de cézio em metanol/água (50/50). Nestes experimentos foram detectados os íons Cs⁺ e Cs(CsCl)⁺ como previsto pelo modelo CRM.

No modelo IEM proposto por Iribarne e Thomson, a formação dos íons ocorre quando o processo de evaporação e fissão coulombiana das gotas atinge gotículas com raios entre 10 e 20 nm, aproximadamente. Neste estágio, a força do campo eletrostático promove a evaporação de íons da superfície das gotículas para a fase gasosa. Sob estas condições, a evaporação de íons M⁺ ocorreria em condições nas quais, a carga na superfície das gotas é menor que a requerida para que o limite de Rayleigh seja atingido e a fissão coulombiana ocorra.

Não há unanimidade na comunidade científica sobre qual modelo de formação de íons livres na fase gasosa é correto. O fato é que, na maior parte dos casos o modelo IEM parece mais consistente com as observações experimentais que o modelo CRM. Apesar disso, o modelo CRM apresenta-se mais adequado à interpretação dos fenômenos relacionados à formação de íons de macromoléculas⁴⁵. Possivelmente, os processos propostos em ambos modelos ocorram simultaneamente e, íons M⁺ devam ser produzidos por IEM e, íons como (M⁺)_x(MX)_n onde $x > 1$, 2 ou 3 e $n \gg 1$ sejam produzidos por CRM, especialmente para macromoléculas como proteínas e polímeros^{43,48}. Em publicação recente do grupo de Kebarle⁴⁹, íons como Na(NaCl)⁺ foram detectados para soluções de NaCl, em concordância com o modelo CRM.

3.3.2.4 Intensidade do sinal no *electrospray*

A intensidade do sinal de um analito no *electrospray* não depende exclusivamente da concentração deste analito em solução. Isto porque, a presença de outros eletrólitos no sistema é determinante na intensidade do sinal de um íon a ser detectado. A faixa linear do *electrospray*, onde a concentração do analito é proporcional à intensidade do seu sinal, está localizada entre 10⁻⁶ e 10⁻³ mol L⁻¹. A presença de eletrólitos interferentes na solução pode alterar esta

seção linear mas, por outro lado, a determinação de concentrações do analito inferiores a $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ só é possível devido à presença de impurezas dos solventes que geralmente estão presentes nesta ordem de concentração ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)⁴⁴.

Quando a concentração de um analito A^+ for menor que $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a corrente do capilar (I) será determinada pela concentração da impureza B^+ . Nestas condições a corrente do capilar será constante, pois a concentração do eletrólito B^+ é constante e este predominará na gota carregada. Se a concentração do analito A^+ é aumentada para valores acima de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a intensidade do sinal do eletrólito B^+ diminuirá em virtude da fraca dependência da corrente com a concentração total. Este aumento da concentração de A^+ faz com que este ion predomine na gota carregada⁴⁴.

Kearle e Tang⁴⁰, baseados no modelo de evaporação do íon (IEM) de Iribarne e Thomson, propuseram um modelo em que a taxa de evaporação do íon é proporcional à concentração do íon na gota carregada (equação 15).

$$I_A = f p \frac{k_A [A^+]}{k_A [A^+] + k_B [B^+]} I \quad (15)$$

onde:

I_A = Intensidade do sinal do íon A^+ detectado no espectrômetro de massas

f = fração de cargas na gota convertidas para a fase gasosa

p = fração de íons detectados em relação aos íons gerados

$[A^+]$ = concentração do íon A^+

$[B^+]$ = concentração do íon B^+

k_A, k_B = constantes que expressam a taxa de transferência de íons para a fase gasosa

I = corrente do *electrospray*

Embora a equação 15 apresente um sistema de apenas dois eletrólitos, esta pode ser aplicada a um sistema com mais eletrólitos. Esta dependência da concentração de outros íons na intensidade do sinal de um íon no *electrospray* está relacionada à competição entre os íons na transferência da fase líquida para a fase gasosa. A espécie em maior concentração tende a prevalecer na superfície da gota carregada e vencer a competição de transferência para a fase gasosa.

Com o surgimento da técnica de ionização por *electrospray* e a possibilidade de análise de compostos polares de uma extensa faixa de peso molecular, a química, a bioquímica e as áreas correlatas, passaram a contar com uma poderosa ferramenta no auxílio do entendimento dos processos e mecanismos que ocorrem em fase líquida. Isto porque, além de permitir a realização de estudos em fase líquida por espectrometria de massas, compostos não voláteis e termoestáveis passaram a ser analisados por esta inovadora técnica de ionização.

3.4 Herbicida glifosato: uma breve introdução

O glifosato, principal analito deste trabalho, é o herbicida mais utilizado da atualidade. Devido à elevada eficiência e à baixa toxicidade a mamíferos, o glifosato tem sido utilizado intensivamente desde 1971, quando a formulação Round-up® (patente da empresa Monsanto) foi comercializada. Recentemente, evidências mostraram que o uso prolongado do glifosato apresenta efeitos ambientais negativos, com o desenvolvimento de ervas daninhas resistentes ao herbicida⁵⁰.

O composto N-(fosfonometil)glicina, glifosato, é um herbicida sistêmico, não-seletivo, pós-emergente e de amplo espectro de ação que possui como modo primário de ação a inibição da enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase (EPSP sintase) nas plantas. Esta enzima catalisa a formação de EPSP a partir do fosfoenolpiruvato (PEP) e shikimate 3-fosfato (S3P). Esta inibição bloqueia a

produção do intermediário chorismate, o qual é requerido para a biossíntese de uma ampla variedade de metabólitos aromáticos nas plantas, como os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Estes aminoácidos são precursores de produtos secundários nas plantas como antocianinas, ligninas, alcalóides, flavonóides, ácidos benzóicos, promotores e inibidores de crescimento e produção de proteínas⁵¹.

O glifosato possui duas principais rotas de degradação microbiológica (Figura 9). A primeira consiste na clivagem oxidativa da ligação carbono-nitrogênio produzindo o ácido aminometilfosfônico (AMPA), o qual pode ser degradado a fosfato inorgânico⁵². A segunda rota consiste na clivagem da ligação fósforo-carbono por ação da bactéria *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase) produzindo a sarcosina⁵⁰.

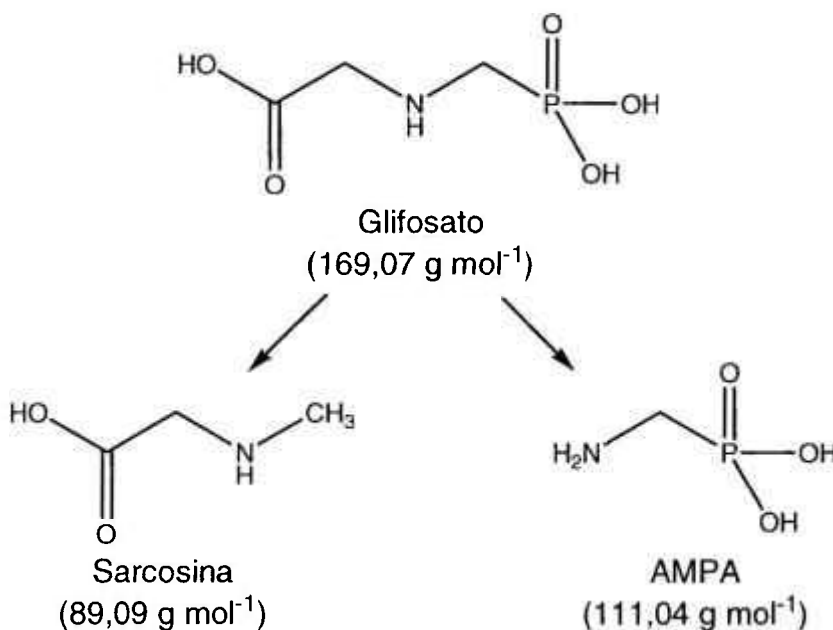


Figura 9. Esquema de degradação do herbicida glifosato.

Um outro herbicida denominado glufosinato, que é similar ao glifosato na sua estrutura química e uso, foi aplicado em parte deste trabalho por ser um herbicida de ampla utilização. O glufosinato é um herbicida não-seletivo e pós-emergente que age nas plantas infestantes pela inibição irreversível da atividade

da enzima glutamina sintetase, a qual é precursora do aminoácido glutamina. A ação do glufosinato conduz à redução dos níveis de glutamina e ao aumento dos níveis de amônia nos tecido da planta, promovendo assim a inibição da fotossíntese⁵³. A degradação microbiológica do glufosinato produz o ácido metilfosfínico (MPPA) como mostrado na Figura 10.

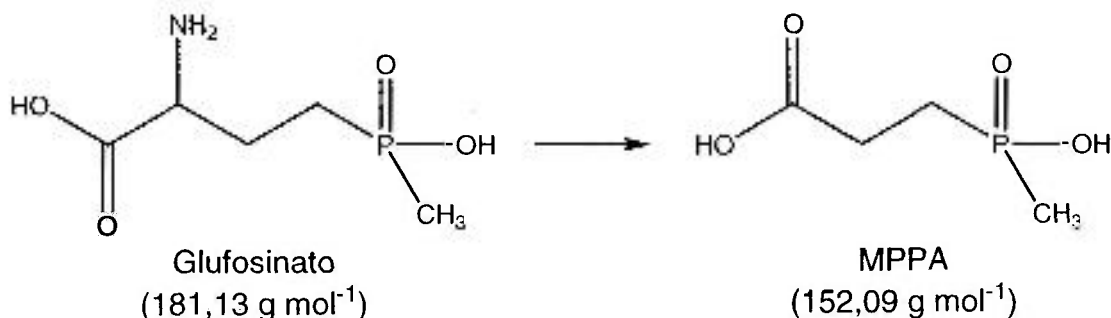


Figura 10. Esquema de degradação do herbicida glufosinato.

Como o objeto central deste trabalho é o herbicida glifosato, o glufosinato não será abordado extensivamente. Este composto e seu produto de degradação MPPA, entretanto, foram analisados nas amostras de água apresentadas na seção experimental.

3.4.1 Propriedades físico-químicas e classificações

O glifosato possui fórmula molecular C₃H₈NO₅P e massa molar de 169,1 g mol⁻¹. A solubilidade do glifosato em água é de 12 g L⁻¹ a 25 °C e o composto é muito pouco solúvel em solventes orgânicos. O glifosato apresenta densidade aparente de 0,5 g cm⁻³, coeficiente de partição octanol-água de -log 0,17 x 10⁻², ponto de fusão de 200 °C e pressão de vapor desprezível (<10⁻⁵ Pa a 25 °C). Suas constantes de dissociação⁵⁴ são pK₁ = 0,8; pK₂ = 2,2; pK₃ = 5,4 e pK₄ = 10,2 e estão ilustradas no esquema da Figura 11.

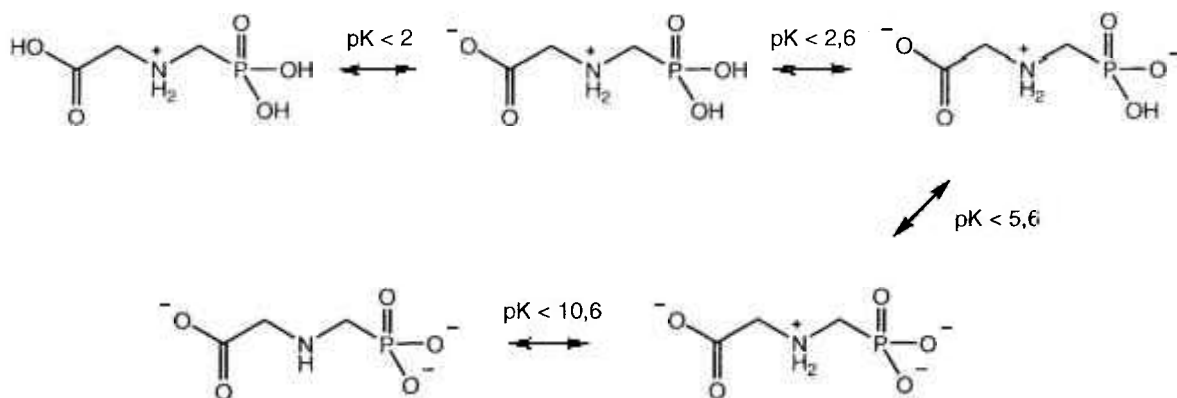


Figura 11. Constantes de ionização do glifosato.

De acordo com a Figura 11, em pH abaixo de 2 o glifosato apresenta carga positiva com uma protonação no grupo amino. Em pH 2,6 o glifosato apresenta-se com carga zero devido a uma dissociação no grupo fosfônico e a protonação no grupo amino. Entre pH 2,6 e 5,6 inicia-se a dissociação do ácido carboxílico e, a partir de pH 5,6 até pH 10,6 três dissociações podem ocorrer. Em pH superior a 10,6 a molécula de glifosato encontra-se totalmente dissociada. Esta sequência de dissociações demonstra que os grupos ácido presentes na estrutura do composto apresentam maior caráter ácido que o grupo amino.

O glifosato é um composto que apresenta baixa toxicidade aos mamíferos embora possua uma ação muito eficaz no combate a ervas daninhas em campos de cultivo. Seu valor de LD_{50} oral em ratos é de 5600 mg kg^{-1} segundo a empresa Monsanto e de 4230 mg kg^{-1} segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO). A dose de ingestão diária aceitável do glifosato é de $0,042 \text{ mg}$ por massa corpórea⁵⁰.

3.4.2 Legislação

No Brasil, os limites de resíduos de agrotóxicos em alimentos são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e estão mostrados na Tabela 1. Estes limites, chamados de Limite Máximo de Resíduo (LMR), determinam a quantidade máxima de resíduo de um determinado agrotóxico que pode ser aceita em cada alimento.

Tabela 1. Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido pela ANVISA.

Culturas	Modalidade de Emprego	LMR (mg kg⁻¹)	Intervalo de Segurança
Algodão	Pós-emergência	3,0	(1)
Ameixa	Pós-emergência	0,2	17 dias
Arroz	Pós-emergência	0,2	(1)
Banana	Pós-emergência	0,02	30 dias
Cacau	Pós-emergência	0,1	30 dias
Café	Pós-emergência	1,0	15 dias
Cana-de-açúcar	Maturador	1,0	30 dias
Cana-de-açúcar	Pós-emergência	1,0	(1)
Citros	Pós-emergência	0,2	30 dias
Eucalipto	Pós-emergência	Uso não alimentar	
Feijão	Pós-emergência	0,05	(1)
Maçã	Pós-emergência	0,2	15 dias
Milho	Pós-emergência	0,1	(1)
Nectarina	Pós-emergência	0,2	30 dias
Pastagens	Pós-emergência	0,2	(1)
Pêra	Pós-emergência	0,2	15 dias
Pêssego	Pós-emergência	0,2	30 dias
Pinus	Pós-emergência	Uso não alimentar	
Seringueira	Pós-emergência	Uso não alimentar	
Soja	Pós-emergência	10,0	56 dias
Trigo	Pós-emergência	0,05	(1)
Uva	Pós-emergência	0,2	17 dias

O LMR estabelecido pela ANVISA para o glifosato em soja e apresentado na Tabela 1, foi estabelecido com base na cultura geneticamente modificada. O limite estabelecido pelo *Codex Alimentarius Commission* para glifosato em soja é de 0,2 mg kg⁻¹.

A aplicação do glifosato como herbicida pós-emergente é autorizada no Brasil pela ANVISA para emprego nas culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, feijão, maçã, milho, nectarina, pastagens, pêra, pêssego, seringueira, soja, trigo e uva. O glifosato também é utilizado como maturador de cana-de-açúcar, para controle da rebrota do eucalipto, para eliminação de soqueira no cultivo de arroz e de cana-de-açúcar e como pós-emergente de plantas infestantes em florestas de eucalipto e pinus⁵⁵.

Os limites permitidos para agrotóxicos em água, visando estabelecer a qualidade da água para o consumo humano e o seu padrão de potabilidade são regulamentados pelo Ministério da Saúde através da Portaria 518 de 25 de Março de 2004⁵⁶. A Tabela 2 apresenta o Valor Máximo Permitido (VMP) de agrotóxicos em água para o padrão de potabilidade segundo a Portaria 518.

Tabela 2. Valor Máximo Permitido (VMP) de resíduos de agrotóxicos em água de acordo com a Portaria 518.

Agrotóxico	VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Agrotóxico	VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Alaclor	20,0	Hexaclorobenzeno	1
Aldrin e Dieldrin	0,03	Lindano (γ -BHC)	2
Atrazina	2	Metolaclo	10
Bentazona	300	Metoxiclo	20
Clordano (isômeros)	0,2	Molinate	6
2,4 D	30	Pendimetalina	20
DDT (isômeros)	2	Pentaclorofenol	9
Endossulfan	20	Permetrina	20
Endrin	0,6	Propanil	20
Glifosato	500	Simazina	2
Heptaclo e Heptaclo Epóxido	0,03	Trifluralina	20

Na Europa, os limites permitidos para agrotóxicos em água potável são estabelecidos pela Comunidade Econômica Européia⁵⁷ (EEC) que definiu o limite de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para a maioria dos agrotóxicos, sendo que a concentração total de agrotóxicos deve ser de até $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental⁵⁸ (EPA) estabelece o limite de $700 \mu\text{g L}^{-1}$ de glifosato em água potável. Não há no Brasil legislação que estabeleça limites de resíduos de agrotóxicos em solos.

3.4.3 Métodos analíticos

Outros agrotóxicos como o GLIF, que também contém em sua estrutura grupos como aminoácidos ou ácidos fosfônicos, são amplamente utilizados mundialmente. Dentre estes destacam-se o GLIF, o GLUF e o bialafós (BIAL). Basicamente, a determinação destes compostos por espectrometria de massas tem sido feita com o acoplamento a técnicas cromatográficas de análise. Independentemente da determinação ser realizada por cromatografia em fase líquida ou gasosa, devido à alta polaridade e baixa volatilidade destes compostos, reações de derivação são necessárias para que os mesmos possam ser volatilizados e/ou cromatografados.

3.4.3.1 Cromatografia gasosa / espectrometria de massas

Por apresentarem baixa volatilidade, compostos como o glifosato necessitam de uma etapa de derivação pré-coluna para a obtenção de um derivado volátil a ser analisado em cromatografia gasosa.

Guinivan e colaboradores^{59,60} analisaram simultaneamente GLIF e AMPA em frutas por GC-MS utilizando ionização por elétrons (IE) e ionização química (IC) dos compostos na forma de derivados de cloroetil heptafluorobutiril (HFBA).

Tsunoda⁶¹ realizou a determinação simultânea de GLIF, AMPA, GLUF, MPPA e BIAL em água empregando ionização por elétrons e ionização química. Os analitos foram determinados após reação de derivação com N-metil-N-(t-butildimetilsilil)trifluoroacetamida (MTBSTFA).

Alferness e colaboradores⁶² realizaram a derivação de GLIF e AMPA com ácido trifluoroacético anidro (TFAA) e heptafluorobutanol (HFB), seguida de ionização por elétrons e ionização química para a determinação destes compostos em diferentes matrizes. Esta mesma reação de derivação foi empregada por Royer e colaboradores⁶³ em análise por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) de GLIF e AMPA em água com limites de detecção de 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tsuji e colaboradores⁶⁴ empregaram a técnica de GC-MS com ionização por elétrons na determinação simultânea de GLIF, GLUF e MPPA em diferentes culturas após a derivação dos compostos com ácido acético e trimetil-orto-acetato (TMOA). Limites de detecção de 0,02 mg kg^{-1} foram obtidos para os três compostos. Stalikas e Pilidis⁶⁵ também empregaram esta reação de derivação para a análise de GLIF, AMPA, GLUF, MPPA e BIAL em amostras de água obtendo limites de detecção de 0,65; 0,29; 0,32; 0,05 e 14,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Boerjesson e Torstensson⁶⁶ obtiveram limites de detecção de 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,003 $\mu\text{g g}^{-1}$ em água e solo, respectivamente, para os compostos GLIF e AMPA após realizarem derivação com ácido trifluoroacético anidro (TFAA) e trifluoroetanol (TFE). As análises foram realizadas em GC-MS empregando ionização por elétrons.

3.4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Existem na literatura diversas aplicações da técnica de cromatografia líquida com detecção de fluorescência para a determinação de glifosato e AMPA. Apesar disso, métodos de determinação empregando cromatografia líquida e detecção com espectrometria de massas ainda são pouco encontrados.

3.4.3.3 Cromatografia líquida / espectrometria de massas

3.4.3.3.1 Derivação com FMOC-Cl

Em 1979, Moyne e Boning⁶⁷ foram os primeiros a empregar a reação de derivação do cloroformato de 9-fluorenil-metoxycarbonil (FMOC-Cl) com o glifosato. Antes deste evento, em 1972, Carpino e Han⁶⁸ já haviam utilizado a reação com FMOC-Cl para proteção de aminogrupos de moléculas orgânicas. Embora mais de vinte anos tenham se passado desde a primeira aplicação desta reação na derivação do glifosato, alguns trabalhos na literatura atual ainda são realizados com base neste princípio, ainda que não haja um consenso sobre as condições ideais desta reação. Recentemente, Nedelkoska e Low⁶⁹ realizaram um importante estudo de otimização do efeito da concentração, pH, temperatura e solventes na reação de FMOC-Cl com GLIF e AMPA, validando a metodologia para a determinação destes compostos em amostras de grama.

Apesar de haver diferentes condições de reação descritas na literatura, todas apresentam elevadas concentrações de FMOC-Cl devido à alta reatividade deste composto que em meio aquoso reage formando FMOC-OH. Mallat e Barceló⁷⁰ aplicaram a derivação com FMOC-Cl de GLIF e AMPA para a determinação destes compostos em água obtendo limites de detecção de 2,0 e 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de GLIF e AMPA, respectivamente, empregando detecção por fluorescência. Esta mesma técnica de detecção foi aplicada por Hogendoorn e colaboradores⁷¹ em amostras de cereais empregando extração em fase sólida para um limite de quantificação de GLIF e AMPA de 0,5 mg kg^{-1} .

