

ANA CAROLINA PEREIRA PAIVA

**RESÍDUOS DE GLYPHOSATE EM GRÃOS DE CAFÉ DETERMINADOS POR
LC-MS/MS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Antonio Alberto da Silva

Coorientadora: Maria Eliana L. R. de Queiroz

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P149r
2024 Paiva, Ana Carolina Pereira, 1994-
Resíduos de glyphosate em grãos de café determinados por
LC-MS/MS / Ana Carolina Pereira Paiva. – Viçosa, MG, 2024.
1 tese eletrônica (117 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Antonio Alberto da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Química, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.410>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Glifosato. 2. Plantas - Efeito dos herbicidas. 3. Café -
Contaminação. 4. Análise espectral. 5. Cromatografia à líquido.
I. Silva, Antonio Alberto da, 1950-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação
em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 632.954

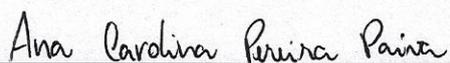
ANA CAROLINA PEREIRA PAIVA

RESÍDUOS DE GLYPHOSATE EM GRÃOS DE CAFÉ DETERMINADOS POR
LC-MS/MS

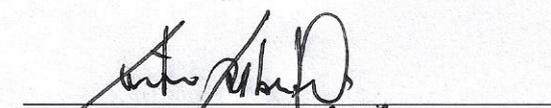
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 19 de março de 2024.

Assentimento:



Ana Carolina Pereira Paiva
Autora



Antonio Albertó da Silva
Orientador

*A todos os pesquisadores
persistentes, que buscam
tornar o mundo melhor
por meio da Ciência,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar o dom da vida, toda saúde, proteção e amparo, e me permitir realizar este trabalho e deixar minha contribuição à sociedade.

Aos meus pais, Eli e Eliana, por todo amor, carinho, incentivo e confiança. Obrigada por estarem sempre ao meu lado e me ajudarem a tornar mais esta conquista possível!

Ao meu orientador, Prof. Antonio Alberto da Silva, pela orientação, ensinamentos, persistência, amizade e incentivo ao longo desta pesquisa!

À Prof^a. Maria Eliana por todas as contribuições, ensinamentos, acolhimento, carinho e amizade, e todos os cafés nesses muito mais de dois anos de Laqua!

Ao Leonardo d'Antonino, grande parceiro neste trabalho, por toda contribuição, amizade e esforços investidos para tornar esta pesquisa possível!

Ao Emanuel, companheiro de doutorado, e à Vanessa, dedicada estagiária, por todo apoio, incentivo, troca de conhecimentos e bons momentos vividos ao longo destes 4 anos!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

À família Laquariana, que me acolheu por tantos anos, obrigada por todo apoio, amizade, ensinamentos e os bons momentos compartilhados!

Ao grupo de pesquisas MIPD, em especial à amizade e carinho de Laryssa, Elisa, Dilma e Mari, por todo apoio, ajuda e incentivo! O doutorado se tornou mais leve nos momentos de cafezinho com vocês!

Aos meus amigos de longa data, Ana Luiza, Amanda, Angelina, Letícia, Sara e Humberto, muito obrigada por todo carinho, confiança, apoio e amizade incrível de cada um de vocês!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

ANA CAROLINA PEREIRA PAIVA, filha de Eliana Lopes Pereira Paiva e Eli Magno de Souza Paiva, nasceu em Conselheiro Lafaiete, Minas Gerais, em 22 de agosto de 1994.

Em fevereiro de 2011 iniciou o curso Técnico em Química pela Unidade de Ensino Moderno (UEM), localizada em Conselheiro Lafaiete, recebendo o título em dezembro de 2012.

Em maio de 2013 iniciou o curso de Química pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se como bacharela em Química em 26 de janeiro de 2018. Durante a graduação atuou como tutora da disciplina de Química Analítica Aplicada por 1 semestre e foi bolsista de iniciação científica por 3 anos (períodos 2014/2015, 2015/2016 e 2016/2017), desenvolvendo trabalhos na área de Química Analítica com ênfase em degradação de pesticidas e análises por métodos cromatográficos.

Em março de 2018, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de Mestrado, pela Universidade Federal de Viçosa. Atuou avaliando a remoção de pesticidas de amostras aquosas por processos oxidativos avançados e análises por cromatografia gasosa. Ainda, durante todo o curso, atuou como monitora e professora auxiliar na disciplina de Química Analítica Aplicada, ofertada pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Submeteu-se à defesa de sua dissertação em 14 de fevereiro de 2020.

Em março de 2020, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de Doutorado, também pela Universidade Federal de Viçosa. Atuou no desenvolvimento de métodos para determinação de glyphosate em café e soja e análises por cromatografia líquida. Manteve-se professora auxiliar de Química Analítica Aplicada até março de 2022. Aprofundou seus estudos em cromatografia e espectrometria de massas, com ênfase em análises de pesticidas e comportamento de herbicidas no ambiente. Submeteu-se à defesa de sua tese em março de 2024.

RESUMO

PAIVA, Ana Carolina Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2024. **Resíduos de Glyphosate em Grãos de Café Determinados por LC-MS/MS**. Orientador: Antonio Alberto da Silva Coorientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

O glyphosate é amplamente aplicado em diversas culturas de grande interesse econômico em todo o mundo. Dentre estas culturas, destaca-se o café, cujo maior produtor mundial é o Brasil. Acredita-se que aplicações inadequadas do glyphosate podem levar à contaminação de grãos de café. Desta forma, encontrar maneiras de se realizar o monitoramento de resíduos deste herbicida nos grãos é de fundamental importância. Neste sentido, este trabalho se propôs a desenvolver um método para detecção e quantificação de resíduos de glyphosate em grãos de café verde por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS) (Capítulo 1). Em sequência, esse método foi aplicado em um estudo a campo para avaliar a possível contaminação de grãos de café verde após a aplicação do glyphosate em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura do café (Capítulo 2). Por fim, avaliou-se o efeito da torrefação na degradação do herbicida em grãos de café contaminados (Capítulo 3). O método desenvolvido foi otimizado e validado para as principais figuras de mérito de maneira satisfatória, apresentando seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez adequados, com limite de quantificação satisfatório ($LOQ = 0,48 \text{ mg kg}^{-1}$) e baixo efeito de matriz. Visando compreender melhor a possível contaminação dos grãos de café após a aplicação do glyphosate, foi realizado um estudo a campo com aplicação do produto comercial Roundup Original® DI em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura. As análises dos grãos, colhidos após a completa maturação, indicaram a presença de resíduos em 4 de 5 estágios avaliados, porém em concentrações abaixo do limite máximo permitido para esta cultura no Brasil ($< 1,0 \text{ mg kg}^{-1}$). O método desenvolvido também foi aplicado em análises de amostras coletadas por produtores da região da Zona da Mata, em Minas Gerais, sendo detectado o glyphosate em 2 amostras, em concentrações inferiores ao limite de quantificação do método. Sendo evidente a possível

contaminação dos grãos de café por glyphosate, uma nova etapa do estudo foi realizada, com o intuito de se verificar se esta contaminação permanece após o processo de torrefação do café. Para esta avaliação, o método desenvolvido para análise do herbicida em grãos de café verde foi validado para grãos de café torrado. A validação se deu de maneira satisfatória para as figuras de mérito avaliadas, obtendo-se seletividade, linearidade, precisão e exatidão adequados, com limite de quantificação satisfatório ($LOQ = 0,44 \text{ mg kg}^{-1}$), similar ao obtido para café verde, entretanto com efeito de matriz significativo (35%). Amostras de café torrado adquiridas aleatoriamente na região de Viçosa, MG foram analisadas, não sendo detectados resíduos em nenhuma das amostras selecionadas. Para avaliar o efeito da torrefação na degradação do herbicida, grãos de café verde contaminados com glyphosate em diferentes concentrações foram submetidos à torra média e escura. Observou-se que o processo de torrefação é capaz de remover em até 58 e 74%, respectivamente, a quantidade de herbicida nos grãos. Apesar de não ser totalmente eliminado, a torrefação contribui para a mitigação do glyphosate, tornando-se uma aliada na busca por maior segurança alimentar em café.

Palavras-chave: Herbicidas, Cromatografia Líquida; Espectrometria de Massas; Segurança Alimentar; Contaminação; Torrefação.

ABSTRACT

PAIVA, Ana Carolina Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2024. **Glyphosate Residues in Coffee Beans Determined by LC-MS/MS.** Adviser: Antonio Alberto da Silva Coadviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

Glyphosate is extensively employed in various crops of great economic interest, with coffee being one of the prominent ones, especially considering Brazil's position as the world's largest coffee producer. Due to concerns about coffee beans contamination resulting from improper glyphosate applications, it is fundamentally important to monitor residues of this herbicide in the beans. Therefore, this study aimed to develop a method for detecting and quantifying glyphosate residues in green coffee beans by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Chapter 1). Subsequently, this method was applied in a field study to assess the potential contamination of the beans after glyphosate application at different stages of coffee crop development (Chapter 2). Finally, the effect of roasting on the degradation of the herbicide in contaminated coffee beans was evaluated (Chapter 3). The developed method was satisfactorily optimized and validated for essential performance parameters, demonstrating adequate selectivity, linearity, precision, accuracy, and robustness, with a satisfactory limit of quantification ($LOQ = 0.48 \text{ mg kg}^{-1}$) and low matrix effect. To better understand potential coffee bean contamination after glyphosate application, a field study was conducted using the commercial product Roundup Original® DI at different stages of crop development. Analyses of the beans harvested after full maturation indicated residue presence in 4 out of 5 evaluated stages, although at concentrations below the maximum allowed limit for this crop in Brazil ($< 1.0 \text{ mg kg}^{-1}$). The developed method was also applied to analyze samples collected by producers in the Zona da Mata region of Minas Gerais, where glyphosate was detected in 2 samples at concentrations below the method's limit of quantification. With evident coffee beans contamination by glyphosate, a subsequent study phase aimed to verify whether this contamination persists after the coffee roasting process. For this assessment, the method developed for analyzing the herbicide in green coffee beans was validated for

roasted coffee beans. The validation yielded satisfactory results for the evaluated performance parameters, obtaining adequate selectivity, linearity, precision, and accuracy, with a satisfactory limit of quantification ($LOQ = 0.44 \text{ mg kg}^{-1}$), similar to that obtained for green coffee, even though with a significant matrix effect (35%). Roasted coffee samples randomly acquired in the region of Viçosa, MG, were analyzed. However, no residues were detected in any of the selected samples. To evaluate the roasting effect on herbicide degradation, green coffee beans contaminated with glyphosate at different concentrations underwent medium and dark roasting. It was observed that the roasting process can remove up to 58% and 74% of the herbicide, respectively, from the beans. Although not entirely eliminated, roasting contributes to glyphosate mitigation, making it a valuable asset in enhancing food safety concerning coffee.

Keywords: Herbicides, Liquid Chromatography; Mass Spectrometry; Food Safety; Contamination; Roasting.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** - Reação de derivatização do herbicida glyphosate com o reagente FMOC-Cl. 29
- Figura 2** - Esquema do método otimizado para extração de glyphosate em grãos de café verde..... 36
- Figura 3** - Cromatogramas obtidos após análise de solução padrão de glyphosate a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ em eluição isocrática (fluxo $0,4 \text{ mL min}^{-1}$) com as seguintes composições de fase móvel e modo de análise: (A) 90% solução aquosa de formiato de amônio $0,63 \text{ g L}^{-1}$ e hidróxido de amônio 0,05% (v/v) e 10% metanol (Modo SIM +); (B) 90% solução aquosa de formiato de amônio $0,63 \text{ g L}^{-1}$ e hidróxido de amônio 0,05% (v/v) e 10% metanol (Modo SIM -); (C) 90% solução aquosa de ácido fórmico 0,5% (v/v) e 10% acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,5% (v/v) (Modo SIM +); (D) 90% solução aquosa de ácido fórmico 0,5% (v/v) e 10% acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,5% (v/v) (Modo SIM -). 46
- Figura 4** - Valor de carga efetiva da molécula de glyphosate x pH..... 47
- Figura 5** - Fragmentos de glyphosate monitorados como íons produto em análise no modo MRM (-). 48
- Figura 6** - Cromatogramas obtidos após análise de solução padrão de glyphosate a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ em eluição gradiente: (A) gradiente de eluição 1 e (B) gradiente de eluição 2 (ambos descritos na Tabela 6)..... 50
- Figura 7** - Áreas obtidas após análise de extratos de grãos de café moído fortificados com glyphosate a $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ e mantidos em repouso por diferentes períodos de tempo após a fortificação. 51
- Figura 8** - Gráfico de Pareto representado o efeito dos fatores volume de água (mL), tempo de agitação (min) e velocidade de rotação (rpm) na extração de glyphosate de grãos de café. 52

Figura 9 - Gráfico de Pareto representado o efeito dos fatores volume de água (mL) e velocidade de rotação (rpm), após análise de regressão por <i>stepwise</i> , na extração de glyphosate de grãos de café.....	53
Figura 10 - Gráfico de Pareto representado o efeito dos fatores velocidade de rotação (rpm) e temperatura (°C) da centrifugação na extração de glyphosate de grãos de café.....	54
Figura 11 - Cromatogramas obtidos após análise de extratos de matriz fortificada com glyphosate a 0,5 mg kg ⁻¹ submetida ao processo de extração com proporções de metanol e extrato na etapa final de 50:50 %(v/v) (A), 60:40 %(v/v) (B) e 70:30 %(v/v) (C).	56
Figura 12 - Fragmentos de glyphosate isotopicamente marcado (¹³ C, ¹⁵ N) monitorados como íons produto em análise no modo MRM (-).....	58
Figura 13 - Cromatogramas obtidos após análise de solução padrão de glyphosate a 500 µg L ⁻¹ (A); solução padrão de glyphosate ¹³ C, ¹⁵ N a 500 µg L ⁻¹ (B) e solução contendo glyphosate e glyphosate ¹³ C, ¹⁵ N a 250 µg L ⁻¹ (C).....	59
Figura 14 - Cromatogramas obtidos após análise de: solução padrão de glyphosate (E) e glyphosate ¹³ C, ¹⁵ N (F), ambos a 100 µg L ⁻¹ (em verde); extrato da matriz fortificada com glyphosate a 1,0 mg kg ⁻¹ (C) e com glyphosate ¹³ C, ¹⁵ N a 4,0 mg kg ⁻¹ (D) (em vermelho) e extrato da matriz sem a presença do herbicida (A e B, em azul).....	60
Figura 15 - Curva analítica obtida após análise do extrato das amostras de grãos de café moído fortificadas em diferentes concentrações de glyphosate, com adição de glyphosate ¹³ C, ¹⁵ N como padrão interno, submetidas ao método de extração otimizado e analisadas por LC-MS/MS.....	61
Figura 16 - Razão entre as respostas cromatográficas e as concentrações estabelecidas na curva analítica (razão de área/concentração) <i>versus</i> concentração de glyphosate.....	62
Figura 17 - Curvas analíticas de glyphosate preparadas por fortificação do extrato da matriz (em vermelho) e em mistura de solventes (em preto) em diferentes concentrações.	67

Figura 18 - Cromatograma de íons totais (TIC) e cromatogramas de íons extraídos (XIC) obtidos após análise de extrato da matriz fortificada a $4,0 \text{ mg kg}^{-1}$ com solução de glyphosate e glyphosate ^{13}C , ^{15}N . À esquerda são apresentados os cromatogramas para o glyphosate e suas respectivas transições selecionadas $168,10 > 63,10$; $168,10 > 149,90$; $168,10 > 78,80 \text{ m/z}$. À direita são apresentados os cromatogramas para o glyphosate ^{13}C , ^{15}N e suas respectivas transições selecionadas $169,90 > 63,20$; $169,90 > 81,10$; $169,90 > 78,90 \text{ m/z}$ 70

Capítulo 2

Figura 1 - Estágios de frutificação (F1, F3 e F5) e maturação (M2 e M3) selecionados como tratamento do delineamento experimental, seguindo-se as fases fenológicas do cafeeiro apresentadas por Morais *et al.* (2008). 87

Capítulo 3

Figura 1 - Esquema do método de extração de glyphosate em grãos de café torrados e moídos. 101

Figura 2 - Esquema do processo de fortificação, partição e torrefação em diferentes níveis de amostras de grãos de café. 104

Figura 3 - Concentração inicial versus concentração estimada de glyphosate em grãos de café verde e em grãos de café após torrefação em torra média e torra escura. 109

Figura 4 - Glyphosate remanescente (%) em grãos de café verde e grãos submetidos à torra média e torra escura após fortificação em diferentes níveis de concentração..... 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais propriedades físico-químicas da molécula de glyphosate.	20
---	----

Capítulo 1

Tabela 1 - Planejamento fatorial 2 ³ proposto para estabelecer o volume de água ultrapura (mL), o tempo de agitação em agitador rotativo (min) e a velocidade de rotação (rpm) na extração do glyphosate em grãos de café.	38
Tabela 2 - Planejamento Fatorial 2 ² proposto para estabelecer a velocidade de rotação da centrífuga (rpm) e a temperatura de centrifugação (°C) no <i>clean up</i> dos extratos de grãos de café.	39
Tabela 3 - Planejamento experimental utilizado para validação do parâmetro robustez.....	43
Tabela 4 - Valores dos parâmetros já otimizados para análise de glyphosate em modo MRM (-). A otimização foi realizada pelo software LabSolutions (Shimadzu®) por injeção direta no espectrômetro de massas de 20 µL de solução padrão de glyphosate de 500 µg L ⁻¹ , a um fluxo de 0,4 mL min ⁻¹	47
Tabela 5 - Valores dos parâmetros já otimizados da fonte de ionização por <i>Electrospray</i> . A otimização foi realizada por injeções consecutivas diretamente no espectrômetro de massas de 20 µL de solução padrão de glyphosate de 500 µg L ⁻¹ , a um fluxo de 0,4 mL min ⁻¹ , com análise da intensidade do pico a cada injeção.	48
Tabela 6 - Gradientes de eluição avaliados para análise de glyphosate por LC- MS/MS.....	49
Tabela 7 - Efeito, efeito padrão estimado (t(24)) e p-valor dos fatores volume de água (mL) e velocidade de rotação (rpm) obtidos após análise de regressão por <i>stepwise</i>	53

