

AVALIAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA PARA ANÁLISE DE GLIFOSATO EM URINA POR CLAE

João Lucas Frabetti Cabral (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Samuel Botião Nerilo (Coorientador), Simone Aparecida Galerani Mossini (Orientadora).
E-mail: ra124365@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Farmácia, Análises Toxicológicas

Palavras-chave: Glifosato; Cromatografia; Microextração.

RESUMO

O uso crescente de agrotóxicos vem aumentando os riscos de intoxicações ocupacionais entre trabalhadores rurais. O glifosato [N-(fosfonometil) glicina], um dos principais herbicidas utilizado em todo o mundo, destaca-se pelo seu amplo espectro de ação e sua grande representatividade no mercado. Mesmo sendo um organofosforado que não possui a capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase, vários estudos apresentam seus potenciais efeitos tóxicos, carcinogênicos e teratogênicos. Cerca de 20 a 40% do glifosato pode ser absorvido pelo trato gastrointestinal, sofrendo posteriormente uma mínima biotransformação a ácido aminometilfosfônico (AMPA), sendo principalmente excretado pela urina. A detecção do glifosato em amostras biológicas tem se mostrado um grande desafio devido à inúmeras dificuldades encontradas na quantificação da substância. O projeto teve por objetivo avaliar o método de microextração líquido-líquido dispersiva para extração e detecção de glifosato e AMPA em amostras de urina, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência, contribuindo dessa forma para o monitoramento ocupacional e prevenção dos riscos associados a exposição à herbicidas.

INTRODUÇÃO

O uso intensivo de agrotóxicos tem aumentado a preocupação com relação às intoxicações ocupacionais em trabalhadores rurais. Em 2024, foram notificados mais de 5.000 casos de intoxicação agrotóxicos de uso agrícola no Brasil (DATASUS, 2024). Dentre os diversos tipos de agrotóxicos, destacam-se os herbicidas, que são amplamente empregados para o controle de ervas classificadas como daninhas. O glifosato [N-(fosfonometil) glicina], popularmente conhecido pelo seu nome comercial Roundup®, é o herbicida mais utilizado no mundo, devido ao fato de ser um herbicida não seletivo e de amplo espectro de ação (AMARANTE-JUNIOR et al., 2002). Apresenta um mecanismo de ação nas plantas que se baseia na inibição da enzima EPSPS, comprometendo dessa forma a síntese de aminoácidos, além da

síntese de clorofila e proteínas (AZIZ, 2020; GAZZIERO et al., 2016). Cerca de 20 a 40% do glifosato ingerido pelo trato gastrointestinal é absorvido, além de sofrer pouca biotransformação a ácido aminometilfosfônico (AMPA) e ser excretado majoritariamente na urina após 48 horas da exposição (MELO, 2018). Alguns estudos apontam que o glifosato é possivelmente carcinogênico, além de apresentar potenciais efeitos nocivos hepáticos, renais, reprodutivos e até mesmo neurológicos quando associados à exposição prolongada (AZIZ, 2020). Exposições prolongadas a agentes químicos, como a que ocorre no meio rural, resultam em efeitos prejudiciais à saúde dos trabalhadores expostos. Com isso, medidas de controle e prevenção precisam ser implantadas juntamente com os dados coletados com o monitoramento ocupacional (OGA, 2022). A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) vem sendo destaque, pois demonstrou ser uma técnica de preparo de amostra simples e eficiente, apresentando um baixo custo e relativamente um menor uso de solvente, se enquadrando nos princípios da química verde (REZAEI et al., 2006). Dessa forma, este estudo visa avaliar a DLLME para extração e detecção de glifosato em urina por CLAE, auxiliando então no monitoramento da exposição de trabalhadores rurais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra biológica

A amostra biológica escolhida foi a urina, devido a facilidade de coleta e por esta ser a principal via de excreção do glifosato e AMPA. As amostras foram obtidas de voluntários não expostos ocupacionalmente e de trabalhadores do sexo feminino e masculino cadastrados para atendimento pelo IDR-Paraná Marialva, Centenário do Sul e Cafeara-PR. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (COPEP/UEM), CAAE nº 31596620.9.0000.0104, sob o parecer nº 5.578.887.

Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Foram utilizados tubos Falcon, de 15 mL e adicionados 900 µL de amostras enriquecidas com o padrão de Glifosato [N-(fosfonometil) glicina] e seu principal metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA), em diferentes concentrações. Foi então posteriormente adicionado, com auxílio de pipeta Pasteur, uma mistura de solvente dispersor (acetonitrila) e solvente extrator (diclorometano). Com isso, os tubos foram agitados por 2 minutos em ultrassom e centrifugados (3000 rpm/10 minutos). Após a centrifugação, a fase extratora que correspondia à fase mais densa, portanto a fase inferior do tubo Falcon, a qual continha os analitos de interesse, foi pipetada e transferida para um *vial* e levada à evaporação em banho de água (40 °C). Em seguida, foi adicionado solução derivatizadora nos *vials*, para derivatização do analito, pois o glifosato é uma molécula pequena de baixo peso molecular, sendo de difícil detecção pelo massas. O derivatizador escolhido foi o cloreto de 9-fluorenilmetoxycarbonila (FMOC-Cl), pois a derivatização do glifosato e formação da molécula FMOC-Glifosato apresenta uma boa identificação pelo detector de massas.

Cromatografia líquida de ultra eficiência com massas em tandem (UPLC-MS/MS)

A identificação dos analitos foi realizada em um cromatógrafo líquido de ultra-eficiência (ACQUITY UPLC H-Class) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo com fonte de ionização *electrospray* (Xevo™ TQD) da marca Waters (Milford, EUA). Para realização dessa análise, foi utilizada coluna *Waters Symmetry® C18* (50 mm x 4,6 mm x 3,0 µm). Condições cromatográficas: para o glifosato foi utilizado voltagem no capilar de 2,50 (kV), voltagem no cone de 25 (V), temperatura de dissolução de 400°C, fluxo de gás para dissolução de 450 (L/Hr) e para o cone de 25 (L/Hr); para o AMPA, uma voltagem no capilar de 3,50 (kV), voltagem no cone de 30 (V), temperatura de dissolução de 450°C, fluxo de gás para dissolução de 500 (L/Hr) e para o cone de 30 (L/Hr).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas no UPLC-MS/MS dos padrões puros resultaram na detecção do padrão de glifosato e de AMPA, juntamente com seus espectros de fragmentação, como ilustrado nas Figuras 1 e 2.

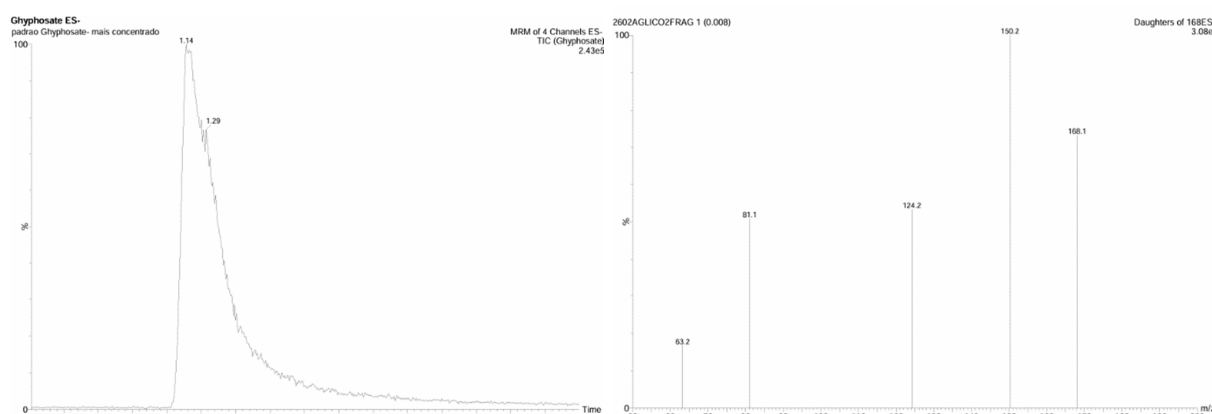


Figura 1: Sinal e espectros de fragmentação do glifosato (modo positivo, UPLC-MS/MS)