Vreeken e colaboradores⁷² empregaram a espectrometria de massas em *tandem* com ionização por *electrospray* para a determinação de GLIF, AMPA e GLUF em diferentes tipos de amostras de água. Após a derivação com FMOC-Cl uma etapa de pré-concentração e purificação usando extração em fase sólida (SPE) foi empregada. A separação cromatográfica dos compostos foi realizada em coluna Inertsil ODS-2 (250 x 4,6 mm; 5 μm) empregando água e acetonitrila com acetato de amônio como eluentes do sistema. Os limites de detecção e

quantificação obtidos para GLIF e AMPA foram de 0,03 e 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Lee e colaboradores⁷³ realizaram um estudo comparativo entre um novo método ELISA e a técnica HPLC/MS na determinação de GLIF e AMPA. Os analitos foram separados em coluna Prodigy C-18 (250 x 3,0 mm; 5 μm) após a derivação dos compostos com FMOC-Cl. Um padrão marcado de glifosato foi empregado como padrão interno e um padrão de ácido cisteico foi utilizado como outro padrão interno de controle de tempo de retenção. Empregando etapa de pré-concentração dos analitos em colunas de SPE Oasis HLB, os limites de detecção do método foram de 0,084; 0,078 e 0,057 $\mu\text{g L}^{-1}$ para GLIF, AMPA e GLUF, respectivamente.

Ibáñez e colaboradores⁷⁴ publicaram recentemente um estudo de determinação de GLIF, AMPA e GLUF em água e solo usando cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massas em *tandem*. Empregando etapa de pré-concentração com SPE (Oasis HLB) e separação dos analitos em coluna Discovery C-18, os limites de detecção reportados para os analitos foram de 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ em água e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ em solo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

4.1.1 Amostras de água

Amostras de água superficial e tratada foram empregadas nos estudos de recuperação do método. As amostras de água superficial foram coletadas em frascos de vidro âmbar de 500,0 mL em um rio da região do Vale do Ribeira e foram encaminhadas ao laboratório em caixas de isopor com gelo, sendo acondicionadas sob refrigeração a 4°C até a realização das análises. As amostras de água tratada foram coletadas em uma torneira do laboratório, momentos antes do início dos experimentos.

4.1.2 Amostras de soja

Amostras de grãos de soja orgânica foram utilizadas como branco nos experimentos de recuperação. Estas amostras foram adquiridas em um supermercado da região metropolitana de São Paulo. As amostras foram trituradas em blender e acondicionadas em sacos plásticos de polipropileno lacrados, sob refrigeração a 4°C, até a realização das análises.

4.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de padrão analítico (PA) ou de grau HPLC. A quantidade de 1,0 g de padrão primário dos compostos GLIF, AMPA, GLUF e MPPA com 98% de pureza foi adquirida da empresa Supelco (Bellefonte, PA, EUA) e a quantidade de 5,0 g de FMOC-Cl foi adquirida da empresa Merck (Darmstadt, AL). Água purificada foi obtida em um sistema EASYpure RF System (Barnstead, Dubuque, IA, EUA). Os solventes orgânicos utilizados foram: metanol (J. T. Baker, Deventer, HO), diclorometano (Merck, Darmstadt, AL) e acetonitrila

(Fluka, Bucks, SW). Carbonato de amônio P.A. (Merck, Darmstadt, AL), hidróxido de amônio P.A. (Merck, Darmstadt, AL), acetato de amônio P.A. (J. T. Baker, Deventer, HO), formiato de amônio P.A. (Sigma Aldrich, Steinheim, AL), ácido acético glacial (J. T. Baker, Deventer, HO) e ácido fórmico 88% (J. T. Baker, Deventer, HO) foram utilizados como aditivos de fase móvel.

Todas as amostras de soja foram analisadas utilizando-se tubos de polipropileno (Greiner, Alemanha) de 15,0 e 50,0 mL.

4.3 Soluções padrão

Soluções estoque dos analitos foram preparadas separadamente, em água purificada, na concentração de 500,0 mg L⁻¹. As soluções foram acondicionadas em tubos de polipropileno de 50,0 mL, envoltos com papel alumínio, sob temperatura de 4°C. Todas as soluções padrão utilizadas foram preparadas em água purificada por diluições adequadas das soluções estoque.

4.4 Preparação das amostras

4.4.1 Amostras de água

As amostras de água superficial e tratada foram fortificadas em balões volumétricos de 10,0 mL nas concentrações de 10,0; 50,0 e 500,0 µg L⁻¹, com adição de 2,0; 10,0 e 100,0 µL, respectivamente, de uma solução de GLIF, AMPA, GLUF e MPPA na concentração de 50,0 mg L⁻¹, preparada em água purificada. As amostras foram filtradas com membranas de 0,45 µm (Millex®, Millipore, Bedford, MA, EUA) e encaminhadas para injeção no sistema LC-MS/MS.

4.4.2 Amostras de soja

Para a validação da metodologia, 2,0 g de amostra foram pesados em tubos de polipropileno de 50,0 mL e estudos de recuperação foram conduzidos em amostras fortificadas nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 2,0 mg kg⁻¹ por adição de 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; e 100,0 µL, respectivamente, de uma solução de GLIF e AMPA na concentração de 40,0 mg L⁻¹. Após decorridas quatro horas do

momento da fortificação das amostras, iniciou-se a extração dos analitos com 20,0 mL de água purificada e 5,0 mL de diclorometano. A extração foi realizada sob agitação mecânica durante 60,0 min. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15,0 min e uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno de 15,0 mL. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de metanol e agitou-se as amostras em vortex por 1,0 min para a precipitação de proteínas, centrifugando novamente a 3000 rpm durante 15,0 min. Após a centrifugação, 20,0 μ L da amostra foram transferidos para vial cromatográfico de 2,0 mL e foram adicionados 980,0 μ L de água para injeção no sistema LC-MS/MS (Figura 12).

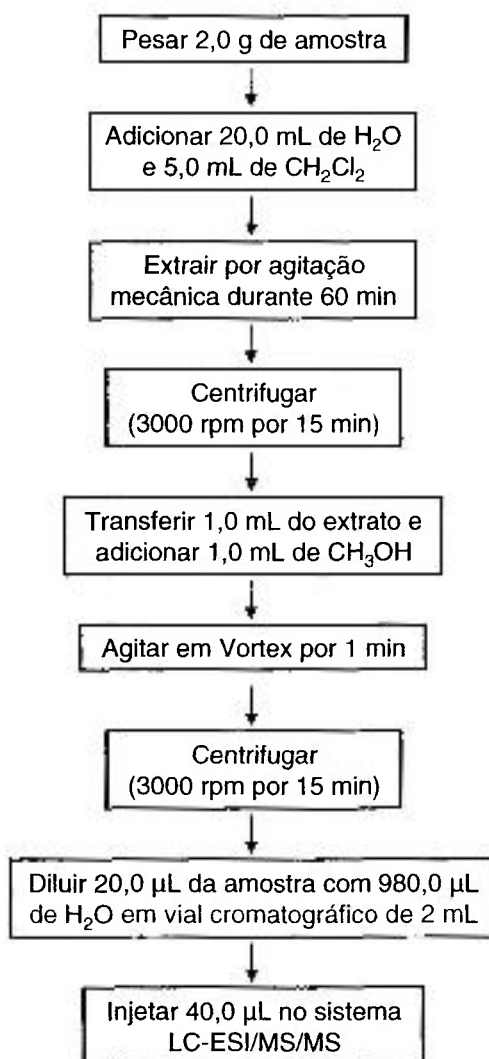


Figure 12. Fluxograma das etapas de preparação das amostras de soja para análise de Glifosato e AMPA por LC-ESI/MS/MS.

4.5 Determinação

As determinações foram realizadas em um sistema LC-MS/MS composto de um espectrômetro de massas triploquadrupolar API 4000TM, Applied Biosystems/MDS Sciex, (Sciex, Concord, CA) equipado com cela de colisão LINAC[®], fonte de ionização Turbo VTM operada no modo TurbolonSpray[®] (*electrospray*), gerador de gases PEAK Generator (PEAK Scientific Instruments, Escócia) e bomba de infusão Harvard Apparatus (Holliston, MA, EUA). O espectrômetro de massas foi acoplado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, AL) equipado com bomba quaternária, sistema degaseificador, amostrador automático com controle de temperatura e capacidade para 100 frascos de amostra de 2,0 mL e forno para coluna analítica. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o *software Analyst*[®] versão 1.4.1.

4.5.1 Espectrometria de Massas

O espectrômetro de massas foi calibrado nos modos de íons positivos e negativos com uma solução padrão de calibração de poli(glicol propilênico)⁷⁵ (PPG), infundida sob fluxo de 10,0 $\mu\text{L min}^{-1}$, com o capilar posicionado em relação ao contra-eletrodo nas posições 5 e 10 mm nas direções horizontal e vertical, respectivamente. Ar sintético foi utilizado como gás nebulizante (GS1), gás secante (GS2) e gás de exaustão (*Exhaust Gas*) na fonte Turbo VTM. Nitrogênio foi empregado como cortina de gás de dessolvatação (*Curtain Gas*TM) e como gás de colisão (*CAD Gas*TM) na célula LINAC[®].

Os compostos foram caracterizados no triploquadrupolo nos modos MS (*Q1 Scan*) e MS/MS (*Product Ion Scan*, *Precursor Ion Scan* e *Neutral Loss Scan*). Os parâmetros potencial de orifício (*DP*), energia de colisão (*CE*) e potencial de saída da cela de colisão (*CXP*) foram otimizados para operação do espectrômetro de massas no modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) para a realização das análises quantitativas. As Tabelas 3 e 4 apresentam, respectivamente, os valores otimizados para estes parâmetros usados nas análises de soja e de água.

Tabela 3. Parâmetros otimizados para análise em modo MRM de glifosato e AMPA em amostras de soja.

Analito	ESI	Transição (m/z)	Propósito	Dwell Time	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Glifosato	(+)	170>42	Confirmação	250 ms	41	37	8
	(+)	170>60	Confirmação	250 ms	41	25	10
	(+)	170>88	Quantificação	250 ms	41	15	14
AMPA	(-)	110>63	Confirmação	250 ms	-50	-26	-1
	(-)	110>79	Quantificação	250 ms	-50	-38	-3
	(-)	110>81	Confirmação	250 ms	-50	-18	-3

Tabela 4. Parâmetros otimizados para análise em modo MRM de glifosato, AMPA, glufosinato e MPPA em amostras de água.

Analito	ESI	Transição (m/z)	Propósito	Dwell Time	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Glifosato	(+)	170>60	Confirmação	100 ms	41	25	10
	(+)	170>88	Quantificação	100 ms	41	15	14
	(-)	168>124	Confirmação	100 ms	-50	-16	-1
	(-)	168>150	Quantificação	100 ms	-50	-14	-13
AMPA	(+)	112>30	Quantificação	100 ms	36	19	4
	(+)	112>47	Confirmação	100 ms	36	61	8
	(-)	110>63	Confirmação	100 ms	-50	-26	-1
	(-)	110>79	Quantificação	100 ms	-50	-38	-3
Glufosinato	(+)	182>56	Quantificação	100 ms	46	39	10
	(+)	182>136	Confirmação	100 ms	46	19	24
	(-)	180>95	Quantificação	100 ms	-50	-22	-7
	(-)	180>136	Confirmação	100 ms	-50	-24	-9
MPPA	(+)	153>79	Confirmação	100 ms	36	33	14
	(+)	153>135	Quantificação	100 ms	36	15	24
	(-)	151>107	Confirmação	100 ms	-50	-22	-5
	(-)	151>133	Quantificação	100 ms	-50	-18	-7

Os parâmetros otimizados para a fonte de *electrospray* (*TurbolonSpray*®) e para o gás de colisão (*CAD Gas*™) da célula LINAC®, usados nas análises de soja e de água estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5. Parâmetros da fonte de ionização *TurbolonSpray*® e do gás de colisão empregados nas análises de soja.

Parâmetro	ESI (+)	ESI (-)
Tensão do Capilar (<i>IonSpray Voltage</i> - IS)	5500 V	-4500 V
Gás Nebulizante (GS1)	50 psi	50 psi
Gás Secante (GS2)	50 psi	50 psi
Temperatura (TEM)	750°C	750°C
Cortina de Gás (<i>Curtain Gas</i> ™ - CUR)	12 psi	12 psi
Gás de Colisão (<i>CAD Gas</i> ™)	10 u.a.	10 u.a.

Tabela 6. Parâmetros da fonte de ionização *TurbolonSpray*® e do gás de colisão empregados nas análises de água.

Parâmetro	ESI (+)	ESI (-)
Tensão do Capilar (<i>IonSpray Voltage</i> - IS)	5500 V	-4500 V
Gás Nebulizante (GS1)	50 psi	50 psi
Gás Secante (GS2)	50 psi	50 psi
Temperatura (TEM)	600°C	600°C
Cortina de Gás (<i>Curtain Gas</i> ™ - CUR)	12 psi	12 psi
Gás de Colisão (<i>CAD Gas</i> ™)	10 u.a.	10 u.a.

4.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A análises de soja foram realizadas em coluna Zorbax Eclipse® XDB-C8 de 15,0 cm x 4,6 mm x 5 µm (Agilent Technologies, Waldbronn, AL) e as análises de água foram realizadas em coluna Inertsil ODS-3 de 7,5 cm x 4,6 mm x

3 μm (Metachem, CA, EUA). Todas as análises foram realizadas sob temperatura constante do forno da coluna de 25°C.

Os gradientes de eluição empregados nas análises de soja na coluna Zorbax e nas análises de água na coluna Inertsil estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Programação dos gradientes de eluição utilizados nas análises das amostras de soja (acima) e de água (abaixo).

Zorbax RDB			
Tempo (min)	Fluxo ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
-0,01	1200	65	35
0,50	1200	65	35
0,51	1200	10	90
2,25	1200	10	90
2,26	1200	65	35
4,00	1200	65	35

Inertsil ODS-3			
Tempo (min)	Fluxo ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
-3,50	700	70	30
1,50	700	70	30
1,51	700	5	95
4,00	700	5	95

Em ambas metodologias de análise empregou-se como fase móvel A uma solução aquosa contendo 1,5 mmol L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ e, como fase móvel B uma solução de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (95/5, v/v) contendo 1,5 mmol L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 Ionização dos analitos: efeito dos solventes e aditivos

Soluções de GLIF, AMPA, GLUF e MPPA foram introduzidas no sistema ESI/MS/MS com o objetivo de estabelecer os melhores parâmetros de ionização destes compostos por *electrospray* e avaliar o efeito dos solventes e aditivos na eficiência da ionização. Soluções na concentração de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram preparadas em metanol/água (50/50, v/v) e acetonitrila/água (50/50, v/v) e foram testados como aditivos os ácidos fórmico e acético à 0,1%, os sais de amônio: formiato, acetato e carbonato à concentração $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, e o hidróxido de amônio 0,25%.

Os espectros de massas foram adquiridos em modo *Q1 Scan (MS)* com tempo de varredura de 3 segundos usando ionização por *electrospray* nos modos de íons positivos e negativos. Para a aquisição dos espectros foi realizada em modo “*Multiple Channel Acquisition*” (MCA), onde, dez ciclos de espectros de massas adquiridos. Cada aquisição foi realizada em 5 replicatas e as médias obtidas para cada condição estão apresentadas nas Figuras 13, 14, 15 e 16.

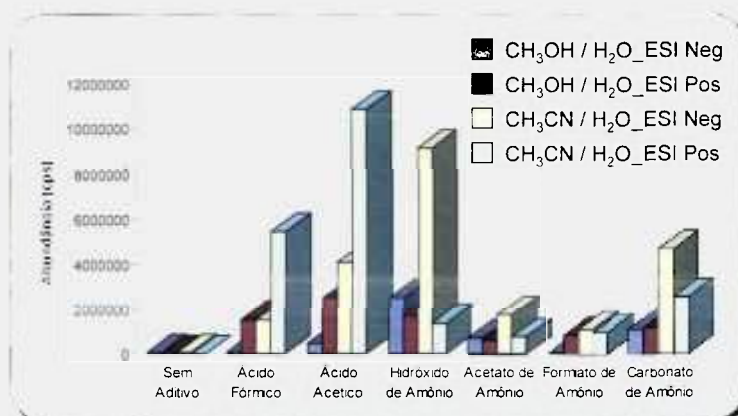


Figura 13. Intensidade média do sinal obtido em ionização por *electrospray* para os íons precursores do GLIF empregando-se diferentes solventes e aditivos.

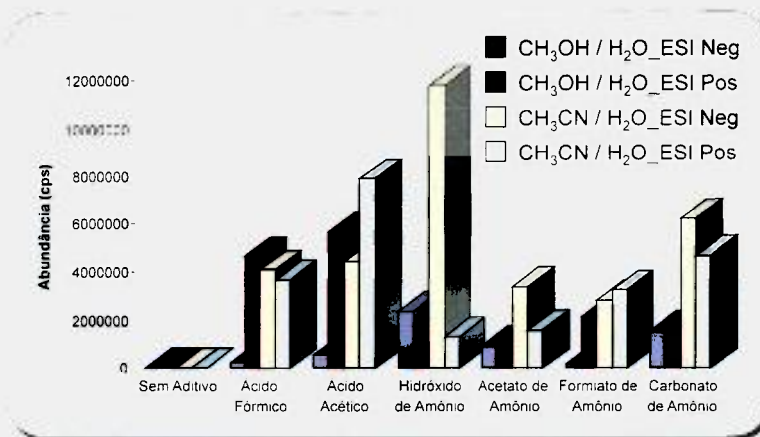


Figura 14. Intensidade média do sinal obtido em ionização por *electrospray* para os íons precursores do AMPA empregando-se diferentes solventes e aditivos.

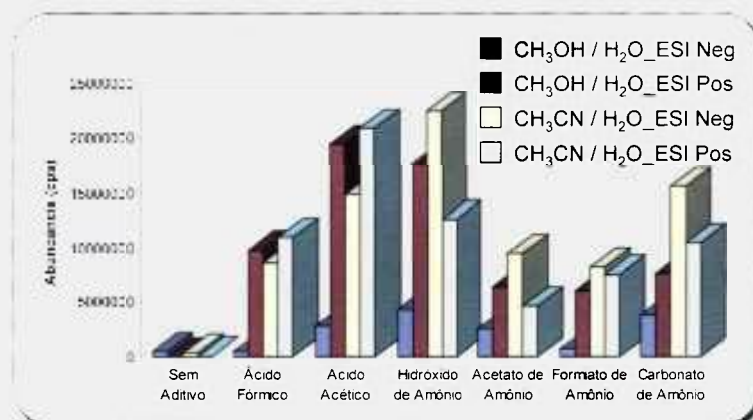


Figura 15. Intensidade média do sinal obtido em ionização por *electrospray* para os íons precursores do GLUF empregando-se diferentes solventes e aditivos.

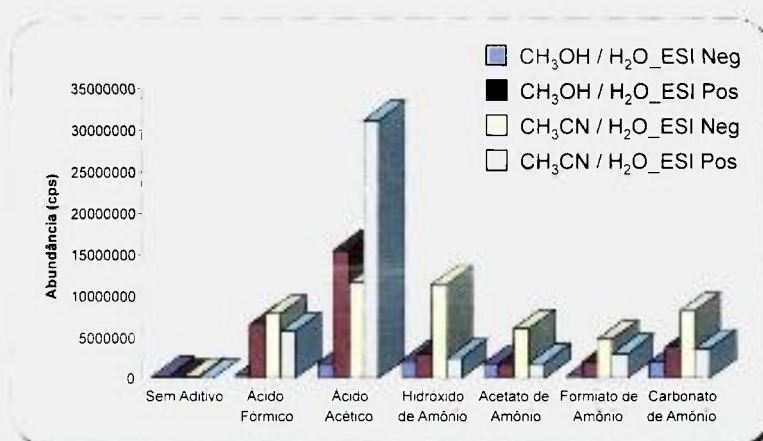


Figura 16. Intensidade média do sinal obtido em ionização por *electrospray* para os íons precursores do MPPA empregando-se diferentes solventes e aditivos.

No caso da ionização em modo positivo, verificou-se que o melhor sinal foi obtido com a adição de ácido acético, enquanto para o modo de íons negativos as maiores abundâncias iônicas foram conseguidas empregando hidróxido de amônio como aditivo. Estes resultados mostram que os eletrólitos adicionados participam dos processos de associação e dissociação dos analitos, isto porque, os analitos já estão ionizados em fase líquida e por possuírem diferentes sítios ionizáveis, a carga dos compostos em fase líquida varia em função do pH da solução.

Um sinal menos intenso que o obtido com o ácido acético foi observado quando empregado o ácido fórmico como aditivo na ionização em modo de íons positivos. Uma das causas desta observação deve ser as diferentes constantes de ionização dos dois ácidos e a conseqüente variação do pH da solução. Como o *electrospray* trata-se de um método de transferência competitiva de íons da fase líquida para a fase gasosa, o excesso de íons produzidos pela dissociação do ácido pode promover parcial supressão do sinal dos analitos.

Para a ionização por ESI negativo, o hidróxido de amônio e o carbonato de amônio foram os aditivos que apresentaram as maiores intensidades de íons precursores nos espectros de massas adquiridos. Este evento, assim como observado no modo positivo, está relacionado ao aumento do pH da solução que contribui para o processo de dissociação dos analitos já na fase líquida. De qualquer maneira, nem sempre a escolha do melhor aditivo para analitos ionizáveis ocorrerá em função da seleção do modo de ionização e dos equilíbrios ácido-base envolvidos. Como pode ser visto nos resultados, todos os analitos foram ionizados em ambos modos de ionização nas diferentes faixas de pH. A formação de íons desprotonados em solução de baixo pH e íons positivos protonados em soluções alcalinas ocorrem em função de processos eletrolíticos na fonte de *electrospray*⁷⁶.