Tabela 8 - Valores dos parâmetros otimizados para análise de glyphosate isotopicamente marcado ^{13}C , ^{15}N em modo MRM (-). A otimização foi realizada pelo software LabSolutions (Shimadzu®) por injeção direta no espectrômetro de massas de 20 μL de solução padrão de glyphosate ^{13}C , ^{15}N de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, a um fluxo de 0,4 mL min^{-1}	57
Tabela 9 - Concentração real de glyphosate em amostras de grãos de café e a média das concentrações calculadas por meio da equação da reta obtida. Estão representados o desvio padrão e o coeficiente de determinação, respectivamente, para cada concentração, ou ponto da curva analítica.....	63
Tabela 10 - Limite de detecção e limite de quantificação obtidos por meio de parâmetros da curva analítica para o método de determinação de glyphosate em grãos de café.....	63
Tabela 11 - Resultados obtidos para validação da figura de mérito precisão em termos da repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados estão expressos em termos de coeficiente de variação (CV).....	65
Tabela 12 - Valores de porcentagem de recuperação (%R) obtidos como avaliação da exatidão do método de determinação de glyphosate em grãos de café.	65
Tabela 13 – Desvio padrão das concentrações de glyphosate obtidas para avaliação dos parâmetros tempo de agitação, tempo de centrifugação e temperatura da coluna na robustez do método em estudo.	68
Tabela 14 - Resultados de desvio padrão para os ensaios de repetibilidade e robustez, realizados por análise de amostras de grãos de café fortificados a 1,0 mg kg^{-1} e submetidas ao processo de extração otimizado.	69
Tabela 15 - Erro percentual referente às intensidades relativas dos fragmentos de glyphosate e glyphosate ^{13}C , ^{15}N no extrato da matriz ($C(\text{gly}) = 1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ e $C(\text{gly } ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}) = 4,0 \text{ mg kg}^{-1}$) em comparação à solução padrão, ambos os padrões na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$	70

Capítulo 2

Tabela 1 - Concentrações de glyphosate em mg kg^{-1} obtidas após análise em LC- MS/MS das amostras coletadas do experimento a campo..... 89

Capítulo 3

Tabela 1 - Características e composição físico-química de grãos de café arábica verdes e torrados. Adaptado de Bonnländer *et al.* (2005) e Wang e Lim (2015).
..... 97

Tabela 2 - Parâmetros da validação do método: Regressão linear, coeficiente de determinação (r^2), faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, efeito de matriz, nível de fortificação (NF), precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária expressos pelo coeficiente de variação (CV), exatidão em termos de porcentagem de recuperação (%R), intensidade relativa dos íons 63,1; 78,8 e 149,9 m/z em solução padrão e no extrato da matriz, cromatograma de íons extraídos e seletividade (A = branco do extrato da matriz; B = extrato da matriz fortificada com glyphosate a $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ e C = solução padrão de glyphosate a $100 \mu\text{g L}^{-1}$) para determinação de glyphosate em café torrado.. 107

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 1	25
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE GLYPHOSATE EM GRÃOS DE CAFÉ	25
RESUMO.....	26
1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Reagentes e Soluções.....	33
3.2 Instrumentação	33
3.3 Análise de glyphosate por LC-MS/MS.....	33
3.3.1 Otimização das condições cromatográficas de análise	34
3.3.2 Otimização dos parâmetros espectrométricos de análise	35
3.4. Determinação de glyphosate em grãos de café verde	36
3.4.1 Tempo de contato entre glyphosate e grãos de café verde	37
3.4.2. Otimização do método de determinação de glyphosate em grãos de café verde	37
3.4.3 Validação do método de determinação de glyphosate em grãos de café verde	40
3.5 Aplicação do método na análise de amostras de grãos de café verde da região da Zona da Mata em Minas Gerais	44
4 RESULTADOS	45
4.1 Otimização da análise de glyphosate por LC-MS/MS.....	45
4.2 Otimização do método de determinação de glyphosate em grãos de café verde.....	50
4.3 Validação do método de determinação de glyphosate em grãos de café verde.....	57
4.3.1 Seletividade	60
4.3.2 Linearidade	61
4.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação	63

4.3.4 Repetibilidade e Precisão Intermediária	64
4.3.5 Recuperação.....	65
4.3.6 Efeito de matriz.....	66
4.3.7 Robustez	67
4.3.8 Cromatogramas de íons extraídos e proporção das intensidades relativas dos íons.....	69
4.4 Comparação do método proposto com a literatura.....	71
4.5 Análise de amostras de grãos de café verde da região da Zona da Mata em Minas Gerais	73
5 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS.....	75
CAPÍTULO 2.....	81
DETERMINAÇÃO DE ÉPOCAS SEGURAS DE APLICAÇÃO DO GLYPHOSATE NA CULTURA DO CAFÉ.....	81
RESUMO.....	82
1 INTRODUÇÃO	83
2 OBJETIVOS	85
2.1 Objetivo geral.....	85
2.2 Objetivos específicos	85
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	86
3.1 Área experimental.....	86
3.2 Aplicação do herbicida glyphosate na cultura cafeeira	86
4 RESULTADOS	89
5 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS.....	92
CAPÍTULO 3.....	94
EFEITO DA TORREFAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DO GLYPHOSATE EM GRÃOS DE CAFÉ.....	94
RESUMO.....	95
1 INTRODUÇÃO	96
2 OBJETIVOS	99
2.1 Objetivo Geral	99
2.1 Objetivos Específicos.....	99
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	100

3.1 Reagentes e Soluções.....	100
3.2 Instrumentação	100
3.3. Determinação de glyphosate em café torrado	101
3.3.1 Validação do método de determinação de glyphosate em café torrado.....	102
3.4 Aplicação do método na análise de amostras autênticas de café torrado	102
3.5 Avaliação do efeito da torrefação na degradação do glyphosate em grãos de café.....	103
4 RESULTADOS	106
4.1 Validação do método de determinação de glyphosate em café torrado	106
4.2 Análise de amostras de café torrado moído	108
4.3 Avaliação do efeito da torrefação na degradação do glyphosate em grãos de café.....	108
5 CONCLUSÕES	112
PERSPECTIVAS.....	113
REFERÊNCIAS.....	115
APÊNDICE	117

INTRODUÇÃO GERAL

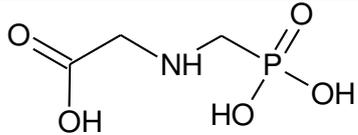
O Brasil é referência mundial na produção agropecuária. O país se destaca no setor de exportação de insumos como carnes (bovina, suína e de aves), suco de laranja, açúcar, soja, milho e café (EMBRAPA, 2018). Este último possuiu grande importância econômica no mercado, nacional e internacional.

O Brasil já ocupa há mais de 150 anos o posto de maior produtor mundial de café, e em 2012 se tornou o segundo maior consumidor de café do mundo, atrás somente dos Estados Unidos (SUPLICY, 2013). Em 2022, o país consumiu cerca de 4,77 kg de café torrado por habitante (ABIC, 2023). De acordo com boletim de Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, disponibilizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) em janeiro de 2024, a produção total de café (arábica e *conillon*) obtida na Safra 2023 alcançou pouco mais de 55,1 milhões de sacas, e a estimativa para 2024 é de aumento em torno de 5,5% deste valor (CONAB, 2024).

O país se destaca pelo cultivo de ambas as espécies: a *Coffea arabica*, que produz o café arábica, caracterizado pelo gosto suave, aromático e achocolatado, e a *Coffea canephora*, que produz o café conilon, mais resistente a pragas, porém, com gosto mais amargo e adstringente (MARTINS, 2012). De todo modo, o café nacional faz parte não só do dia a dia de milhares de brasileiros, como alimenta cerca de 38% do mercado internacional (ICO, 2023).

A fim de se garantir esta produtividade, se faz necessário o uso de pesticidas para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas. Tem-se por planta daninha toda planta presente na lavoura que contribua para a queda de produção, diminua a qualidade dos grãos, retarde o início reprodutivo da cultura ou dificulte o processo de colheita (RONCHI, SILVA e FERREIRA, 2001).

Dentre as moléculas químicas mais utilizadas no Brasil no controle das plantas daninhas, inclusive na cultura do café, se destaca o glyphosate. O glyphosate (N-(fosfometil)glicina) é um herbicida organofosforado sistêmico, não-seletivo, recomendado para várias culturas. As principais propriedades físico-químicas do glyphosate são apresentadas na Tabela 1.

Propriedades físico-químicas do glyphosate	
Estrutura	
Massa molar	169,07 g mol ⁻¹
Solubilidade em água a 20 °C	1050 g L ⁻¹
Pressão de vapor a 20 °C	desprezível
Densidade	1,7 g cm ⁻³
Constante de dissociação ácido-base (pKa)	2,0 ₍₁₎ ; 2,6 ₍₂₎ ; 5,6 ₍₃₎ ; 10,6 ₍₄₎
Volatilidade	desprezível

Fonte: PubChem, 2022; Paiva, 2023 (ACD/ChemSketch 2019.1.2).

Tabela 1 – Principais propriedades físico-químicas da molécula de glyphosate.

Seu mecanismo de ação consiste em inibir a síntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), mais especificamente na inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), causando desregulação da rota do ácido chiquímico. Ainda, há a redução da síntese de fitoalexinas, compostos que atuam em resposta à infecção por microrganismos ou estresse na planta, e aumento do nível de substâncias tóxicas que aceleram a morte da planta (FERREIRA *et al.*, 2008).

Em 2021, o consumo deste herbicida no Brasil ultrapassou 210 mil toneladas (IBAMA, 2022). Esse alto consumo se deve ao amplo espectro de ação do produto e, principalmente, ao desconhecimento dos produtores sobre as consequências de seu uso inadequado, o que tem levado ao uso abusivo deste herbicida. Isto tem como consequência sérios problemas ambientais, como redução da biodiversidade, aparecimento de biotipos de plantas daninhas resistentes e a presença de resíduos desse herbicida nos grãos colhidos (SULLIVAN e SULLIVAN, 2003; RELYEA, 2005; GAZZIERO *et al.*, 2012).

Além dos efeitos danosos ao ambiente, tem-se aumentado as preocupações quanto à exposição humana ao glyphosate. Pesquisas apontam que o glyphosate pode causar impactos negativos à saúde humana. Estudos evidenciaram que o herbicida pode causar danos a alguns tipos de células, como células endócrinas, somáticas e cutâneas (GASNIER *et al.*, 2009;

THONGPRAKAISANG *et al.*, 2013; PEILLEX e PELLETIER, 2020). Alguns estudos também correlacionam a exposição ao glyphosate a doenças como diabetes, hipertensão, derrame, doenças inflamatórias e degenerativas, Alzheimer e Parkinson (SWANSON *et al.*, 2014; PEILLEX e PELLETIER, 2020). Além disso, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, pertencente à Organização Mundial da Saúde, classificou o glyphosate como possível cancerígeno em 2017, o que aumentou o debate no meio acadêmico sobre a segurança do uso deste herbicida (WHO, 2017).

A possível contaminação de grãos de café com glyphosate se tornou relevante para o agronegócio brasileiro, uma vez que pode inviabilizar a exportação dos grãos para alguns países importadores. Durante a aplicação por pulverização, a deriva do herbicida pode atingir as folhas dos cafeeiros.

A deriva é um fenômeno caracterizado por qualquer desvio que afeta a trajetória da gota do composto aplicado, não atingindo o alvo pretendido, seja sua causa relacionada ao tamanho das gotas formadas ou às condições climáticas no momento da pulverização (correntes de ar e evaporação). Estima-se que, em média, 10% do herbicida pulverizado pode atingir plantas não-alvo na forma de deriva de pulverização (SCHRÜBBERS *et al.*, 2014). Ainda que seus efeitos possam ser minimizados, a deriva é um fenômeno inerente à aplicação de pesticidas, sendo difícil eliminá-la completamente do processo (AZEVEDO e FREIRE, 2006). Como consequência, moléculas do herbicida aplicado acabam atingindo folhas e grãos das lavouras.

Uma vez em contato com as folhas, o glyphosate pode ser translocado por toda a planta e se acumular nos grãos. Contudo, pouco se tem relatado na literatura sobre análise do glyphosate em grãos de café, principalmente em se tratando de métodos validados cujo preparo de amostra não requeira a reação de derivatização do glyphosate. Além disso, não há registro de estudos que avaliam as épocas seguras de aplicação do glyphosate, que resultem na produção de grãos sem resíduos, ou em concentrações abaixo do limite máximo permitido. Ainda, pouco se sabe sobre a degradação do glyphosate após a torrefação, devido à escassez de estudos nesta área.

Neste sentido, este trabalho se propõe a desenvolver um método para análise de resíduos de glyphosate em grãos de café por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Ainda, empregar este

método para avaliar a(s) época(s) de aplicação do herbicida, em relação aos estágios de desenvolvimento da planta, que não resultem em contaminação dos grãos produzidos. E, por fim, avaliar o efeito de dois níveis de torra na degradação do glyphosate em grãos de café verde contaminados com este herbicida.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). **Indicadores da Indústria de Café: Evolução do consumo interno de café no Brasil**, 2023. Disponível em: <<https://estatisticas.abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/>>. Acesso em: 11 dez 2023.

AZEVEDO, F. R.; FREIRE, F. D. C. O. **Tecnologia de Aplicação de Defensivos Agrícolas**. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE, p. 47. 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café - 1º levantamento**. CONAB. Brasília, DF, v.11, n. 1 primeiro levantamento, janeiro 2024. 47 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Visão 2030: O Futuro da Agricultura Brasileira**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2018. 212 p.

FERREIRA, F. A.; SILVA, A. A.; GALON, L.; CONCENÇO, G.; FERREIRA, E. A. Mecanismo de Ação de Herbicidas. In: ZAMBOLIN, L.; PICANÇO, M. C.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. A.; JESUS JUNIOR, W. C. **Produtos Fitossanitários (Fungicidas, Inseticidas, Acaricidas e Herbicidas)**. Viçosa, MG: UFV/DFP, Cap. 8, p. 349-384, 2008.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M.; SÉRALINI, G. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, p. 184-191, 2009.

GAZZIERO, D. L. P.; ADEGAS, F.; FORNAROLLI, D.; VARGAS, L.; KARAM, D.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; VOLL, E. Um Alerta Sobre a Resistência de Plantas Daninhas ao Glifosato. **VI Congresso Brasileiro de Soja**, Cuiabá, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Boletins Anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil. **IBAMA**, 2022. Disponível em: <http://ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594&Itemid=54>. Acesso em: 06 set 2022.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Coffee Market Report: December 2023**. International Coffee Organization. Disponível em: <https://icocoffee.org/#>. Acesso em 12 jan 2024.

MARTINS, A. L. **História do Café**. 2ª. ed. São Paulo: Contexto, 2012.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate. **PubChem**, 2022. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>>. Acesso em: 16 set 2022.

PEILLEX, C.; PELLETIER, M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. **Journal of Immunotoxicology**, v. 17, n. 1, p. 163-174, 2020.

RELYEA, R. A. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. **Ecological Applications**, v. 15, n. 2, p. 618-627, 2005.

RONCHI, C. P.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R. **Manejo de Plantas Daninhas em Lavouras de Café**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2001. 94 p.

SCHRÜBBERS, L. C.; VALVERDE, B. E.; SORENSEN, J. C.; CEDERGREEN, N. Glyphosate spray drift in *Coffea arabica* – Sensitivity of coffee plants and possible use of shikimic acid as a biomarker for glyphosate exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 15-22, 2014.

SULLIVAN, T. P.; SULLIVAN, D. S. Vegetation management and ecosystem disturbance: impact of glyphosate herbicide on plant and animal diversity in terrestrial systems. **Environmental Reviews**, Canada, v. 11, n. 1, p. 37-59, 2003.

SUPLICY, E. M. Brasil se consolida na tradição de grande produtor mundial de café. **Visão Agrícola - Esalq**, Piracicaba, v. 12, n. 12, p. 124-126, 2013.

SWANSON, N.; LEU, A.; ABRAHAMSON, J.; WALLET, B. Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America. **Journal of Organic Systems**, v. 9, n. 2, p. 6-37, 2014.

THONGPRAKASANG, S.; THIANANAWAT, A.; RANGKADILOK, N.; SURIYO, T.; SATAYAVIVAD, J. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 129-136, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some organophosphate insecticides and herbicides**. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2017.

CAPÍTULO 1

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS
DE GLYPHOSATE EM GRÃOS DE CAFÉ

RESUMO

O café é uma cultura de grande importância econômica no Brasil e no mundo. O monitoramento de resíduos de pesticidas que podem comprometer a qualidade dos grãos de café, como o glyphosate, é de extrema relevância. Contudo, os métodos apresentados na literatura para estas determinações envolvem a análise indireta do glyphosate, ou uso de reações de derivatização das amostras, tornando as análises do herbicida por técnicas cromatográficas mais lentas e onerosas. Neste sentido, este estudo propõe um método eficaz para a detecção e quantificação de resíduos de glyphosate em grãos de café verde empregando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS). O preparo de amostra foi realizado sem etapas de derivatização, com o *clean up* integrado, o que contribuiu para melhorar a frequência analítica do método. O método foi otimizado e validado seguindo-se os guias de validação de métodos analíticos SANTE/11312/2021 e ANVISA. Os resultados obtidos após a validação foram adequados, garantindo-se a seletividade, linearidade ($r^2 = 0,9991$), reprodutibilidade ($CV \leq 9\%$) e recuperação (92 a 112%), com limite de quantificação satisfatório ($LOQ = 0,48 \text{ mg kg}^{-1}$) e baixo efeito de matriz ($< 10\%$). O método foi aplicado na análise de 6 amostras de grãos verdes de café, coletadas por produtores da Zona da Mata, em Minas Gerais. Os resultados indicaram a contaminação de 2 amostras com glyphosate, em concentrações inferiores ao LOQ. Desse modo nota-se que o método proposto é adequado para o monitoramento de resíduos de glyphosate em grãos de café verde, e pode ser utilizado como uma ferramenta eficiente para garantir a qualidade e segurança dos grãos.

1 INTRODUÇÃO

O café é uma bebida consumida mundialmente. A sua alta aceitação social está, entre outros fatores, associada aos seus aromas e sabores cativantes. Além disso, os efeitos estimulantes que promovem maior atenção e concentração, além de outras propriedades benéficas à saúde humana, como prevenção contra depressão e processos oxidativos (ENCARNAÇÃO e LIMA, 2003; HALL, YUEN e GRANT, 2018; KONO *et al.*, 1995), diminuição das chances de se desenvolver doenças degenerativas do cérebro e doença de Mal de Parkinson (MUNOZ e FUJIOKA, 2018; WANDERLEY *et al.*, 2017; WEBSTER ROSS *et al.*, 2000), resultaram na valorização do café, tornando-o um hábito rotineiro em diversos países.

A História aponta que o café teve suas origens no nordeste da África, mais especificamente na Etiópia. Apesar de deterem a planta, coube aos árabes aprimorarem o cultivo e consumo do café. Estima-se que no ano de 575 as primeiras mudas chegaram ao Sudoeste Asiático, na região do Iêmen, mas somente no século XIV foi desenvolvido o processo de torrefação e o comércio com outras regiões da Arábia (MARTINS, 2012). O café chegou à Europa em 1615, pela cidade de Veneza. Comercializado somente por grãos, ou torrado e moído, o café era preparado por meio de infusão, uma bebida rara, elegante e que rapidamente se tornou muito apreciada no continente. A produção e comercialização se expandiu pela Europa, iniciada pelos holandeses, os quais foram os responsáveis por levar o café à América do Sul em 1718, quando mudas foram plantadas no Suriname.