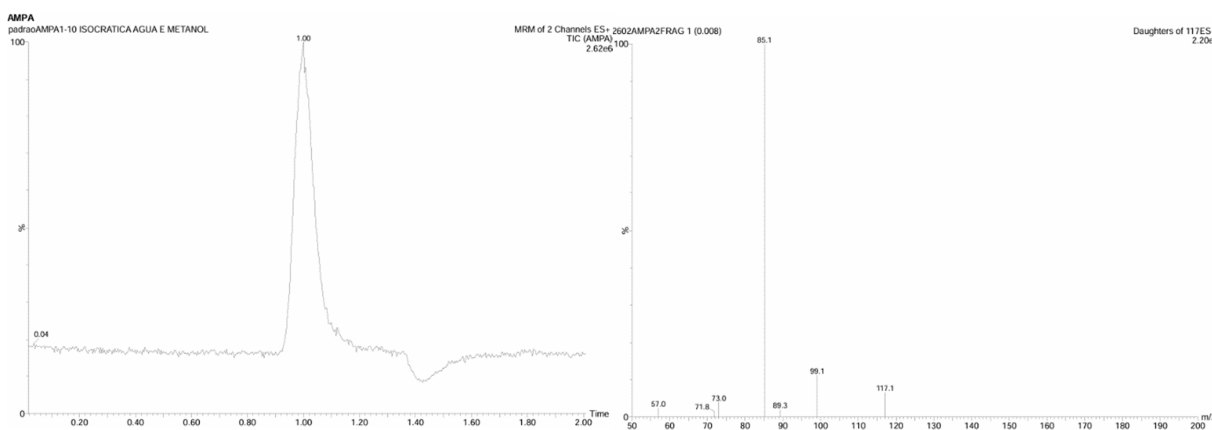


Figura 2: Sinal e espectros de fragmentação do AMPA (modo positivo, UPLC-MS/MS)

Entretanto, quando foram analisadas amostras de urina enriquecidas e derivatizadas com FMOC-Cl, não foi possível obter nenhum resultado. Após várias tentativas e modificações no processo de extração optou-se pelo teste com um novo derivatizador, o pentafluorobenzil brometo, que será utilizado para a continuidade dos estudos de extração e detecção do glifosato e AMPA em amostras de urina.

CONCLUSÕES

A metodologia de identificação dos padrões de glifosato e AMPA por UPLC-MS/MS se mostrou eficiente na detecção dos analitos de interesse, entretanto, após realizar os testes com amostras de urina fortificadas com os padrões, as mesmas não foram eficientes. A dificuldade pode ser devida a uma possível degradação do padrão após adição ao sistema extrator, não sendo possível dar continuidade nos experimentos. Com a chegada dos novos padrões, serão realizados novos testes envolvendo a derivatização com o FMOC-Cl e também com o pentafluorobenzil brometo, um agente de derivatização versátil em cromatografia e espectrometria de massas que se mostrou muito eficiente na identificação do analito de glifosato em publicações recentes.

AGRADECIMENTOS

PIBIC/CNPq-FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA-UEM e LATOX-UEM.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **Notificações por ano de notificação segundo agente tóxico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/>. Acesso em: 23 ago. 2025.

Aziz, Z. A. **Efeitos Toxicológicos do Glifosato**. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas. Instituto Universitário Egas Moniz, 2020. Acesso em: 22 ago. 2025.

Gazzieiro, D. L. P. et al. Capítulo 1. In: **A Era do Glyphosate**. Londrina: [s.n.], 2016. Acesso em: 25 ago. 2025.

Rezaee, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A** 2006; 1116(1-2): 1–9. Acesso em: 25 ago. 2025.

Melo, K. G. **Determinação de glifosato em amostras de urina humana pela derivatização com cloroformato de 9-fluorenilmetilo por cromatografia líquida com detecção de fluorescência**. Dissertação de mestrado—Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP. 2019. Acesso em: 25 ago. 2025.

Amarante Junior, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002. Acesso em: 25 ago. 2025.