É possível verificar também que a intensidade dos sinais obtidos para as amostras sem aditivos é inferior às demais, independente da composição de solventes empregadas. A utilização de aditivos é imprescindível para a obtenção de um sinal estável no *electrospray*. Ikonomou e colaboradores⁷⁷ determinaram a

condutividade limiar em metanol para que o fenômeno de *electrospray* ocorra, como sendo de aproximadamente $10^{-7} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Esta condutividade em solução equivale, aproximadamente, à concentração de $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de eletrólitos como os metais alcalinos. O sinal de aproximadamente 10^4 cps obtido para os analitos sem aditivo nem sempre é verificado em ionização por *electrospray*. Isto se deve à presença de interferentes presentes nos solventes como sais de amônio e sódio dissolvidos e, ao fato de que os analitos já estão ionizados na fase líquida e, portanto, contribuem para o aumento da condutividade da solução. Este aumento controlado da condutividade promove uma maior eficiência do processo de migração eletroforética para a formação das gotas carregadas⁷⁸. O aumento da condutividade da solução assiste o processo de nebulização da amostra conduzindo à formação de gotas de tamanhos menores, entretanto, a eficiência da separação eletroforética das cargas diminui drasticamente em altas condutividades⁴⁶. Geralmente, o sinal apresenta-se estável para concentrações superiores a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ⁷⁹.

Os sinais mais intensos para os íons precursores foram obtidos nas soluções preparadas em mistura acetonitrila/água. A composição da solução pode ser fundamental no sinal obtido em ionização por *electrospray*. O equilíbrio entre a constante dielétrica e a tensão superficial da fase líquida é um fator importante. Por este motivo, o emprego de soluções compostas entre a água e um solvente orgânico permite unir a elevada constante dielétrica da água com a baixa tensão superficial do solvente orgânico⁸⁰. As propriedades dos solventes podem influenciar a formação do spray de diferentes modos, uma vez que, o potencial aplicado ao capilar depende da tensão superficial da fase líquida, a corrente do spray depende da condutividade da solução e o tamanho da gota formada é dependente da viscosidade (Tabela 8). Considerando que o potencial aplicado ao capilar foi mantido constante em todos os experimentos e, que ambas soluções possuam condutividade similar atribuída à concentração conhecida dos eletrólitos, as propriedades do metanol e do acetonitrila são as principais responsáveis pelas diferenças observadas nos experimentos.

Tabela 8. Algumas propriedades físicas dos solventes orgânicos empregados na preparação das soluções utilizadas no estudo de formação dos íons.

Solvente	CH ₃ OH	CH ₃ CN
Tensão Superficial γ (N m ⁻¹)	0,0226	0,030
Constante Dielétrica	32,70 (25°C)	37,50 (20°C)
Pressão de Vapor (Torr)	125 (25°C)	158,4 (20°C)
Ponto de Ebulição (°C)	64,7	81,6

Por possuir menor viscosidade, as gotas carregadas formadas com acetonitrila podem ter sido produzidas em diâmetros menores que as produzidas em metanol e, desta forma ter propiciado um processo de dessolvatação mais eficiente que no caso do metanol. Outras propriedades como o momento dipolar de cada solvente, são parâmetros que afetam a intensidade do sinal do *electrospray*. É importante ressaltar que a condição utilizada nos experimentos não foi otimizada para cada caso, ou seja, o único parâmetro variado foi a composição dos solventes ou aditivos. Possivelmente, modificações do fluxo da amostra ou da taxa de vazão dos gases poderiam modificar o sinal obtido para os analitos em uma determinada condição, entretanto, o principal objetivo foi verificar a variação da composição dos solventes e aditivos.

Os espectros de massas obtidos no estudo de ionização positiva e negativa dos compostos em diferentes solventes e aditivos, estão sobrepostos e apresentados nas Figuras 17, 18, 19 e 20. Os picos de diferentes colorações, conforme pode ser verificado nas legendas dos espectros de massas correspondem aos diferentes aditivos empregados, onde, azul escuro: ácido fórmico, vermelho: ácido acético, verde: hidróxido de amônio, cinza: acetato de amônio, azul claro: formiato de amônio, rosa: carbonato de amônio e verde escuro: sem aditivo.

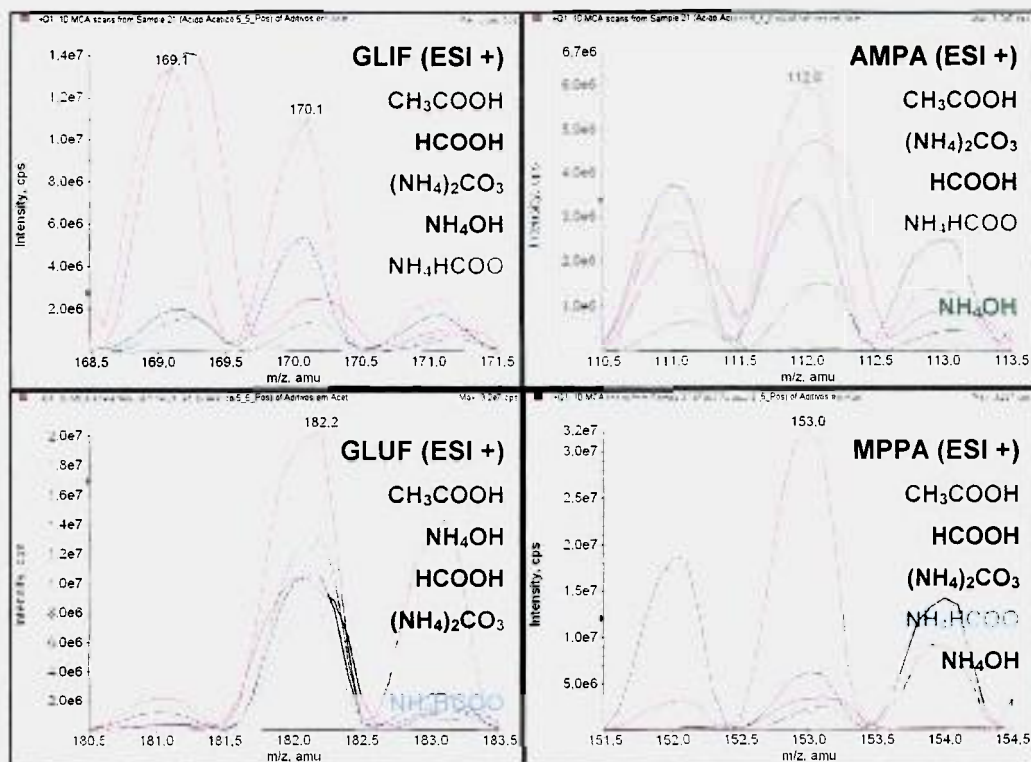


Figura 17. Espectros de massas MS dos íons precursores obtidos com ESI positivo para soluções preparadas em acetonitrila/água com diferentes aditivos.

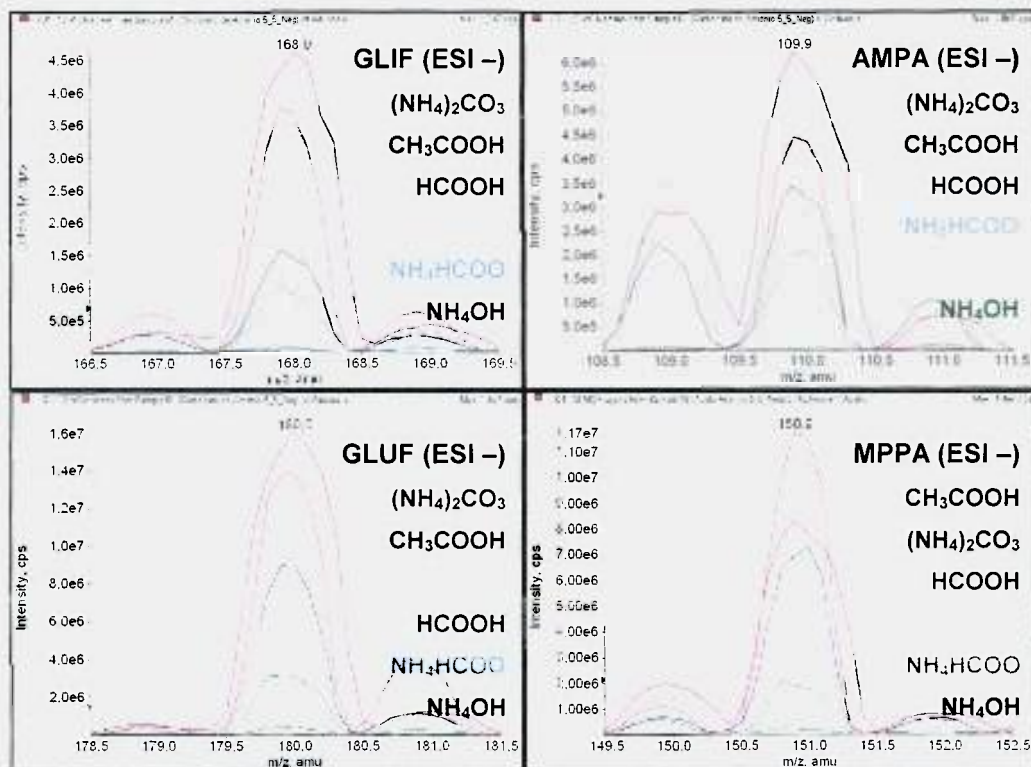


Figura 18. Espectros de massas MS dos íons precursores obtidos com ESI negativo para soluções preparadas em acetonitrila/água com diferentes aditivos.

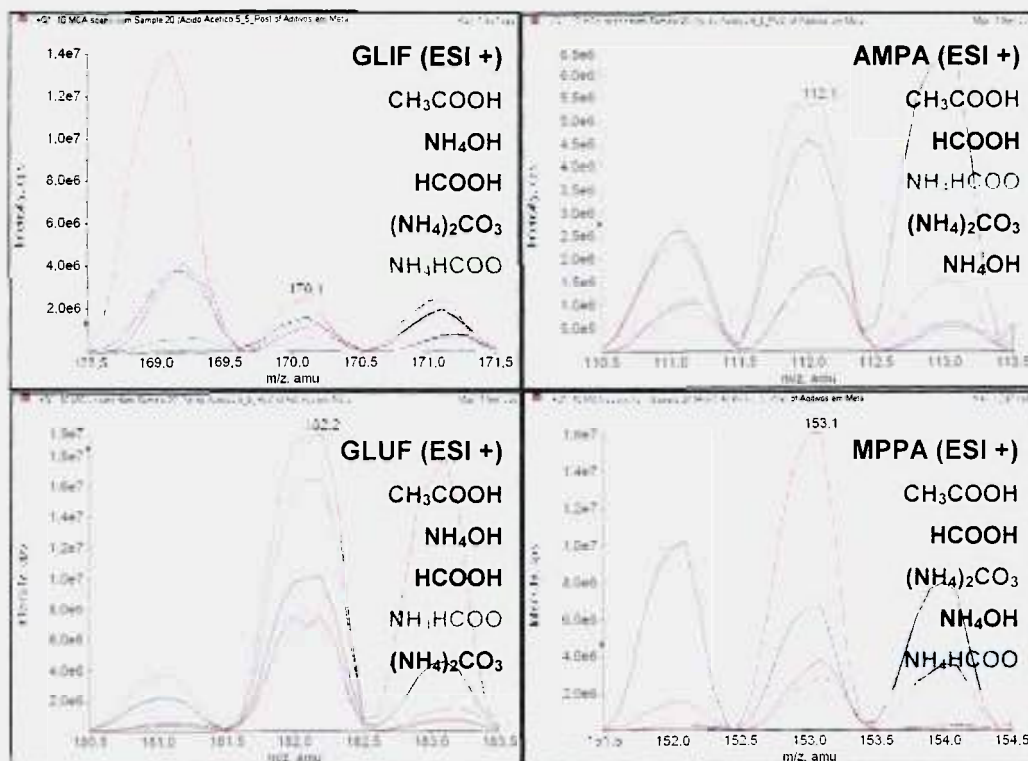


Figura 19. Espectros de massas MS dos íons precursores obtidos com ESI positivo para soluções preparadas em metanol/água com diferentes aditivos.

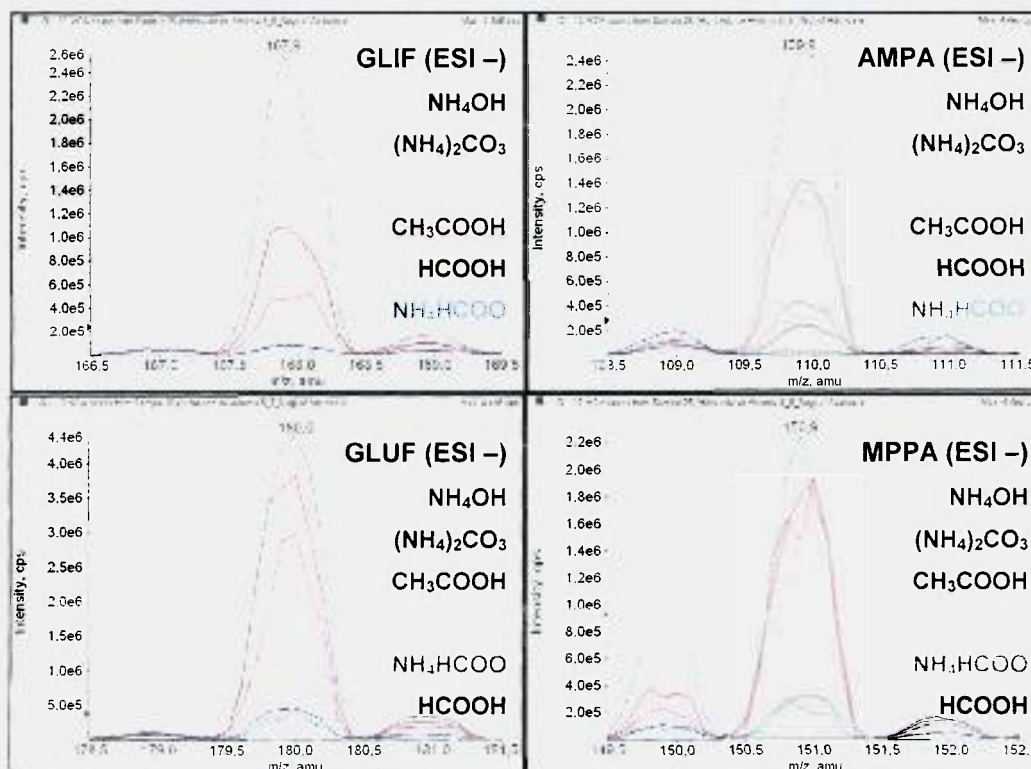


Figura 20. Espectros de massas MS dos íons precursores obtidos com ESI negativo para soluções preparadas em metanol/água com diferentes aditivos.

A variação da concentração de carbonato de amônio foi empregada com o intuito de verificar a influência deste aditivo no sinal dos analitos. As Figuras 21 e 22 mostram, respectivamente, os gráficos referentes à intensidade do sinal de GLIF e AMPA em diferentes concentrações deste eletrólito.

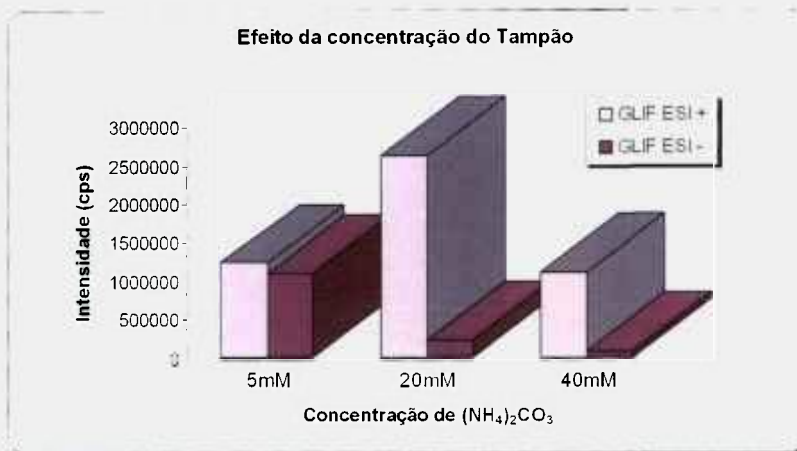


Figura 21. Intensidade média de sinal obtida para o íon precursor do glifosato com a variação da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

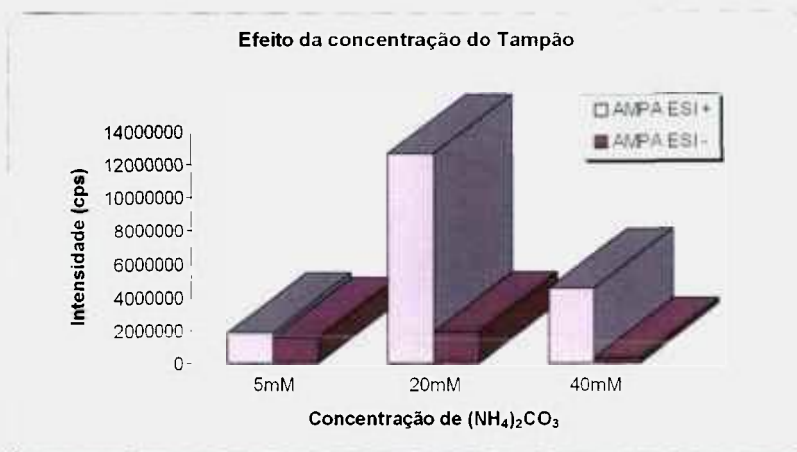


Figura 22. Intensidade média de sinal obtida para o íon precursor do AMPA com a variação da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

Como pode ser visto nas Figuras 21 e 22, a concentração do aditivo é um fator importante na intensidade do sinal dos analitos. Somente em concentrações superiores a 20 mmol L⁻¹ se inicia o fenômeno de supressão de sinal para estes compostos. Este foi um ensaio importante na escolha da concentração ideal do aditivo a ser empregada, uma vez que, a contribuição de eletrólitos provenientes da matriz de soja era muito elevada. A obtenção de um sinal estável com menores concentrações de aditivo, pode minimizar o fenômeno de supressão de sinal causado pela presença dos interferentes da matriz.

5.2 Caracterização dos compostos: experimentos de CID

Após o estudo da eficiência de ionização dos analitos nos modos positivo e negativo, os íons precursores foram isolados na cela de colisão (Q2) e foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID) no modo *Product Ion Scan (MS/MS)*.

Goodal e colaboradores^{81,82} realizaram um estudo detalhado do padrão de fragmentação dos quatro analitos com ionização por *electrospray* em modo de íons negativos. Entretanto, não encontrou-se na literatura nenhum trabalho publicado que descrevesse o padrão de fragmentação destes compostos no modo de íons positivos. Todas as estruturas que serão apresentadas adiante, principalmente aquelas que correspondem aos íons positivos, foram propostas com a finalidade de elucidar a estrutura destes íons na fase gasosa.

Segue abaixo uma breve discussão à respeito dos espectros de massas MS/MS de cada composto e as estruturas sugeridas para os íons produto observados.

5.2.1 GLIF – Fragmentação

Os espectros de massas MS/MS correspondentes à fragmentação do GLIF em ESI positivo e negativo estão apresentados na Figura 23.

No modo de ionização por ESI positivo, vários clusters de íons são observados ao longo do espectro de MS/MS para a molécula de GLIF protonada, $[M + H]$. O pico base do espectro de massas MS/MS foi o íon com m/z 88, correspondente à perda neutra do ácido fosfônico da estrutura da molécula do GLIF. Outros picos menos abundantes foram observados como o íon m/z 42 correspondente à estrutura $[C_2H_3N + H]^+$ e o radical com m/z 60 correspondente à estrutura $[CH_2COOH + H]^+$. A Figura 24 apresenta algumas estruturas sugeridas para os íons produtos do GLIF em modo positivo

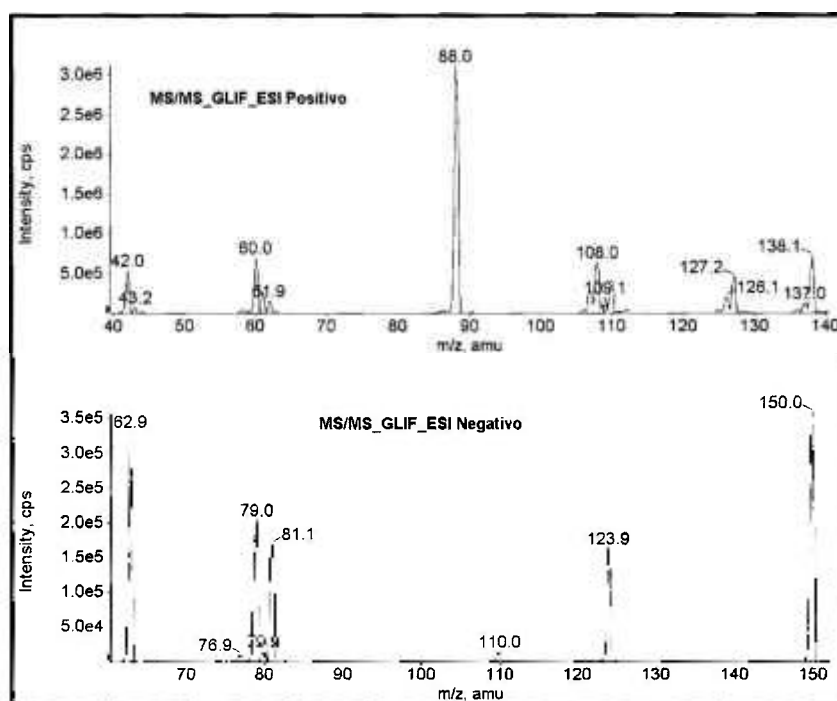


Figura 23. Espectros de massas MS/MS do composto GLIF ionizado em *electrospray* positivo (acima) e negativo (abaixo).

No modo de íons negativos, a fragmentação da molécula de GLIF desprotonada, $[M - H]^-$, apresentou poucos íons específicos não observados nos outros analitos. O íon com m/z 150 apresentou a maior abundância dentre os íons produto observados. Este íon corresponde à perda de água da molécula de GLIF, $[M - H_2O - H]^-$. Outro fragmento específico observado para o GLIF foi o íon de m/z 124 correspondente à perda de CO_2 do grupo carboxila. É possível observar também no espectro MS/MS de GLIF a presença do íon m/z 110 que

corresponde ao seu principal produto de degradação, o AMPA. Os picos de m/z 63, 79 e 81 correspondem ao íon fosfinato $[\text{PO}_2]^-$, ao íon metafosfato $[\text{PO}_3]^-$ e ao íon fosfonato $[\text{HP}(\text{OH})\text{O}_2]^-$, respectivamente (Figura 25).

