

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO,
ETILENOTIOURÉIA E METAMIDOFÓS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA NO
MODO HILIC ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Monografia apresentada ao
Instituto de Química de São Carlos,
unidade da Universidade de São
Paulo para a obtenção do diploma
de Bacharelado em Química.

Aluno: Matheus Barraca

Orientador:
Prof.º Dr.º Álvaro José dos
Santos Neto

São Carlos, Dezembro de 2023.

Sumário

Agradecimentos.....	
Resumo.....	
Abstract.....	
1. Introdução.....	1
1.2 Objetivos	1
1.3 Glifosato	2
1.4 Contaminação por Glifosato	4
1.5 Outros Metabolitos de Pesticidas Polares	5
1.6 Métodos de Detecção de Glifosato, Glufosinato e seus Derivados.....	6
1.6.1 LC-MS/MS.....	7
1.6.2 GC-MS.....	10
2. Materiais e métodos	11
2.2 Equipamento	11
2.3 Analitos avaliados.....	11
3. Resultados e discussão.....	12
3.2 Glifosato	12
3.3 ETU e metamidofós.....	16
3.3.1 ETU	16
3.3.2 Metamidofós	17
4. Conclusões.....	19
5. Referências.....	20

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos professores, ao meu orientador Prof.º Dr.º Álvaro José dos Santos Neto, e a todo o Instituto de Química de São Carlos e a Universidade São Paulo, por todo o apoio necessário durante meu tempo de graduação. Aos meus pais e minha irmã, por toda ajuda que me proporcionaram chegar aqui. Aos meus amigos, por sempre estarem me incentivando a buscar o melhor. E ao Dr. Willian Garcia Birolli, pela ajuda na composição desse trabalho.

Resumo

Pesticidas a base de glifosato tiveram um aumento significativo de uso devido ao aumento das plantações resistentes a este princípio ativo ao redor do mundo. Em 2015, a IARC, Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, publicou uma monografia classificando o glifosato como potencialmente carcinogênico em humanos, apesar do fato de que alguns estudos publicados contestam esta toxicidade. Ainda assim, a preocupação em monitorar o glifosato no meio ambiente e em organismos vivos se mantém. Métodos analíticos foram desenvolvidos visando manter o monitoramento do glifosato, glufosinato e seus metabólitos em humanos e animais. Como o glifosato é muito solúvel em água e excretado na urina, esta matriz tornou-se o principal biomarcador de exposição para sua detecção. Estes métodos no geral utilizam cromatografia acoplada à espectrometria de massas, sendo diferenciados pelo preparo da amostra, material da coluna cromatográfica, fase móvel empregada e pelo tipo de identificação ao final do processo. Estas estratégias analíticas vêm se mostrando eficientes na identificação de glifosato em urina ao obter bons limites de quantificação, precisão e exatidão. Dessa forma, foi avaliada uma nota técnica para análise de glifosato utilizando uma coluna Torus DEA, também avaliando etilenotioureia e metamidofós, buscando obter cromatogramas com bons parâmetros de validação para o desenvolvimento de um método multiresíduo. O método apresentou um tempo de retenção adequado para o glifosato (4,8 minutos), entretanto os outros dois analitos avaliados eluíram em tempos curtos (0,6 minutos), praticamente no tempo morto. Quanto aos limites de quantificação, o método obteve $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o glifosato e aproximadamente $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o metamidofós. Quanto ao ETU, a razão sinal/ruído foi de 255, que representa um baixo limite de quantificação. Assim, os métodos revisados se mostraram eficientes na identificação e quantificação do glifosato, considerando que amostras reais possuem em torno de $0,001 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto a estratégia analítica sugerida precisa de alterações significativas considerando a instrumentação empregada, como procedimentos de derivatização visando obter melhores limites de quantificação. Quanto ao ETU e ao metamidofós, ambos não apresentaram tempos de retenção adequados para o estabelecimento de um método multiresíduo.

Abstract

Glyphosate-based herbicides have seen a significant increase in their use due to the increase in glyphosate-resistant crops around the world. In 2015, IARC, the International Agency for Research on Cancer, published a monograph classifying glyphosate as potentially carcinogenic in humans, although some published studies have contested this classification. However, the concern about monitoring glyphosate in the environment and living organisms remains. Analysis methods have been developed to monitor the action of glyphosate, glufosinate and their metabolites in humans and animals. Since glyphosate is very soluble in water and excreted in urine, this matrix became the main biomarker of exposure for its detection. These methods generally use chromatography coupled to mass spectrometry, being differentiated by sample preparation, chromatographic column material, mobile phase used and the type of identification at the end of the process. These analytical strategies show efficiency in identifying glyphosate in urine to obtain good limits of quantification, precision, and accuracy. In this way, a technical note for the analysis of glyphosate was evaluated using a Torus DEA column, also assessing ethylenethiourea and methamidophos, seeking to obtain chromatograms with good parameters for development of a multiresidue method. The method presented an adequate retention time for glyphosate (4.8 minutes), however the other two analytes eluted in short times (0.6 minutes), practically at dead time. Regarding the limits of quantification, the method obtained $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ for glyphosate and approximately $0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ for methamidophos. As for ETU, the signal-to-noise ratio was 255, which represents a low limit of quantification. Thus, the revised methods proved to be efficient in identifying and quantifying glyphosate, considering that real samples have around $0,001 \mu\text{g mL}^{-1}$, while the suggested analytical strategy requires significant changes considering the employed instrumentation, such as derivatization procedures aiming the obtention of better limits of quantification. As for ETU and methamidophos, both did not show adequate retention times for the establishment of a multi-residue method.

1. Introdução

Pode-se dizer que a era do manejo agrícola pelo emprego de herbicidas sintéticos começou após a Segunda Guerra Mundial com a introdução do 2,4-D (ácido diclorofenóxiacético). Mesmo com este princípio ativo estando há mais tempo disponível no mercado, a molécula simples do glifosato [N-(fosfonometil)glicina] passou a ser o mais importante herbicida do presente momento (DUKE; POWLES, 2008a).

Com a introdução de plantações resistentes a ação de herbicidas a base de glifosato (PRGs), no fim dos anos 90, houve uma alta nas vendas do glifosato. Atualmente, cerca de 90% das plantações de todo o mundo são PRGs, o que pode ser explicado pelo ótimo retorno financeiro recebido pelos agricultores ao usá-las (DUKE; POWLES, 2008b).

Entre os produtos em que mais se utiliza este herbicida estão a soja, o milho e a beterraba. De maneira que estas foram as plantas nas quais mais variantes resistentes ao glifosato foram empregadas ao longo dos anos. Fazendas nos Estados Unidos utilizaram soja tolerante a herbicidas (TH) em 93% das plantações em 2013. Para o milho, a porcentagem foi de 85% de milho de TH nas plantações. Já para a beterraba, 95% da área das plantações recebeu beterraba resistente ao glifosato (ISAAA, 2011).

1.2 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação de métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massas desenvolvidos para determinação de glifosato em urina, revisando os parâmetros obtidos para a validação dos mesmos. Também busca-se o desenvolvimento de um método multiresíduo utilizando uma coluna Torus DEA para determinação dos pesticidas glifosato, etilenotioréia e metamidofós baseado na cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Por meio do uso de cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) e avaliando os limites de quantificação (LOQs) e tempos de retenção obtidos.