Os registros históricos relatam a introdução do café no Brasil em 1727, ano em que algumas sementes foram semeadas no Pará, trazidas pelo Sargento-Mor Francisco de Melo Palheta (MARTINS, 2012; RUFINO, 2006). Desde então, o cultivo de café foi se desenvolvendo até se tornar um dos principais produtos nacionais. Nas primeiras décadas do século XX o Brasil já se destacava por deter mais de 50% da produção mundial de café, com mais de 16 milhões de sacos produzidos em 1950 (RUFINO, 2006). O incentivo à produtividade e crescimento desta cultura levaram o Brasil a ser um dos maiores produtores mundiais de café, desde os períodos do Império até os dias atuais,

além de contribuir para o crescimento econômico do país (RUFINO, 2006; SUPLICY, 2013).

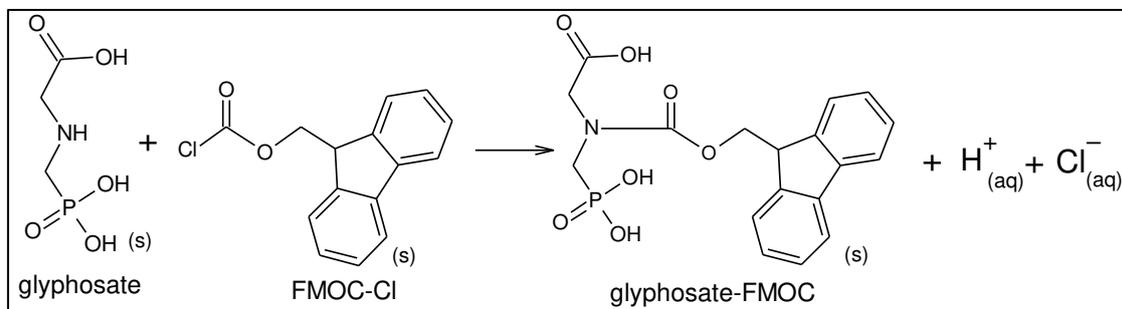
O sabor e aroma do café são dependentes da composição química dos grãos e das modificações causadas pelo processo de torra. Em se tratando de grãos de café verde (cru), estes grãos apresentam em sua composição ácidos, alcaloides, proteínas, açúcares redutores e não redutores, lipídios, minerais, compostos voláteis e água, sendo os polissacarídeos (46 – 53%), lipídios (15 – 18%) e proteínas (8,5 – 12%) os componentes majoritários (BELITZ, GROSCH e SCHIEBERLE, 2009; WANG e LIM, 2015). Contudo, essa composição é dependente das condições ambientais no local de cultivo, práticas culturais e origem genética do cafeeiro (SCHOLZ *et al.*, 2000; WANG e LIM, 2015).

Em relação à contaminação de grãos de café por glyphosate, a ausência de estudos na literatura para análise e quantificação de resíduos deste herbicida se justifica por conta dos desafios encontrados no preparo das amostras e análise por métodos cromatográficos. A complexidade da matriz, por conta de sua variada composição, a polaridade e o pequeno tamanho da molécula do glyphosate são fatores que dificultam estas análises.

De modo geral, para que se possa analisar este composto, é preciso aplicar o processo de derivatização na amostra e/ou solução padrão contendo o analito, que consiste em transformar o analito de interesse em uma molécula adequada para ser analisada por cromatografia e/ou introduzir um grupo químico específico que irá aumentar sua detectabilidade (COLLINS, BRAGA e BONATO, 1997). Em relação especificamente ao glyphosate, é possível encontrar na literatura diversos estudos que aplicam esta estratégia, utilizando, geralmente, o reagente FMOC (9-fluorenilmetilcloroformiato) como agente derivatizante (Figura 1). Esta modificação na estrutura do herbicida permite a análise por cromatografia líquida em fase reversa, uma vez que a molécula se torna mais apolar, sendo possível empregar colunas de fase estacionária hidrofóbica, como C8 e C18, e detecção por fluorescência, ou mesmo espectrometria de massas. Esta metodologia já foi empregada para análise de glyphosate em diversas matrizes, como águas naturais (HANKE, SINGER e HOLLENDER, 2008), solo (SUN *et al.*, 2017), trigo e pães (GÉLINAS, GAGNON

e MCKINNON, 2018) e grãos como arroz e feijão preto (SCHRÜBBERS *et al.*, 2016).

Figura 1 – Reação de derivatização do herbicida glyphosate com o reagente FMOC-Cl.



Fonte: Bernal *et al.*, 2012.

Contudo, a derivatização demanda maior custo e tempo para análise das amostras. Neste sentido, novos métodos têm sido estudados, buscando-se eliminar esta etapa no processo de determinação do composto. O método QuPpe (*Quick Polar Pesticides Method*), desenvolvido por Anastassiades *et al.* (2019), se enquadra nesta concepção. Este método é utilizado para extração e análise de pesticidas de alta polaridade em alimentos de origem vegetal (frutas, vegetais, cereais, leguminosas, grãos, nozes e mel) e já foi empregado como método base para análise do glyphosate em óleos (CHIARELLO *et al.*, 2019) e vegetais (KACZYNSKI, 2017). Um outro método de extração de glyphosate proposto por Martins-Júnior *et al.* (2009) apresenta maior simplicidade, com menos etapas no preparo da amostra, além de demandar menos reagentes quando comparado ao método QuPpe, tendo sido eficientemente empregado para análise de resíduos do herbicida em grãos de soja.

Nestes dois métodos, as amostras contendo o herbicida são analisadas por LC-MS/MS. Por ser um composto muito polar, o glyphosate é facilmente ionizável, favorecendo sua análise por espectrometria de massas, em especial a espectrometria de massas tandem, uma vez que o composto é submetido a duas análises de massa no mesmo equipamento (MS/MS), tornando a identificação mais segura (GROSS, 2017). Nos métodos apresentados foram utilizados equipamentos cujos analisadores são do tipo triplo quadrupolo, capazes de realizar o monitoramento de múltiplas reações de fragmentação,

caracterizando o modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Este modo garante maior sensibilidade e seletividade nas análises, uma vez que apenas o composto de interesse e seus respectivos fragmentos gerados são monitorados em cada evento (GROSS, 2017). Sem a detecção de coextrativos, e com especificidade na análise do composto de interesse, o uso da espectrometria de massas se mostra fundamental para monitoramento de resíduos a nível traço (GROSS, 2017; KACZYNSKI, 2017; ANASTASSIADES *et al.*, 2019).

Contudo, do ponto de vista cromatográfico, em análises diretas do glyphosate sem as etapas de derivatização, como apresentado pelo método QuPPE, as colunas empregadas em análises em fase reversa não apresentam a mesma eficiência, sendo necessário empregar outras fases estacionárias. Colunas com fase estacionária do tipo HILIC (interação hidrofílica); a base de sílica híbrida; a base de grafite poroso (PGC), ou mesmo do tipo IonPac, têm sido recomendadas para análise não só de glyphosate, mas também para análise de compostos iônicos e de outros compostos polares com características semelhantes (ANASTASSIADES *et al.*, 2019).

As colunas HILIC apresentam fases estacionárias polares a base de sílica ou de polímeros, que podem ser modificadas para apresentar característica zwitteriônica (ZIC-HILIC), ou ter em sua superfície grupos funcionais, como amina e amida (OELLIG E SCHWACK, 2017; REDÓN, SUBIRATS e ROSÉS, 2020). A separação é realizada com emprego de fase móvel composta por solvente orgânico, majoritariamente, e baixo percentual de solução aquosa. Dessa forma, forma-se uma camada laminar aquosa na superfície da fase estacionária, garantindo a retenção dos compostos polares na coluna, porém assegurando a solubilidade destes compostos na fase móvel e posterior eluição (JIANG, SMITH e LIU, 2011; REDÓN, SUBIRATS e ROSÉS, 2020). Por outro lado, as colunas PGC tem sido uma alternativa às colunas HILIC, devido à sua maior estabilidade em relação ao pH do meio (HILIC: estável em $\text{pH} < 8$; PGC: estável em $0 < \text{pH} < 14$) e mecanismos únicos de separação, que envolvem interações dispersivas e um efeito polar de retenção, no qual compostos polares apresentam alta afinidade com a superfície do grafite (FENG *et al.*, 2020; PEREIRA, 2008; YOUNG *et al.*, 2021). Estas características permitem a separação não só de compostos polares, mas também de compostos iônicos, além da separação de isômeros (YOUNG *et al.*, 2021; ZHOU *et al.* 2017).

Quanto à análise de resíduos de glyphosate em grãos de café, poucos estudos são encontrados na literatura. Alguns pesquisadores avaliam o efeito do herbicida sobre as plantas, por meio do monitoramento de substâncias produzidas, como a resposta fisiológica da planta (CARVALHO *et al.*, 2012), a atividade fotossintética e quantidade de carbono consumido (CARVALHO *et al.*, 2013) e a quantidade de ácido chiquímico (SCHRÜBBERS *et al.*, 2014). Também se encontra estudos em que as folhas dos cafeeiros são submetidas à processo de extração e análise de resíduos de glyphosate (SCHRÜBBERS *et al.*, 2016). Em estudo realizado por Jian-Lin *et al.* (2020), um método de análise do glyphosate em grãos de café por UPLC-MS/MS é proposto, porém o preparo da amostra requer o processo de derivatização por FMOC-Cl. Desse modo, até o presente momento, no melhor do nosso conhecimento, não foi encontrado na literatura um estudo que avalia resíduos de glyphosate em café sem a etapa de derivatização. Torna-se necessário, então, o desenvolvimento de um método com análise direta do herbicida, sem derivatização, de fácil utilização e que seja capaz de detectar e quantificar com segurança resíduos do glyphosate em café. Assim, neste capítulo será apresentado o desenvolvimento de um método para quantificação de resíduos de glyphosate em grãos de café por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS). O método foi aplicado na análise de amostras de café coletadas por produtores da região da Zona da Mata, em Minas Gerais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método de extração para detecção e quantificação de resíduos de glyphosate em grãos de café verde do tipo *Coffea arabica* utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (LC- MS/MS).

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar e validar o método de extração de glyphosate para detecção e quantificação de resíduos do herbicida em grãos de café verde do tipo *Coffea arabica*;
- Aplicar o método desenvolvido na análise de amostras de grãos de café verde adquiridas de cafeicultores da microrregião de Viçosa, Minas Gerais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Soluções

Acetonitrila e metanol, ambos de grau LCMS, foram adquiridos da Sigma Aldrich. Ácido fórmico (> 98%, Sigma Aldrich), ácido medrônico ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich), diclorometano (grau HPLC > 99,8%, Sigma Aldrich), formiato de amônio (98%, Carlo Erba) e hidróxido de amônio (28 - 30%, Synth) também foram utilizados nos experimentos. Soluções padrão estoque e de trabalho de glyphosate (pureza de 99 % m/m – Sigma Aldrich) e glyphosate isotopicamente marcado (^{13}C , ^{15}N) ($\geq 99\%$ – Sigma Aldrich) foram preparadas em água ultrapura e acetonitrila na proporção 90:10 (% v/v) em diferentes concentrações. Todos os reagentes foram utilizados sem nenhuma etapa de purificação adicional.

3.2 Instrumentação

As análises de glyphosate foram realizadas em cromatógrafo a líquido acoplado ao espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo modelo LCMS 8040 Shimadzu[®] (LC-MS/MS), equipado com injetor automático SIL-10Ai, forno CTO 20A e fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Para separação cromatográfica foi empregada uma coluna Restek[®] Raptor Polar X (30 mm L x 2,1 mm I.D. x 2,7 μm).

Para preparo das amostras foi utilizado um processador de alimentos IKA A11 basic (Sovereign Brasil). Ainda, foram utilizados balança de precisão analítica AY220 (Shimadzu), agitador rotativo acoplado à motor com rotação controlada (Fisatom) e centrífuga refrigerada Multifuge X1R (Thermo Scientific).

3.3 Análise de glyphosate por LC-MS/MS

Para as análises de glyphosate por LC-MS/MS, sem etapa de derivatização, foi realizado o procedimento de passivação do sistema cromatográfico. Este procedimento consiste em passar uma solução

passivadora pelo sistema de injeção, coluna e demais linhas do cromatógrafo, com exceção do espectrômetro de massas, para isolamento dos componentes metálicos do sistema e obtenção de bons picos cromatográficos. Dessa forma, foi utilizada uma solução passivadora composta por ácido medrônico a 1760 mg L^{-1} em água:metanol (50:50 % (v/v)). O procedimento de passivação, seguindo as recomendações do fabricante, consistiu em: injeções de 10 ciclos de $50 \text{ }\mu\text{L}$ de solução passivadora, sem coluna, utilizando-se a fase móvel empregada na análise das amostras, constituída de fração aquosa e fração orgânica na proporção 50:50 % (v/v), a um fluxo de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. A coluna foi removida nesta etapa para que a solução passivadora pudesse passar pelo sistema de injeção do cromatógrafo e respectivas linhas, porém foi descartada em seguida, sem seguir para o espectrômetro de massas. Posteriormente foram realizados 5 ciclos de injeções de $2 \text{ }\mu\text{L}$ de solução passivadora, com coluna devidamente instalada, seguindo-se o método cromatográfico utilizado para análise das amostras. Novamente a solução foi descartada após a saída da coluna, de modo que não entrasse no sistema do espectrômetro de massas. Este procedimento foi executado previamente às análises de soluções padrão e amostras contendo glyphosate, e repetido sempre que necessário.

3.3.1 Otimização das condições cromatográficas de análise

A molécula de glyphosate pode ser positiva ou negativamente ionizada na fonte de ionização ESI. Desse modo, foram avaliadas duas composições de fase móvel, para se determinar qual a condição forneceria maior sensibilidade nas análises. Selecionou-se as seguintes composições binárias: solução aquosa de ácido fórmico 0,5% (Fase A) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,5% (Fase B) e solução aquosa de formiato de amônio $0,63 \text{ g L}^{-1}$ e hidróxido de amônio 0,05% (v/v) (Fase A) e metanol (100%) (Fase B) (MARTINS - JÚNIOR *et al.*, 2009; RESTEK, 2021a). Soluções padrão de glyphosate na concentração de $500 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ foram injetadas, com volume de injeção de $5 \text{ }\mu\text{L}$, e eluídas em modo isocrático (90% A, 10% B), a um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. A temperatura do forno foi mantida a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. As análises foram realizadas no modo *Single Ion Monitoring* (SIM+ e SIM-). Foram selecionadas

as razões massa/carga 170 e 168 m/z para análise em modo positivo e negativo, respectivamente, valores correspondentes à razão m/z da molécula de glyphosate com adição de um próton e remoção de um próton ($[M+H]^+$ e $[M-H]^-$). Para análise dos resultados tomou-se a intensidade do sinal do analito e o formato do pico cromatográfico.

Também foram avaliados diferentes modos de análise em gradiente visando obter melhor eficiência na eluição do glyphosate, tomando-se como referência dados disponibilizados em nota de aplicação do fabricante da coluna empregada neste trabalho (RESTEK, 2021a).

3.3.2 Otimização dos parâmetros espectrométricos de análise

A otimização das transições utilizadas na análise em modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) foi executada pelo software LabSolutions (Shimadzu®). Foram selecionados os parâmetros: ajuste da razão m/z do íon precursor e dos íons produto, otimização da energia da célula de colisão e otimização das voltagens dos quadrupolos (Q1 e Q3). Uma vez que o equipamento utilizado apresenta somente um sistema de injeção tanto para o sistema cromatográfico quanto espectrométrico, para a otimização dos parâmetros, a coluna foi removida, permitindo a injeção direta de soluções no espectrômetro de massas. Foi injetado um volume de 20 µL de solução padrão de glyphosate a 500 µg L⁻¹. O fluxo de fase móvel e temperatura do forno utilizados foram mantidos como citado no tópico 3.3.1. A composição da fase móvel foi definida após os resultados obtidos no tópico 3.3.1. As melhores condições foram selecionadas pelo software e apresentadas em relatório gerado automaticamente após a otimização.

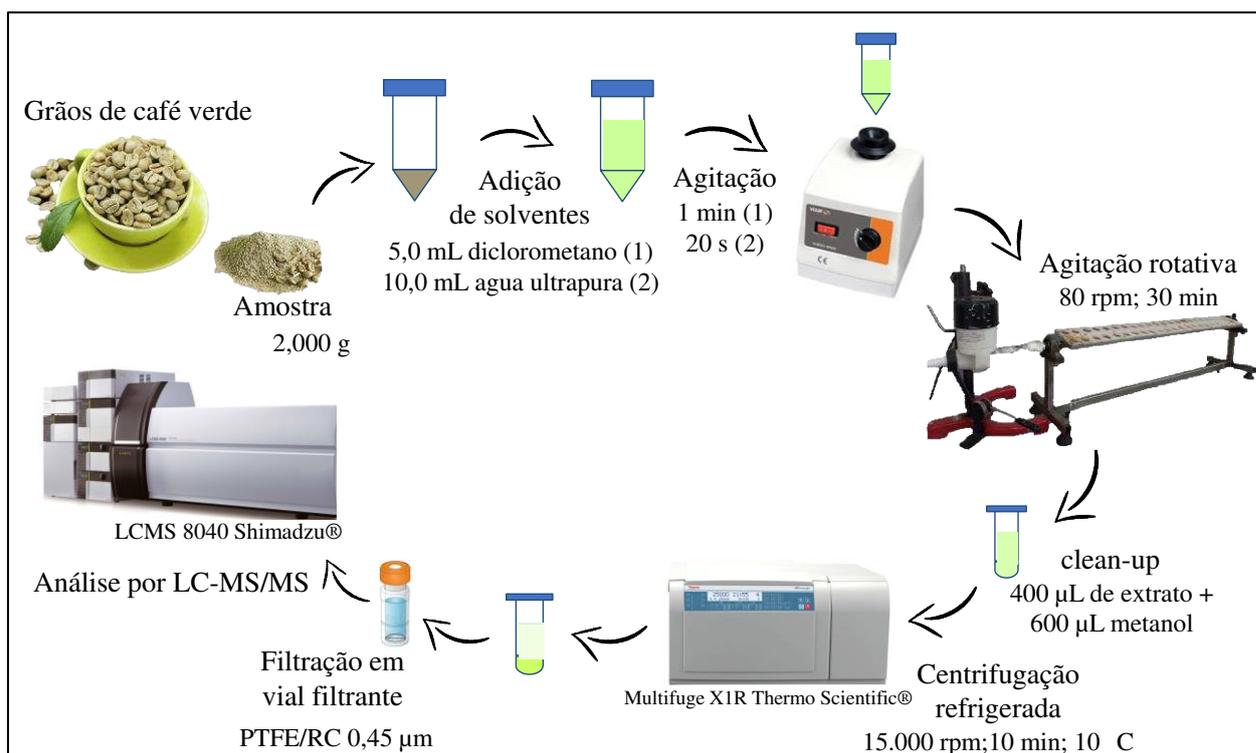
Os parâmetros da fonte de ionização ESI foram otimizados buscando-se aumento da intensidade do sinal do herbicida. Foram selecionados os seguintes parâmetros: fluxo do gás de nebulização (1,0; 2,0 e 3,0 L min⁻¹), fluxo do gás de secagem (3,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 L min⁻¹), temperatura da linha de dessolvatação (100, 150, 200, 250, 280 e 300 °C) e temperatura do bloco de aquecimento (50, 100, 200, 300, 400, 450 e 500 °C). Novamente a otimização foi realizada com remoção da coluna, para injeção direta no espectrômetro de

massas de 20 μL de solução padrão de glyphosate a $500 \mu\text{g L}^{-1}$. O fluxo de fase móvel e temperatura do forno utilizados foram mantidos como citado no tópico 3.3.1. A composição da fase móvel foi definida após os resultados obtidos no tópico 3.3.1. Cada parâmetro da fonte de ionização foi avaliado individualmente, com alteração dos valores estudados a cada injeção. A melhor condição foi determinada por análise da intensidade, ou altura, do pico obtido.