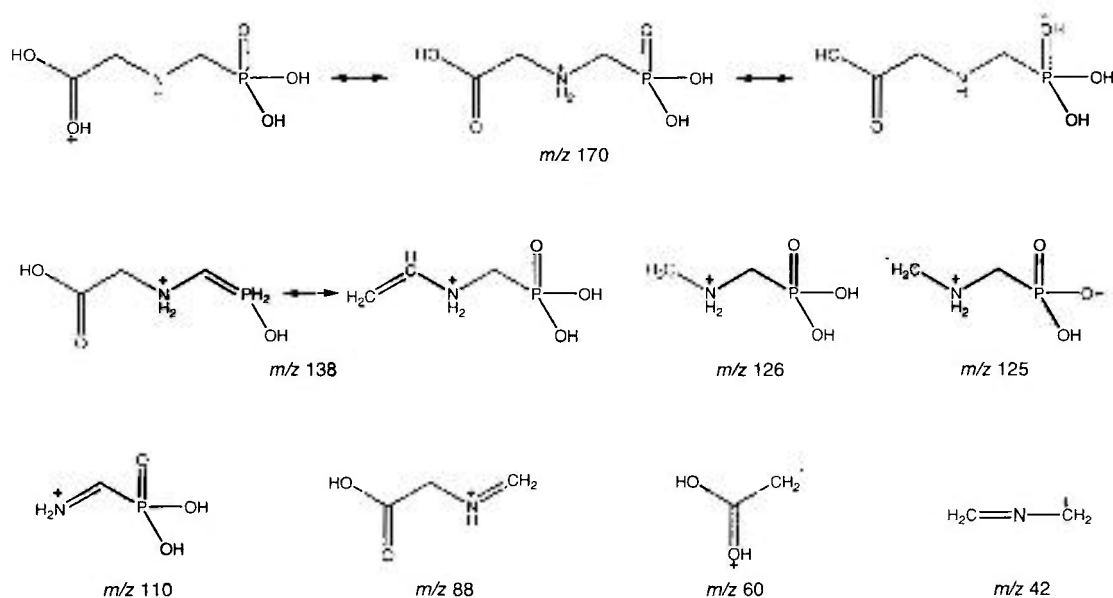


Figura 24. Estruturas sugeridas para íons produto do GLIF em ESI positivo.

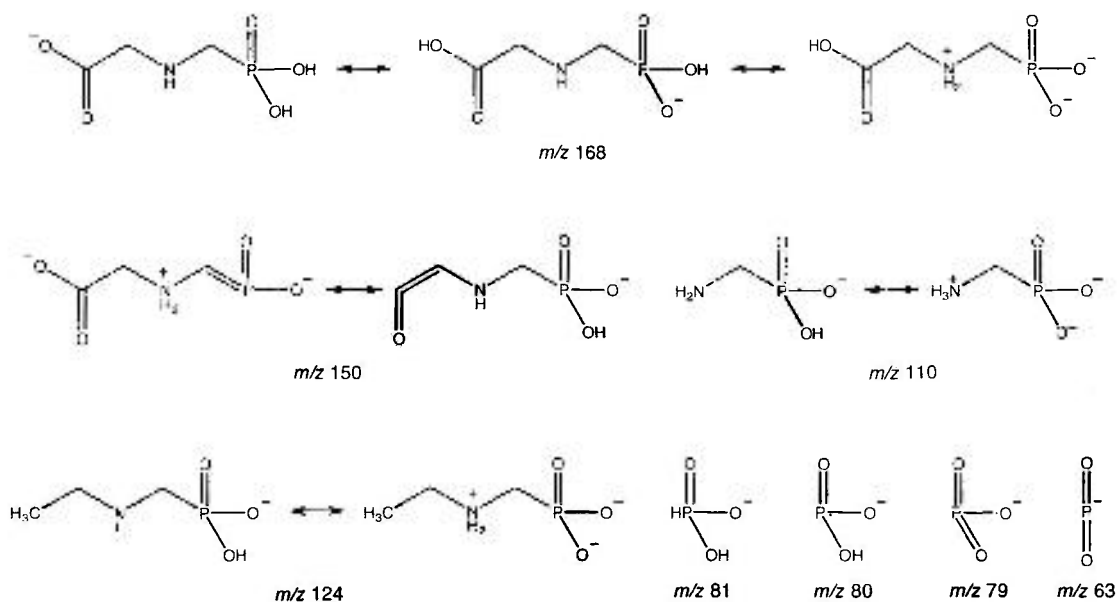


Figura 25. Estruturas sugeridas para íons produto do GLIF em ESI negativo.

5.2.2 AMPA – Fragmentação

Dos quatro analitos estudados, o AMPA foi o composto que apresentou uma menor sensibilidade e um menor número de rotas e mecanismos de fragmentação, o que pode ser atribuído à sua massa molar (111g mol^{-1}), a menor entre os compostos. A Figura 26 apresenta os espectros de MS/MS do AMPA nos modos positivo e negativo.

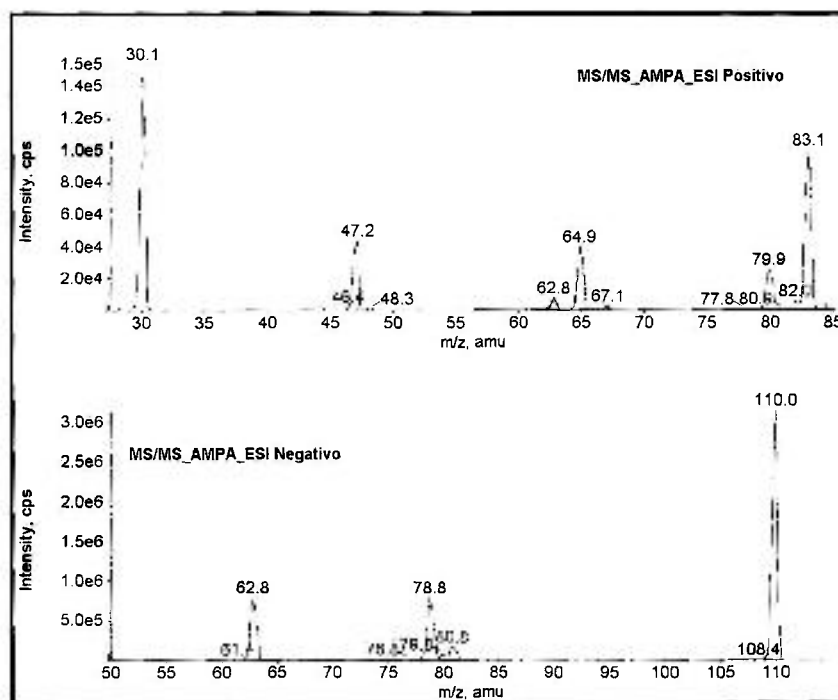


Figura 26. Espectros de massas MS/MS do composto AMPA ionizado em *electrospray* positivo (acima) e negativo (abaixo).

No modo de ionização por ESI positivo, a maior abundância foi obtida para o íon de m/z 30 correspondente à estrutura $[\text{HN}=\text{CH}_2 + \text{H}]^+$ formada pela perda neutra de ácido fosfônico, $\text{HPO}(\text{OH})_2$, do íon precursor $[\text{M} + \text{H}]^+$. O segundo íon de maior abundância observado no espectro de massas de $[\text{M} + \text{H}]^+$ foi o íon m/z 83 que corresponde ao grupo fosfônico protonado e pode ser representado como $[\text{HPO}(\text{OH})_2 + \text{H}]^+$. Outros íons menos abundantes foram observados com m/z 47, 65 e 80 e suas estruturas foram sugeridas e estão apresentadas na Figura 27.

Em ESI negativo, o íon precursor $[M - H]^-$ com m/z 110 foi isolado e fragmentado em Q2, produzindo três íons-produto, m/z 63, 79 e 81, com elevada abundância. Todos estes íons são provenientes de fragmentações entre o grupo amino e o grupo fosfônico e seguidas fragmentações do grupo fosfônico. O íon m/z 79, o mais abundante dentre os observados corresponde ao metafosfato $[PO_3]^-$, o íon m/z 63 corresponde ao íon fosfinato $[PO_2]^-$ e o íon m/z 81, corresponde ao íon fosfonato $[HP(OH)O_2]^-$. O íon de m/z 80 corresponde ao radical fosfonato, $[HPO_3]^\bullet$, e sua estrutura está apresentada com os demais íons na Figura 28.

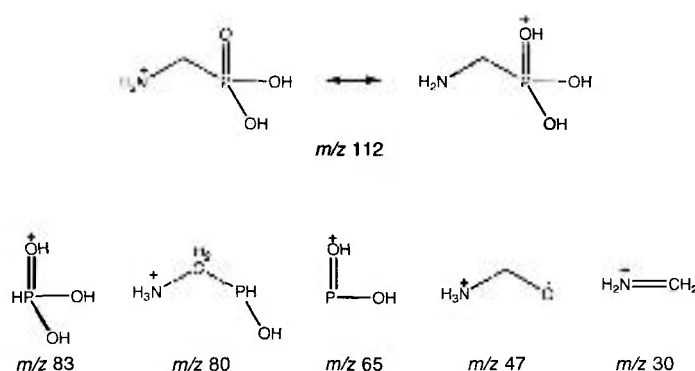


Figura 27. Estruturas sugeridas para íons produto do AMPA em ESI positivo.

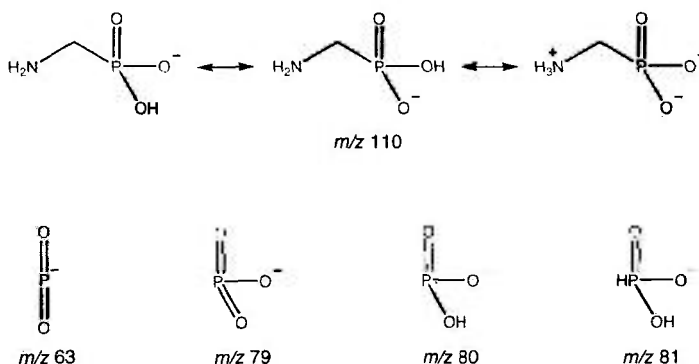


Figura 28. Estruturas sugeridas para íons produto do AMPA em ESI negativo.

5.2.3 GLUF – Fragmentação

O espectro de massas MS/MS do GLUF (Figura 29) apresentou três íons produto principais com m/z 56, 119 e 136, provenientes da fragmentação do íon $[M + H]^+$. O íon m/z 136 corresponde à perda neutra de ácido metanóico do grupo carboxila e sua intensidade normaliza o espectro de massas. O íon m/z 119 corresponde às perdas neutras de NH_3 e $HCOOH$ e o íon m/z 56 corresponde à perda neutra dos ácidos metanóico e metilfosfínico. As estruturas dos íons produto formados estão apresentadas na Figura 30.

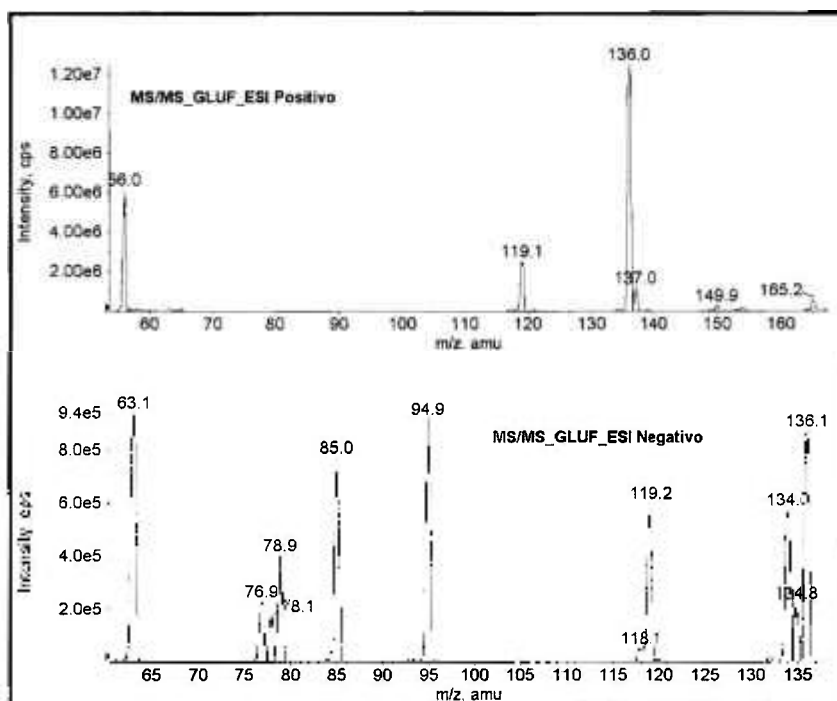


Figura 29. Espectros de massas MS/MS do composto GLUF ionizado em *electrospray* positivo (acima) e negativo (abaixo).

No modo ESI negativo a fragmentação da molécula desprotonada do GLUF, $[M - H]^-$, apresentou um número de mecanismos de fragmentação maior que os observados para todos os outros analitos. Entre os principais íons formados observou-se um cluster com três picos de m/z 134, 135 e 136 que apresentaram elevada abundância e corresponde a fragmentações no grupo carboxila (Figura 31). O íon m/z 134 corresponde à perda do grupo carboxila na

forma de ácido metanóico formando uma insaturação entre o grupo amino e seu carbono adjacente. Os íons m/z 135 e 136 correspondem, respectivamente, à perda de uma carboxila radicalar e a uma perda de CO_2 do grupo carboxila. Os íons produto de m/z 162 e 163 apresentaram uma baixa abundância no espectro de massas e correspondem às perdas neutras de água e amônia. Por outro lado, o íon com m/z 95 referente à perda de CO_2 do grupo carboxila e de NCCH_3 e o íon com m/z 119 referente às perdas neutras de amônia e dióxido de carbono apresentaram uma elevada abundância no espectro MS/MS do GLUF. O espectro de massas sequencial do íon $[\text{M} - \text{H}]^-$ do GLUF ainda apresentou o íon fosfinato (m/z 63) e um cluster com m/z 77, 78 e 79 que correspondem a espécies derivadas do metilfosfinato.

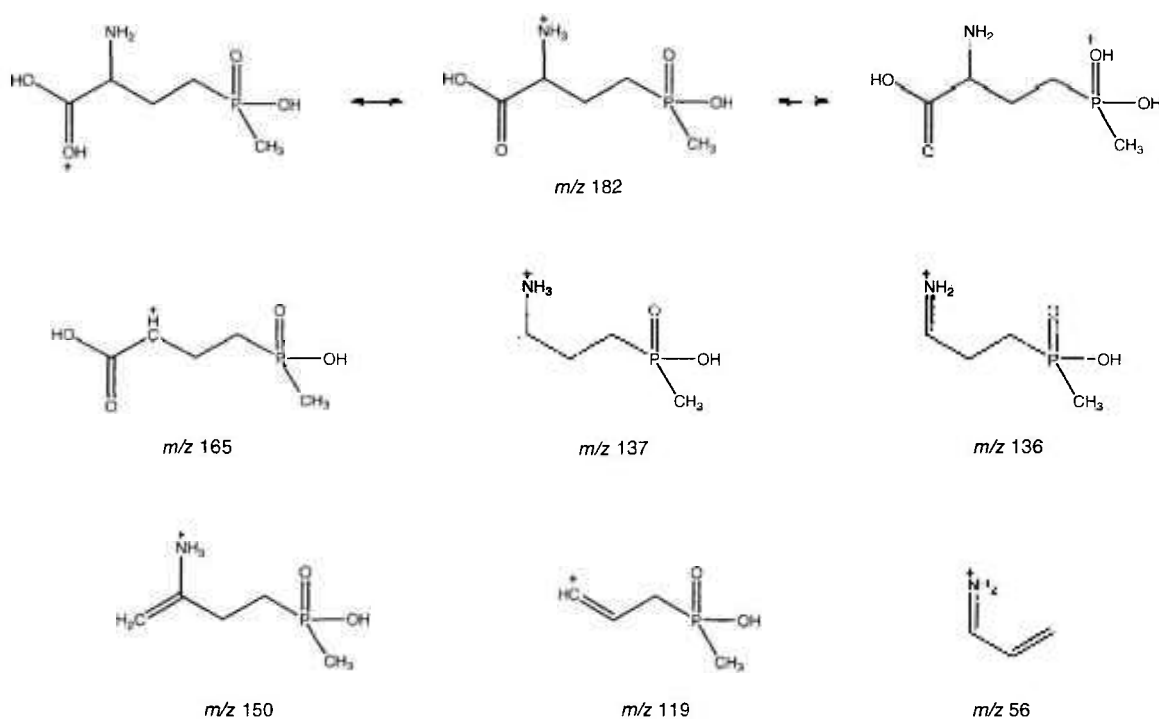


Figura 30. Estruturas sugeridas para íons produto do GLUF em ESI positivo.

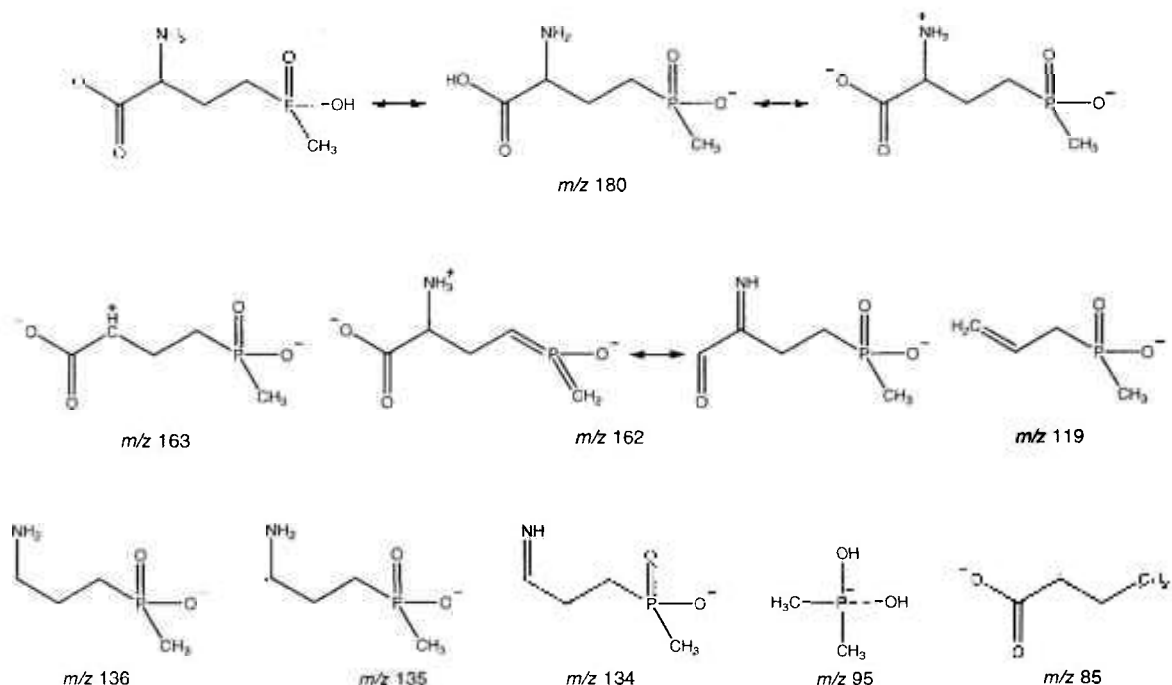


Figura 31. Estruturas sugeridas para íons produto do GLUF em ESI negativo.

5.2.4 MPPA – Fragmentação

O MPPA é o único analito estudado que não apresenta em sua estrutura o grupo amino. A Figura 32 apresenta os espectros de massas obtidos nos modos positivo e negativo.

No modo ESI positivo, o íon m/z 153, o qual corresponde à molécula protonada, $[M + H]^+$, foi isolado e fragmentado na cela de colisão. As estruturas dos íons produto estão sugeridas na Figura 33. O fragmento mais abundante do espectro de MS/MS correspondeu à perda neutra de água, produzindo o íon $[M - H_2O + H]^+$ com m/z 135. O íon m/z 107 corresponde à perda de HCOOH da molécula protonada ou à perda seqüencial de CO do íon m/z 135. Uma fragmentação pouco abundante, com uma conseqüente perda de CO₂ também pode ser observada pela formação do íon de m/z 109. O abundante íon de m/z 105 deve corresponder a uma espécie radicalar derivada do íon m/z 107 assim como o íon m/z 97. Os íons com m/z 89 e 91 são formados, respectivamente, pela perda de água do grupo metilfosfinato e através da perda de HCOOH e CO₂

da molécula protonada. Um cluster de íons entre m/z 50 e 60 com menor abundância também pode ser observado.

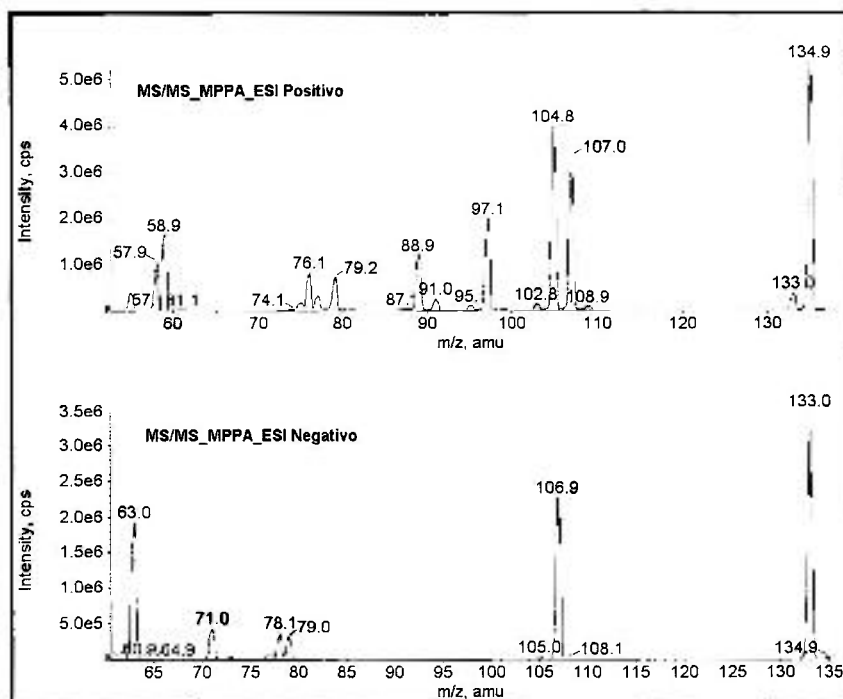


Figura 32. Espectros de massas MS/MS do composto MPPA ionizado em *electrospray* positivo (acima) e negativo (abaixo).