1.3 Glifosato

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (US EPA), pesticidas são quaisquer substâncias usadas com o propósito de repelir, destruir, prevenir, regular ou controlar pragas, tais como ervas daninhas, insetos, roedores e até mesmo infecções microbianas (TAYLOR E.L.; HOLLEY A.G.; KIRK M., 2007).

Os herbicidas são os agrotóxicos mais consumidos no Brasil, correspondendo entre 2009 e 2019 a uma média de 58% das vendas totais no território nacional. Dentre eles, o herbicida recordista foi o glifosato (GLYP), e os chamados “herbicidas a base de glifosato”, que corresponderam a 61% das vendas de herbicidas e a 35% das vendas totais de agrotóxicos no país (IBAMA, 2020).

Esta molécula possui excelente função herbicida e ajuda a melhorar o rendimento de diversas colheitas, principalmente de grãos como cereais (trigo, cevada, aveia, milho, sorgo), oleaginosas (soja e canola), leguminosas (feijões, ervilhas, grão-de-bico, lentilhas) e pseudocereais (trigo-sarraceno e quinua) (XU et al., 2019).

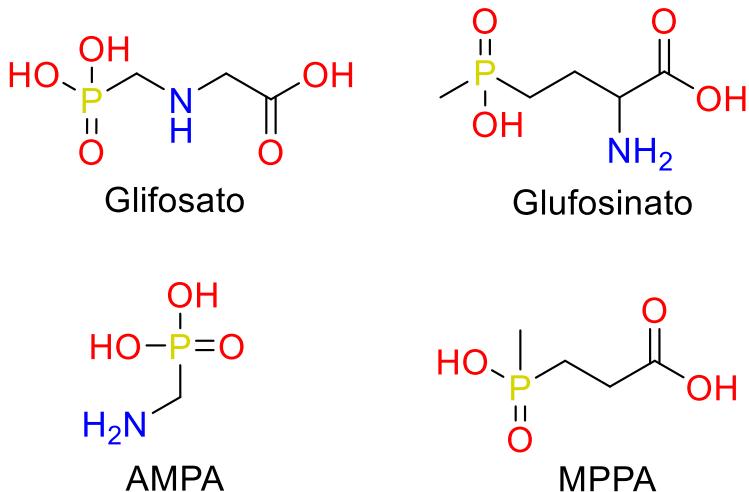
O glifosato se trata de uma molécula pequena (sua massa molecular é de 169,07 g mol⁻¹), não-volátil e polar. Pode existir em diferentes estados iônicos a depender do pH do meio, já que tanto o ácido fosfônico de uma extremidade quanto o ácido carboxílico da outra podem ser ionizados, assim como a amina central pode ser protonada (BRESSÁN et al., 2021).

Outro herbicida comumente utilizado como co-formulante do glifosato é o glufosinato (GLUF), que assim como o GLYP, se trata de um herbicida de largo espectro e alta eficiência muito utilizado em terras cultivadas e não-cultivadas. Sua interação com as ervas daninhas se dá pela inibição irreversível da enzima glutamina sintase que leva a um excessivo acúmulo de amônia e acaba levando as plantas à morte (XU et al., 2019).

O ácido aminometilfosfônico (AMPA) se trata do principal produto de degradação do glifosato. É quimicamente similar ao glifosato e tem propriedades similares em termos de comportamento ambiental e toxicidade. A molécula também é polar e tem boa solubilidade em água, de maneira que frequentemente é mais detectada no meio ambiente do que o próprio glifosato (LEWIS et al., 2016). Além do AMPA, o MPPA (ácido 3-metilfosfinicopropionico) também se trata de um metabólito muito comum do GLYP e GLUF (OHARA et al., 2021).

Assim, as moléculas citadas de GLYP, GLUF e AMPA são muito parecidas em se tratando de seus grupos funcionais, diferenciando-se apenas em algumas ligações na cadeia carbônica, como pode ser observado na figura 1.

Fig. 1 - Moléculas de GLYP, GLUF, AMPA e MPPA



Fonte: De autoria própria

A primeira síntese do glifosato se deu por Henri Martin, em uma pequena empresa farmacêutica na Suíça (Cilag), mas neste período a molécula não foi testada e nem mesmo patenteada para o uso como herbicida. Seu primeiro teste como herbicida e, logo após, sua patente, se deu nos anos 70, por John E. Franz, da Monsanto Company. O herbicida chegou oficialmente aos mercados, na forma de sal de isopropilamina de glifosato, em 1974 (DUKE; POWLES, 2008). Seu potencial herbicida se dá pela sua eficiência em inibir a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) da via metabólica do chiquimato (DUKE, S.O. 1988).

Não é exatamente claro como a inibição da via metabólica do chiquimato consegue matar as ervas daninhas. É assumido que a insuficiência na produção de aminoácidos aromáticos é o efeito primário. Outros pesquisadores destacam evidências sobre o aumento do fluxo de carbono para a via metabólica do chiquimato inibindo a EPSPS, resultando na escassez de carbono para outras vias (SIEHL, 1997). Além disso, a EPSPS é responsável pela biogênese do ácido corísmico, um intermediário na síntese de aminoácidos aromáticos (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Além destas hipóteses, é dito que, ao agir diretamente nas reações do chiquimato, o glifosato impede a síntese de importantes aminoácidos aromáticos para as plantas, como fenilalanina, tirosina e triptofano. Este mecanismo de ação também sugere que o glifosato

não seria agressivo ao organismo humano, já que ele não possui a enzima EPSPS (ATSDR, 2020).

O glifosato também é responsável por afetar processos fitoquímicos e fisiológicos das plantas, levando à redução de taxas fotossintéticas, degradação da clorofila, assim como a inibição e oxidação do hormônio regulatório das plantas, a auxina, responsável pelo crescimento delas. Isso é auxiliado pela facilidade que o herbicida tem de se locomover ao longo de todos os tecidos das plantas, desde a parte mais externa das folhas até os órgãos internos e raízes, resultado de suas propriedades físico-químicas (GEIGER; SHIEH; FUCHS, 1999).

Adicionalmente à suas propriedades como herbicida, o glifosato é um agente quelante que pode formar complexos estáveis com cátions divalentes em soluções aquosas. Esse fenômeno foi estabelecido em análises de água do meio ambiente (FREUZE et al., 2007) e é de grande importância para a matriz de urina que consiste primariamente de água, solutos orgânicos e íons inorgânicos (XU et al., 2019).

Quanto à sua absorção no solo, o glifosato consegue ser amplamente e facilmente absorvido quando comparado com outros herbicidas, o que se dá por conta do seu caráter poliprótico presente nos seus três grupos funcionais (amino, fosfônico e carboxílico) (GILL; SETHI; MOHAN, 2017). Sua dessorção é bastante dificultada, pois a taxa de dessorção sempre é inversamente proporcional à taxa de absorção. Adicionalmente, a taxa de absorção pode aumentar com a diminuição do pH do solo. A dessorção gira em torno de 5-24% dependendo do tipo de solo, o que deixa pouco do glifosato disponível para ser absorvido pelas plantas e interagir com cátions metálicos. Os metais com os quais o glifosato pode formar quelatos e complexos são Cu e Zn (mais fortemente), Fe, Ca, Mg e Mn (GILL et al., 2017).