3.4. Determinação de glyphosate em grãos de café verde

O método de extração do glyphosate empregado neste trabalho foi adaptado do método para extração deste herbicida em soja (MARTINS - JÚNIOR *et al.*, 2009) (Figura 2).

Figura 2 – Esquema do método otimizado para extração de glyphosate em grãos de café verde.



Fonte: Paiva, 2023.

O método consiste em adicionar 2,000 g de amostra de grãos verdes (crus) triturados e peneirados a um tubo de polipropileno do tipo Falcon de 50 mL, seguido da adição de 5,0 mL de diclorometano e agitação em vórtex por

1 min. Em sequência adiciona-se água ultrapura, sendo este sistema novamente submetido à agitação em vórtex por 20 s e à agitação em agitador rotativo (360°). A seguir, uma alíquota do sobrenadante é adicionada a um novo tubo do tipo *eppendorf* com capacidade para 1,5 mL, juntamente com metanol. O sistema é agitado em vórtex por 10 s e centrifugado em centrífuga refrigerada por 10 min. O sobrenadante é filtrado em *vial* filtrante (*vial* integrado contendo um dispositivo de filtração com membrada de PTFE ou celulose regenerada 0,45 µm) e analisado por LC- MS/MS.

3.4.1 Tempo de contato entre glyphosate e grãos de café verde

Os experimentos subsequentes de otimização e validação foram realizados com grãos de café secos e despolidos, não torrados, isentos do herbicida. Primeiramente, para simular uma situação em que o grão proveniente do campo está contaminado, foi avaliado o efeito do tempo de contato do analito (glyphosate) com a matriz (grãos de café) após a fortificação. Neste estudo, amostras de 2,0 g de grãos de café moídos foram fortificadas com 2,0 mL de solução de glyphosate a 1,0 mg L⁻¹(água ultrapura : acetonitrila 90:10 %(v/v)), homogeneizadas em vórtex por 10 s e deixadas em repouso em recipiente aberto por diferentes períodos (0; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20 e 24h). Em seguida, estas amostras foram submetidas à técnica de extração descrita no tópico **3.4**. Os extratos foram filtrados em *vial* filtrante contendo membrana de celulose regenerada (RC) 0,45 µm e analisados por LC-MS/MS. Todo o experimento foi realizado em triplicata. Tomou-se como resposta as áreas dos picos obtidas após as análises cromatográficas e o tempo de contato ideal entre o glyphosate e os grãos moídos foi determinado como o tempo mínimo para que estes valores de área permanecessem constantes.

3.4.2. Otimização do método de determinação de glyphosate em grãos de café verde

Visando proporcionar a melhor eficiência na extração do glyphosate em grãos de café, o método de extração do glyphosate foi otimizado quanto a alguns

fatores que poderiam influenciar no processo. Para otimização do método, foram avaliados os efeitos dos seguintes parâmetros: volume de solvente extrator, tempo de agitação em agitador rotativo e velocidade de rotação, velocidade e temperatura de centrifugação e fator de diluição do extrato em metanol. A otimização foi realizada em três etapas para melhor avaliação dos efeitos estudados.

Inicialmente avaliou-se o efeito do volume de água ultrapura, responsável por extrair o herbicida, o tempo de agitação em agitador rotativo e a velocidade de rotação durante a agitação, fatores que podem atuar na interação do solvente extrator utilizado e a matriz.

Estabeleceu-se um planejamento fatorial 2^3 com ponto central e 3 repetições, totalizando 27 experimentos (Tabela 1). Os valores de volume de água foram definidos em 10, 20 e 30 mL. O tempo de agitação foi avaliado por 30, 60 e 90 min. Os valores de velocidade de rotação do agitador rotativo foram definidos em 40, 60 e 80 rpm.

Planejamento Fatorial - 2^3				
Experimento	Repetições	Vol. H ₂ O (mL)	Agitação (min)	Rotação (rpm)
1	3	10	30	40
2	3	10	30	80
3	3	10	90	40
4	3	10	90	80
5	3	30	30	40
6	3	30	30	80
7	3	30	90	40
8	3	30	90	80
9 (PC)	3	20	60	60

Tabela 1 – Planejamento fatorial 2^3 proposto para estabelecer o volume de água ultrapura (mL), o tempo de agitação em agitador rotativo (min) e a velocidade de rotação (rpm) na extração do glyphosate em grãos de café.

Todos os experimentos seguiram o procedimento experimental descrito anteriormente. Os extratos foram filtrados em *via*/ filtrante (RC 0,45 μ m) e analisados por LC-MS/MS. As áreas dos picos foram utilizadas como resposta

do planejamento fatorial. Todos os dados foram analisados utilizando-se o software Statistica® 7, com nível de confiança de 95%.

A segunda etapa de otimização avaliou o efeito da velocidade e temperatura de centrifugação, fatores que atuam diretamente no *clean up* da amostra. A centrifugação refrigerada em alta velocidade é recomendada para a centrifugação de amostras que apresentam dificuldade na etapa de filtração, como cereais, oleaginosas e demais grãos. Para estas avaliações, foi elaborado um novo planejamento fatorial 2² com 3 repetições. Os valores de rotação da centrífuga refrigerada foram definidos em 5.000 e 15.000 rpm e os valores de temperatura durante a centrifugação foram definidos em 10 e - 10 °C (Tabela 2).

Planejamento Fatorial - 2 ²			
Centrifugação			
Experimento	Repetições	Rotação (rpm)	Temperatura (°C)
1	3	5.000	-10
2	3	5.000	10
3	3	15.000	-10
4	3	15.000	10

Tabela 2 – Planejamento Fatorial 2² proposto para estabelecer a velocidade de rotação da centrífuga (rpm) e a temperatura de centrifugação (°C) no *clean up* dos extratos de grãos de café.

Todos os experimentos seguiram o procedimento experimental descrito anteriormente, porém com as modificações referentes aos resultados obtidos na primeira otimização. Os extratos foram filtrados em *vial* filtrante (RC 0,45 µm) e analisados por LC-MS/MS. Novamente as áreas dos picos foram utilizadas como resposta do planejamento fatorial, e os dados foram analisados utilizando-se o software Statistica® 7, com nível de confiança de 95%.

Por fim, a proporção entre o volume de metanol e o volume de extrato foi avaliada em estudo univariado. O metanol auxilia na precipitação de proteínas e lipídios provenientes da matriz, diminuindo suas solubilidades no extrato aquoso. Buscou-se avaliar diferentes proporções de metanol, de modo a se obter um extrato final mais adequado para análise cromatográfica. Os valores da proporção de metanol e extrato foram definidos em 50:50, 60:40 e 70:30 %(v/v),

em dois níveis de concentração de glyphosate (0,5 e 1,0 mg kg⁻¹). Neste ensaio, os cromatogramas obtidos foram comparados, e as proporções de área na relação sinal:ruído foram utilizadas como resposta para definição da melhor condição de análise.

3.4.3 Validação do método de determinação de glyphosate em grãos de café verde

A quantificação de glyphosate foi realizada utilizando-se o método de superposição de matriz com adição de padrão interno. Neste trabalho, o padrão interno selecionado foi glyphosate isotopicamente marcado (¹³C, ¹⁵N). Antes de se iniciar o procedimento de validação, foi realizada a otimização das transições utilizadas no modo MRM para o padrão interno por meio do software LabSolutions (Shimadzu®), assim como descrito no tópico **3.3.2**.

O método foi validado seguindo-se o guia de validação para análise de resíduos de pesticidas em alimentos disponibilizado pela União Europeia SANTE/11312/2021 (2022), e tomou-se a Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 166, disponibilizada pela ANVISA em 2017, como complemento para a validação, dada a abrangência desta Resolução à tópicos não abordados pelo SANTE/11312/2021 (2022). Foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), efeito de matriz, robustez, cromatograma de íons extraídos (XIC) e proporção da intensidade dos íons.

A seletividade foi avaliada comparando as repostas cromatográficas, por meio do tempo de retenção (t_R) do analito, de uma solução padrão de glyphosate e de um extrato da matriz fortificada com glyphosate, frente à resposta de um extrato da matriz (amostra branco), isenta do analito, neste mesmo tempo. É necessário que a resposta do branco seja $\leq 30\%$ da resposta do analito em valores a serem usualmente reportados. Sendo assim, o ensaio foi realizado considerando-se o LMR, de 1,0 mg kg⁻¹.

A linearidade foi avaliada por meio de curva analítica preparada por meio de extração da matriz fortificada, em 7 níveis distintos, com triplicata em cada

nível. Foram definidas as concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mg kg⁻¹, que englobam o limite máximo de resíduo de glyphosate para café (LMR = 1,0 mg kg⁻¹) (ANVISA, 2023), e valores abaixo e acima deste LMR. A linearidade foi avaliada em termos do coeficiente de determinação (r^2) e por meio gráfico (razão de área/concentração *versus* concentração de glyphosate). Ainda, foi determinado o desvio padrão relativo, ou coeficiente de variação, da concentração calculada frente à concentração real ($\leq \pm 20\%$) para todos os níveis estudados, de modo a verificar se a faixa de trabalho escolhida está dentro do aceitável pelos guias de validação.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados por meio dos parâmetros da curva analítica na matriz: coeficiente angular (S) e estimativa do desvio padrão do branco (s) (extrato da matriz isenta do analito), como indicado nas Equações 1 e 2:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (1)$$

$$LQ = 10,0 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

A precisão foi avaliada, por meio dos coeficientes de variação (CV), quanto à repetitividade, realizada em um único dia de análise, e quanto à precisão intermediária, com análises realizadas em 3 dias não consecutivos. Ambos os ensaios foram realizados por um único analista e em dois níveis de concentração distintos, correspondentes ao LMR (1,0 mg kg⁻¹) e 5 x LMR (5,0 mg kg⁻¹), com 5 repetições para cada nível. São aceitáveis valores de CV menores ou iguais (\leq) a 20%, (Equação 3):

$$CV = \frac{s'}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

Onde s' é a estimativa do desvio padrão das concentrações de glyphosate calculadas por meio da equação da reta da curva analítica obtida, e \bar{x} é a média destas concentrações.

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação (%R) do método (70 a 120%) (Equação 4). Os ensaios também foram realizados em dois níveis distintos (LMR e 5 x LMR), com 5 repetições para cada nível.

$$\%R = \frac{C(gly)_E}{C(gly)_R} \times 100 \quad (4)$$

Onde $C(gly)_E$ é a concentração de glyphosate calculada por meio da equação da reta da curva analítica obtida, e $C(gly)_R$ é a concentração de glyphosate real.

O efeito de matriz busca avaliar o efeito do extrato da matriz na resposta cromatográfica do analito. Para avaliar esta figura de mérito foram elaboradas curvas analíticas de glyphosate em água ultrapura e acetonitrila na proporção 90:10 %(v/v) e no extrato da matriz, ambas na mesma faixa de concentração (5, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 $\mu\text{g L}^{-1}$, com concentração do padrão interno fixa em 80 $\mu\text{g L}^{-1}$). O efeito de matriz percentual (%EM) foi determinado utilizando-se o coeficiente angular das curvas analíticas obtidas, empregando-se a Equação 5:

$$\%EM = \frac{S_E - S_S}{S_S} \times 100 \quad (5)$$

Onde S_E é o coeficiente angular da curva analítica preparada no extrato da matriz e S_S é o coeficiente angular da curva analítica preparada em solventes.

A robustez avalia a sensibilidade do método ao sofrer pequenas variações. Sendo assim, para avaliação desta figura de mérito, três parâmetros foram selecionados e levemente alterados ao longo do preparo da amostra: tempo de agitação em agitador rotativo (28 e 32 min), tempo de centrifugação em centrífuga refrigerada (8 e 12 min) e temperatura da coluna cromatográfica (33 e 37 °C). As amostras isentas de glyphosate foram fortificadas a 1,0 mg kg^{-1} (LMR) e submetidas ao processo de extração seguindo-se o planejamento apresentado na Tabela 3.

Após os ensaios, as concentrações de glyphosate foram calculadas e os desvios padrões relacionados a cada parâmetro foram determinados por meio da Equação 6:

$$\text{Desvio padrão de } I = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})}{n - 1}} \quad (6)$$

Onde $\sum(x_i - \bar{x})$ é o somatório do quadrado da diferença de cada concentração de glyphosate (maior e menor valor do parâmetro selecionado) em relação à média das concentrações de glyphosate obtidas nos experimentos realizados e n é o número de elementos (concentrações), ou seja, $n = 2$ para cada parâmetro estudado.

Avaliação da robustez do método				
Experimento	Repetições	Agitação (min)	Centrifugação (min)	Temperatura da Coluna (°C)
1	3	28	8	33
2	3	28	8	37
3	3	28	12	33
4	3	28	12	37
5	3	32	8	33
6	3	32	8	37
7	3	32	12	33
8	3	32	12	37

Tabela 3 – Planejamento experimental utilizado para validação do parâmetro robustez.

Além disso, a robustez foi avaliada por meio da abordagem de Youden (EUROPEAN COMMISSION, 2002), com a determinação do desvio padrão das diferenças (DP_{D_i}) dos efeitos dos parâmetros avaliados (Equação 7).

$$DP_{D_i} = \sqrt{2 \sum \left(\frac{D_i^2}{n} \right)} \quad (7)$$

Onde D_i^2 é o quadrado das diferenças dos parâmetros selecionados e n é o número de parâmetros.

Por fim, uma vez que as análises foram realizadas em LC-MS/MS, o método também foi validado quanto aos íons selecionados para identificação e quantificação de glyphosate pelo modo MRM. É necessário que o pico do analito nos cromatogramas das transições selecionadas sejam completamente sobrepostos. Além disso, verifica-se a proporção entre as intensidades relativas dos íons (fragmentos) selecionados, obtidos na análise de soluções padrão, em relação às respostas obtidas em amostras do analito no extrato da matriz. As intensidades relativas dos íons em amostras obtidas após extração do glyphosate em grãos de café não deve variar acima de 30% quando comparada à solução padrão do analito.

3.5 Aplicação do método na análise de amostras de grãos de café verde da região da Zona da Mata em Minas Gerais

Após a otimização e validação do método, este foi aplicado na análise de 6 amostras distintas de grãos de café verde adquiridas de cafeicultores da Microrregião de Viçosa, localizada na Zona da Mata, em Minas Gerais, Brasil.

As amostras foram preparadas em triplicata, seguindo-se o método de extração otimizado. Os extratos foram analisados por LC-MS/MS e as respostas obtidas foram avaliadas usando-se uma curva analítica preparada em matriz isenta do analito no mesmo dia.

4 RESULTADOS

4.1 Otimização da análise de glyphosate por LC-MS/MS

Inicialmente, determinou-se a melhor composição de fase móvel para análise de glyphosate. Para isto, soluções padrão do herbicida na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ foram analisadas em modo SIM utilizando-se duas composições de fase móvel distintas. As respostas cromatográficas obtidas estão representadas na Figura 3.

A partir das análises realizadas, tomou-se como composição de fase móvel a solução de ácido fórmico 0,5 % (v/v) (Fase A) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,5 % (v/v) (Fase B) e o modo de ionização negativo (cromatograma D). Nesta composição, o pH da fase móvel é de aproximadamente 2,3.

Para justificar a melhor ionização em modo negativo e obtenção de sinal satisfatório, como observado na Figura 3D neste valor de pH, avaliou-se o valor da carga efetiva (q_{ef}) da molécula de glyphosate neste pH. A carga efetiva é definida pela soma da carga da espécie multiplicada por sua fração de equilíbrio (Equação 8) e os resultados são apresentados na Figura 4.

$$q_{ef} = \sum q_i \alpha_i \quad (8)$$

Onde q_i é a carga da espécie química e α_i é a fração de equilíbrio da espécie em um determinado valor de pH.

Figura 3 – Cromatogramas obtidos após análise de solução padrão de glyphosate a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ em eluição isocrática (fluxo $0,4 \text{ mL min}^{-1}$) com as seguintes composições de fase móvel e modo de análise: (A) 90% solução aquosa de formiato de amônio $0,63 \text{ g L}^{-1}$ e hidróxido de amônio 0,05% (v/v) e 10% metanol (Modo SIM +); (B) 90% solução aquosa de formiato de amônio $0,63 \text{ g L}^{-1}$ e hidróxido de amônio 0,05% (v/v) e 10% metanol (Modo SIM -); (C) 90% solução aquosa de ácido fórmico 0,5% (v/v) e 10% acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,5% (v/v) (Modo SIM +); (D) 90% solução aquosa de ácido fórmico 0,5% (v/v) e 10% acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,5% (v/v) (Modo SIM -).