No modo ESI negativo a molécula desprotonada, referente ao íon m/z 151, foi isolada e fragmentada na cela de colisão. As estruturas dos íons produto estão apresentadas na Figura 34. Os íons mais abundantes obtidos foram os de m/z 133 e 107, os quais correspondem à perda de H_2O e CO_2 , respectivamente. O íon de m/z 63 corresponde ao íon fosfinato $[PO_2]^-$, característico de todos os analitos no modo negativo, enquanto que o íon m/z 71 corresponde à perda de $[OPHCH_2]$ do íon m/z 107.

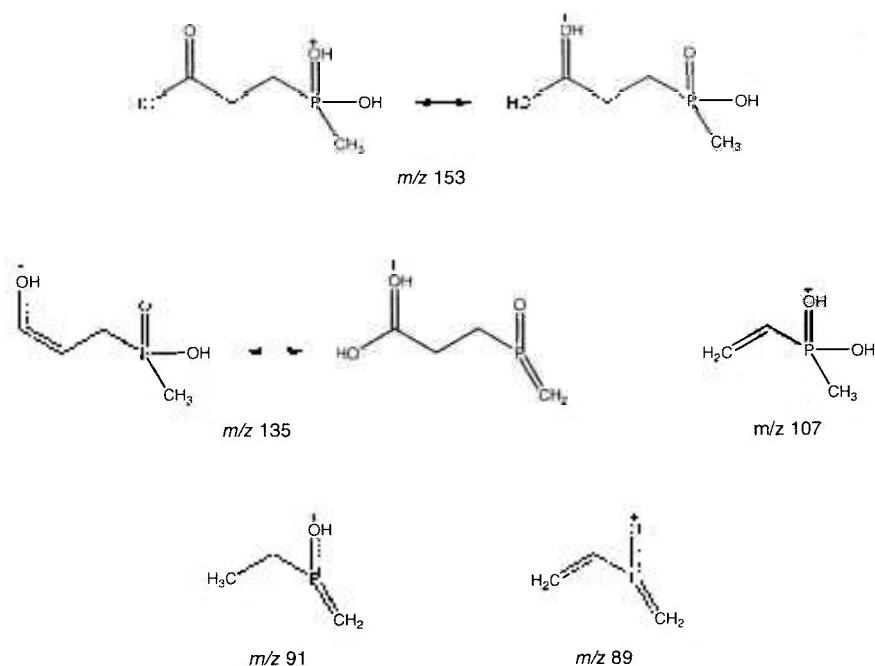


Figura 33. Estruturas sugeridas para íons produto do MPPA em ESI positivo.

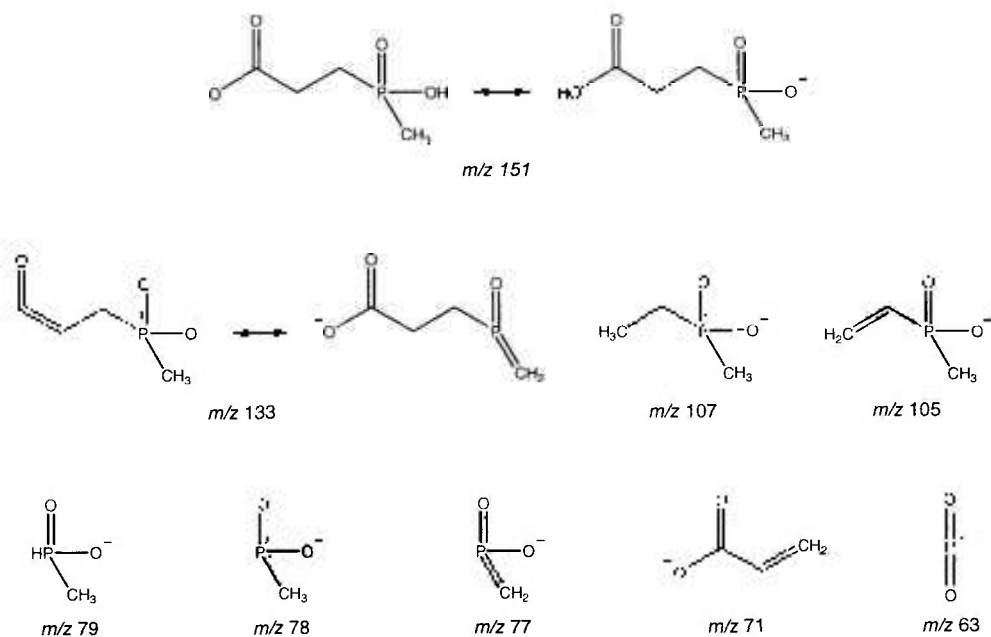


Figura 34. Estruturas sugeridas para íons produto do MPPA em ESI negativo.

5.3 Seleção da fase móvel e tampão

Os mesmos aditivos e solventes utilizados no estudo de eficiência de ionização dos compostos foram testados como fase móvel em cromatografia líquida de fase reversa. Uma solução de GLIF, AMPA, GLUF e MPPA à concentração de $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foi injetada no sistema LC-ESI/MS/MS empregando como fase móvel soluções entre metanol/água e acetonitrila/água com os aditivos: ácidos fórmico e acético 0,1%; formiato, acetato e carbonato de amônio 5,0 mmol L^{-1} ; e hidróxido de amônio 0,25%. Em todos os casos foi empregada eluição isocrática com 70% de água e 30% do solvente orgânico.

A Figura 35 apresenta os cromatogramas obtidos da eluição do glifosato em diferentes aditivos. Os cromatogramas da esquerda são referentes ao modo de ionização positivo e os cromatogramas da direita ao modo de ionização negativo. Os respectivos aditivos utilizados são mostrados nos cromatogramas.

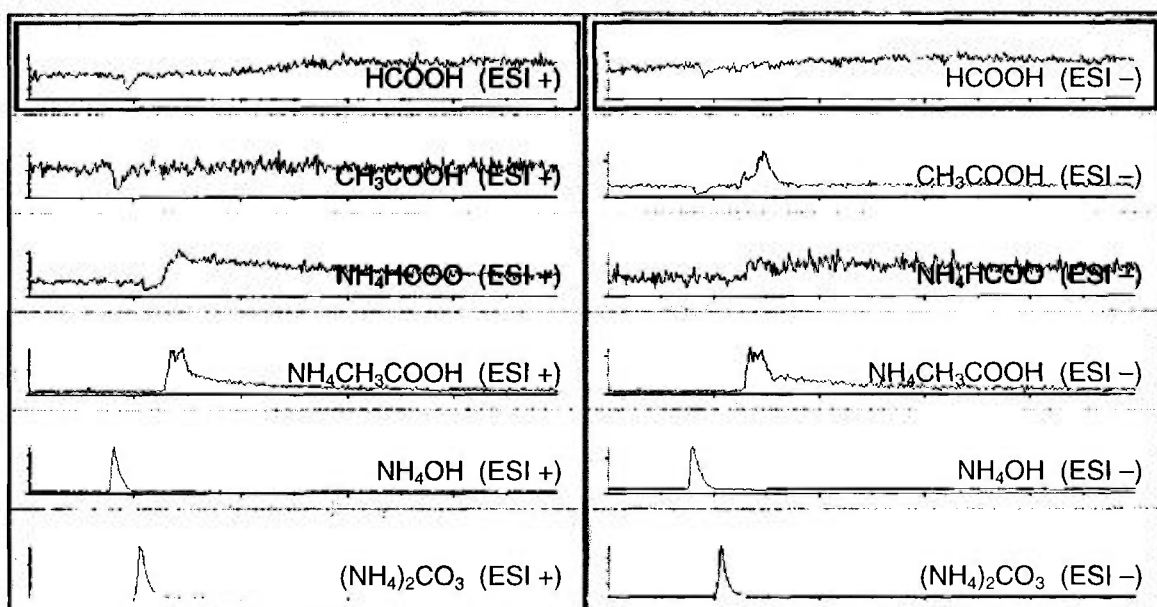


Figura 35. Cromatogramas obtidos para o composto glifosato nos modos positivo e negativo após eluição com diferentes aditivos.

Como pode ser visto nos cromatogramas da Figura 35, os melhores picos foram obtidos com o emprego de aditivos de pH alto, neste caso, carbonato de amônio e hidróxido de amônio.

Os resultados são independentes do modo de ionização empregado, isto porque, a eluição dos compostos na coluna analítica é função do pH da fase móvel como consequência de cada aditivo utilizado. Esta condição se faz verificar pela magnitude e pelo mecanismo de interação dos analitos em fase líquida com os grupos silanóis livres das colunas de fase reversa.

O maior mecanismo de separação empregado na cromatografia de fase reversa é a partição de analitos neutros entre as fases móvel e estacionária⁸³. Devido aos grupos silanóis residuais, estes empacotamentos podem estar ionizados quando analitos iônicos ou ionizáveis e componentes do tampão estão presentes na fase móvel, promovendo outros mecanismos de retenção e separação como a exclusão de carga ou a troca iônica^{84,85,86}.

O principal fator de separação de analitos iônicos em colunas de fase reversa é o pH da fase móvel com base nas propriedades ácido-base dos compostos. No caso dos compostos GLIF, GLUF, AMPA e MPPA, embora apresentem caráter zwitteriônico, o seu predominante caráter básico reduz a habilidade de análise destes compostos em colunas de fase reversa. Isto ocorre em virtude da interação dos sítios básicos dos analitos com os grupos silanóis residuais presentes na fase estacionária que, por sua vez, proporcionam picos cromatográficos alargados, baixa eficiência, retenção imprevisível e baixa reprodutibilidade entre colunas. Uma alternativa adequada para a análise de compostos com caráter básico por fase reversa é o emprego de tampões com alto pH, o que tem sido uma alternativa para a análise de uma diversidade de fármacos que apresentam esta propriedade⁸⁷.

Para fins de quantificação, o carbonato de amônio foi preferido quando comparado com o hidróxido de amônio por alguns motivos comentados a seguir. Primeiramente, optou-se pela seleção de um único aditivo que se adequasse aos modos de ionização positivo e negativo, uma vez que o GLIF e o AMPA

apresentaram maior sensibilidade em modos de ionização de polaridade diferente. Como o GLIF, principal analito deste trabalho, apresentou uma maior sensibilidade no modo de íons positivos, selecionou-se o carbonato de amônio pela intensidade do sinal gerado. Outro fator importante foi a maior retenção do GLIF na coluna cromatográfica usando o carbonato de amônio ao invés do hidróxido de amônio, aumentando assim a seletividade e especificidade do método. Finalmente, o aumento do pH da fase móvel com o uso do hidróxido de amônio aproxima-se do valor limiar recomendado para a coluna utilizada, o que faz com que a vida útil da coluna diminua razoavelmente.

5.4 Derivação com FMOC-Cl

A derivação dos analitos com FMOC-Cl foi estudada durante a etapa inicial deste trabalho. A Figura 36 apresenta um cromatograma dos analitos GLIF, AMPA e GLUF derivados com FMOC-Cl, além do composto MPPA não derivado por não apresentar o grupo amino em sua estrutura.

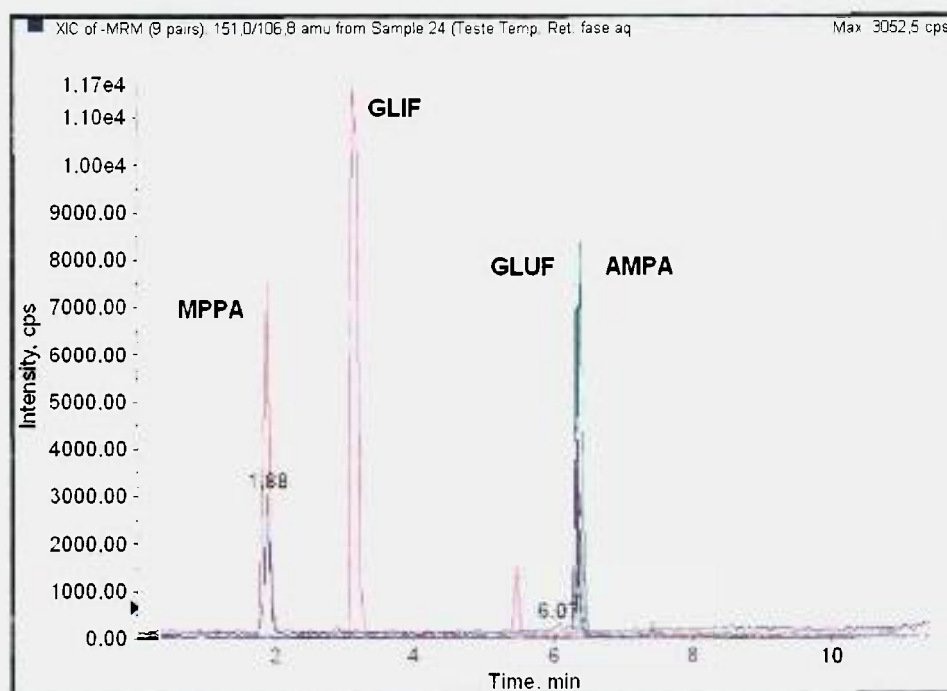


Figura 36. Cromatograma de solução padrão dos analitos empregando derivação pré-coluna com FMOC-Cl.

Embora o cromatograma da Figura 36 apresente uma excelente separação cromatográfica com elevada especificidade, esta etapa de derivação com FMOC-Cl foi desprezada em virtude dos resultados obtidos para os compostos sem derivação e pela dificuldade de reprodução dos resultados e das condições de reação entre os analitos e o reagente derivatizante (FMOC-Cl).

5.5 Determinação em Soja

A validação da metodologia analítica foi realizada em conformidade com a EC/2002/657⁸⁸. Com o estabelecimento do limite de validação do método em $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$, foram criados quatro séries de experimentos a serem realizados. Nos três primeiros dias foram realizados experimentos de recuperação nos níveis 0,2; 0,4 e $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ com seis replicatas para cada nível e nos níveis 0,8 e $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ analisados em um único experimento de recuperação, além do branco da amostra, totalizando 21 experimentos diários. No quarto experimento foram realizados estudos de recuperação em dez replicatas fortificadas no nível de $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ e em dez brancos da matriz. Os resultados foram plotados no *software ResVal* (versão 2.0) para o tratamento dos dados.

5.5.1 Avaliação do efeito de matriz

Testes de efeito de matriz foram realizados com os compostos GLIF e AMPA usando ionização por *electrospray* nos modos positivo e negativo, respectivamente. Estes testes foram realizados com o objetivo de avaliar se os constituintes presentes na matriz (soja) produziram algum efeito de alteração na resposta dos analitos.

A Figura 37 apresenta os cromatogramas obtidos no teste de infusão pós-coluna realizado para o GLIF e o AMPA em amostra de soja.

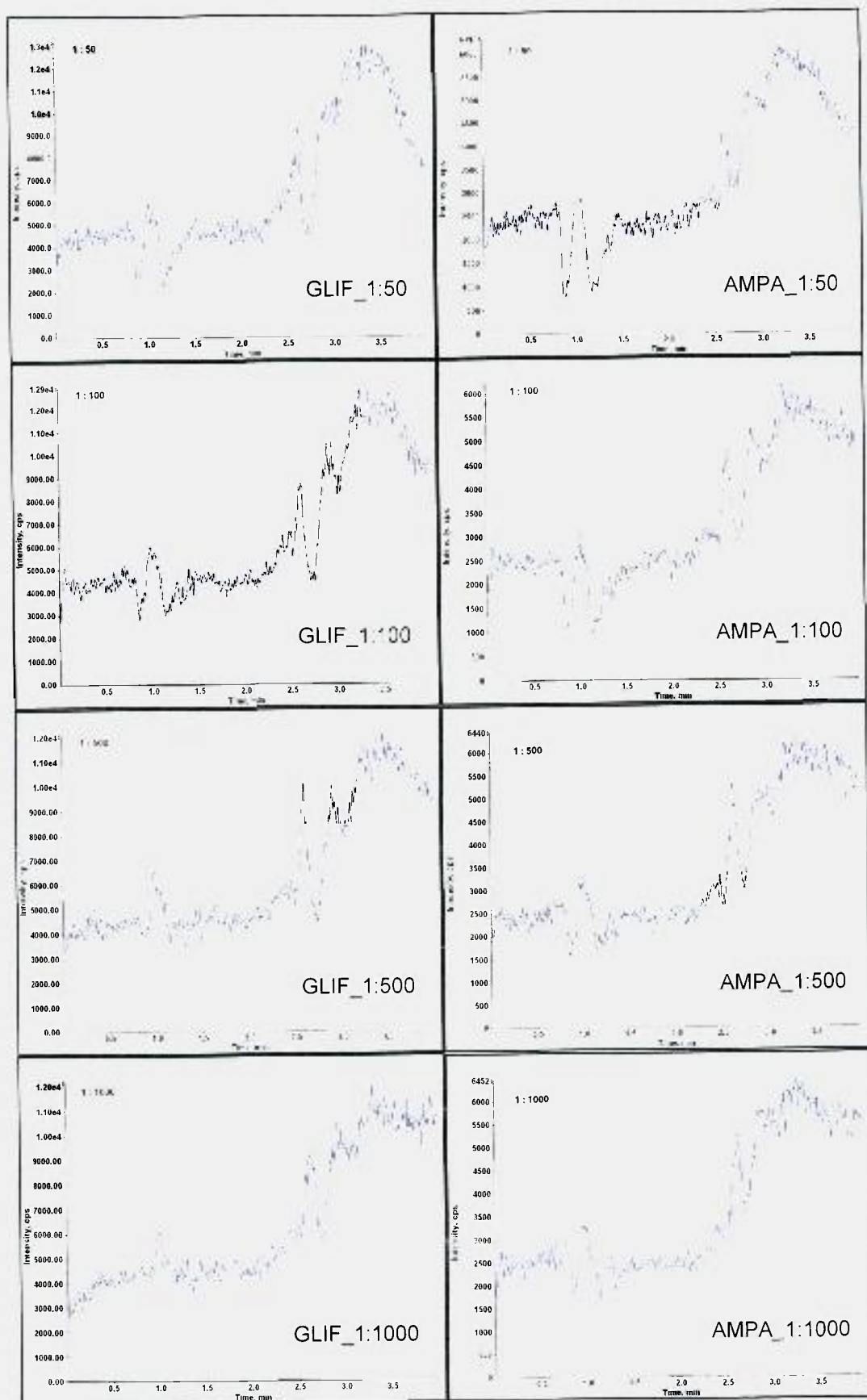


Figura 37. Cromatogramas dos analitos usando o método de infusão pós-coluna.

Os dois métodos mais encontrados na literatura para a determinação do efeito de matriz em LC-MS/MS são a adição pós-extração^{89,90,91} e a infusão pós-coluna^{92,93,94}.

O método de adição pós-extração consiste na adição de uma quantidade conhecida do analito no extrato da amostra em branco e comparar o sinal da resposta do analito com um padrão de igual concentração preparado em um solvente puro.

A avaliação do efeito de matriz neste trabalho foi realizada através do método de infusão pós-coluna. A vantagem do método de infusão pós-coluna é que este método permite obter informação sobre o efeito de matriz durante toda a corrida cromatográfica, enquanto que, o método de adição pós-extração traz informação apenas do ponto de vista do analito⁹⁴.

No método de infusão pós-coluna, uma amostra de um branco da matriz é injetada no método de aquisição desenvolvido no HPLC. Na saída da coluna analítica, é adicionado um fluxo de infusão auxiliar de um padrão concentrado do analito (Figura 38).

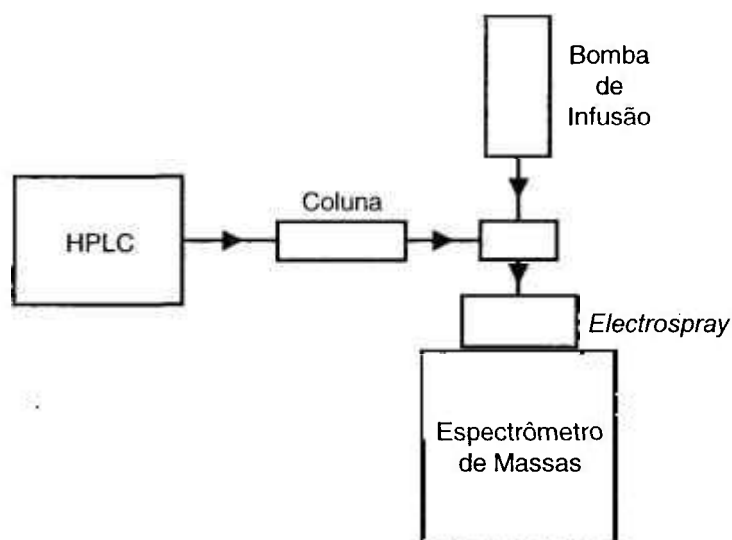


Figure 38. Representação esquemática da avaliação do efeito de matrix usando o método de infusão pós-coluna.

Este procedimento faz com que a linha de base do cromatograma seja alta, devido à introdução contínua do analito que está sendo infundido. Com a eluição da amostra injetada na coluna analítica, analisa-se as possíveis perturbações que podem ocorrer na linha de base gerada pelo sinal do analito sob fluxo de infusão constante. Estas possíveis perturbações caracterizam o efeito de matriz para aquela condição específica.