1.4 Contaminação por Glifosato

Em 2015, a IARC (International Agency for Research on Cancer, em português Agência Internacional para Pesquisa em Câncer), classificou o glifosato como “provavelmente carcinogênico em humanos”, o que foi baseado em evidências experimentais limitadas de câncer em humanos e evidências suficientes de câncer em animais (IARC, 2015).

Porém, um estudo realizado por Colin Berry (BERRY, 2020) onde foram avaliadas algumas pesquisas acerca da ocorrência de câncer em algumas espécies de ratos, foi

mostrado que não há evidência estatística o suficiente para se concluir que há um aumento do potencial carcinogênico nos mesmos, mostrando que a monografia apresentada pela IARC pode estar equivocada ou desatualizada, sugerindo que não há carcinogenicidade comprovada. Além dele, Greim et al., após revisar 14 estudos sobre carcinogenicidade informando decisões regulatórias, chegou à conclusão de que o glifosato não representa preocupações no que diz respeito ao potencial cancerígeno em humanos (GREIM et al., 2015).

Pode-se notar uma contradição entre estudos realizados e a própria monografia da IARC, a qual mostra a constante dúvida sobre o efeito prejudicial ao organismo humano, ou se os agricultores e consumidores estão seguros ingerindo quantidades maiores que o limite máximo de resíduo permitido (GLYPHOSATE | TOXICOLOGICAL PROFILE | ATSDR, 2019).

Em 2018, foi realizada uma revisão acerca da toxicidade em humanos e animais para este herbicida por Gill et al, onde todos os processos do glifosato foram descritos em detalhe, desde a sua absorção pelos tecidos das plantas, pelo solo, seu perfil toxicológico e sua toxicidade em animais e humanos. Quanto a toxicidade nos animais, foi realizada uma descrição em detalhes para cada espécie (GILL et al., 2017).

Em se tratando dos humanos, é dito que, por ser um herbicida solúvel em água, o glifosato se acumula em aquíferos e no solo, os quais são a porta de entrada para o mercado alimentício. É mostrado que, em 2011, o Departamento de Agricultura dos EUA divulgou que em 90,3% de 300 amostras analisadas de soja houve detecção de glifosato, com concentração média de $1,9 \mu\text{g mL}^{-1}$. Também foi detectada a presença de AMPA em 95,7% das amostras de soja na concentração média de $2,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Assim, a presença do glifosato e seus metabólitos na comida se mostram uma séria ameaça à saúde humana (GILL; SETHI; MOHAN, 2017).

1.5 Outros Metabolitos de Pesticidas Polares

Etilenotioréia (ETU) se trata de uma molécula proveniente dos fungicidas da classe dos ditiocarbamatos (DTC), os quais são conhecidos por serem de amplo espectro, sendo utilizados na agricultura como fungicida. Exemplos desses fungicidas incluem Ziram, Maneb e Mancozeb, e as plantações que mais o recebem são os vinhedos, plantações de batatas e a indústria da floricultura. Após o contato de DTC com

organismos em geral, além de processos ambientais, ocorre a formação do ETU, principal metabólito formado em plantas e mamíferos (STADLER et al., 2022).

Sabe-se que o ETU pode causar distúrbios na tireoide, defeitos durante o nascimento e câncer, como foi visto em animais em laboratório, além de efeitos genotóxicos. Embora ensaios supervisionados com DTC's tenham revelado que não ocorre a acumulação de ETU no organismo por conta de sua excreção, o processamento de produtos agrícolas contendo estes princípios ativos pode aumentar os níveis deste metabólito tóxico. Dessa forma, é importante manter o monitoramento de resíduos de ETU no organismo (ZHOU et al., 2013).

Os organofosfatos são ésteres de ácido fosfórico e a base de muitos pesticidas e agentes neurotóxicos. Um desses inseticidas organofosfatos se trata do metamidofós (O,S-dimetil fosforamidotiolato) (ORTEGA-OLVERA et al., 2018). É um pesticida não-seletivo utilizado extensivamente no controle de uma larga gama de insetos e um potente inibidor da acetilcolinesterase que controla a população de insetos e aranhas em plantas ornamentais, frutas cítricas e outras plantações (WEI et al., 2009). O metamidofós é classificado como um pesticida de classe IV de alta toxicidade pela OMS. Ele age ao inativar por fosforilação de resíduos de serina dos sítios ativos da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. Sua função também se deve pelo bloqueio complexo de receptores de acetilcolina nicotínica neuronal e pela inibição da carboxilase nas células (LIN et al., 2020).

Por conta de sua fácil absorção e solubilidade, grandes quantidades do pesticida permanecem nos campos e na água de irrigação. Assim, o tratamento biológico da água contaminada se mostra um método eficiente e viável. Ainda assim, mantém-se a importância do biomonitoramento do metamidofós nos organismos devido aos seus efeitos de saúde. Adicionalmente, o metamidofós recebe destaque em biomonitoramento por ser um dos principais metabólitos dos pesticidas organofosforados em geral (ZHANG et al., 2020).

1.6 Métodos de Detecção de Glifosato, Glufosinato e seus Derivados

Existe uma grande importância na determinação não apenas do glifosato, mas também de seus metabólitos para análises de toxicidade, ponto de forte interesse na química analítica. As técnicas de detecção existentes incluem a eletroforese capilar (CE),

cromatografia líquida com detecção de fluorescência (LC-FLD) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) (CHEN et al., 2019).

Uma estratégia importante na análise destes compostos é a derivatização, já que por conta da alta polaridade e baixa volatilidade, existe uma certa dificuldade em se separar estas moléculas por cromatografia líquida ou gasosa. Tal passo já foi muito utilizado, porém atualmente, são reportados métodos que procuram ser otimizados a ponto de não serem necessárias derivatizações. Na literatura, é possível encontrar métodos de derivatização utilizando N-acetyl e O-metil com ácido acético e trimetil ortoacetato, também foram descritos procedimentos de derivatização com N-metil-N-terc-butil-dimetilsililtrifluoroacetamida ou cloreto de p-toluenossulfonila. Porém, é importante destacar que tais métodos com frequência apresentam alta complexidade e aumento do tempo de preparo de amostra (OHARA et al., 2021).

Existem diferentes tipos de biomarcadores de exposição com correspondência geral ou específica a contaminantes conhecidos. No entanto, muitos deles são adaptáveis a novos derivados de ingredientes ativos. Nessa questão, diferentes classes químicas podem ser enfatizadas, tais como glifosato e 2,4-D, os quais são frequentemente detectadas em urina, assim como seus respectivos metabólitos AMPA e 2,4-diclorofenol. Enquanto o paraquat é excretado sem modificações, outros ingredientes ativos como carbofurano, mancozeb, cipermetrina, clorpirifós e acetamiprid são monitorados em seres humanos por meio de seus metabólitos que são considerados biomarcadores de exposição (JOHN; THIERMANN, 2021).