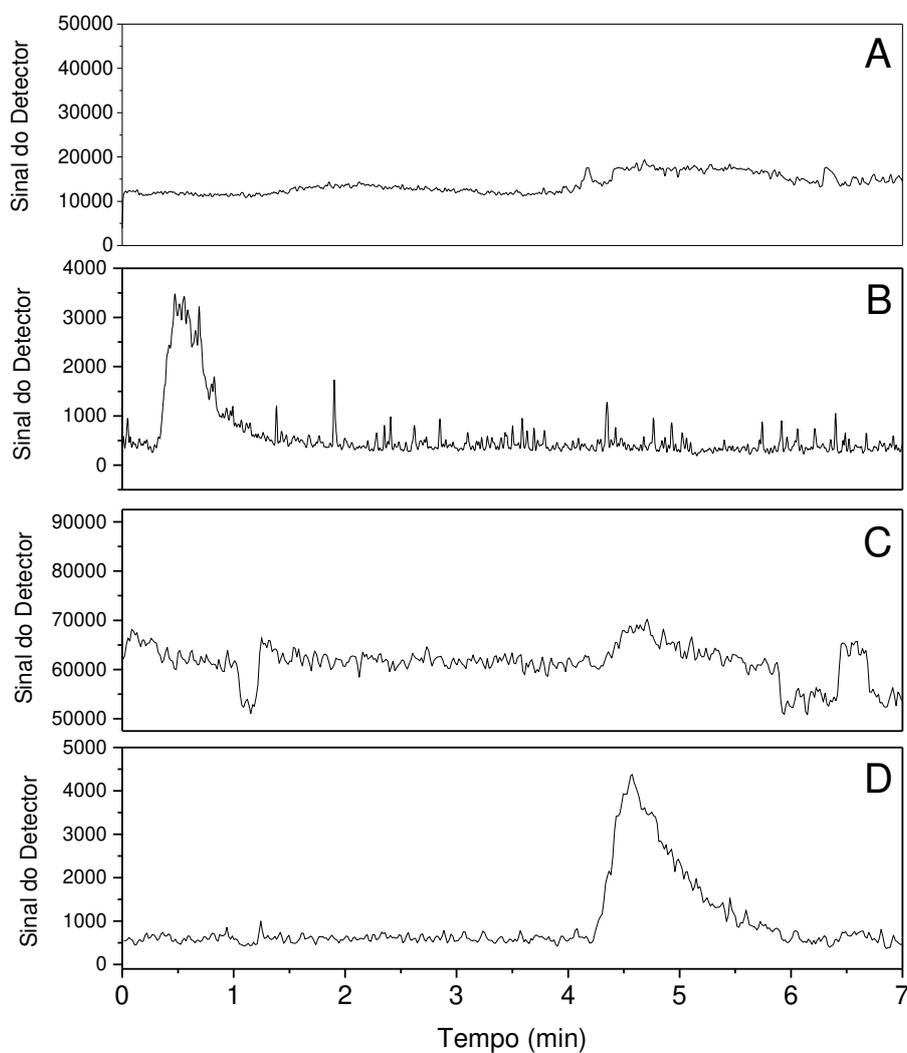
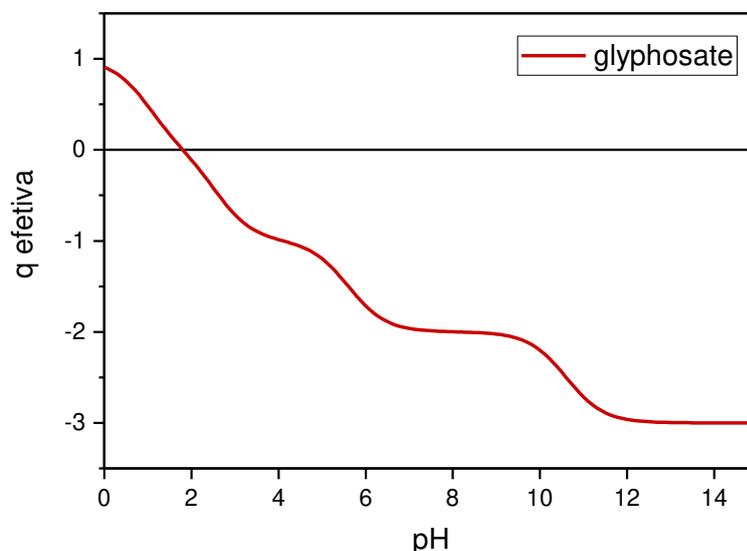


Figura 4 – Valor de carga efetiva da molécula de glyphosate x pH.



Observa-se que a carga efetiva do glyphosate é negativa em pH 2,3 de modo que majoritariamente a carga das espécies de glyphosate no meio será negativa, favorecendo a ionização da espécie em modo negativo na fonte ESI.

Entretanto, o espectrômetro de massas possuiu melhor resolução quando operando em modo MRM, uma vez que a seletividade da análise é maior. Assim, uma vez definida a fase móvel, foi realizada a otimização da análise de glyphosate no modo MRM, ou seja, foram realizados os ajustes dos valores da razão m/z do íon precursor e dos íons produtos gerados na célula de colisão, assim como otimização das energias nos quadrupolos 1(Q1) e 3(Q3) e na célula de colisão. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

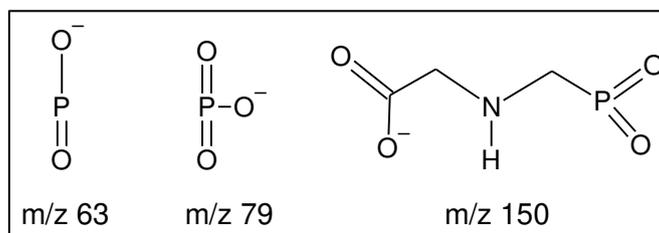
Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	EC* (V)	Q1 (V)	Q3 (V)
168,1	63,1	26	10	10
168,1	78,8	40	24	26
168,1	149,9	14	17	28

* Energia de colisão

Tabela 4 – Valores dos parâmetros já otimizados para análise de glyphosate em modo MRM (-). A otimização foi realizada pelo software LabSolutions (Shimadzu®) por injeção direta no espectrômetro de massas de 20 μL de solução padrão de glyphosate de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, a um fluxo de 0,4 mL min^{-1} .

Os íons produto gerados estão representados na Figura 5, estes foram estimados de acordo com os mecanismos de fragmentação do glyphosate elucidados por Goodwin *et al.* (2004).

Figura 5 – Fragmentos de glyphosate monitorados como íons produto em análise no modo MRM (-).



Fonte: Goodwin *et al.*, 2004.

Em sequência, foi realizada a otimização dos parâmetros da fonte de ionização, para aumento da intensidade do sinal do glyphosate. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Parâmetros	Valores
Gás de nebulização	3,0 L min ⁻¹
Gás de secagem	15,0 L min ⁻¹
Linha de dessolvatação	280 °C
Bloco de aquecimento	450 °C

Tabela 5 – Valores dos parâmetros já otimizados da fonte de ionização por *Electrospray*. A otimização foi realizada por injeções consecutivas diretamente no espectrômetro de massas de 20 µL de solução padrão de glyphosate de 500 µg L⁻¹, a um fluxo de 0,4 mL min⁻¹, com análise da intensidade do pico a cada injeção.

Por fim, foi otimizado o modo de eluição adequado para a análise do glyphosate. A coluna Raptor Polar X empregada nas análises apresenta fase estacionária composta por partículas porosas de sílica ligadas a um ligante Polar X (não informado pelo fabricante). Em função disto, esta coluna apresenta tanto a capacidade de interagir hidrofílicamente com o analito (cromatografia HILIC) quanto é capaz de realizar troca iônica, de acordo com a polaridade da fase móvel ao longo da corrida cromatográfica. Desta forma, para melhor eluição do glyphosate, torna-se necessária a variação da polaridade da fase móvel ao longo da análise, utilizando-se a eluição em gradiente. Inicialmente a fase móvel

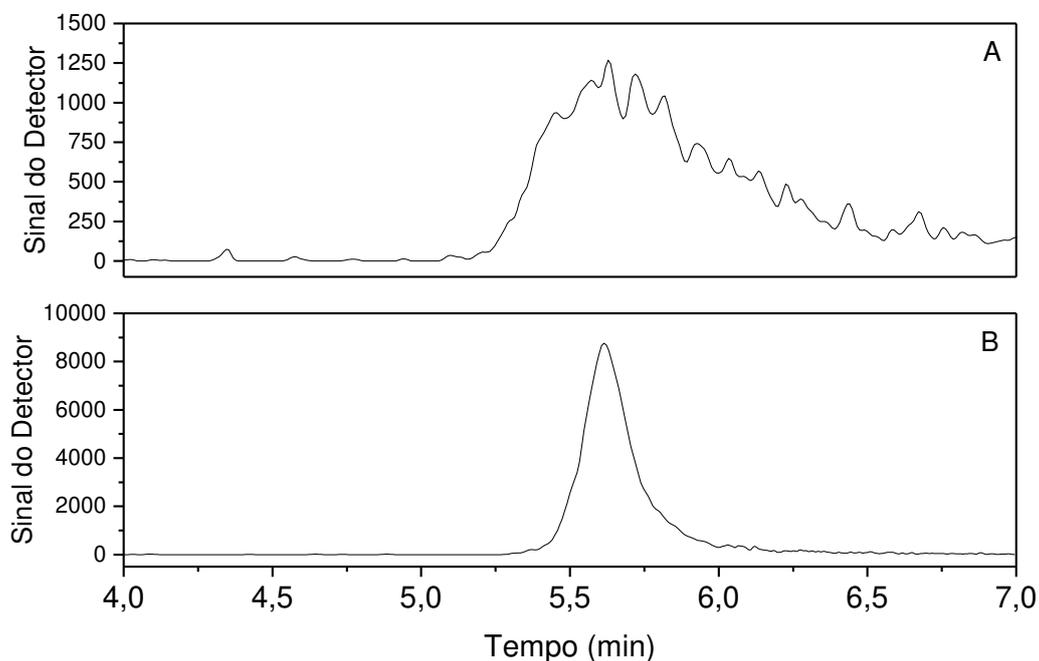
apresenta maior porcentagem de solvente orgânico, garantindo-se assim uma maior interação do analito com a fase estacionária (retenção HILIC). Ao longo da corrida cromatográfica tem-se o aumento da fração aquosa, permitindo a eluição do herbicida (mecanismo de troca iônica) (RESTEK, 2021b). Para definição do gradiente de fase móvel utilizado neste trabalho, soluções padrão de glyphosate a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ foram analisadas em 2 modos distintos de gradientes, os quais estão representados na Tabela 6.

Gradiente 1		Gradiente 2	
Tempo (min)	% B	Tempo (min)	% B
0,0	65	0,0	60
5,0	10	1,5	60
6,5	10	2,5	5
6,51	65	7,0	5
8,0	65	7,01	60
-	-	10,0	60

Tabela 6 – Gradientes de eluição avaliados para análise de glyphosate por LC- MS/MS.

Ao final de cada corrida a coluna permanece com maior porcentagem da Fase B para reequilíbrio da fase estacionária. As respostas cromatográficas obtidas estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6 – Cromatogramas obtidos após análise de solução padrão de glyphosate a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ em eluição gradiente: (A) gradiente de eluição 1 e (B) gradiente de eluição 2 (ambos descritos na Tabela 6).

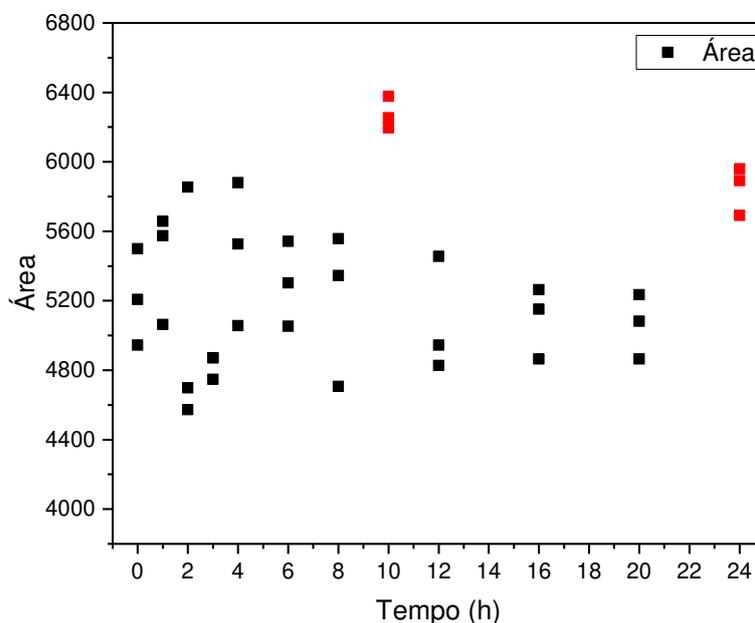


A partir dos resultados obtidos, definiu-se o gradiente 2 para as análises subsequentes de glyphosate ($t_R = 5,6$ min).

4.2 Otimização do método de determinação de glyphosate em grãos de café verde

Para realização dos estudos de otimização e validação da técnica de extração de glyphosate, tomou-se grãos de café da espécie *Coffea arabica*, secos, despulpados, não torrados, isentos do herbicida. Ao longo dos estudos estas amostras foram fortificadas com solução de glyphosate em diferentes concentrações. Desse modo, foi necessário avaliar o tempo ideal de contato entre o analito (herbicida) e a matriz (grãos) após a fortificação, e os possíveis efeitos e/ou alterações nas respostas cromatográficas do glyphosate. O estudo foi realizado com diferentes tempos de interação, as áreas dos cromatogramas de íons totais foram obtidas como resposta e os resultados estão apresentados na Figura 7.

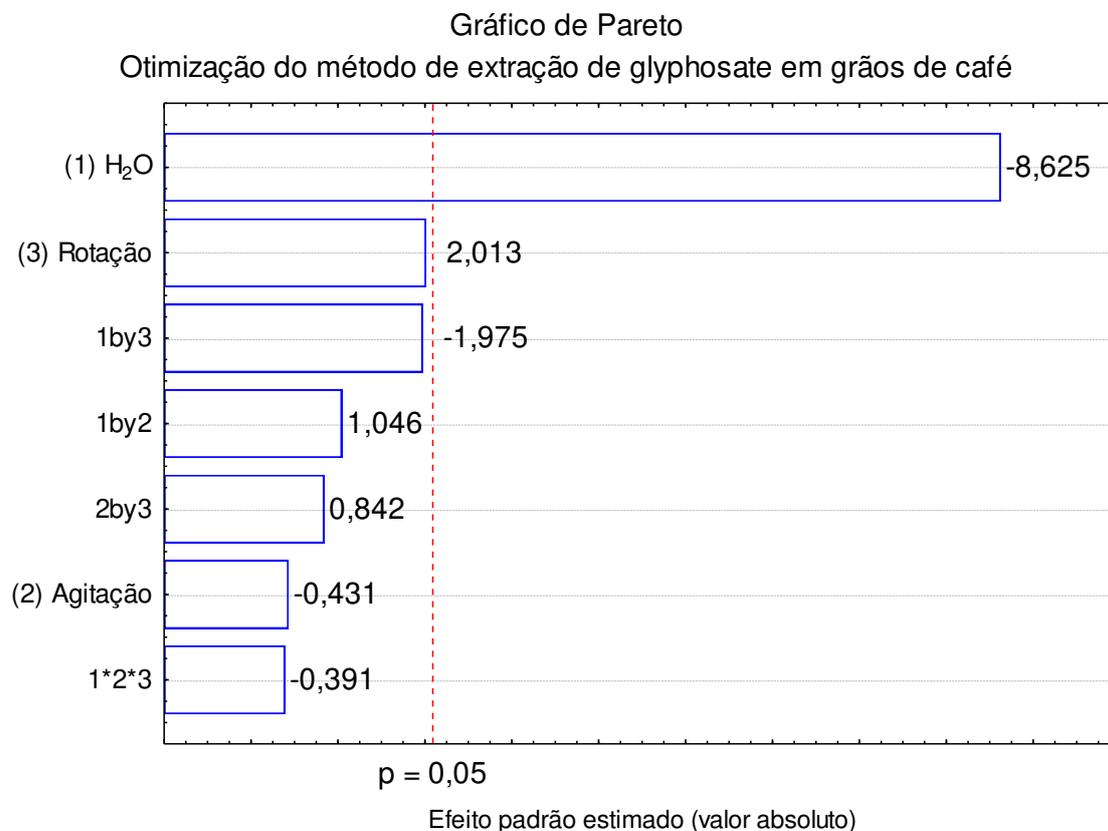
Figura 7 – Áreas obtidas após análise de extratos de grãos de café moído fortificados com glyphosate a $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ e mantidos em repouso por diferentes períodos de tempo após a fortificação.



Ainda que tenha se observado uma maior dispersão dos dados entre 1 e 4h de contato, as áreas obtidas no tempo 0h e nos demais tempos (a partir de 6h) apresentaram menor dispersão e se mantiveram constantes, indicando que a quantidade de glyphosate extraído não se alterou com a variação do tempo de contato entre a amostra e o analito após a fortificação. Em função disto, nos experimentos subsequentes, foi iniciado o procedimento de extração logo após a fortificação das amostras. Ainda, as amostras que permaneceram em repouso por 10 e 24h, demarcadas em vermelho na Figura 7, foram consideradas *outliers*.

Na primeira etapa da otimização, os efeitos dos parâmetros volume de solvente extrator, tempo e velocidade (rotação) de agitação em agitador rotativo foram avaliados. As áreas obtidas após as análises cromatográficas foram utilizadas como resposta do planejamento fatorial empregado. Os resultados obtidos estão apresentados em um Gráfico de Pareto na Figura 8.

Figura 8 – Gráfico de Pareto representando o efeito dos fatores volume de água (mL), tempo de agitação (min) e velocidade de rotação (rpm) na extração de glyphosate de grãos de café.



Legenda:

Volume de H₂O (mL): 10,0 (-); 20,0 (0); 30,0 (+)

Tempo de Agitação (min): 30 (-); 60 (0); 90 (+)

Velocidade de Rotação (rpm): 40 (-); 60 (0); 80 (+)

De acordo com os resultados dispostos no Gráfico de Pareto, o único parâmetro que se mostrou significativo para extração do herbicida ($p < 0,05$) foi o volume de água, sendo o menor volume (10,0 mL) mais adequado, provavelmente devido à diluição do analito quando empregado maiores volumes do extrator.