Os cromatogramas apresentados na Figura 37 foram obtidos da injeção de brancos da amostra com fatores de diluição de 50, 100, 500 e 1000 vezes. Como pode ser visto nos cromatogramas, apenas com fator de diluição de 1000 vezes do extrato da soja, não há variação significativa da linha de base na região próxima a 1 minuto, referente ao tempo de eluição dos analitos. Isto ocorre devido à complexidade da matriz de soja que, dentre outros constituintes, é uma matriz muito proteica e oleosa.

O efeito de matriz é um parâmetro muito importante a ser avaliado em um processo de desenvolvimento de metodologia analítica por LC-MSMS. O acoplamento das interfaces de ionização à pressão atmosférica (API) à espectrometria de massas em *tandem*, após sucessivas filtrações de massas, conduz a uma pequena ou inexistente interferência da matriz mesmo na presença de altas concentrações de compostos co-extraídos ou co-eluídos⁹⁵. Apesar desta elevada seletividade, em análises quantitativas a determinação pode sofrer interferência dos constituintes da matriz havendo uma modificação do sinal dos analitos quando comparado ao sinal obtido com soluções padrão preparadas em solventes puros, denominada “efeito de matriz”.

O efeito de matriz é a variação do sinal do analito pela co-eluição ou presença de interferentes presentes na amostra (matriz), através dos fenômenos de supressão (*ion suppression*) ou adição (*ion enhancement*) de sinal. No caso do GLIF e do AMPA, na região referente ao tempo de retenção destes compostos é possível verificar uma diminuição do sinal da linha de base (supressão de sinal).

Os principais mecanismos do efeito de matriz em espectrometria de massas com ionização à pressão atmosférica ainda não são totalmente

elucidados. Busch e colaboradores²⁶ descreveram três tipos de efeitos de matriz em espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS). O primeiro diz respeito à diminuição da eficiência de ionização de um determinado analito com a mudança da composição da mistura introduzida na fonte de ionização. Diminuindo-se a quantidade de íons do analito produzidos, haverá uma diminuição do sinal em virtude da menor quantidade de íons gerados e consequentemente detectados. Este processo de diminuição da eficiência de ionização é bastante peculiar ao fenômeno de ionização por *electrospray*. Como mencionado na seção 3.2.2.4 a intensidade do sinal de um íon formado no *electrospray* depende da competição na taxa de transferência para a fase gasosa deste íon específico com outros interferentes que podem estar presentes na amostra⁴⁰. Como o GLIF e o AMPA são analitos carregados na fase líquida, a retenção destes compostos em colunas de fase reversa é muito pequena, o que faz com que estes íons eluam juntamente com interferentes da matriz que possuam pequena interação com a coluna.

A segunda forma de efeito matriz descrita por Busch e colaboradores²⁶ é mais branda que a anterior e está relacionada às mudanças de estrutura e reatividade dos íons precursores. A presença de determinados interferentes da matriz podem alterar o sítio de ionização dos analitos e reduzir quantitativamente o resultado esperado. No caso do GLIF e do AMPA, existem vários sítios ionizáveis que, mesmo em fase líquida, podem estar parcialmente ionizados sob determinada condição. A variação deste rendimento de ionização em determinado sítio da molécula pode promover uma variação quantitativa dos íons precursores e produtos formados, diminuindo assim a quantidade de íons gerados à serem detectados. Além disso, variações da pressão das fontes de ionização pela presença de diferentes quantidades de amostras vaporizadas, podem diminuir a reatividade dos íons precursores²⁶.

A terceira forma de efeito de matriz em MS/MS descrita por Busch e colaboradores²⁶ diz respeito às interações intermoleculares entre os analitos e os interferentes da matriz. Neste caso, os fatores de diluição da amostra são muito importantes pois, quando um padrão puro é introduzido no sistema, as moléculas do analito estão solvatadas e interagindo apenas com as moléculas do solvente. Quando os interferentes da matriz estão presentes na amostra, a esfera de

solvatação do analito pode ser formada por diferentes moléculas que podem, por exemplo, afetar as condições de pH da solução, a reatividade e estrutura dos analitos ou, realizar interações intermoleculares diferentes daquelas ocorridas no padrão puro.

De acordo com Bonfiglio e colaboradores⁹⁶ o efeito de matriz é um parâmetro dependente do composto. Em estudos realizados com compostos de diferentes polaridades, eles verificaram que os compostos mais polares sofreram maior efeito de supressão de sinal que os de menor polaridade. Estes dados são coerentes com o observado para o GLIF e o AMPA que são compostos de alta polaridade.

Para resolver o problema de efeito de matriz sofrido na determinação do GLIF e do AMPA em soja, testes de purificação da amostra foram realizados com extração em fase sólida (SPE), partição líquido-líquido e precipitação de proteínas.

Nos testes de extração em fase sólida, foram empregadas colunas de fase estacionária amino, ciano, C18, sílica, alumina e florisil. Estes testes não apresentaram resultados satisfatórios pois, os analitos não apresentaram retenção assim como os interferentes potenciais.

Nos testes com partição líquido-líquido empregando solventes orgânicos foram testados hexano, ciclohexano, diclorometano, clorofórmio, tetracloreto de carbono, isooctano, octanol. Os melhores resultados foram obtidos empregando clorofórmio e diclorometano e, por este motivo o diclorometano foi usado durante a etapa de extração.

A etapa de precipitação de proteínas mostrou-se um método eficiente na purificação do extrato de soja. Foram testados para esta finalidade acetonitrila, metanol, acetona, ácido fórmico e ácido acético. Os melhores resultados foram obtidos usando metanol.

Para resolver o problema de efeito de supressão de sinal, a curva analítica foi construída na matriz pela fortificação de extratos de amostras de soja orgânica.

5.5.2 Sensibilidade e linearidade

Em virtude da sensibilidade, neste trabalho GLIF e AMPA foram analisados nos modos de ionização positivo e negativo, respectivamente. Para este fim, as amostras foram injetadas em dois métodos analíticos diferentes, um para cada analito. É importante ressaltar que toda a etapa de preparação das amostras foi a mesma para GLIF e AMPA, diferindo apenas no método de quantificação devido a diferença de polaridade de ionização

A Tabela 9 apresenta os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método, calculados pela injeção de um padrão de concentração $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$, preparado em um extrato de um branco da matriz de soja (equivalente à concentração de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$) e apresentado na Figura 39. Para o cálculo dos limites de detecção e de quantificação apresentados na Tabela 9 assumiu-se como limites de detecção e de quantificação, uma concentração equivalente a uma razão sinal/ruído igual a três e a dez, respectivamente.

Tabela 9. Sensibilidade da técnica de LC-MS/MS.

Composto	Íon Precursor	Transição (m/z)	LD (mg kg^{-1})	LQ (mg kg^{-1})
GLIF	$[M + H]^+$	170>88	0,09	0,30
AMPA	$[M - H]^-$	110>79	0,10	0,34

Os limites foram calculados dividindo-se a concentração dos analitos no padrão injetado ($0,2 \text{ ng mL}^{-1}$) pela razão sinal/ruído (S/R) obtida para o GLIF (S/R = 6,7) e para o AMPA (S/R = 5,9) e, em seguida, multiplicando-se o resultado por três (3) e por dez (10), para os limites de detecção e quantificação, respectivamente.

Para o cálculo dos limites de detecção e quantificação foram usados os valores de sinal/ruído obtidos sem o emprego de suavização dos pontos ("*smooth*"), os quais são geralmente aplicados para uma melhor integração dos picos cromatográficos nos tratamentos de pós-aquisição de dados. Esta condição foi escolhida pois o emprego de *smooth* faz com que a razão sinal/ruído aumente devido à suavização do ruído da linha de base do cromatograma.

Apesar do procedimento de *smooth* ser normalmente empregado na pós-aquisição de dados para uma melhor integração dos picos cromatográficos obtidos, a apresentação dos dados brutos permite visualizar com maior clareza a sensibilidade do método. Outro fator importante é avaliar a estabilidade do sinal produzido na linha de base como a resposta da fonte de *electrospray*. A estabilidade do sinal, no caso de uma linha de base muito ruidosa, pode requerer um melhor ajuste de parâmetros como a vazão dos gases ou da fase móvel, a temperatura da fonte e as posições vertical e horizontal do capilar em relação ao contra-eletrodo.

A Figura 40 apresenta um cromatograma de uma amostra de padrão à concentração de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de GLIF e AMPA onde o procedimento de *smooth* foi aplicado. É possível perceber a suavização dos pontos do pico e principalmente da linha de base, o que faz com que as razões sinal/ruído sejam maiores devido aos motivos comentados anteriormente.

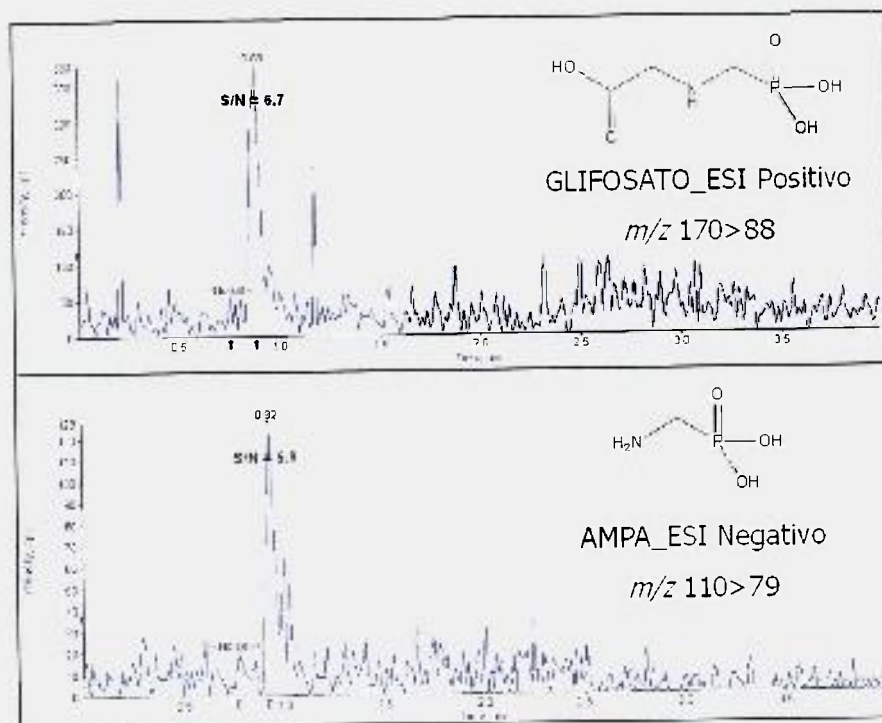


Figure 39. Cromatogramas de solução padrão de GLIF e AMPA de $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$.

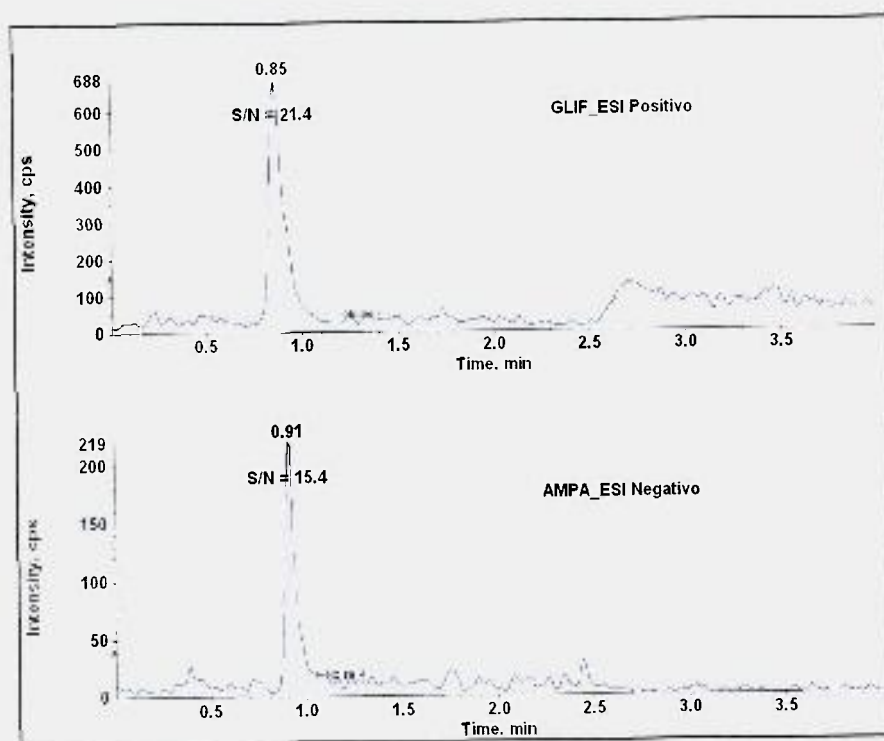


Figure 40. Cromatogramas de solução padrão de GLIF e AMPA de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$.

As Figuras 41 e 42 apresentam, respectivamente, os cromatogramas de íons extraídos para o GLIF e AMPA nas concentrações de 0.4 ng mL^{-1} os quais correspondem à concentração na matriz de 0.4 mg kg^{-1} . Nestes cromatogramas também não foram aplicados *smooth* e os dados brutos da aquisição para as três transições de m/z monitoradas estão apresentados juntamente com as razões sinal/ruído e as respectivas transições de m/z monitoradas em modo MRM.

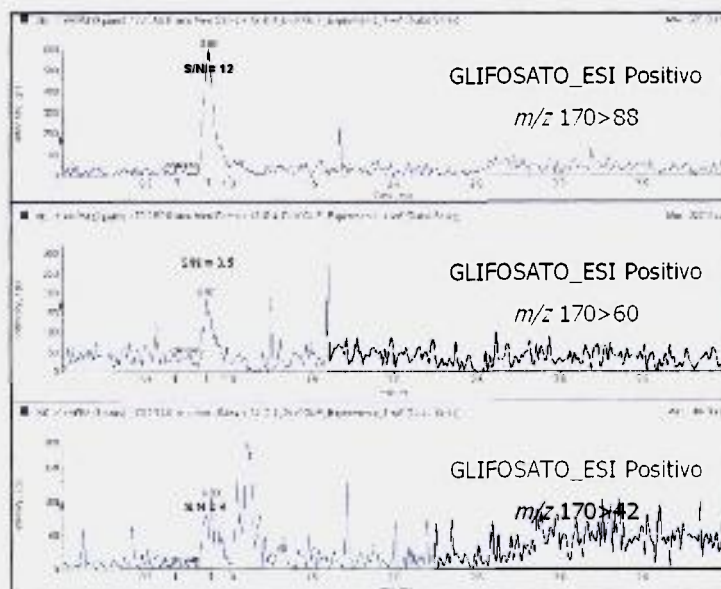


Figure 41. Cromatogramas dos íons extraídos do composto GLIF.

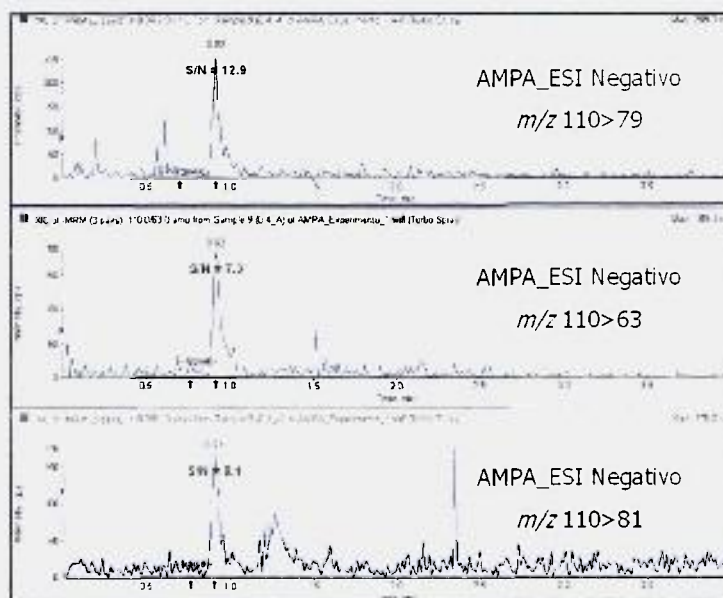


Figure 42. Cromatogramas dos íons extraídos do composto AMPA.

Considerando a baixa retenção dos analitos na coluna, o monitoramento de três transições de m/z para cada composto foi muito importante para garantir a especificidade do método analítico e a confiabilidade dos resultados. De acordo com a norma da Comunidade Européia são necessárias apenas duas transições de m/z para a auto-confirmação do resultado. O monitoramento de três transições para um mesmo composto fornece uma segurança superior à exigida pela Comunidade Européia evitando assim resultados falsos ou duvidosos.

A técnica de LC-MS/MS apresentou uma sensibilidade adequada para os dois analitos, o que foi um fator favorável durante o desenvolvimento do método. A amostra de soja é uma matriz muito complexa, por este motivo, a determinação de resíduos nesta matriz requer etapas de preparação exaustivas com procedimentos de purificação. No caso de GLIF e AMPA, o método tradicional emprega cromatografia líquida de troca iônica com detecção por fluorescência, precedida de duas etapas de purificação do extrato de soja em colunas empacotadas com resinas de troca catiônica e aniônica. Após as etapas de purificação, o eluato aquoso é concentrado, e uma reação de derivação pós-coluna precisa ser feita para detecção dos analitos. No caso do método desenvolvido, esta etapa de preparação da amostra é consideravelmente reduzida devido à especificidade e sensibilidade desta técnica.

A quantificação dos analitos foi realizada pelo método de padronização externa, onde, padrões de cinco concentrações diferentes foram injetados seis vezes cada. A Tabela 10 apresenta os dados das curvas analíticas obtidas para cada composto.

Tabela 10. Dados das curvas analíticas de glifosato e AMPA.

Composto	Faixa ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Inclinação (a)	Intersecção (b)	Correlação (r^2)
GLIF	0,1 – 3,0	5900,522	687,452	0,9991
AMPA	0,1 – 3,0	2033,580	-14,593	0,9998

A resposta linear do sistema à concentração dos analitos, dentro da faixa de trabalho (0,1 a 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), está expressa através dos coeficientes de correlação apresentados. As Figuras 43 e 44 apresentam as curvas analíticas das transições de quantificação do GLIF e do AMPA, respectivamente.

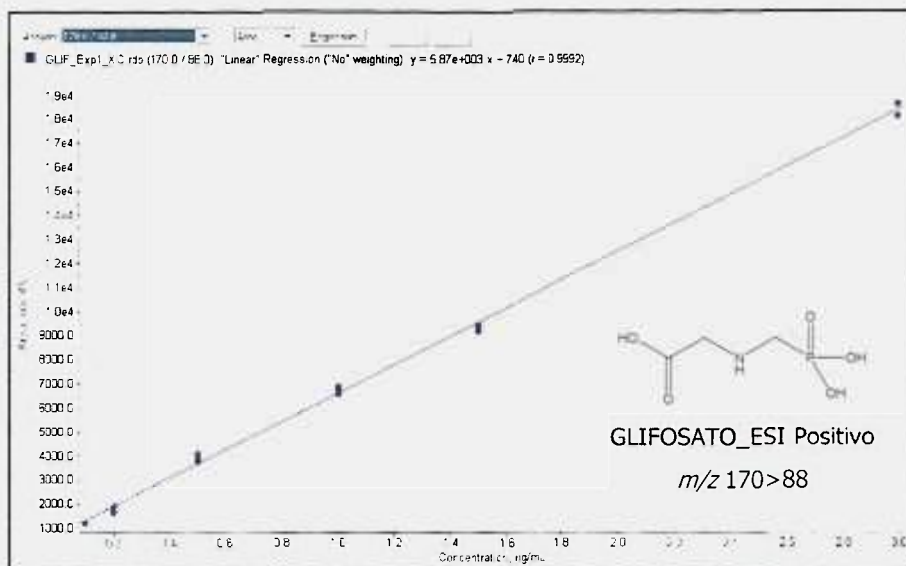


Figure 43. Curva analítica da transição de quantificação do GLIF.

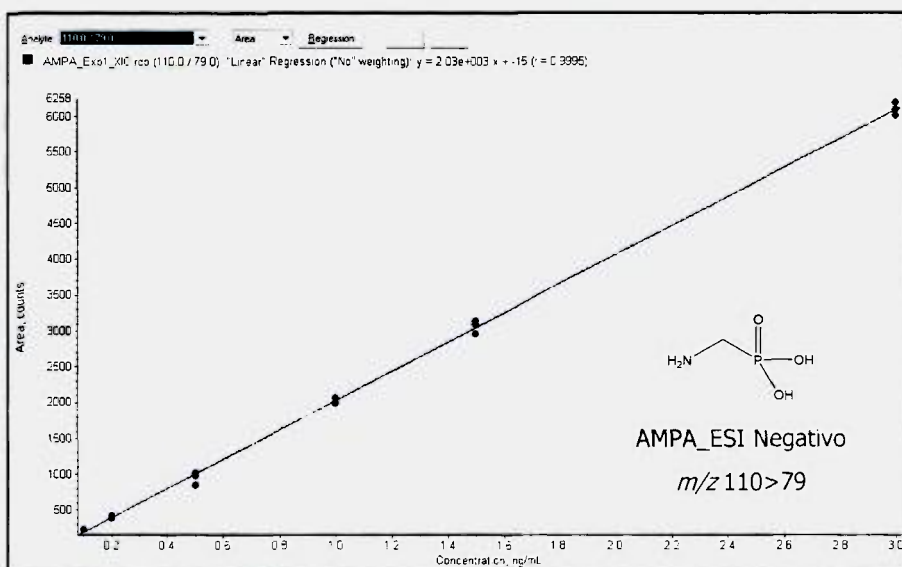


Figure 44. Curva analítica da transição de quantificação do AMPA.

O dois analitos apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,999 demonstrando que não há problemas de variação da resposta linear dos analitos por estarem diluídos em brancos da matriz. Este dado é importante pois assegura que mesmo com a influência da matriz na supressão do sinal dos analitos, a linearidade da resposta é mantida e as quantificações das amostras podem ser realizadas.