1.6.1 LC-MS/MS

Glifosato e seus metabolitos têm sido o foco de um intenso debate sobre seus efeitos carcinogênicos desde que a IARC publicou seu relatório classificando a substância como provável carcinogênico em humanos (grupo 2A). Em contradição, muitos autores consideram glifosato como não carcinogênico e seguro para os humanos, promovendo uma busca por novas informações na qual os equipamentos do tipo LC-MS/MS têm desempenhado papel fundamental para a determinação de resíduos deste princípio ativo.

1.6.1.1 UPLC-ESI-TQ

O glifosato, seu metabólito AMPA e seu derivado glufosinato podem ser quantificados pelo método UPLC-ESI-TQ desenvolvido por Ohara et al., sem a necessidade de qualquer tipo de extração após a derivatização com acetato/anidrido acético e ortoacetato de trimetila, os quais promovem reações de metilação e acetilação. Foram observados limites de quantificação (LOQs) de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$, exatidão de 80-111%, precisão de 1-13% e 65-140% de efeito matriz (ME), dados que podem ser observados na tabela 1. Além disso, os ácidos (\pm)-2-amino-4-fosfonobutírico e DL-2-amino-5-fosfonopentanóico tiveram desempenhos similares ao glifosato quando utilizados como padrões internos (IS), se tornando alternativas com melhor custo-benefício (OHARA et al., 2021).

Já na derivatização com FMOC-Cl (cloreto de fluorenilmetiloxicarbonila), que também foi avaliada na determinação de glifosato e AMPA, foram obtidos limites de quantificação de 0,001 e $0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, exatidão de 104-119%, precisão de 5-13% e 19-23% de ME (tabela 2). Além disso, o método foi aplicado para 20 agricultores, onde um dos participantes apresentou $0,002 \mu\text{g mL}^{-1}$, um valor consistente para medidas realizadas em dias de pulverização com os herbicidas (MARTIN-REINA et al., 2021). A reação entre a molécula de glifosato e do FMOC-Cl que ocorre na derivatização é representada na figura 2.

Tabela 1 – Parâmetros do método de UPLC-ESI-TQ (OHARA et al., 2021).

Configuração	Condição
Derivatização	Acetato/anidrido acético e ortoacetato de trimetila
LOQs	0,05 µg mL ⁻¹
Exatidão	80-111%
Precisão	1-13%
ME	65-140%
IS	Ácido (±)-2-amino-4-fosfonobutírico e DL-2-amino-5-fosfonopentanoico
Solventes da Fase Móvel	Ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila (B) (condição 1); Formato de amônio 10 mM (A) e formato de amônio 200 mM/acetonitrila (B).

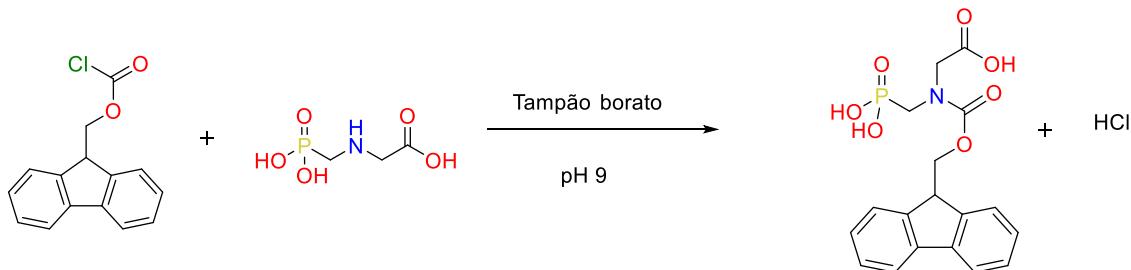
Fonte: De autoria própria.

Tabela 2 – Parâmetros do método de derivatização com FMOC-Cl (MARTIN-REINA et al., 2021)

Configuração	Condição
Derivatização	FMOC-Cl
LOQs	0,001 (GLY) e 0,0005 (AMPA) µg mL ⁻¹
Exatidão	104 – 119%
Precisão	5 – 13%
ME	19 – 23%
IS	-
Solventes da Fase Móvel	Acetato de amônio 10 mM em água (A) e acetonitrila em água (95:5, v/v) + acetato de amônio 10 mM).

Fonte: De autoria própria

Fig. 2 - Reação de derivatização do glifosato com FMOC-Cl



Fonte: De autoria própria

1.6.1.2 UPLC – Orbitrap

Outra abordagem para determinação de glifosato e AMPA aplicou espectrometria de massas de alta resolução com detecção por espectrômetro de massas do tipo Orbitrap (UPLC-Orbitrap) com separação de fase induzida por baixas temperaturas e DPX (Dispersive Pipette Xtraction) hidrofílica, resultando em uma exatidão de 78-110%, precisão de 3-9%, e 4-7% de ME, com limites de quantificação de $6,0 \times 10^{-6}$ - $2,5 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os LOQs apresentados podem ser considerados altos, desde que as medianas de em torno de $1,0 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ são frequentemente observadas, entretanto, sistemas analíticos mais recentes podem ser explorados (CHEN et al., 2019).

Tabela 3 – Parâmetros do método de UPLC – Orbitrap (CHEN et al., 2019)

Configuração	Condição
Derivatização	-
LOQs	$0.006 \mu\text{g mL}^{-1}$
Exatidao	76 – 110%
Precisão	3 – 14%
ME	4 – 7%
IS	$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -GLY
Solventes da Fase Móvel	Acetonitrila em água (20:80 v/v) com ácido fórmico 0,1%.

Fonte: De autoria própria

1.6.2 GC-MS

No trabalho de Saito et al. foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS. A avaliação procurou determinar o teor do ácido aminofosfônico, glifosato, glufosinato e os pesticidas organofosfatos fenitrotion, malation e fontoato. Foram determinados LOQs de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os organofosfatos e $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o glifosato e glufosinato com exatidão de 97-110% e precisão de 6-13%. Embora a exatidão obtida seja adequada, a recuperação de massa foi em torno de 5%. Os mesmos autores também avaliaram o mesmo método, mas utilizando uma coluna monolítica TiO-C18 para os mesmos analitos (SAITO et al., 2011).

Tabela 4 – Parâmetros do método de GC-MS (SAITO et al., 2011)

Configuração	Condição
Derivatização	MTBSTFA + 1% TBDMCS
LOQs	0.5 µg mL ⁻¹ (GLY)
Exatidão	97 – 110%
Precisão	4 – 14%
ME	Não observado
IS	APPA
Gás de Arraste	He

Fonte: de autoria propria

2. Materiais e métodos

2.2 Equipamento

A Análise foi realizada por cromatografia líquida de ultra-performance acoplada à espectrometria de massas tandem em um sistema Waters Acquity UPLC-Xevo TQ MS 2008 empregando uma coluna Torus DEA (130A, 1,7 µm, 2.1 mm x 100 mm). As fases móveis utilizadas foram água com formiato de amônio (50 mM) e ácido fórmico 0,9% (fase móvel A) e acetonitrila com ácido fórmico 0,9% (fase móvel B).

2.3 Analitos avaliados

O glifosato foi adquirido da Sigma Aldrich com pureza de 99,7%. Etilenotiureia adquirido da Supelco com pureza de 98,4%, Paraquat da Sigma Aldrich com pureza de 99,4% e Metamidofos da ChemCruz com pureza de 98%.