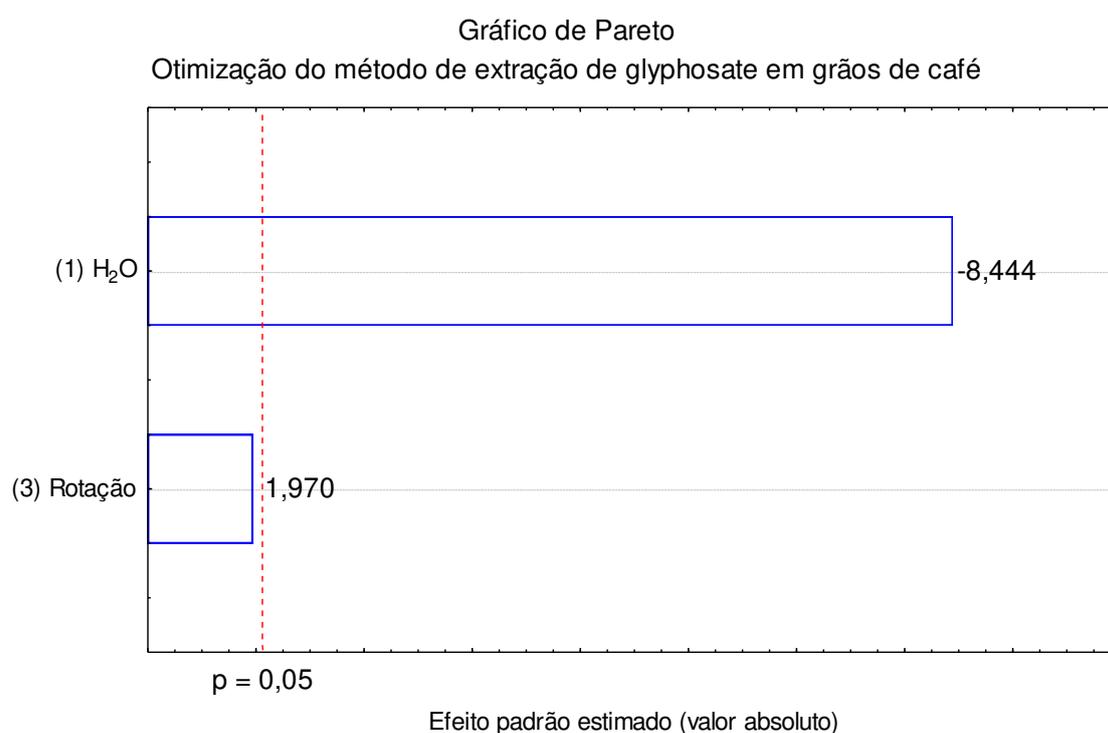
Para melhor compreensão do sistema foi realizada nova análise dos dados, com regressão por *stepwise*, a qual consiste em adicionar e remover sistematicamente as variáveis de maior e menor significância, respectivamente. Esta nova análise dos resultados buscou determinar o melhor ajuste do modelo empregado e avaliar o efeito do fator velocidade de rotação e sua interação com o fator volume de água. Contudo, após a análise, observou-se que a velocidade

de rotação se trata de um fator não-significativo para a técnica de extração (p- valor = 0,06) (Tabela 7 e Figura 9).

Fator	Efeito	t(24)	p
Vol. H ₂ O	-1071,08	-8,44	0,00
Rotação	249,92	1,97	0,06

Tabela 7 – Efeito, efeito padrão estimado (t(24)) e p-valor dos fatores volume de água (mL) e velocidade de rotação (rpm) obtidos após análise de regressão por *stepwise*.

Figura 9 – Gráfico de Pareto representando o efeito dos fatores volume de água (mL) e velocidade de rotação (rpm), após análise de regressão por *stepwise*, na extração de glyphosate de grãos de café.



Legenda:

Volume de H₂O (mL): 10,0 (-); 20,0 (0); 30,0 (+)

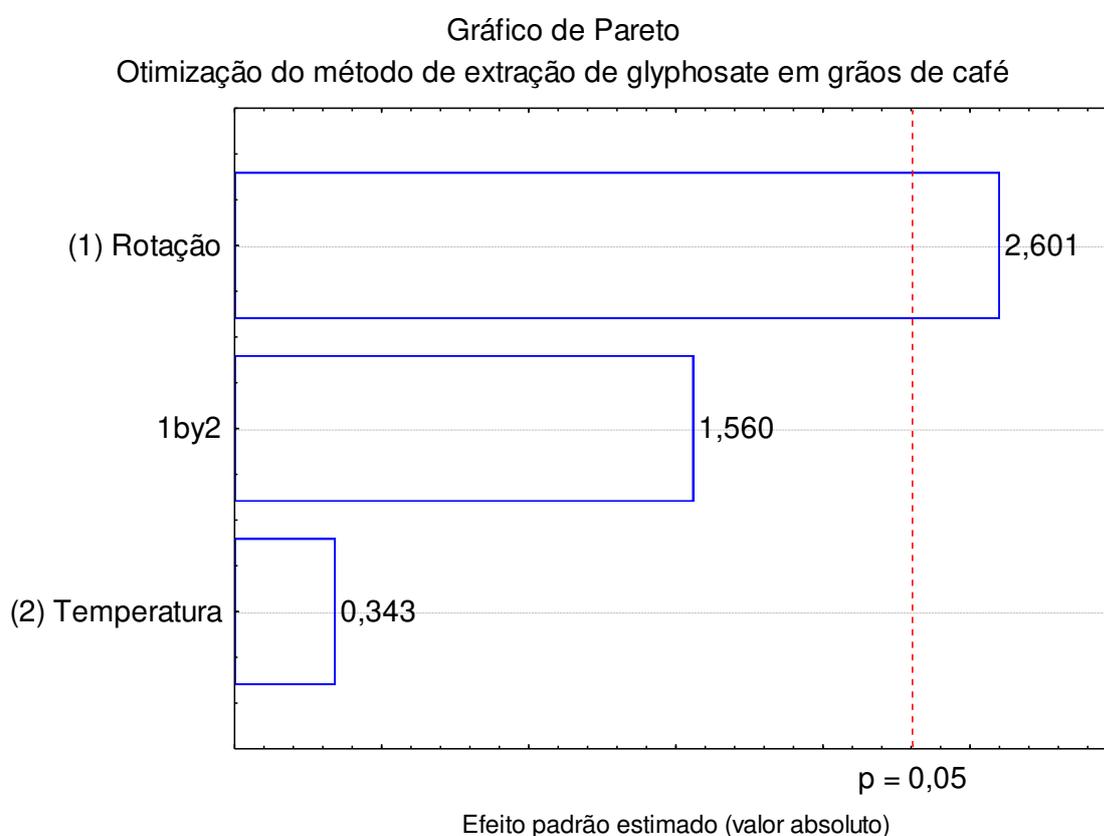
Velocidade de Rotação (rpm): 40 (-); 60 (0); 80 (+)

Portanto, as melhores condições para a extração consistiram em utilizar volume de água de 10,0 mL para extração. Uma vez que os demais fatores não foram significativos na técnica empregada, estabeleceu-se 30 min como tempo de agitação, visando a redução do tempo total de preparo de amostra. Já a

velocidade de rotação foi mantida a 80 rpm. Ainda que esse fator tenha se mostrado não significativo a 95% de confiança, observou-se um ganho médio de sinal de 9% quando comparado à agitação a 40 e 60 rpm.

Na segunda etapa de otimização foram avaliados os efeitos dos parâmetros velocidade e temperatura de centrifugação. As áreas obtidas após as análises cromatográficas foram utilizadas como resposta do planejamento. Os resultados obtidos estão apresentados pelo Gráfico de Pareto na Figura 10.

Figura 10 – Gráfico de Pareto representando o efeito dos fatores velocidade de rotação (rpm) e temperatura (°C) da centrifugação na extração de glyphosate de grãos de café.



Legenda:

Velocidade de Rotação (rpm): 5000 (-); 15000 (+)

Temperatura de centrifugação (°C): -10 (-); 10 (+)

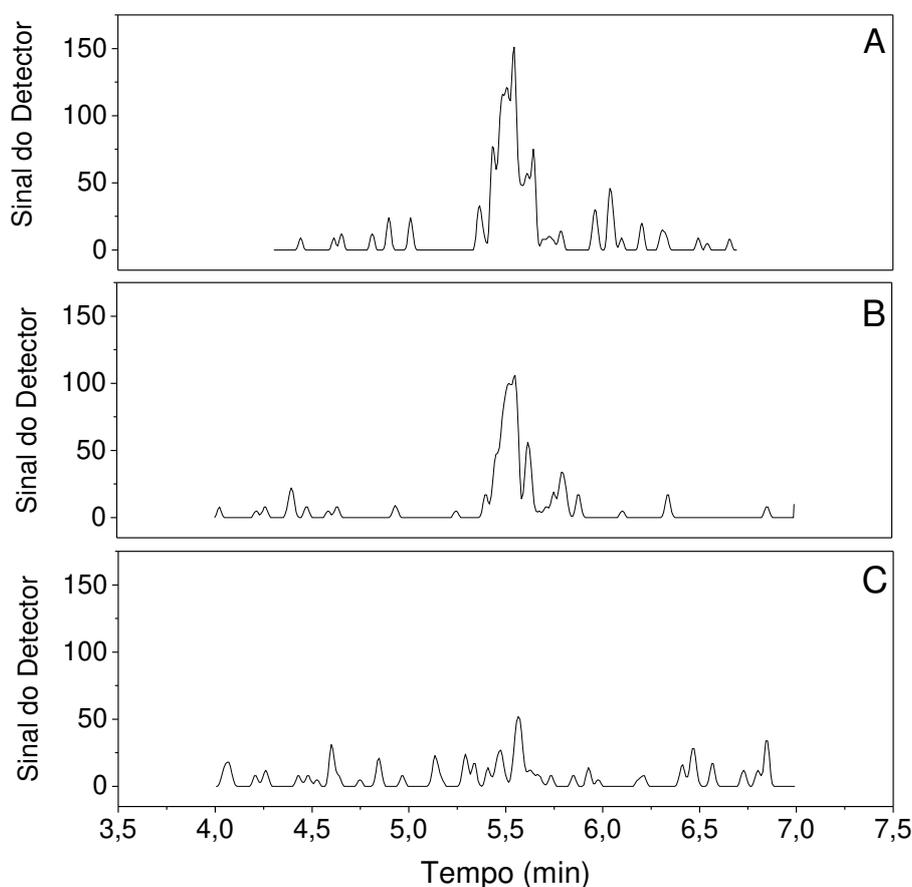
De acordo com os resultados dispostos no Gráfico de Pareto, somente o parâmetro velocidade de rotação da centrífuga foi positivamente significativo na extração do herbicida ($p < 0,05$). Desse modo, tomou-se a maior velocidade de centrifugação (15.000 rpm) para realização dos experimentos futuros. A rotação

em alta velocidade permite uma melhor deposição das partículas presentes no extrato, de modo que o sobrenadante se torne mais limpo e livre de interferentes que possam dificultar e/ou mascarar a ionização e posterior detecção do glyphosate. Além disso, a ausência de partículas no sobrenadante facilita o processo de filtração do extrato antes da análise cromatográfica (ANASTASSIADES *et al.*, 2019).

Uma vez que a temperatura de centrifugação não foi um parâmetro significativo para extração, esta foi mantida em 10 °C, por requerer menor tempo de pré-resfriamento da centrífuga.

Em relação à adição de metanol ao extrato, visando a precipitação de proteínas e lipídios provenientes da matriz, observou-se, pelos cromatogramas obtidos, que a alteração da proporção do volume de metanol e de extrato não comprometeu a visualização do pico do glyphosate nas amostras fortificadas em 1,0 mg kg⁻¹. Contudo, em relação aos extratos correspondentes às amostras fortificadas em 0,5 mg kg⁻¹, a alteração do pico cromatográfico foi significativa. Foi realizada a integração do pico do glyphosate nos cromatogramas obtidos após análise das amostras fortificadas e a integração no mesmo tempo de retenção do glyphosate em um branco da matriz, ou seja, em amostra isenta do herbicida. As áreas obtidas foram utilizadas para determinação da razão sinal:ruído entre o analito e o branco da matriz. Nos extratos cujas proporções de volume de metanol e de extrato foram 50:50 e 60:40 %(v/v), a razão sinal:ruído obtida entre as amostras e o branco foram de, respectivamente, 23:1 e 10:1, aproximadamente. Em relação à proporção 70:30 %(v/v) de metanol e extrato, a razão sinal:ruído foi menor que 5:1 (Figura 11), sendo o pico muito próximo ao próprio ruído. Dessa forma, tomou-se para as análises futuras a proporção volume de metanol e volume de extrato de 60:40 %(v/v), adequada para melhor preservação do sistema cromatográfico, enquanto permite a detecção e possível quantificação do glyphosate.

Figura 11 – Cromatogramas obtidos após análise de extratos de matriz fortificada com glyphosate a $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ submetida ao processo de extração com proporções de metanol e extrato na etapa final de 50:50 % (v/v) (A), 60:40 % (v/v) (B) e 70:30 % (v/v) (C).



Ao final de todos os estudos apresentados, o método de extração do glyphosate ficou definido em: adição de 2,000 g de amostra de grãos triturados e peneirados (malha de 2,0 mm) a um tubo do tipo Falcon de 50 mL, seguido da adição de 5,0 mL de diclorometano e agitação em vórtex por 1 min. Após esta etapa, são adicionados 10,0 mL água ultrapura, nova agitação em vórtex por 20 s e agitação em agitador rotativo (360°) a 80 rpm por 30 min. Deste tubo, 400 μL do sobrenadante são transferidos para o tubo do tipo *ependorf*, juntamente com 600 μL de metanol, agitado em vórtex por 10 s e centrifugado em centrífuga refrigerada por 10 min, a 15.000 rpm e 10°C . O sobrenadante foi filtrado em *vial* filtrante e analisado por LC-MS/MS.

4.3 Validação do método de determinação de glyphosate em grãos de café verde

A quantificação do glyphosate foi realizada pelo método de superposição com extração da matriz, ou seja, todo o procedimento de construção da curva analítica e de validação do método se deu por fortificação de amostras de grãos de café, isentas do analito, com diferentes quantidades de glyphosate. Logo em sequência, estas amostras foram submetidas ao método de extração otimizado, e os extratos obtidos foram filtrados em *vial* filtrante contendo membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,45 μm e analisados por LC-MS/MS. Dessa forma, os efeitos de possíveis interferentes da matriz na quantificação de glyphosate são compensados (RIBANI *et al.*, 2004).

Ainda, foi realizada a adição de padrão interno. O padrão interno (PI) é utilizado em uma concentração conhecida fixa, de modo a se verificar a correta execução do método analítico. É necessário que o composto selecionado como PI seja estável e apresente comportamento semelhante ao analito utilizado no estudo (EUROPEAN COMMISSION, 2022). Neste trabalho foi utilizado glyphosate isotopicamente marcado ^{13}C , ^{15}N como padrão interno. Previamente à validação, foi realizada a otimização das transições a serem utilizadas para análise deste composto no modo MRM (-). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

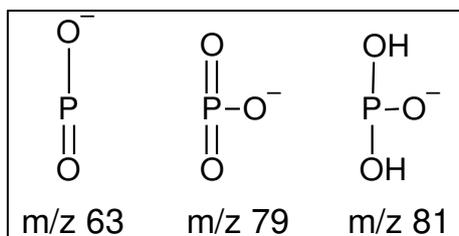
Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	EC* (V)	Q1 (V)	Q3 (V)
169,9	63,2	23	20	23
169,9	78,9	37	28	13
169,9	81,1	17	17	13

* Energia de colisão

Tabela 8 – Valores dos parâmetros otimizados para análise de glyphosate isotopicamente marcado ^{13}C , ^{15}N em modo MRM (-). A otimização foi realizada pelo software LabSolutions (Shimadzu®) por injeção direta no espectrômetro de massas de 20 μL de solução padrão de glyphosate ^{13}C , ^{15}N de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, a um fluxo de 0,4 mL min^{-1} .

Os íons produto gerados estão representados na Figura 12, estimados de acordo com os mecanismos de fragmentação do glyphosate elucidados por Goodwin *et al.* (2004).

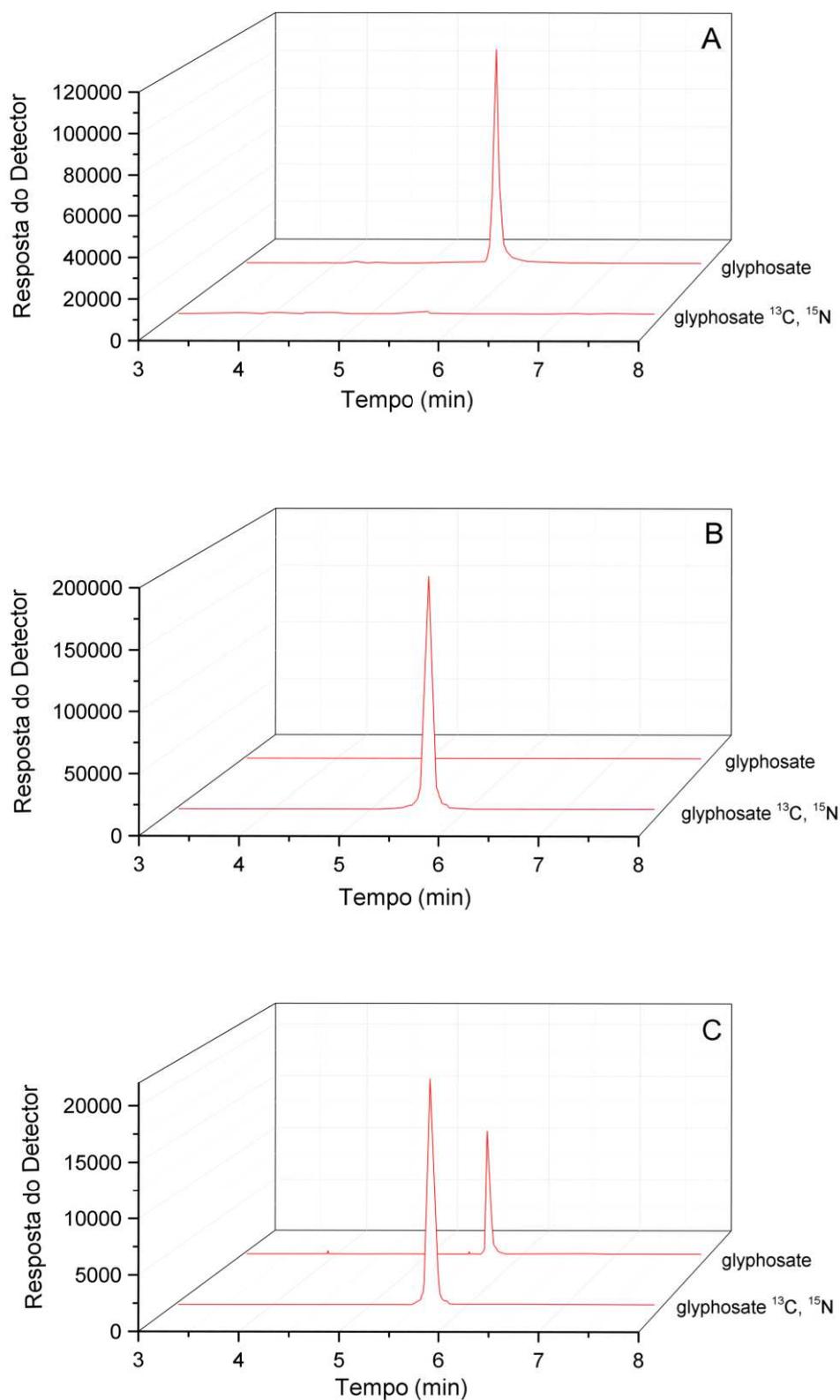
Figura 12 – Fragmentos de glyphosate isotopicamente marcado (^{13}C , ^{15}N) monitorados como íons produto em análise no modo MRM (-).



Fonte: Goodwin *et al.*, 2004.

Os resultados obtidos foram integrados ao método de análise de glyphosate, para monitoramento simultâneo dos dois compostos. Soluções padrão de glyphosate na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, glyphosate isotopicamente marcado (^{13}C , ^{15}N) a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e de mistura dos dois analitos na concentração de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ cada foram injetadas para verificação do tempo de retenção do padrão interno e da capacidade do equipamento de diferenciar os analitos. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 13. Uma vez que as análises foram satisfatórias, deu-se sequência à validação do método.