5.5.3 Estudos de Recuperação em amostras de soja

Os dados de recuperação dos analitos nas amostras de soja foram plotados em curva de regressão linear para a avaliação da recuperação do método em diferentes concentrações de fortificação. A Tabela 11 apresenta os dados das curvas construídas para GLIF e AMPA no *software ResVal* como função da recuperação em cada nível de fortificação.

Tabela 11. Linearidade das curvas de recuperação das amostras fortificadas.

Amostras fortificadas com GLIF ($y = ax + b$)				
Exp.	Inclinação (a)	Intersecção (b)	Correlação (r^2)	n
1	5601,647	615,882	0,9885	20
2	5453,588	493,592	0,9914	20
3	5232,618	489,706	0,9930	20
Amostras fortificadas com AMPA ($y = ax + b$)				
Exp.	Inclinação (a)	Intersecção (b)	Correlação (r^2)	n
1	1811,244	-2,735	0,9897	20
2	1881,229	-30,824	0,9894	20
3	1828,329	-80,824	0,9895	20

As curvas representam as recuperações obtidas nos experimentos 1, 2 e 3, realizados nos três primeiros dias de validação, nas concentrações de 0,2 mg kg⁻¹ (n = 6), 0,4 mg kg⁻¹ (n = 6), 0,6 mg kg⁻¹ (n = 6), 0,8 mg kg⁻¹ (n = 1) e 2,0 mg

kg^{-1} ($n = 1$), totalizando 20 experimentos diários de fortificação. As amostras do branco (sem fortificação) não foram plotadas nas curvas.

A linearidade nas curvas das amostras demonstra que o método apresenta uma recuperação adequada dentro da faixa de fortificação realizada nas amostras. Esta faixa de recuperação apresenta uma ordem de grandeza de dez vezes, ou seja, varia de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ a $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$.

Outros parâmetros importantes a serem determinados segundo a EC/657/2002 foram os níveis críticos, denominados limite de decisão ($\text{CC}\alpha$) e capacidade de detecção ($\text{CC}\beta$).

Os limites $\text{CC}\alpha$ e $\text{CC}\beta$ estão apresentados na Tabela 12 e foram calculados de acordo com as equações 16 e 17:

$$\text{CC}\alpha = \frac{y_{\text{inters.}} + 2,33 \times \text{desv.pad. } y_{\text{intersec.}} - y_{\text{intersec.}}}{\text{slope}} \quad (16)$$

$$\text{CC}\beta = \frac{y_{\text{inters.}} + 2,33 \times \text{desv.pad. } y_{\text{intersec.}} + 1,64 \times \text{desv.pad. } y_{\text{intersec.}} - y_{\text{intersec.}}}{\text{slope}} \quad (17)$$

Tabela 12. Níveis críticos de acordo com EC/657/2002.

GLIF			AMPA		
Exp	$\text{CC}\alpha$ (mg kg^{-1})	$\text{CC}\beta$ (mg kg^{-1})	Exp	$\text{CC}\alpha$ (mg kg^{-1})	$\text{CC}\beta$ (mg kg^{-1})
1	0,04	0,06	1	0,03	0,06
2	0,03	0,05	2	0,03	0,06
3	0,03	0,05	3	0,03	0,06
Média	0,03	0,05	Média	0,03	0,06

A recuperação média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) obtidos nos estudos de recuperação de glifosato e AMPA nas amostras de soja fortificadas estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados dos estudos de recuperação de Glifosato e AMPA em amostras de soja fortificadas.

Composto	Nível (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	DP (%)	CV (%)	n
Glifosato	0,2	79,6	9,8	12,2	18
	0,4	109,1	6,6	6,1	28
	0,6	88,6	5,4	6,1	18
	0,8	92,1	-	-	3
	2,0	89,0	-	-	3
AMPA	0,2	89,7	8,5	9,4	18
	0,4	94,0	5,6	6,0	28
	0,6	88,3	7,3	8,2	18
	0,8	85,7	-	-	3
	2,0	90,9	-	-	3

O valor médio da recuperação do método para ambos compostos está entre 80 e 110%, valor este recomendado pela Comunidade Européia através da norma EC/2002/657. De acordo com esta norma, estudos de resíduos em níveis superiores a 0,01 mg kg⁻¹ devem apresentar recuperações entre 80 e 120%.

Os resultados de cada experimento foram avaliados de acordo com a norma ISO 5725-2 no *software ResVal*. Esta norma apresenta um ferramenta estatística para a avaliação da performance de diferentes laboratórios que empregam o mesmo método analítico. No *software ResVal*, os diferentes experimentos realizados nos três primeiros dias (experimentos 1, 2 e 3) foram empregados como se fossem estes diferentes laboratórios. Os resultados foram plotados no *software* para o cálculo da repetibilidade dos dados, da variância inter-laboratórios (neste caso variância inter-experimentos) e da reprodutibilidade da variância.

A repetibilidade foi calculada de acordo com a equação 18:

$$s_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_i - 1) s_i^2}{\sum_{i=1}^p (n_i - 1)} \quad (18)$$

onde:

s_{ij}^2 = repetibilidade

p = número de experimentos

n_{ij} = número de análises de cada experimento em determinado nível

s_{ij} = derivação padrão de cada experimento em determinado nível

A variância entre experimentos foi calculada pelas equações 19 a 21:

$$S_i^2 = \frac{s_{ij}^2 + s_{ij}^2}{n_i} \quad (19)$$

$$s_{ij}^2 = \frac{1}{p-1} \left[\sum_{i=1}^p n_i (\bar{y}_i)^2 - (\bar{y})^2 \sum_{i=1}^p n_i \right] \quad (20)$$

$$n_i = \frac{1}{p-1} \left[\sum_{i=1}^p n_{ij} - \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij}^2}{\sum_{j=1}^p n_j} \right] \quad (21)$$

onde:

$\bar{y}_{ij}$ = média aritmética dos resultados de um experimento em determinado nível

$\bar{y}_j$ = média geral de todos os resultados em determinado nível

A variância da reprodutibilidade foi calculada pela equação 22:

$$S_R^2 = S_r^2 + S_L^2 \quad (22)$$

onde:

S_R^2 = variância da reprodutibilidade

S_r^2 = repetibilidade

S_L^2 = variância entre experimentos

Os resultados de repetibilidade e reprodutibilidade calculados pelo *software ResVal* estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados de acordo com ISO 5725-2

Composto	Nível (mg kg ⁻¹)	Repetibilidade (S _r ²)	Entre Exp. (S _L ²)	Reprodutibilidade (S _R ²)
GLIF	0,2	0,0003	0,0002	0,0004
	0,4	0,0010	0,0004	0,0015
	0,6	0,0011	0,0009	0,0020
AMPA	0,2	0,0001	0,0001	0,0001
	0,4	0,0006	0,0018	0,0024
	0,6	0,0019	0,0015	0,0035

A metodologia analítica desenvolvida para a determinação de GLIF e AMPA em amostras de soja mostrou-se suficientemente adequada para esta aplicação. Os níveis de determinação atingidos permitem atender plenamente ao limite máximo de resíduo estabelecido pela ANVISA (10 mg kg⁻¹) e também ao limite máximo de resíduo estabelecido pelo Codex (0,2 mg kg⁻¹). A construção da curva na matriz foi uma alternativa viável para a eliminação do efeito de supressão de sinal produzido na detecção dos analitos.

5.6 Determinação em Água

Em complementação ao estudo realizado com amostras de grãos de soja, mais dois analitos: o glufosinato (GLUF) e o seu principal produto de degradação, o ácido metilfosfínico propiônico (MPPA), foram analisados. Estes novos compostos foram quantificados simultaneamente com o GLIF e o AMPA em amostras de água superficial e tratada fortificadas em diferentes concentrações.

5.6.1 Sensibilidade e linearidade

A exemplo do GLIF e do AMPA, os compostos GLUF e MPPA também não apresentam retenção em colunas de fase reversa. A Figura 45 apresenta os cromatogramas dos quatro analitos analisados usando ionização por *electrospray* nos modos positivo e negativo.

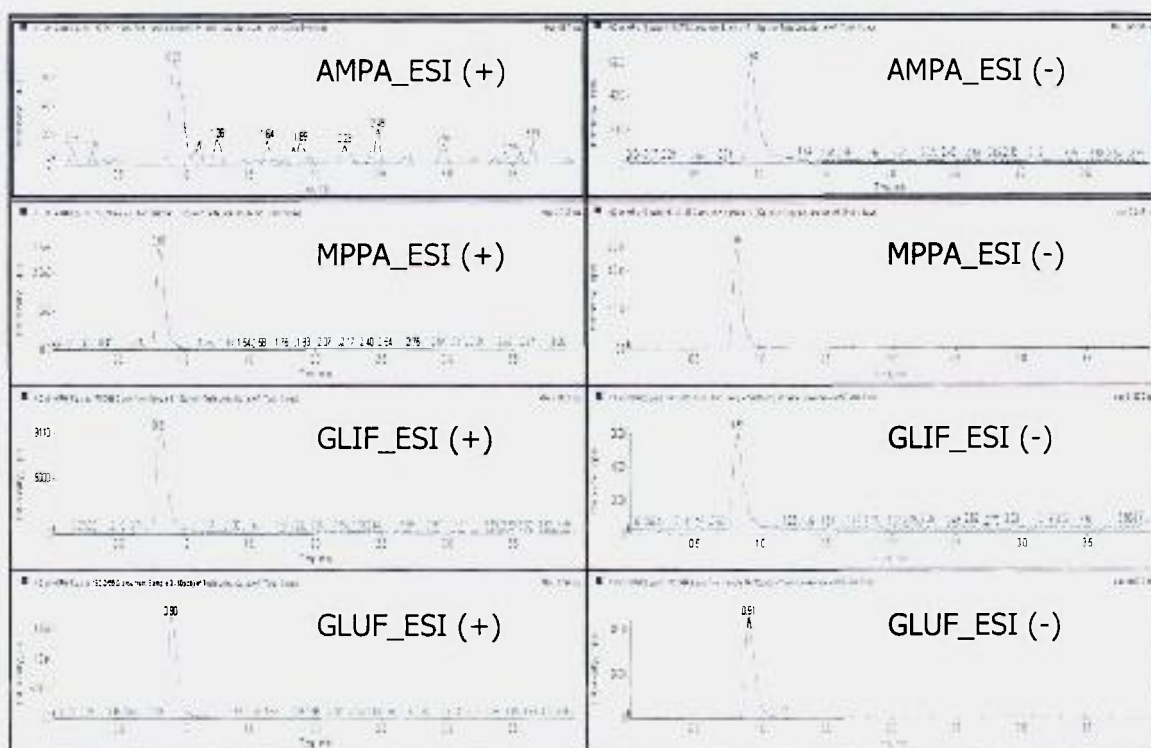


Figure 45. Cromatogramas dos íons extraídos para os analitos usando ionização por *electrospray* nos modos positivo (esquerda) e negativo (direita).

Com elevada polaridade, a principal diferença entre os quatro analitos é que o MPPA não apresenta em sua estrutura o grupo amino. De forma similar ao GLIF e ao AMPA, estes outros dois compostos também podem ser ionizados nos dois modos de polaridade de ionização e, por este motivo, as análises simultâneas dos quatro analitos foram realizadas nos modos de *electrospray* positivo e negativo para a comparação dos resultados. Apesar de todos os analitos ionizarem bem nas duas polaridades de ionização, o composto AMPA em *electrospray* positivo apresentou um sinal de intensidade muito baixa para as transições de quantificação e de confirmação.

Para a quantificação dos analitos empregou-se o método de padronização externa, através da injeção dos padrões da curva analítica. Os dados de linearidade das curvas analíticas nos modos negativo e positivo estão apresentados nas Tabelas 15 e 16, respectivamente. Para a construção das curvas analíticas injetou-se padrões diluídos em água às concentrações de 5,0; 10,0; 100,0; 500,0 e 1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em seis replicatas para cada concentração.

Tabela 15. Dados da linearidade das curvas analíticas em ESI negativo.

Composto	Íon Precursor	Transição (m/z)	Propósito*	R ²
AMPA	[M – H] ⁻	110>63	C	0,9998
AMPA	[M – H] ⁻	110>79	Q	0,9996
MPPA	[M – H] ⁻	151>107	C	0,9995
MPPA	[M – H] ⁻	151>133	Q	0,9995
GLIF	[M – H] ⁻	168>124	C	0,9996
GLIF	[M – H] ⁻	168>150	Q	0,9998
GLUF	[M – H] ⁻	180>95	Q	0,9989
GLUF	[M – H] ⁻	180>136	C	0,9993

*Propósito: C = Confirmação; Q = Quantificação

Tabela 16. Dados da linearidade das curvas analíticas em ESI positivo.

Composto	Íon Precursor	Transição (m/z)	Propósito*	R ²
AMPA	[M + H] ⁺	112>30	Q	0,9992
AMPA	[M + H] ⁺	112>47	C	0,9961
MPPA	[M + H] ⁺	153>79	C	0,9999
MPPA	[M + H] ⁺	153>135	Q	1,0000
GLIF	[M + H] ⁺	170>88	Q	0,9998
GLIF	[M + H] ⁺	170>60	C	0,9997
GLUF	[M + H] ⁺	182>56	Q	0,9993
GLUF	[M + H] ⁺	182>136	C	0,9997

*Propósito: C = Confirmação; Q = Quantificação

O sistema de LC-MS/MS apresentou uma resposta linear para os quatro compostos na faixa de 5,0 a 1000,0 µg L⁻¹ e, apenas os compostos AMPA e GLUF nos modos de íons positivo e negativo, respectivamente, apresentaram coeficientes de linearidade menores que 0,999. Estes resultados demonstram que o sistema apresenta uma faixa linear de grande amplitude, permitindo o trabalho com amostras que possuam ampla faixa de concentração dos analitos.

5.6.2 Estudo de recuperação em amostras de água

Todos os analitos foram estudados nas amostras de água superficial e tratada nos níveis de fortificação de 10,0; 50,0 e 500,0 µg L⁻¹, onde, seis replicatas para cada concentração foram preparadas. Neste estudo de recuperação dos analitos em amostras de água foram escolhidos íons produto específicos para cada composto no modo de íons positivos. Este mesmo critério não pode ser adotado no modo negativo pois, muitos íons produto são comuns aos quatro analitos.

A Figura 46 apresenta um gráfico da recuperação média dos analitos nas amostras de água superficial e tratada.

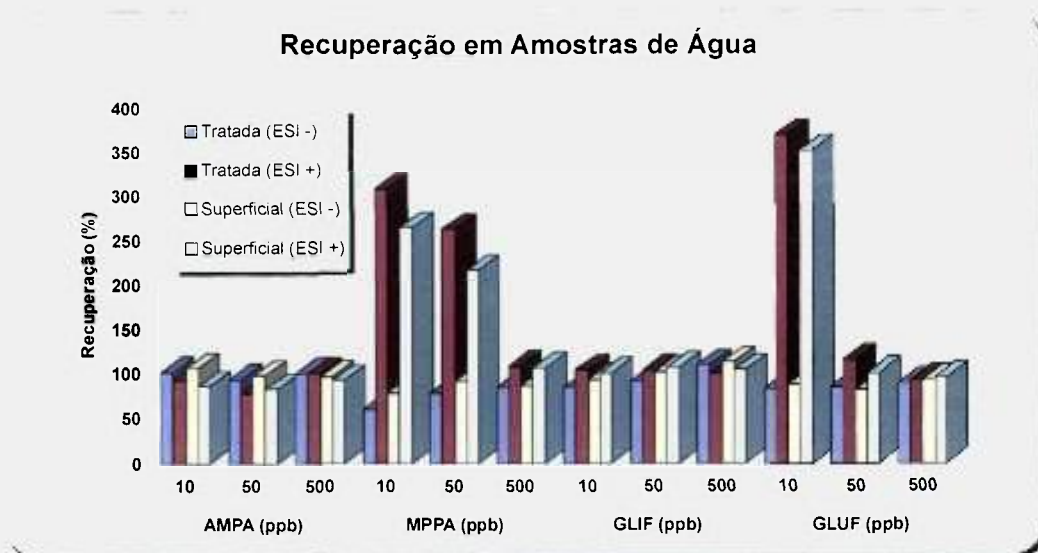


Figura 46. Gráfico da recuperação média dos analitos em amostras de água superficial e tratada que foram analisadas usando ionização por *electrospray* nos modos positivo e negativo.

Na Figura 46 é verificado que apenas os analitos GLUF e MPPA apresentaram recuperação muito superior a 100% no modo de íons positivos. Este efeito de adição de sinal, o qual trata-se de um efeito de matriz, não foi verificado no modo de íons negativos.

A recuperação do GLIF nos dois modos de ionização variou de 84 a 115% com coeficientes de variação menores que 8% para todos os níveis de fortificação estudados. A Tabela 17 apresenta os valores das recuperações do GLIF nas matrizes de água.

Dentre as amostras fortificadas com GLIF, apenas duas no nível de fortificação de 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentaram uma recuperação média superior a 110% para o modo de íons negativos. Nos outros dois níveis de fortificação, uma tendência positiva foi observada no modo de íons positivos e, uma suave tendência negativa dos valores de recuperação no modo de íons negativos.

Tabela 17. Dados da recuperação de GLIF em amostras água.

Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra*	Método ESI	Rec. (%)	DP	CV	n
10,0	AT	(-)	84,9	3,5	4,1	6
	AS	(-)	94,6	4,8	5,1	6
	AT	(+)	105,0	3,7	3,6	6
	AS	(+)	101,1	2,9	2,8	6
50,0	AT	(-)	92,9	2,1	2,2	6
	AS	(-)	102,6	4,5	4,4	6
	AT	(+)	104,3	3,9	3,8	6
	AS	(+)	108,0	4,2	3,9	6
500,0	AT	(-)	110,3	7,8	7,1	6
	AS	(-)	113,3	5,4	4,8	6
	AT	(+)	101,5	4,0	3,9	6
	AS	(+)	105,2	2,4	2,3	6

* Amostra: AT = Água superficial; AS = Água Tratada.

O GLIF apresentou recuperações próximas de 100% para o nível de fortificação de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$, demonstrando a sensibilidade obtida nos dois modos de ionização. De uma maneira geral, não houve diferenças significativas na recuperação do GLIF em amostras de água superficial e tratada, o que demonstra a aplicabilidade desta metodologia para estas matrizes usando ionização por *electrospray* nos modos positivo e negativo.

O composto AMPA apresentou recuperações entre 80 e 110% para todas as amostras em ambos modos de ionização. Os resultados do estudo de recuperação do AMPA nas amostras de água superficial e tratada estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Dados da recuperação de AMPA em amostras água.

Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra*	Método ESI	Rec. (%)	DP	CV	n
10,0	AT	(-)	103,2	3,5	3,4	6
	AS	(-)	106,7	1,8	1,6	6
	AT	(+)	94,6	9,6	10,1	6
	AS	(+)	86,6	12,2	14,1	6
50,0	AT	(-)	94,1	26,8	28,4	6
	AS	(-)	98,3	3,3	3,3	6
	AT	(+)	79,7	9,6	12,1	6
	AS	(+)	83,6	15,9	19,1	6
500,0	AT	(-)	100,7	4,4	4,3	6
	AS	(-)	97,6	2,5	2,6	6
	AT	(+)	101,9	25,3	24,8	6
	AS	(+)	93,3	17,1	18,3	6

* Amostra: AT = Água superficial; AS = Água Tratada.

No modo de íons positivos, principalmente para as amostras fortificadas com $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$, uma tendência negativa é observada nas recuperações do AMPA que são próximas de 80%. Por outro lado, neste mesmo nível de fortificação, altos valores de desvio padrão e coeficiente de variação para as amostras de água tratada foram obtidos em função de uma das seis replicatas de amostra fortificada apresentar um baixo valor de recuperação. Esta baixa recuperação não foi observada para os outros analitos nesta mesma amostra, confirmando assim a variação desta medida.

As recuperações próximas de 100% para o AMPA no modo de íons negativos demonstram o alto desempenho da cela de colisão (Q2). Isto mostra a ausência de efeitos “cross talk” na cela pois, os íons produto selecionados para o analito AMPA são fragmentos característicos dos outros analitos no modo de íons negativos.

A recuperação do composto GLUF, assim como observado nas recuperações do composto MPPA, apresentou um forte efeito de matriz para o nível de fortificação de 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ no modo de íons positivos. Este efeito de adição de sinal não foi observado em outros níveis de fortificação neste mesmo modo de íons mas, dificulta a determinação do GLUF em ESI positivo sob baixas concentrações. No modo de íons negativo, entretanto, excelentes recuperações foram obtidas em todos os níveis de fortificação estudados, apresentando apenas valores elevados de desvio padrão e coeficiente de variação no nível de fortificação de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 19). Isto se deve à baixa recuperação obtida em uma das seis replicatas analisadas à qual apresentou uma recuperação próxima de 50%.

Tabela 19. Dados da recuperação de GLUF em amostras água.

Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra*	Método (ESI)	Rec. (%)	DP	CV	n
10,0	AT	(-)	84,8	2,4	2,9	6
	AS	(-)	88,6	5,1	5,7	6
	AT	(+)	371,3	18,3	4,9	6
	AS	(+)	354,0	16,7	4,7	6
50,0	AT	(-)	86,0	4,5	5,2	6
	AS	(-)	83,0	16,5	19,9	6
	AT	(+)	115,7	6,2	5,3	6
	AS	(+)	101,2	9,5	9,4	6
500,0	AT	(-)	88,9	6,3	7,1	6
	AS	(-)	92,7	5,4	5,8	6
	AT	(+)	92,9	3,4	3,6	6
	AS	(+)	95,6	2,0	2,1	6

* Amostra: AT = Água superficial; AS = Água Tratada.

A recuperação do composto MPPA em amostras de água superficial e tratada apresentou recuperações diferentes em cada modo de ionização. A Tabela 20 apresenta os valores de desvio padrão e coeficiente de variação da recuperação do MPPA, demonstrando a precisão das medidas mesmo nos casos de baixa exatidão dos resultados.

Tabela 20. Dados da recuperação de MPPA em amostras água.

Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra*	Método ESI	Rec. (%)	DP	CV	n
10,0	AT	(-)	60,5	1,1	1,8	6
	AS	(-)	79,0	0,7	0,9	6
	AT	(+)	309,3	4,5	1,5	6
	AS	(+)	264,8	3,8	1,4	6
50,0	AT	(-)	78,3	0,8	1,0	6
	AS	(-)	92,8	2,3	2,4	6
	AT	(+)	263,3	5,6	2,1	6
	AS	(+)	216,7	6,9	3,2	6
500,0	AT	(-)	86,3	2,0	2,3	6
	AS	(-)	88,1	1,8	2,1	6
	AT	(+)	109,3	3,6	2,3	6
	AS	(+)	107,5	3,4	3,2	6

* Amostra: AT = Água superficial; AT = Água Tratada.

Embora o MPPA seja o composto mais sensível apresentando o limite de quantificação mais baixo dentre os compostos estudados, principalmente no modo positivo, um forte efeito de matriz foi observado. Com exceção ao nível de fortificação de $500,0 \mu\text{g L}^{-1}$, os outros dois níveis de fortificação em ambas as matrizes de água apresentaram valores elevados de recuperação. Provavelmente isto pode ser atribuído ao processo de ionização pois, o efeito de adição de sinal apenas no modo positivo foi verificado.

De uma maneira geral os quatro compostos podem ser analisados simultaneamente em amostras de água superficial e tratada sem nenhum preparo prévio da amostra. Apenas com a filtração das amostras, os quatro analitos foram analisados usando ionização por *electrospray* no modo de íons negativos sem a presença de efeito de matriz e, permitindo assim, o alcance de baixos limites de quantificação que atendam a diversas legislações.

No caso específico do composto GLIF, um limite de quantificação cinquenta vezes menor que o estabelecido na legislação nacional (Portaria 518) e setenta vezes menor que o limite estabelecido pela EPA, pode ser alcançado proporcionando a obtenção de um método analítico de alta rapidez, simplicidade e confiabilidade. Este mesmo limite alcançado para o composto GLIF usando ionização por *electrospray* no modo de íons negativos, também foi alcançado para os outros três analitos mas, ainda não há legislação vigente que estabeleça o limite máximo permitido para estes compostos em água.

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram:

- 1) A técnica de cromatografia líquida de fase reversa com ionização por *electrospray* (LC-ESI/MS/MS) é uma ferramenta analítica que permite a análise de Glifosato e AMPA em amostras de grãos de soja com limites de quantificação (S/R = 10) de 0,30 mg kg⁻¹ para GLIF e 0,34 mg kg⁻¹ para AMPA.
- 2) Todos os analitos empregados neste estudo podem ser ionizados em *electrospray* positivo e negativo independentemente da carga dos mesmos em fase líquida.
- 3) A melhor eficiência de ionização dos analitos foi obtida para soluções usando acetonitrila e água em ambos os modos de ionização quando comparado à ionização dos compostos dissolvidos em metanol e água.
- 4) A escolha do aditivo mais adequado ao *electrospray* apresentou relação direta com os mecanismos de associação e dissociação dos analitos. Os melhores aditivos para ionização dos compostos nos modos positivo e negativo foram o ácido acético e o hidróxido de amônio, respectivamente.
- 5) Com exceção do composto AMPA em modo de íons negativos, os analitos apresentam produtos de fragmentação específicos nos dois modos de ionização.
- 6) Os melhores aditivos a serem empregados na análise dos compostos em colunas de fase reversa são os aditivos alcalinos devido ao caráter básico dos analitos, os quais interagem com os grupos silanóis livre da fase estacionária quando eluídos em pH ácido.

7) O melhor solvente orgânico empregado na eluição cromatográfica do glifosato e do AMPA foi o metanol devido à baixa solubilidade destes compostos em acetonitrila.

8) A melhor alternativa para eliminação do efeito da matriz de soja na determinação dos compostos foi a construção da curva analítica em extratos de soja orgânica, precedida de extração sólido-líquido com partição em diclorometano e precipitação de proteínas com metanol.

10) A detecção simultânea de glifosato e AMPA, bem como de glufosinato e MPPA, empregando derivação pré-coluna dos analitos com FMOC-Cl é uma estratégia que pode ser utilizada entretanto, neste trabalho não foi totalmente investigada devido à dificuldade de sua padronização.

11) A determinação simultânea de GLIF, AMPA, GLUF e MPPA, sem interferência do efeito de matriz, em amostras de água superficial e tratada pode ser realizada no limite de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ por injeção direta da amostra no modo de íons negativos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ ASHCROFF, A. E. *Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry*. Cambridge, United Kingdom, Royal Society Chemistry, Analytical Spectroscopy Monographs, 1997.

² ROBB, D. B.; COVEY, T. R.; BRUINS, A. P. Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 72, n. 15, p. 3653-3659, 2000.

³ LAIKO, V. V.; BALDWIN, M. A.; BURLINGAME, A. L. Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization. *Analytical Chemistry*, v. 72, n. 4, p. 652-657, 2000.

⁴ LAIKO, V. V.; MOYER, S. C.; COTTER, R. J. Atmospheric pressure MALDI/ion trap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 72, n. 21, p. 5239-5243, 2000.

⁵ CHEN, H.; TALATY, N. N.; TAKÁTS, Z.; COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput analysis of pharmaceutical samples in the ambient environment. *Analytical Chemistry*, v. 77, n. 21, p. 6915-6927, 2005.

⁶ TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; COOKS, R. G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry and biology. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 40, p. 1261-1275, 2005.

⁷ TAKÁTS, Z.; COTTE-RODRIGUEZ, I.; TALATY, N.; CHEN, H.; COOKS, R. G. Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Chemistry Communications**, p. 1950-1952, 2005.

⁸ COTTE-RODRIGUEZ, I.; TAKÁTS, Z.; TALATY, N.; CHEN, H.; COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization of explosives on surfaces: sensitivity and selectivity enhancement by reactive desorption electrospray ionization. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 21, p. 6755-6764, 2005.

⁹ TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; GOLOGAN, B.; COOKS, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. **Science**, v. 306, p. 471-473, 2004.

¹⁰ CODY, R. B.; LARAMÉE, J. A.; DURST, D. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 8, p. 2297-2302, 2005.

¹¹ HIRABAYASHI, A.; SAKAIRI, M.; KOIZUMI, H. Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 24, p. 4557-4559, 1994.

¹² HIRABAYASHI, A.; SAKAIRI, M.; KOIZUMI, H. Sonic spray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 17, p. 2878-2882, 1995.

¹³ HIRABAYASHI, Y.; HIRABAYASHI, A.; TAKADA, Y.; SAKAIRI, M.; KOIZUMI, H. A sonic spray interface for the mass analysis of highly charged ions from protein solutions at high flow rates. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 9, p. 1882-1884, 1998.

¹⁴ TAKÁTS, Z.; NANITA, S. C.; COOKS, R. G.; SCHLOSSER, G.; VEKEY, K.; Amino acid clusters formed by sonic spray ionization. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 6, p. 1514-1523, 2003.

¹⁵ TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; GOLOGAN, B.; COOKS, R. G. Electrosonic spray ionization. A gentle technique for generating folded proteins and protein complexes in the gas phase and for studying ion-molecule reactions at atmospheric pressure. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 14, p. 4050-4058, 2004.

¹⁶ FAUBERT, D.; PAUL, G. J. C. GIROUX, J.; BERTRAND, M. J. Selective fragmentation and ionization of organic compounds using an energy-tunable rare-gas metastable beam source. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 124, n. 1, p. 69-77, 1993.

¹⁷ TSUCHIYA, M.; KUWABARA, H. Liquid ionization mass spectrometry of nonvolatile organic compounds. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 1, p.14-19, 1984.

¹⁸ TSUCHIYA, M. Liquid ionization mass spectrometry for studies of hydrogen-bonded clusters and of a mixture that contains non-volatile and less polar organic compounds. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 17, n. 1, p. 51-69, 1998.

¹⁹ TSUCHIYA, M. Development, principle and application of liquid ionization mass spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 14, p. 661-676, 1998.

²⁰ HIRAOKA, K.; FUJIMAKI, S.; KAMBARA, S.; FURUYA, H.; OKASAKI, S. Atmospheric-pressure penning ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 19, p. 2323-2330, 2004.

²¹ MCLUCKEY, S. A.; GLISH, G. L.; ASANO, K. G.; GRANT, B. C. Atmospheric sampling glow discharge ionization source for the determination of trace organic compounds in ambient air. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2220-2227, 1988.

²² NETO, J. G. A. B. **Deconvolução de padrões isotopoméricos obtidos de espectros de massas de baixa resolução para a obtenção de**

padrões isotópicos elementares. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

²³ SMITH, R. M.; BUSCH, K. L. ***Understanding Mass Spectra: A Basic Approach.*** New York, United States, John Wiley & Sons, Inc., 1999.

²⁴ BUSTILLOS, O. V.; SASSINE, A.; MARCH, R. ***A Espectrometria de Massas Quadrupolar.*** São Paulo, Brasil, Editora Scortecci, 2003.

²⁵ FUTRELL, J. H. Development of tandem mass spectrometry: one perspective. ***International Journal of Mass Spectrometry***, v. 200, p. 495-805, 2000.

²⁶ BUSCH, K. L.; GLISH, G. L.; MCLUCKEY, S. A. ***Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry.*** New York, United States, VCH Publisher Inc, 1988.

²⁷ SHUKLA, A. K.; FUTRELL, J. H. Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. ***Journal of Mass Spectrometry***, v. 35, p. 1069-1090, 2000.

²⁸ DOLE, M. MACK, L. L.; HINES, R. L.; MOBLEY, R. C.; FERGUSON, L. D.; ALICE, M. B. J. Molecular beams of macroions. ***Journal of Physical Chemistry***, v. 49, p. 2240, 1968.

²⁹ YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. ***Journal of Physical Chemistry***, v. 88, p. 4451-4671, 1984.

³⁰ VAN BERKEL, G. J.; MCLUCKEY, S. A.; GLISH, G. L. Eletrochemical origin of radical cations observed in electrospray ionization mass spectra. ***Analytical Chemistry***, v. 64, n. 14, p. 1586-1593, 1992.

³¹ XU, X.; NOLAN, S. P.; COLE, R. B. Electrochemical oxidation and nucleophilic addition reactions of metallocenes in electrospray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 66, n.1, p. 119-125, 1994.

³² COLE, R. **Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation and applications**. New York, United States, John Wiley & Sons, Inc., 1997.

³³ BLADES, A. T.; IKONOMOU, M. G.; KEBARLE, P. Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 19, p. 2109-2114, 1991.

³⁴ LOEB, L. B.; KIP, A. F.; HUDSON, G. G.; BENNETT, W. H. Pulses in negative point-to-plane corona. **Physical Review**, v. 60, p. 714-722, 1941.

³⁵ TAYLOR, G. I. Disintegration of water drops in an electric field. **Proceedings of the Royal Society of London, series A**, v. 280, p. 383-397, 1964.

³⁶ ZELENY, J. The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces. **The Physical Review**, v. 3, n. 2, p. 69-91, 1914.

³⁷ ZELENY, J. Instability of electrified liquid surfaces. **The Physical Review**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 1917.

³⁸ RAYLEIGH, L. **Philos. Mag.**, v. 14, p. 184-187, 1882.

³⁹ KEBARLE, P.; TANG, L. From ions in solution to ions in the gas phase. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 972A-986A, 1993.

⁴⁰ TANG, L.; KEBARLE, P. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Analytical Chemistry*, v. 65, n. 24, p. 3654-3668, 1993.

⁴¹ IRIBARNE, J. V.; THOMSON, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*, v. 64, n. 6, p. 2287-2294, 1976.

⁴² THOMSON, B. A.; IRIBARNE, J. V. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *The Journal of Chemical Physics*, v. 71, n. 11, p. 4451-4463, 1979.

⁴³ FENN, J. B. Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, v. 4, p. 524-535, 1993.

⁴⁴ KEBARLE, P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 35, p. 804-817, 2000.

⁴⁵ FENN, J. B. Electrospray wings for molecular elephants. *Nobel Lecture*, 2002.

⁴⁶ ANACLETO, J. F.; PLEASANCE, S.; BOYD, R. K. Calibration of ion spray mass spectra using cluster ions. *Organic Mass Spectrometry*, v. 27, n. 6, p. 660-666, 1992.

⁴⁷ WANG, G.; COLE, R. B. Effect of solution strength on analyte charge state distributions in positive and negative electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 66, n. 21, p. 3702-3708, 1994.

⁴⁸ NOHMI, T.; FENN, J. B. Electrospray mass spectrometry of poly(ethylene glycols) with molecular weights up to five million. ***Journal of The American Chemical Society***, v. 114, p. 3241-3246, 1992.

⁴⁹ BLADES, A. T.; PESCHKE, M.; VERKERK, U. H.; KEBARLE, P. Hydration energies in the gas phase of select $(MX)_mM^+$ ions, where $M^+ = Na^+, K^+, Rb^+, Cs^+, NH_4^+$ and $X^- = F^-, Cl^-, Br^-, I^-, NO_2^-, NO_3^-$. Observed magic numbers of $(MX)_mM^+$ ions and their possible significance. ***Journal of The American Chemical Society***, v. 126, n. 38, p. 11995-12003, 2004.

⁵⁰ AMARANTE-JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. ***Química Nova***, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

⁵¹ FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. Uptake, transport and metabolism of glyphosate in plants. ***Glyphosate: a unique global herbicide, ACS Monograph***, v. 189, p. 143-181, 1997.

⁵² JACOB, G. S.; GARBOW, J. R.; HALLAS, L. E.; KIMACK, N. M.; KISHORE, G. M.; SCHAEFER, J. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. ***Applied Environmental Microbiology***, v. 54, n. 12, p. 2953-2958, 1988.

⁵³ HOERLEIN, G. Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. ***Reviews of Environmental Contamination and Toxicology***, v. 138, p. 73-145, 1994.

⁵⁴ MALLAT, E.; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. ***Journal of Chromatography A***, v. 823, p. 129-136, 1998.

⁵⁵ **Índice Monográfico G01**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, disponível em www.anvisa.gov.br, acessado em Dezembro 2005.

⁵⁶ **Portaria 518**, Ministério da Saúde, 2004.

⁵⁷ Council Directive 98/83/EC **Official Journal of the European Communities**, 1998.

⁵⁸ BARCELÓ, D. Environmental Protection Agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water. **Journal of Chromatography A**, v. 643, n. 1, p. 117-143, 1993.

⁵⁹ GUINIVAN, R. A.; THOMPSON, N. P.; WHEELER, W. B. **Journal of Association Official of Analytical Chemistry**, v. 65, p. 35-42, 1982.

⁶⁰ GUINIVAN, R. A.; THOMPSON, N. P.; WHEELER, W. B. Verification of structures of chloroethyl N-Heptafluorobutyryl derivatives of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid by chemical ionization and electron impact mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 30, p. 977-982, 1982.

⁶¹ 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 A**, v. 637, n. 2, p. 167-173, 1993.

⁶² ALFERNESS, P. L.; IWATA, Y. Determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in soil, plant, animal matrices, and water by capillary gas chromatography with mass-selective detection. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2751-2759, 1994.

⁶³ ROYER, A.; BEGUIN, S.; TABET, J. C.; HULOT, S. S.; REDING, M. A.; COMMUNAL, P. Y. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic

acid residues in water by gas chromatography with tandem mass spectrometry after exchange ion resin purification and derivatization. Application on vegetable matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 16, 3826-3832, 2000.

⁶⁴ TSUJI, M.; AKIYAMA, Y.; YANO, M. Simultaneous determination of glufosinate and glyphosate in crops. **Analytical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 283-286, 1997.

⁶⁵ STALIKAS, C. D.; PILIDIS, G. A. Development of a method for the simultaneous determination of phosphoric and amino acid group containing pesticides by gas chromatography with mass-selective detection. Optimization of the derivatization procedure using an experimental design approach. **Journal of Chromatography A**, v. 872, p. 215-225, 2000.

⁶⁶ BOERJESSON, E.; TORSTENSSON, L. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. **Journal of Chromatography A**, v. 886, p. 207-216, 2000.

⁶⁷ MOYNE, H. A.; BONING, A. J. **Analytical Letters**, v. 12, p. 25-35, 1979.

⁶⁸ CARPINO, L. A.; HAN, G. Y. 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. **Journal of Organic Chemistry**, v. 37, p. 3404-3409, 1972.

⁶⁹ NEDELKOSKA, T. V.; LOW, G. K. C. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, p. 145-153, 2004.

⁷⁰ MALLAT, E.; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion

chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. ***Journal of Chromatography A***, v. 823, p. 129-136, 1998.

⁷¹ HOGENDOORN, E. A.; OSSENDRIJVER, F. M.; DIJKMAN, E.; BAUMANN, R. A. Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. ***Journal of Chromatography A***, v. 833, p. 67-73, 1999.

⁷² VREEKEN, R. J.; SPEKSNIJDER, P.; BOBELDIJK-PASTOROVA, I.; NOIJ, TH. H. M. Selective analysis of the herbicides glyphosate and amonimethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. ***Journal of Chromatography A***, v. 794, p. 187-199, 1998.

⁷³ LEE, E. A.; ZIMMERMAN, L. R.; BHULLAR, B. S.; THURMAN, E. M. Linker-assisted immunoassay and liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of glyphosate. ***Analytical Chemistry***, v. 74, n. 19, p. 4937-4943, 2002.

⁷⁴ IBÁÑEZ, M.; POZO, Ó. J.; SANCHO, J. V., LÓPEZ, F. J.; HERNÁNDEZ, F. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. ***Journal of Chromatography A***, v. 1081, p. 145-155, 2005.

⁷⁵ ANDRADE, C. T.; COUTINHO, F. M. B.; DIAS, M. L.; LUCAS, E. F.; OLIVEIRA, C. M. F.; TABAK, D. ***Dicionário de Polímeros***. Editora Interciência Ltda., 2001.

⁷⁶ ZHOU, S.; COOK, K. D. Protonation in electrospray mass spectrometry: Wrong-Way-Round or Right-Way-Round? ***Journal of The American Society for Mass Spectrometry***, v. 11, p. 961-966, 2000.

⁷⁷ IKONOMOU, M. G.; BLADES, A. T.; KEBARLE, P. Electrospray-ion spray: a comparison of mechanisms and performance. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 18, p. 1989-1998, 1991.

⁷⁸ TANG, L.; KEBARLE, P. Effect of the conductivity of the electrosprayed solution on the electrospray current. Factors determining analyte sensitivity in electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 23, p. 2709-2715, 1991.

⁷⁹ MORAES, M. C. B; LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

⁸⁰ WANG, G.; COLE, R. B. Effects of solvent and counterion on ion pairing and observed charge states of diquatery ammonium salts in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, v. 7, p. 1050-1058, 1996.

⁸¹ GOODWIN, L.; STARTIN, J. R.; GOODALL, D. M.; KEELY, B. J. Tandem mass spectrometric analysis of glyphosate, glufosinate, aminomethylphosphonic acid and methylphosphinicopropionic acid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 17, p. 963-969, 2003.

⁸² GOODWIN, L.; STARTIN, J. R.; GOODALL, D. M.; KEELY, B. J. Negative ion electrospray mass spectrometry of aminomethylphosphonic acid and glyphosate: elucidation of fragmentation mechanisms by multistage mass spectrometry incorporating in-source deuterium labelling. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 18, p. 37-43, 2004.

⁸³ ROSÉS, M.; OUMADA, F. Z.; BOSCH, E. Retention of ionizable compounds on high-performance liquid chromatography VII. Characterization of the retention of ionic solutes in a C₁₈ column by mass spectrometry with electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, v. 910, p. 187-194, 2001.

⁸⁴ COX, G. B.; STOUT, R. W. Study of the retention mechanism for basic compounds on silica under "pseudo-reversed phase" conditions. ***Journal of Chromatography A***, v. 384, p. 315-336, 1987.

⁸⁵ BILDINGMEYER, B. A.; DEL RIOS, J. K.; KORPI, J. Separation of organic amine compounds on silica gel with reversed-phase eluents. ***Analytical Chemistry***, v. 54, n. 3, p. 442-447, 1982.

⁸⁶ NAWROCKI, J. The silanol group and its role in liquid chromatography. ***Journal of Chromatography A***, v. 779, p. 29-71, 1997.

⁸⁷ ESPADA, A.; RIVERA-SAGREDO, A. Ammonium hydrogencarbonate, an excellent buffer for the analysis of basic drugs by liquid-chromatography-mass spectrometry at high pH. ***Journal of Chromatography A***, v. 987, p. 211-220, 2003.

⁸⁸ Commission Decision 2002/657/EC, **Official Journal of the European Communities**, L221, 8, 2002.

⁸⁹ BUHRMAN, D.; PRICE, P.; RUDEWICZ, P. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a study of ion suppression. ***Journal of The American Society for Mass Spectrometry***, v.7, p.1099-1105, 1996.

⁹⁰ MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Matrix effect in quantitative LC-MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. ***Analytical Chemistry***, v. 70, n. 5, p.882-889, 1998.

⁹¹ MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effects in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. ***Analytical Chemistry***, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.

⁹² KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, C.; OLAH, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. ***Journal of The American Society for Mass Spectrometry***, v. 11, p. 942-950, 2000.

⁹³ MÜLLER, C.; SCHÄFER, P.; STÖRTZEL, M.; VOGT, S.; WEINMANN, W. Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionization transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectral libraries. ***Journal of Chromatography A***, v. 773, p. 47-52, 2002.

⁹⁴ DAMS, R.; HUESTIS, M. A.; LAMBERT, W. E.; MURPHY, C. M. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. ***Journal of The American Society for Mass Spectrometry***, v. 14, p.1290-1294, 2003.

⁹⁵ TAYLOR, P. J. Matrix Effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. ***Clinical Biochemistry***, v. 38, p. 328-334, 2005.

⁹⁶ BONFIGLIO, R.; KING, R. C.; OLAH, T. V.; MERKLE, K. The effects of sample preparation methods on variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. ***Rapid Communications in Mass Spectrometry***, v. 13, n. 12, p.1175-1185, 1999.