3. Resultados e discussão

3.2 Glifosato

A massa molecular do glifosato é de 168 g/mol, o que pode ser observado ao realizar um SCAN no padrão de 10 µg mL⁻¹ de glifosato em água. Inicialmente, foi utilizado o próprio método fornecido pela Waters para a coluna Torus DEA. O método, descrito em uma nota de aplicação descreve os parâmetros necessários para a determinação de glifosato, glufosinato e seus metabólitos em soja. As condições cromatográficas foram apresentadas na tabela 5 e demais parâmetros do método na tabela 6 e 7 (WATERS, 2019).

Tabela 5: Condições cromatográficas para a determinação inicial de glifosato (WATERS, 2019).

Configuração	Condição
Fase Móvel A	Água deionizada com formiato de Amônio (50 mM) + ácido fórmico (0,9%)
Fase Móvel B	Acetonitrila + ácido fórmico (0,9%)
Taxa de Vazão	0,5 mL/min
Volume de Injeção	5 µL
Temperatura da Coluna	50°C
Temperatura da Amostra	10°C
Tempo da Corrida	16 min

Fonte: De autoria própria

Tabela 6: Gradiente de fase móvel empregado para a análise de glifosato.

Tempo (min)	%A	%B	Curva
0.00	10.0	90.0	-
2.00	60.0	40.0	2
5.00	90.0	10.0	6
8.50	90.0	10.0	6
9.50	10.0	90.0	6
16.00	10.0	90.0	6

Fonte: Waters

Tabela 7: Condições espectrométricas para a análise (WATERS, 2019)

Configuração	Condição
Ionização	ESI-
Voltagem do Capilar	2.5 kV
Limite de Contagem de Íons	250
Temperatura de Dessolvatação	600°C
Fluxo de Gás da Dessolvatação	1000 L/Hr
Temperatura da Fonte	150°C
Fluxo de Gás do Cone	300 L/Hr
Fluxo do Gás de Colisão	0.14 mL/min
Pressão do Gás Nebulizador	7 Bar

Fonte: De autoria própria

Após a análise utilizando $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de uma solução padrão de glifosato preparada no laboratório foi possível chegar as melhores transições com as suas respectivas voltagens de cone e energias de colisão otimizadas (Tabela 8).

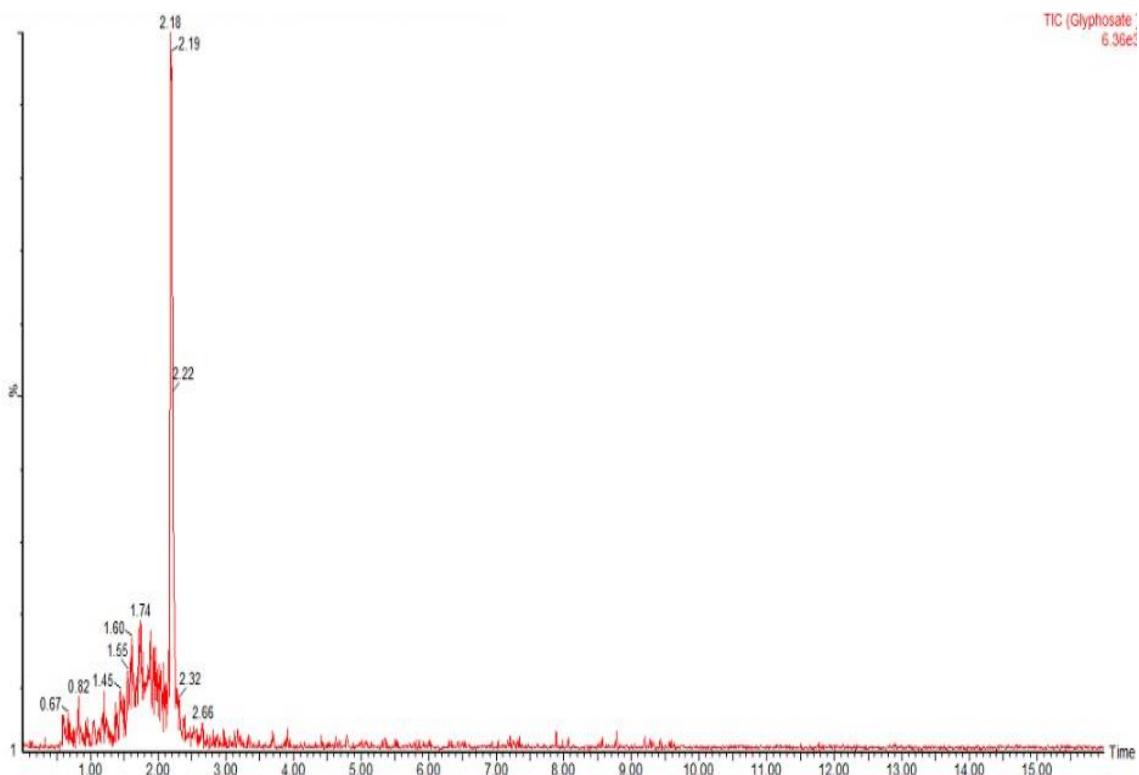
Tabela 8: Melhores transições para o glifosato com voltagem de cone e energia de colisão otimizadas.

Transição (m/z)	Voltagem de Cone (V)	Energia de Colisão (V)
168 --> 62,9	20	18
168 --> 78,8	20	24
168 --> 80,9	20	15
168 --> 93,8	20	23
168 --> 109,9	20	18
168 --> 123,9	20	11
168 --> 149,8	20	9

Fonte: De autoria própria

Com a voltagem de cone e as energias de colisão otimizadas foi feita uma corrida cromatográfica com uma amostra padrão de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, que apresentou pico (1.23e4) aos 2,2 minutos (Figura 3), nos fornecendo este tempo de retenção para o método em questão. Tal concentração apresentou uma relação sinal ruído de 9 necessária para obtenção do limite de quantificação. Portanto, o LOQ do glifosato foi de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Fig. 3: Cromatograma obtido na análise de glifosato $1 \mu\text{g mL}^{-1}$



Fonte: De autoria própria

Este método não apresentou limites de quantificações praticáveis para a determinação destes compostos em urina, uma vez que mesmo empregando técnicas como Extração de Fase Sólida seguida por concentração do eluato, não seria possível alcançar o limite de quantificação usualmente necessário de $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$, uma vez que seria necessária uma concentração de 1000x, a qual resultaria em um efeito matriz forte, já que outros componentes presentes na urina, como ureia e algumas proteínas, também se tornariam mais concentrados, gerando maior alterações e distorções durante as análises. Dessa forma, fez-se necessária uma otimização do método cromatográfico visando melhores LOQ.

O método cromatográfico apresentava picos alargados, além de uma oscilação de linha de base que se assemelha a um fronte que aparece antes do pico no cromatograma, o que prejudicava a qualidade dos dados obtidos, fazendo-se necessária uma alteração no método, visando um tempo de retenção maior para o glifosato. O gradiente de fase móvel foi otimizado por meio de alterações na primeira parte da corrida cromatográfica, como pode ser observado na tabela 9. Logo, foi mantida a concentração inicial de 90% B como razão inicial, porém foi adicionada uma curva com concentração final de 90% B em 5.0.