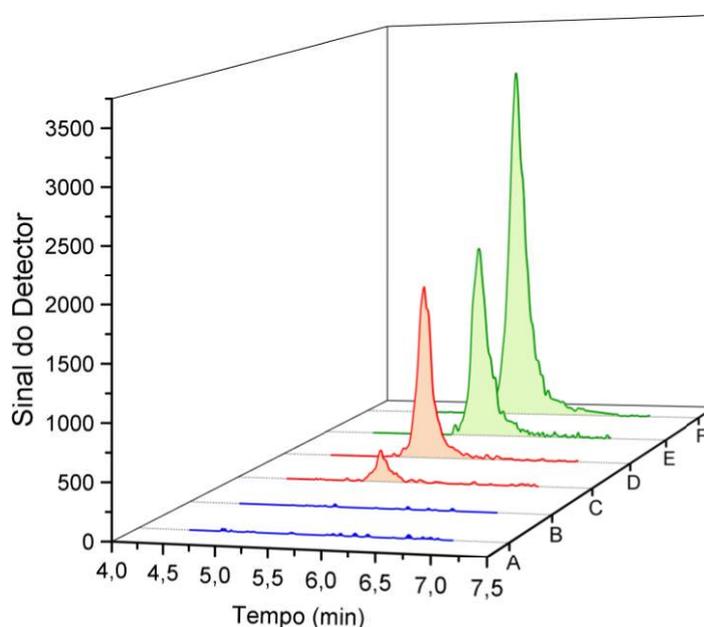
Figura 13 – Cromatogramas obtidos após análise de solução padrão de glyphosate a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (A); solução padrão de glyphosate ^{13}C , ^{15}N a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (B) e solução contendo glyphosate e glyphosate ^{13}C , ^{15}N a $250 \mu\text{g L}^{-1}$ (C).



4.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por comparação dos cromatogramas de solução padrão de glyphosate, extrato da matriz fortificada com glyphosate e amostra branco do extrato da matriz, isenta do analito. Foi avaliada a resposta do branco no mesmo tempo de retenção t_R do herbicida. Os resultados obtidos estão expostos na Figura 14.

Figura 14 – Cromatogramas obtidos após análise de: solução padrão de glyphosate (E) e glyphosate ^{13}C , ^{15}N (F), ambos a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (em verde); extrato da matriz fortificada com glyphosate a $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (C) e com glyphosate ^{13}C , ^{15}N a $4,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (D) (em vermelho) e extrato da matriz sem a presença do herbicida (A e B, em azul).



Como é possível observar, o método se mostra seletivo, e específico, para análise de glyphosate, não apresentando resposta no cromatograma na amostra branco para o mesmo tempo de retenção do analito (t_R (glyphosate) = 5,4 min) e do padrão interno utilizado (t_R (glyphosate ^{13}C , ^{15}N) = 5,5 min).

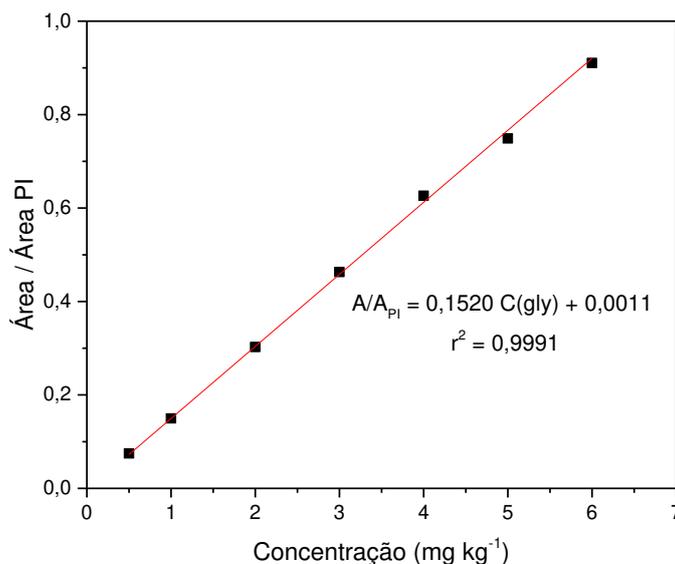
Foi avaliada a resposta cromatográfica, em termos de área, da amostra branco no mesmo tempo de retenção do glyphosate. Este valor foi comparado com a resposta obtida para o glyphosate em extrato da matriz. Verificou-se que a área do ruído no branco ($A = 32$) equivale a 0,19% da área do analito ($A = 17058$),

estando este resultado de acordo com o exigido pelo guia de validação SANTE/11312/2021 (2022) ($\leq 30\%$).

4.3.2 Linearidade

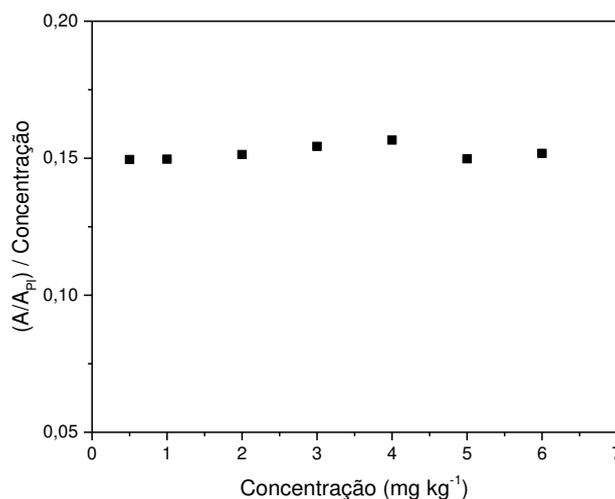
Amostras de grãos de café moído e peneirado foram fortificadas com solução padrão glyphosate e glyphosate ^{13}C , ^{15}N nas concentrações definidas para a curva analítica (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mg kg^{-1}), com concentração constante do padrão interno de 4,0 mg kg^{-1} e triplicata em cada nível. Todas as amostras foram submetidas ao método de extração já otimizado e as áreas de ambos os padrões foram tomadas como resultado. Para plotagem da curva analítica foi utilizada a média das razões área glyphosate / área do padrão interno para cada ponto, e a equação da reta obtida foi $A/A_{\text{PI}} = 0,1520 C(\text{gly}) + 0,0011$, com coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9991 (Figura 15), valor acima do valor mínimo exigido pela ANVISA (2017), de 0,990.

Figura 15 – Curva analítica obtida após análise do extrato das amostras de grãos de café moído fortificadas em diferentes concentrações de glyphosate, com adição de glyphosate ^{13}C , ^{15}N como padrão interno, submetidas ao método de extração otimizado e analisadas por LC-MS/MS.



A linearidade foi avaliada pela razão entre as respostas cromatográficas (áreas) e as concentrações estabelecidas na curva analítica versus estas concentrações (Figura 16).

Figura 16 – Razão entre as respostas cromatográficas e as concentrações estabelecidas na curva analítica (razão de área/concentração) versus concentração de glyphosate.



Observa-se que os valores se mantêm constantes ao longo de toda a faixa de concentração, constatando a linearidade da curva obtida.

Ainda, foi verificado se a faixa de trabalho selecionada se encontra dentro do erro aceitável, por meio do desvio percentual, ou coeficiente de variação (CV), entre a concentração real e a concentração calculada, o qual deve ser $\leq 20\%$ (EUROPEAN COMMISSION, 2022). Foram obtidos valores entre 0,49 e 8,62% (Tabela 9), para as diferentes concentrações de glyphosate nas amostras fortificadas, estando estes de acordo com as exigências do guia de validação.

Concentração real (mg kg ⁻¹)	Concentração calculada média (mg kg ⁻¹)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
0,50	0,48	0,04	8,62
1,00	0,98	0,01	0,49
2,00	1,98	0,02	1,17
3,00	3,04	0,17	5,62
4,00	4,11	0,10	2,38
5,00	4,92	0,24	4,86
6,00	5,98	0,25	4,18

Tabela 9 – Concentração real de glyphosate em amostras de grãos de café e a média das concentrações calculadas por meio da equação da reta obtida. Estão representados o desvio padrão e o coeficiente de determinação, respectivamente, para cada concentração, ou ponto da curva analítica.

4.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) se refere ao menor valor de concentração que pode ser detectado pelo método, porém não quantificável. Já o limite de quantificação (LQ) se refere à menor concentração validada com exatidão aceitável que pode ser quantificada pelo método desenvolvido (EUROPEAN COMMISSION, 2022). Os limites de detecção e de quantificação do método foram determinados utilizando-se parâmetros da curva analítica e calculados como descrito nas Equações 1 e 2 (ANVISA, 2017). Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 10.

Parâmetro	
Limite de detecção	0,16 mg kg ⁻¹
Limite de quantificação	0,48 mg kg ⁻¹

Tabela 10 – Limite de detecção e limite de quantificação obtidos por meio de parâmetros da curva analítica para o método de determinação de glyphosate em grãos de café.

Os valores obtidos para LD e LQ se mostraram adequados para monitoramento e quantificação de resíduos de glyphosate nos grãos produzidos

nacionalmente, uma vez que estes estão abaixo do limite máximo de resíduo (LMR) permitido no Brasil, de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (ANVISA, 2023). Ainda, estes valores também estão abaixo do LMR permitido no Estados Unidos, de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (USDA, 2022). Contudo, não foi possível atingir o LMR da União Europeia, de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (EUROPEAN COMMISSION, 2013). Estima-se que as etapas do preparo de amostra, envolvendo altos fatores de diluição, e algumas características da coluna observadas ao longo do estudo, como alta assimetria dos picos em baixas concentrações do glyphosate ($< 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$), e retenção pela fase estacionária de coextrativos da matriz, influenciaram na determinação do LD e LQ.

4.3.4 Repetibilidade e Precisão Intermediária

A precisão avalia a variação dos resultados experimentais independentes obtidos após a aplicação do método em estudo. Esta avaliação é feita por meio de repetição e análise do desvio padrão e desvio padrão relativo, ou coeficiente de variação (CV) (EUROPEAN COMMISSION, 2022).

Neste trabalho, a precisão foi avaliada em termos da repetibilidade, cujas análises foram realizadas em único dia por um único analista, e em termos de precisão intermediária, com análises sendo realizadas em três dias não consecutivos por um único analista. Amostras de grãos de café moído foram fortificadas em duas concentrações distintas ($1,0$ e $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$), com 5 repetições para cada concentração. As áreas dos cromatogramas de íons totais foram tomadas, as concentrações foram calculadas por meio da curva analítica apresentada no tópico **4.3.2** e os resultados foram expressos em termos de coeficiente de variação (Tabela 11).

	Repetibilidade	Precisão Intermediária
Concentração (mg kg ⁻¹)	CV (%)	CV (%)
1,00	8,45	9,05
5,00	5,25	5,74

Tabela 11 – Resultados obtidos para validação da figura de mérito precisão em termos da repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados estão expressos em termos de coeficiente de variação (CV).

Observa-se que os valores obtidos tanto para repetibilidade quanto para precisão intermediária estão abaixo de 20%, como exigido pelo guia de validação utilizado (EUROPEAN COMMISSION, 2022).

4.3.5 Recuperação

A exatidão do método avalia a proximidade entre o resultado analítico experimental, calculado por meio de curva analítica, e o valor de referência (EUROPEAN COMMISSION, 2022). Neste trabalho a exatidão foi avaliada em termos de recuperação (%R), em um único dia e por um único analista. Para tal, amostras de grãos de café moído foram fortificadas em duas concentrações distintas (1,0 e 5,0 mg kg⁻¹), com 5 repetições para cada concentração. Após o processo de extração e análise dos extratos, as áreas dos cromatogramas foram tomadas, as concentrações foram calculadas por meio da curva analítica apresentada no tópico 4.3.2 e os resultados foram determinados empregando-se a Equação 4 (Tabela 12).

Concentração (mg kg ⁻¹)	%R
1,00	112,01
5,00	92,08

Tabela 12 – Valores de porcentagem de recuperação (%R) obtidos como avaliação da exatidão do método de determinação de glyphosate em grãos de café.

De acordo com o guia de validação SANTE/11312/2021 (2022), a recuperação deve estar entre 70 e 120%. Observa-se que os resultados obtidos neste trabalho e apresentados na Tabela 12 estão de acordo com a faixa estabelecida pelo guia.

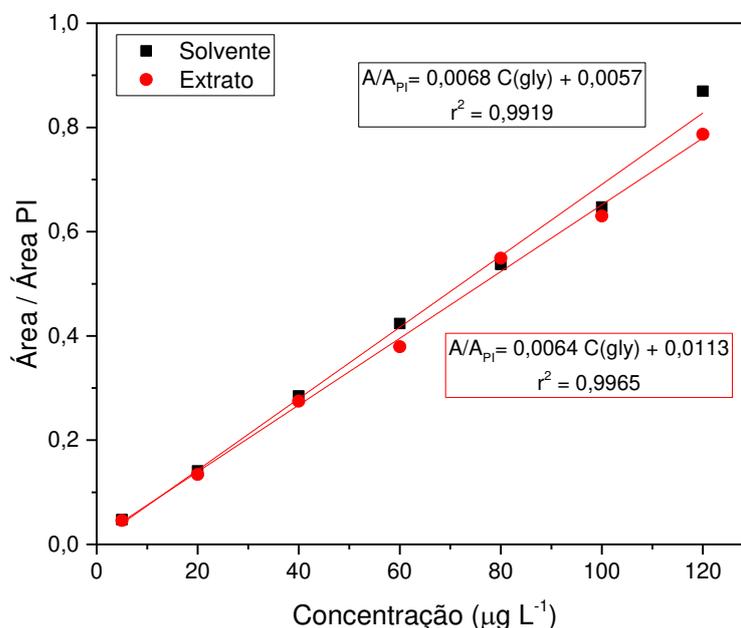
Além da análise de recuperação em um único dia, esta foi monitorada ao longo de toda a validação, como forma de se verificar a capacidade do método de continuar fornecendo valores de recuperação aceitáveis. Ao longo dos estudos realizados, os valores de %R permaneceram entre 80,09 e 112,01%, atedendo às exigências do guia para validação do método.

4.3.6 Efeito de matriz

O efeito de matriz é caracterizado pelo efeito que um ou mais coextrativos da amostra causa na resposta do analito. Este efeito pode ser observado por um aumento ou diminuição da resposta do analito no extrato da matriz quando comparado com a resposta deste em solução de solvente puro (EUROPEAN COMMISSION, 2022).

Deste modo, o efeito de matriz foi avaliado por comparação das curvas analíticas preparadas no extrato da matriz isenta do analito e em mistura de solventes (água ultrapura e acetonitrila 90:10 %(v/v)). O efeito de matriz percentual (%EM) (Figura 17) foi calculado utilizando a Equação 5.

Figura 17 – Curvas analíticas de glyphosate preparadas por fortificação do extrato da matriz isenta do analito (em vermelho) e em mistura de solventes (em preto) em diferentes concentrações.



Ambas as curvas apresentaram inclinação muito semelhante, com coeficientes angulares de $S_{(\text{Extrato})} = 0,0064$ e $S_{(\text{Solvente})} = 0,0068$. O efeito de matriz percentual foi calculado e a resposta obtida foi $\%EM = -6,53\%$. O valor negativo indica uma diminuição da resposta do glyphosate quando presente no extrato. Contudo, dada a similaridade das curvas e o baixo valor de EM obtidos ($< \pm 10\%$), o efeito de matriz observado não é considerado significativo.

4.3.7 Robustez

A robustez avalia a capacidade do método de sofrer pequenas variações, seja ao longo do preparo da amostra ou durante as análises cromatográficas, sem que estas alterações o afetem significativamente. É dito que um método é robusto quando não é afetado por estas pequenas variações ou modificações (RIBANI *et al.*, 2004).

Em cromatografia líquida, dentre os parâmetros que podem ser avaliados para determinação da robustez do método, se enquadram a variação do pH, da

composição e do fluxo da fase móvel, bem como a variação da temperatura da coluna (ANVISA, 2017). Com relação ao preparo de amostra, um parâmetro importante a ser avaliado é o tempo de extração. Nesse sentido, a fim de se avaliar o efeito da alteração da condição cromatográfica, selecionou-se o parâmetro temperatura da coluna. Os parâmetros composição da fase móvel e gradiente de eluição não foram considerados para determinação da robustez, uma vez que já foram previamente avaliados no estudo do pH. Foram avaliados também os parâmetros tempo de agitação e de centrifugação, que estão atrelados diretamente às alterações no tempo de extração do preparo de amostra.

Após execução dos experimentos dispostos na Tabela 3, foi calculado, por meio da Equação 6, o desvio padrão das concentrações de glyphosate, em relação aos parâmetros avaliados. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13.

Parâmetro	Desvio Padrão
Tempo de agitação	0,026
Tempo de centrifugação	0,002
Temperatura da Coluna	0,018

Tabela 13 – Desvio padrão das concentrações de glyphosate obtidas para avaliação dos parâmetros tempo de agitação, tempo de centrifugação e temperatura da coluna na robustez do método em estudo.

Os baixos valores de desvio padrão obtidos indicam que as modificações realizadas no preparo de amostra, por meio dos parâmetros tempo de agitação e centrifugação e temperatura da coluna, não afetaram significativamente a resposta cromatográfica, ressaltando a robustez do método. Contudo, também se determinou o desvio padrão das diferenças por meio da Equação 7, de acordo com a abordagem de Youden para avaliação da robustez. Obteve-se um desvio padrão $DP_{D_i} = 0,0361$, valor menor que o valor do desvio padrão obtido no ensaio de repetibilidade (Tabela 14).

Desvio Padrão		
Concentração (mg kg ⁻¹)	Repetibilidade	Robustez
1,0	0,0947	0,0361

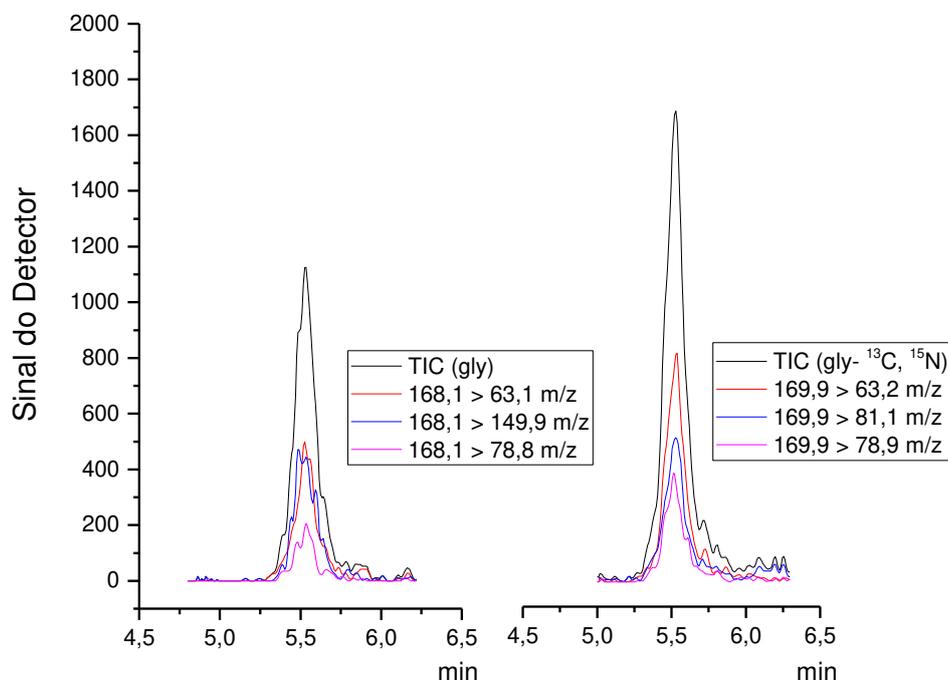
Tabela 14 – Resultados de desvio padrão para os ensaios de repetibilidade e robustez, realizados por análise de amostras de grãos de café fortificados a 1,0 mg kg⁻¹ e submetidas ao processo de extração otimizado.