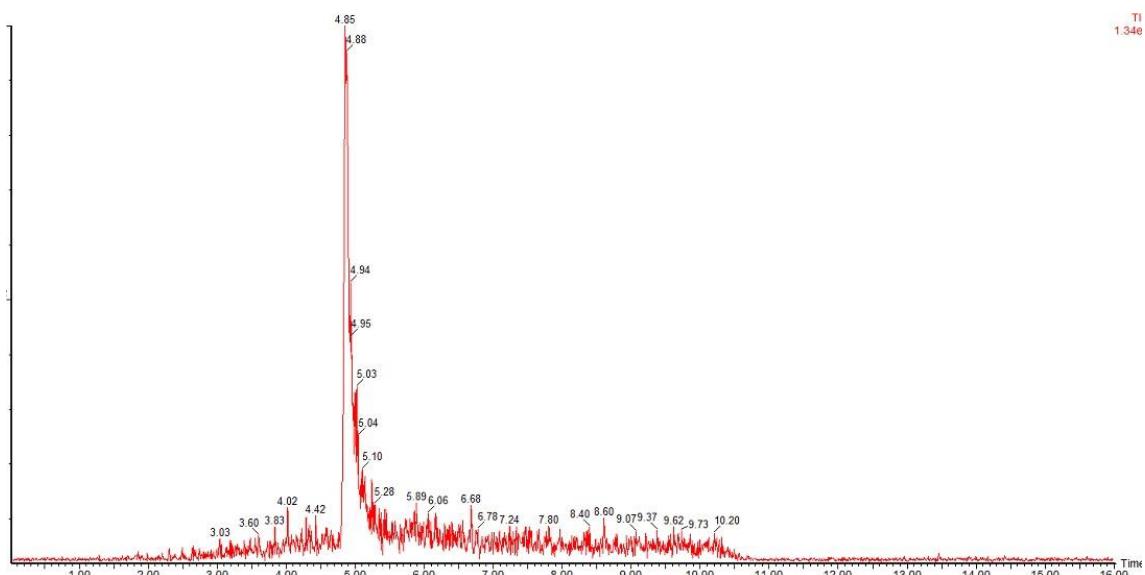
Resultando em um tempo de retenção de 4.8 min, com um LOQ de $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 4).

Tabela 9: Gradiente de fase móvel proposto.

Tempo (min)	%A	%B	Curva
0.00	10.0	90.0	-
5.00	90.0	10.0	6
8.50	90.0	10.0	6
9.50	10.0	90.0	6
16.0	10.0	90.0	6

Fonte: De autoria própria

Fig. 4: Cromatograma obtido na análise de glifosato $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$

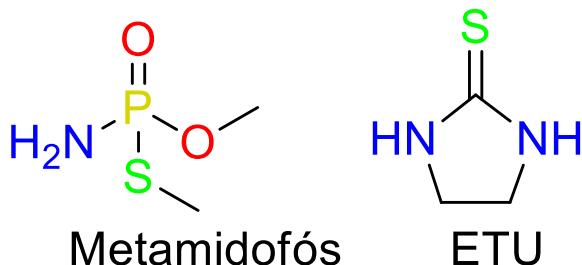


Fonte: De autoria própria

3.3 ETU e metamidofós.

Posteriormente, outros analitos de caráter polar foram avaliados em soluções padrão preparadas em água, assim como o glifosato. Os analitos foram etilenotioréia e metamidofós, que têm suas moléculas apresentadas na figura 5.

Fig. 5: Moléculas dos analitos metamidofós e ETU.



Fonte: De autoria própria.

3.3.1 ETU

Através de um SCAN do padrão preparado de etilenotioréia 10 µg mL⁻¹ foi possível encontrar o *m/z* 103 g mol⁻¹ para a molécula. Analisando os íons produto deste precursor, as melhores transições foram obtidas junto das voltagens de cone e energias de colisão ideias para cada uma, Tabela 10.

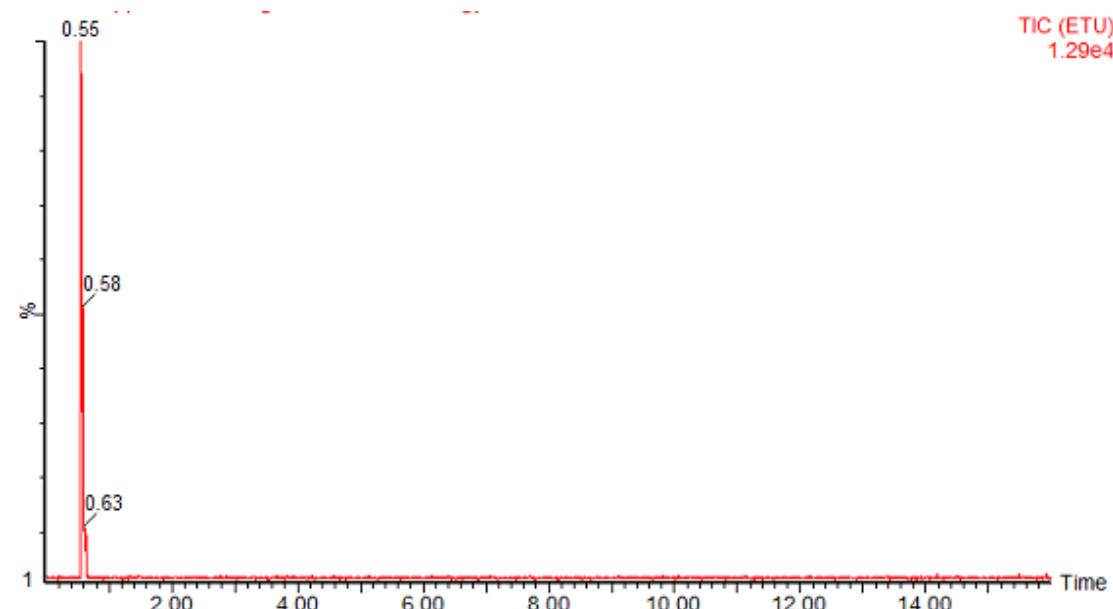
Na análise de uma solução padrão de ETU 1 µg mL⁻¹, foi obtido um cromatograma com relação sinal/ruido de 255, indicando que o método analítico proporcionaria um baixo LOQ instrumental. Para essa concentração e com o método utilizado, o tempo de retenção foi de 0.6 min, que está praticamente no tempo morto, indicando que o analito não foi retido pela coluna. De maneira que os interferentes da matriz dificultariam a determinação deste analito.

Tabela 10: Melhores transições para análise do ETU com voltagem de cone e energia de colisão otimizadas.

Transições (m/z)	Voltagem de Cone (V)	Energia de Colisão (V)
103 --> 60	32	21
103 --> 70	21	30
103 --> 76	33	11
103 --> 86	29	18

Fonte: De autoria própria

Fig. 6: Cromatograma obtido na análise de ETU $1 \mu\text{g mL}^{-1}$



Fonte: De autoria própria

3.3.2 Metamidofós

Assim como para os outros analitos, foi realizada uma análise SCAN para o Metamidofós $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, onde foi observado o m/z precursor de 142, posteriormente foi realizada a análise de íons produto para a definição das melhores transições para o MRM, o qual teve a voltagem de cone e energia de colisão otimizadas, tabela 11:

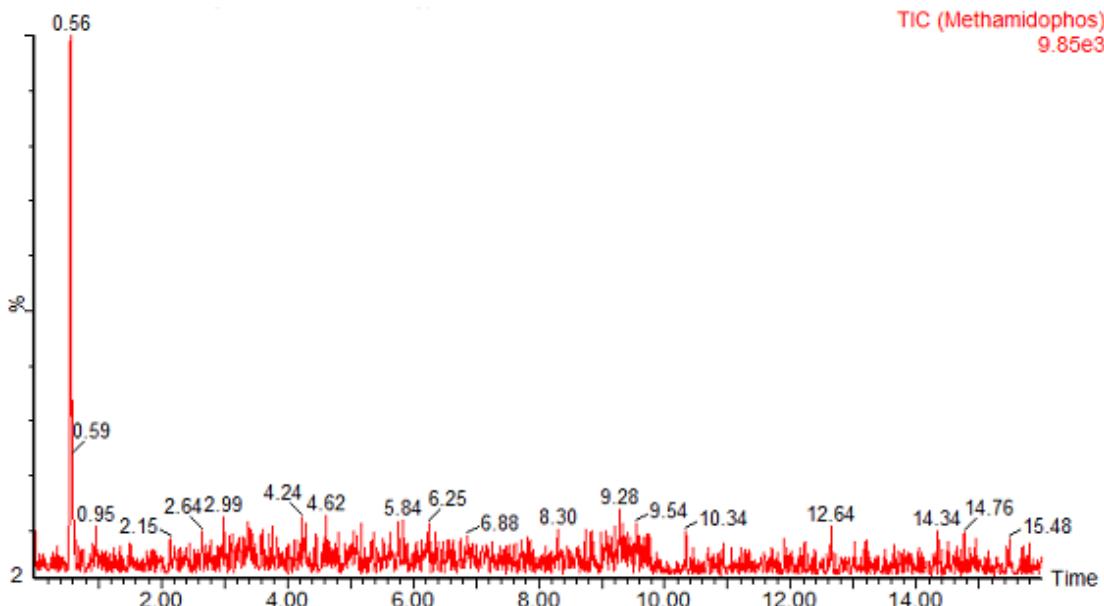
Tabela 11: Melhores transições para o metamidofós com voltagem de cone e energia de colisão otimizadas.

Transições (<i>m/z</i>)	Voltagem de Cone (V)	Energia de Colisão (V)
142 --> 64	21	24
142 --> 78,8	19	21
142 --> 93,9	21	16
142 --> 109,9	21	14
142 --> 124,9	20	13

Fonte: De autoria própria.

Para uma corrida utilizando a voltagem de cone e a energia de colisão refinados com concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, o tempo de retenção para o metamidofós foi de 0,6 min. Utilizando a ferramenta de sinal ruído, foi obtido um valor de 11.1 para a concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando que este é um valor muito próximo ao LOQ instrumental e, supondo uma relação com um sinal/ruído de 9, nos dá um LOQ de $0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$. O tempo de retenção observado está próximo ao volume de tempo morto, logo o analito não foi retido pela coluna de maneira apreciável.

Fig. 7: Cromatograma obtido na análise de Metamidofós 1 ng.mL^{-1}



Fonte: De autoria própria

Uma nota técnica forneceu informações sobre possíveis analitos que poderiam ser analisados cromatograficamente empregando a mesma estratégia com a coluna Torus DEA (WATERS, [2020]), como N-Acetyl glufosinato, N-acetyl glifosato, glufosinato, MPPA, etefão, hidróxido de etefão, hidrazida maleica, fosetil-Al, Ampa, perclorato,

clorato e ácido fosfônico. De maneira a sugerir que outros compostos de interesse também poderiam ser analisados no mesmo método, neste caso metamidofós e ETU foram os objetos do estudo.

As análises realizadas indicaram que os LOQs instrumentais para o glifosato e o metamidofós seriam muito elevados em comparação à concentração frequentemente encontradas na urina da população geral, cerca de $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$. Adicionalmente, a coluna Torus DEA não foi uma alternativa interessante para a promoção de retenção dos analitos metamidofós e ETU nas condições analisadas, de maneira que o efeito matriz observado seria extremamente elevado, dificultando a análise.

4. Conclusões

Existem métodos descritos na literatura para a determinação e análise de glifosato em urina empregando diferentes tipos de sistema de cromatografia-espectrometria de massas, ressaltando-se que amostras reais possuem concentrações em torno de $0,001 \mu\text{g mL}^{-1}$. A determinação de resíduos de agrotóxicos, entre os quais o glifosato, têm recebido muito destaque, sendo ferramenta importante para estudos de impacto à saúde e de biomonitoramento humano, visando a avaliação das consequências da exposição a estes princípios ativos.

No que se refere aos resultados experimentais, a coluna Torus DEA foi empregada para a obtenção de tempos de retenção adequados para a determinação de glifosato, apesar do LOQ instrumental obtido ser considerado alto para os valores comumente encontrados em urina humana. Metamidofos e ETU, resíduos de agrotóxicos solúveis em água, que poderiam ser empregados para o estabelecimento de um método multiresíduo foram avaliados, entretanto os mesmos não apresentaram tempos de retenção satisfatórios nas condições avaliadas. Logo, considerando a instrumentação disponível, sugere-se que em caso de continuidade deste trabalho, o uso da derivatização do glifosato pelo emprego do derivatizante FMOC-Cl possa ser abordada como estratégia para a obtenção de melhores LOQs. Além do estabelecimento de um procedimento de preparo de amostra e extração para a posterior validação de um método de análise de glifosato em urina.

5. Referências

- ATSDR. **Glyphosate | Toxicological Profile.** [s.d.]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/tsp/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=1488&tid=293>>. Acesso em: 20 nov. 2023.
- BERRY, C. Glyphosate and cancer: the importance of the whole picture. **Pest management science**, [s. l.], v. 76, n. 9, p. 2874–2877, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32237045/>>. Acesso em: 29 ago. 2023.
- BRESSÁN, I. G.; LLESUY, S. F.; RODRIGUEZ, C.; FERLONI, A.; DAWIDOWSKI, A. R.; FIGAR, S. B.; GIMÉNEZ, M. I. Optimization and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of glyphosate in human urine after pre-column derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 1171, p. 122616, 2021. . Acesso em: 29 ago. 2023.
- CHEN, D.; MIAO, H.; ZHAO, Y.; WU, Y. A simple liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in human urine using cold-induced phase separation and hydrophilic pipette tip solid-phase extraction. **Journal of chromatography. A**, [s. l.], v. 1587, p. 73–78, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30471790/>>. Acesso em: 6 out. 2023.
- DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 319–325, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.1518>>. Acesso em: 29 ago. 2023.
- Duke, S.O. (1988) Glyphosate. In Kearney, P.C. and Kaufman, D.D., Eds., Herbicides Chemistry, Degradation, and Mode of Action, Dekker, New York, 1-70. - References - Scientific Research Publishing.** [s.d.]. Disponível em: <[https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1350443](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1350443)>. Acesso em: 5 out. 2023.
- FREUZE, I.; JADAS-HECART, A.; ROYER, A.; COMMUNAL, P. Y. Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1175, n. 2, p. 197–206, 2007. . Acesso em: 5 out. 2023.
- GEIGER, D. R.; SHIEH, W. J.; FUCHS, M. A. Causes of Self-Limited Translocation of Glyphosate in Beta vulgaris Plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 124–133, 1999. . Acesso em: 5 out. 2023.
- GILL, J. P. K.; SETHI, N.; MOHAN, A. Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 85–100, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-016-0585-z>>. Acesso em: 5 out. 2023.
- GILL, J. P. K.; SETHI, N.; MOHAN, A.; DATTA, S.; GIRDHAR, M. Glyphosate toxicity for animals. **Environmental Chemistry Letters 2017 16:2**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 401–426, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-017-0689-0>>. Acesso em: 5 out. 2023.
- Glyphosate | Toxicological Profile | ATSDR.** [s.d.]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/tsp/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=1488&tid=293>>. Acesso em: 6 out. 2023.

GREIM, H.; SALTMIRAS, D.; MOSTERT, V.; STRUPP, C. Evaluation of carcinogenic potential of the herbicide glyphosate, drawing on tumor incidence data from fourteen chronic/carcinogenicity rodent studies. **Critical reviews in toxicology**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 185–208, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25716480/>>. Acesso em: 6 out. 2023.

IARC. **IARC Monograph on Glyphosate**. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.iarc.who.int/featured-news/media-centre-iarc-news-glyphosate/>>. Acesso em: 6 out. 2023.

IBAMA. **Relatório de Qualidade do Meio Ambiente (RQMA)**. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/servicos/relatorios/qualidade-ambiental>>. Acesso em: 6 out. 2023.

ISAAA. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011 - ISAAA Brief 43-2011**. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/>>. Acesso em: 6 out. 2023.

JOHN, H.; THIERMANN, H. Poisoning by organophosphorus nerve agents and pesticides: An overview of the principle strategies and current progress of mass spectrometry-based procedures for verification. **Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab**, [s. l.], v. 19, p. 20–31, 2021. . Acesso em: 6 out. 2023.

LEWIS, K. A.; TZILIVAKIS, J.; WARNER, D. J.; GREEN, A. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 1050–1064, 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10807039.2015.1133242>>. Acesso em: 5 out. 2023.

LIN, Z.; PANG, S.; ZHANG, W.; MISHRA, S.; BHATT, P.; CHEN, S. Degradation of Acephate and Its Intermediate Methamidophos: Mechanisms and Biochemical Pathways. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 565022, 2020. . Acesso em: 6 dez. 2023.

MARTIN-REINA, J.; DAHIRI, B.; CARBONERO-AGUILAR, P.; SORIA-DIAZ, M. E.; GONZÁLEZ, A. G.; BAUTISTA, J.; MORENO, I. Validation of a simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in human urine by UPLC-MS/MS. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 170, p. 106760, 2021. . Acesso em: 6 out. 2023.

OHARA, T.; YOSHIMOTO, T.; NATORI, Y.; ISHII, A. A simple method for the determination of glyphosate, glufosinate and their metabolites in biological specimen by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: an application for forensic toxicology. **Nagoya journal of medical science**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 567–587, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34552290/>>. Acesso em: 5 out. 2023.

ORTEGA-OLVERA, J. M.; WINKLER, R.; QUITANILLA-VEGA, B.; SHIBAYAMA, M.; CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; MARTÍN-TAPIA, D.; ALARCÓN, L.; GONZÁLEZ-MARISCAL, L. The organophosphate pesticide methamidophos opens the blood-testis barrier and covalently binds to ZO-2 in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 360, p. 257–272, 2018. . Acesso em: 5 dez. 2023.

SAITO, T.; AOKI, H.; NAMERA, A.; OIKAWA, H.; MIYAZAKI, S.; NAKAMOTO, A.; INOKUCHI, S. Mix-mode TiO-C18 monolith spin column extraction and GC-MS for the simultaneous assay of

- organophosphorus compounds and glufosinate, and glyphosate in human serum and urine. **Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 999–1005, 2011. a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21985924/>>. Acesso em: 6 out. 2023.
- SAITO, T.; AOKI, H.; NAMERA, A.; OIKAWA, H.; MIYAZAKI, S.; NAKAMOTO, A.; INOKUCHI, S. Mix-mode TiO-C18 monolith spin column extraction and GC-MS for the simultaneous assay of organophosphorus compounds and glufosinate, and glyphosate in human serum and urine. **Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 999–1005, 2011. b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21985924/>>. Acesso em: 6 out. 2023.
- SIEHL, D. Inhibitors of EPSP synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. [s. l.], 1997. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/292667029>>. Acesso em: 27 out. 2023.
- STADLER, K.; LI, X.; LIU, B.; BAO, W.; WANG, K.; LEHMLER, H. J. Systematic review of human biomonitoring studies of ethylenethiourea, a urinary biomarker for exposure to dithiocarbamate fungicides. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 292, p. 118419, 2022. . Acesso em: 5 dez. 2023.
- TAYLOR E.L.; HOLLEY A.G.; KIRK M. **Pesticide Development - A Brief Look at the History — Southern Regional Extension Forestry**. [s.d.]. Disponível em: <<https://sref.info/resources/publications/pesticide-development---a-brief-look-at-the-history>>. Acesso em: 6 out. 2023.
- WATERS. **Determination of Glyphosate, Glufosinate and their Relevant Metabolites in Soybean Extracts Using UPLC-MS/MS with the Torus DEA Column**. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.waters.com/nextgen/sg/en/library/application-notes/2019/glyphosate-glufosinate-and-their-relevant-metabolites-in-soybean-extracts-using-uplc-ms-ms-with-the-torus-dea-column.html>>. Acesso em: 29 out. 2023a.
- WATERS. **Torus DEA Column Startup Guide for Polar Pesticide Separations | Waters**. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=134962847&type=USRM>>. Acesso em: 6 dez. 2023b.
- WEI, L.; SHIFU, C.; WEI, Z.; SUJUAN, Z. Titanium dioxide mediated photocatalytic degradation of methamidophos in aqueous phase. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 164, n. 1, p. 154–160, 2009. . Acesso em: 5 dez. 2023.
- WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, [s. l.], v. 31, n. 2 Pt 1, p. 117–165, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10854122/>>. Acesso em: 5 out. 2023.
- XU, J.; SMITH, S.; SMITH, G.; WANG, W.; LI, Y. Glyphosate contamination in grains and foods: An overview. **Food Control**, [s. l.], v. 106, p. 106710, 2019. . Acesso em: 19 set. 2023.
- ZHANG, Y.; XU, Z.; CHEN, Z.; WANG, G. Simultaneous degradation of triazophos, methamidophos and carbofuran pesticides in wastewater using an Enterobacter bacterial bioreactor and analysis of toxicity and biosafety. **Chemosphere**, [s. l.], v. 261, p. 128054, 2020. . Acesso em: 6 dez. 2023.

ZHOU, L.; LIU, X.; KANG, S.; ZHANG, F.; PAN, C. A rapid determination method for ethylenethiourea in potato and cucumber by modified QuEChERS – High performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 138, n. 2–3, p. 1355–1359, 2013. . Acesso em: 6 dez. 2023.