Novamente, este resultado indica que os parâmetros avaliados não influenciaram na resposta do glyphosate, constatando a robustez do método utilizado.

4.3.8 Cromatogramas de íons extraídos e proporção das intensidades relativas dos íons

Para verificação da sensibilidade do espectrômetro de massas, foram analisados os cromatogramas de íons extraídos (XIC) e a proporção das intensidades relativas dos íons (fragmentos) selecionados e monitorados. É necessário que as transições selecionadas para monitoramento e quantificação do analito glyphosate e do padrão interno empregado glyphosate ¹³C, ¹⁵N sejam totalmente sobrepostas. Os cromatogramas de cada transição foram extraídos e estão apresentados na Figura 18.

Figura 18 – Cromatograma de íons totais (TIC) e cromatogramas de íons extraídos (XIC) obtidos após análise do extrato da matriz fortificada a $4,0 \text{ mg kg}^{-1}$ com solução de glyphosate e glyphosate ^{13}C , ^{15}N . À esquerda são apresentados os cromatogramas para o glyphosate e suas respectivas transições selecionadas 168,10 > 63,10; 168,10 > 149,90; 168,10 > 78,80 m/z. À direita são apresentados os cromatogramas para o glyphosate ^{13}C , ^{15}N e suas respectivas transições selecionadas 169,90 > 63,20; 169,90 > 81,10; 169,90 > 78,90 m/z.



Ainda, foram avaliadas as intensidades relativas destes íons em extrato da matriz quando comparado à solução padrão. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15.

Analito	m/z	Intensidade Relativa		Erro %
		Sol. padrão	Extrato da matriz	
glyphosate	63,1	84,0	75,9	-9,7
	78,8	52,9	56,9	7,5
	149,9	100,0	100,0	0,0
glyphosate ^{13}C , ^{15}N	63,2	100	100,0	0,0
	79,9	44,5	38,4	-13,8
	81,1	64,5	47,8	-25,9

Tabela 15 – Erro percentual referente às intensidades relativas dos fragmentos de glyphosate e glyphosate ^{13}C , ^{15}N no extrato da matriz ($C(\text{gly}) = 1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ e $C(\text{gly } ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}) = 4,0 \text{ mg kg}^{-1}$) em comparação à solução padrão, ambos os padrões na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Observa-se que o íon de m/z 149,9 do glyphosate, e m/z 63,2 do glyphosate ^{13}C , ^{15}N , apresentaram intensidade relativa de 100%. Estes são, portanto, os principais íons gerados durante o processo de fragmentação, e consequentemente, mais detectados pelo equipamento, tanto na análise de solução padrão quanto na análise do extrato da matriz. Ainda, avaliando-se os demais fragmentos monitorados, observa-se que o erro percentual referente à diferença de intensidade relativa entre os dados da análise de solução padrão e os da análise do extrato da matriz variou entre -25,9 e 7,5%, valores dentro do exigido pelo guia de validação SANTE/11312/2021 (2022), os quais devem ser de até $\pm 30\%$.

4.4 Comparação do método proposto com a literatura

Poucos trabalhos envolvendo a determinação de glyphosate em grãos de café são encontrados na literatura. Um método foi apresentado por Jian- Lin *et al.* (2020) para esta avaliação, por meio da derivatização dos extratos dos grãos de café com FMOC-Cl e análise cromatográfica (UPLC-MS/MS). Os autores obtiveram um limite de quantificação de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ e resultados satisfatórios de precisão ($\text{RSD} < 4,25\%$) e recuperação (99,6 – 107,6%). Contudo, o método proposto pelos autores apresenta maior custo e baixa frequência analítica, uma vez que o agente derivatizante FMOC possuiu custo elevado (U\$84/g) e o tempo de reação foi de 6h. Neste sentido, métodos que não dependam da derivatização são mais favoráveis, pois permitem menor custo de análise e menor tempo de preparo da amostra, resultando em maior frequência analítica, como o método aqui proposto.

Alguns trabalhos mostram a determinação indireta do glyphosate em café, avaliando-se parâmetros de interesse agrônômico que refletem diretamente no desenvolvimento e produtividade desta cultura. Carvalho *et al.* (2013) avaliaram qual o efeito da aplicação de subdoses de glyphosate (0 a 32% da dose recomendada) na intoxicação da planta de café, com determinação de concentrações de CO_2 e da taxa fotossintética em diferentes dias após as aplicações. Os pesquisadores observaram diminuição na concentração de CO_2 na câmara subestomatal e na razão da concentração de CO_2 interna e externa,

assim como diminuição na taxa fotossintética, comprometimento da altura das plantas, além de sintomas visuais de intoxicação. Por outro lado, Schrübbers *et al.* (2014) analisaram folhas e raízes de plantas de café por eletroforese capilar para determinação do acúmulo de ácido chiquímico após aplicação de diferentes doses de glyphosate. Os pesquisadores verificaram um aumento de ácido chiquímico com aumento da dose de glyphosate aplicada. Outras injúrias visuais também foram observadas, como a clorose das folhas.

Em novo estudo realizado por Schrübbers *et al.* (2016), a análise de glyphosate foi realizada diretamente nas folhas de cafeeiros tratadas com diferentes doses do herbicida e provenientes de áreas com histórico de uso do herbicida. O preparo da amostra envolveu a derivatização com FMOC, e os extratos foram analisados por LCMS. Os autores obtiveram limite de quantificação de $0,35 \text{ mg kg}^{-1}$, com recuperações entre 101 e 107% e precisão de $\text{RSD}\% < 15\%$. As análises das folhas tratadas indicaram um aumento da concentração de glyphosate com aumento da dose aplicada, assim como a análise das folhas coletadas a campo indicaram presença do herbicida, ainda que em baixas concentrações ($< \text{LQ}$). De todo modo, os estudos apresentados evidenciam a absorção e translocação do glyphosate em plantas de café. Todavia, não é possível determinar se ocorre a acumulação deste herbicida nos grãos, uma vez que estes estudos não avaliaram a presença ou ausência do glyphosate nesta matriz.

Entretanto, é possível encontrar na literatura estudos que avaliam a presença de glyphosate em outros alimentos. Diversos estudos reportam o uso do método QuPPE, que se apresenta como um método universal de determinação de pesticidas polares em diversas matrizes alimentares. Porém, os limites de detecção e quantificação são dependes da matriz em questão e da sensibilidade dos equipamentos utilizados para as análises, o que dificulta uma comparação direta entre métodos quando aplicados em matrizes distintas. Como exemplo, em estudos realizados por J3sus *et al.* (2019) empregando este método na determinação de glyphosate em mel, o valor de LQ obtido foi de $25,0 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, um valor quase 4 vezes maior que o obtido por Golge (2021) na determinação do herbicida em cerejas, com LQ de $6,4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$.

Nesse sentido, dada a escassez de estudos sobre análise de glyphosate em grãos de café, uma melhor comparação pode ser realizada entre

metodologias semelhantes. Sendo assim, destaca-se o estudo realizado por Martins-Júnior *et al.* (2009), para determinação de glyphosate em grãos de soja, no qual os pesquisadores utilizaram um preparo de amostra semelhante ao aqui apresentado. Ainda que os grãos se diferenciem, principalmente pela quantidade de proteína presente (café: 8,5 – 12,5%; soja: 38,9 – 41,8%) (BELITZ, GROSCH e SCHIEBERLE, 2009; REDONDO-CUENCA *et al.*, 2006), os métodos validados apresentaram limites de quantificação próximos, (soja: LQ = 0,30 mg kg⁻¹; café: LQ = 0,48 mg kg⁻¹), com boa recuperação e precisão (soja: 79,6-109,0%; RSD ≤ 12,2%; café: 92,1 – 112,0%, RSD ≤ 9,05%).

4.5 Análise de amostras de grãos de café verde da região da Zona da Mata em Minas Gerais

Entre as amostras coletadas, foram detectados resíduos de glyphosate em 2 amostras em valores abaixo do limite de quantificação (< LQ). Estes resultados ressaltam a importância do método apresentado no monitoramento de resíduos deste herbicida em grãos de café.

5 CONCLUSÕES

Neste estudo foi apresentado um método alternativo para a determinação do glyphosate em grãos de café verde por LC-MS/MS. As condições cromatográficas estabelecidas e as otimizações realizadas, tanto no equipamento quanto no método de extração, permitiram a obtenção de um pico com formato adequado e promoveram aumento do sinal, melhorando a sensibilidade do método.

O método de extração foi validado de acordo com os guias regulamentadores SANTE/11312/2021 (2022) e ANVISA (2017). Foi garantida a seletividade, linearidade ($r^2 = 0,9991$), precisão ($CV < 13\%$), exatidão (%R entre 92 e 112%), robustez, com limites de detecção e quantificação satisfatórios (0,16 e 0,48 mg kg⁻¹, respectivamente) e baixo efeito de matriz (< 10%). Ainda, foram realizadas análises de amostras autênticas coletadas na região da Zona da Mata, MG. Os resultados evidenciaram a contaminação de 2 das 6 amostras analisadas, em concentrações abaixo do limite de quantificação (< LOQ). Portanto, o método proposto se mostrou adequado para análises de rotina de monitoramento de resíduos do glyphosate em grãos de café verde.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. ANVISA. Brasília, DF, 2017. 21 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Monografias de Agrotóxicos - Em Vigência**, 2023. Disponível em: Monografias de Agrotóxicos: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/monografias-de-agrotoxicos>. Acesso: 21 de junho de 2024.

ANASTASSIADES, M.; KOLBERG, D. I.; EICHHORN, E.; WACHTLER, A. K.; BENKENSTEIN, A.; ZECHMANN, S.; MACK, D.; WILDGRUBE, C.; BARTH, A.; SIGALOV, I.; GÖRLICH, S.; DÖRK, D.; CERCHIA, G. **Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement I. Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method)**. EURL-SMR. 2019. 86 p.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Coffee, Tea, Cocoa. In: _____ **Food Chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. p. 938-970.

BERNAL, J.; MARTIN, M. T.; SOTO, M. E; NOZAL, M. J; MAROTTI, I.; DINELLI, G.; BERNAL, J. L. Development and Application of a Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Method to Evaluate the Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid Dissipation in Maize Plants after Foliar Treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 16, p. 4017-4025, 2012.

CARVALHO, F. P.; FRANÇA, A. C.; LEMOS, V. T.; FERREIRA, E. A.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.. Photosynthetic activity of coffee after application of glyphosate subdoses. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 1, p. 109-115, 2013.

CARVALHO, L. B.; ALVES, P. L. C. A.; BIANCO, S.; PRADO, R. Physiological Dose-Response of Coffee (*Coffea Arabica L.*) Plants to Glyphosate Depends on Growth Stage. **Chilean Journal of Agricultural Research**, p. 182-187, 2012.

CHIARELLO, M.; JIMÉNEZ-MEDINA, M. L.; SAÉZ, J. M.; MOURA, S.; FRENICH, A. G.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. Fast analysis of glufosinate, glyphosate and its main metabolite, aminomethylphosphonic acid, in edible oils, by liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 36, n. 9, p. 1376-1384, 2019.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. Campinas, SP: UNICAMP, 1997. 262 p.

ENCARNAÇÃO, R. D. O.; LIMA, D. R. **Café & Saúde Humana**. Embrapa/MAPA. Brasília, DF, 2003. (1678-1694). 64 p.

EUROPEAN COMMISSION. **Decisão da Comissão C1 de 14 de Agosto de 2002 que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados (2002/657/CE)**. European Union. 2002. 35 p.

EUROPEAN COMMISSION. **EU Pesticides Database - MRLs**. 2013 Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/mrls>. Acesso em: 21 de junho de 2024.

EUROPEAN COMMISSION. **Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, Document N° SANTE/11312/2021**. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. 2022. 57 p.

FENG, J. H.; WEI, K. Z.; GAO, J. P.; XU, X. Determination of adenosine phosphates in mouse myocardium tissue by HPLC with UV detection and using porous graphite carbon column. **Journal of Chromatography B**, v. 1145, p. 122110, 2020.

GÉLINAS, P.; GAGNON, F.; MCKINNON, C. Wheat preharvest herbicide application, whole-grain flour properties, yeast activity and the degradation of glyphosate in bread. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 1597-1602, 2018.

GOLGE, O. Validation of Quick Polar Pesticides (QuPPE) Method for Determination of Eight Polar Pesticides in Cherries by LC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 14, p. 1432-1437, 2021.

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 Communication in Mass Spectrometry**, v. 18, p. 37-43, 2004.

GROSS, J. H. **Mass Spectrometry - A Textbook**. 3^a. ed. Springer, 2017. 986 p.

HALL, S.; YUEN, J. W.; GRANT, G. D. Bioactive Constituents in Caffeinated and Decaffeinated Coffee and Their Effect on the Risk of Depression—A Comparative Constituent Analysis Study. **Beverages**, v. 4, n. 4, p. 79, 2018.

HANKE, I.; SINGER, H.; HOLLENDER, J. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 2265-2276, 2008.

JESÚS, F.; PEQUEÑO, F.; GÉREZ-GARCÍA, N.; NIELL, S.; CESIO, M. V.; HEINZEN, H. Implementación de un método para el análisis de glifosato en miel por LC-MS/MS, utilizando QuPPE para la preparación de muestra. **Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay**, v. 17, p. 66-77, 2019.

JIANG, Z.; SMITH, N. W.; LIU, Z. Preparation and application of hydrophilic monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2350-2361, 2011.

JIAN-LIN, T.; XIANG, B.; ZHEN-HUA, P.; JIE, B.; XIU-LIN, Z.; ZHI-RUI, N.; JI-XIANG, W.; ZENG-BIN, H.; LEI, F. Determination of glyphosate, aminomethyl phosphoric acid and glufosinate residue in coffee bean by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Food Safety and Quality**, v. 11, n. 15, p. 5062-5067, 2020.

KACZYNSKI, P. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. **Food Chemistry**, v. 230, p. 524-531, 2017.

KONO, Y.; SHIBATA, H.; KODAMA, Y.; SAWA, Y. The suppression of the Nnitrosating reaction by chlorogenic acid. **Biochemical Journal**, v. 312, n. 3, p. 947-953, 1995.

MARTINS, A. L. **História do Café**. 2^a. ed. São Paulo: Contexto, 2012. 320 p.

MARTINS-JÚNIOR, H. A.; LEBRE, D. T.; WANG, A. Y.; PIRES, M. A. F.; BUSTILLOS, O. V. An alternative and fast method for determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in soybean using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 7, p. 1029-1034, 2009.

MUNOZ, D. G.; FUJIOKA, S. Caffeine and Parkinson disease: A possible diagnostic and pathogenic breakthrough. **Neurology**, v. 90, n. 5, p. 1-2, 2018.

OELLIG, C.; SCHWACK, W. Comparison of HILIC columns for residue analysis of dithiocarbamate fungicides. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 40, n. 8, p. 415-418, 2017.

PEREIRA, L. Porous Graphitic Carbon as a Stationary Phase in HPLC: Theory and Applications. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, n. 11-12, p. 1687-1731, 2008.

REDÓN, L.; SUBIRATS, X.; ROSÉS, M. HILIC characterization: Estimation of phase volumes and composition for a zwitterionic column. **Analytica Chimica Acta**, v. 1130, p. 39-48, 2020.

REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M. J.; RODRÍGUEZ-SEVILLA, M. D.; MATEOS-APARICIO, I. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1216–1222, 2006.

RESTEK. **Polar Pesticides in Spinach on Raptor Polar X by LC-MS/MS**. Restek Corporation. USA. 2021a. 1 p.

RESTEK. **Separate a Wide Variety of Polar Analytes with a Novel Hybrid Stationary Phase**. Restek Corporation. USA, 2021b. 12 p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. ; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RUFINO, J. L. S. **Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café: Antecedentes, Criação e Evolução**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 348 p.

SCHOLZ, M. B. S.; PRETE, C. E. C.; CRUDI, E.; MAGRI, T. B. **Composição Química de Variedades de Café (*Coffea arabica*)**. Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Brasília, DF: Embrapa Café. 2000. 4 p.

SCHRÜBBERS, L. C.; VALVERDE, B. E.; SORENSEN, J. C.; CEDERGREEN, N. Glyphosate spray drift in *Coffea arabica* – Sensitivity of coffee plants and possible use of shikimic acid as a biomarker for glyphosate exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 15-22, 2014.

SCHRÜBBERS, L. C.; MASÍS-MORA, M.; ROJAS, E. C.; VALVERDE, B. E.; CHRISTENSEN, J. H.; CEDERGREEN, N. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in leaves from *Coffea arabica* using high performance liquid chromatography with quadrupole mass spectrometry detection. **Talanta**, v. 146, p. 609-620, 2016.

SUN, L.; KONG, D.; GU, W.; GUO, X.; TAO, W.; SHAN, Z.; WANG, Y.; WANG, N. Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1502, p. 8-13, 2017.

SUPLICY, E. M. Brasil se consolida na tradição de grande produtor mundial de café. **Visão Agrícola - Esalq**, Piracicaba, v. 12, n. 12, p. 124-126, 2013.

U. S. Department of Agriculture (USDA). **Maximum Residue Limits (MRL) Database**, 2022. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/maximum-residue-limits-mrl-database>. Acesso em: 21 de junho de 2024.

WANDERLEY, A. B.; COMPESATTO, E. A.; PORTO, I. C. C. M.; MOURA, M. A. B. F.; SILVA, S. A. S.; NASCIMENTO, T. G. Functional Benefits of Green Coffee in Metabolic Syndrome Prevention: A Review Study. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Rese**, v. 9, n. 7, p. 5-12, 2017.

WANG, X.; LIM, L. T. Physicochemical Characteristics of Roasted Coffee. In: _____ **Coffee in Health and Disease Prevention**. Academic Press, 2015. p. 247-254.

WEBSTER ROSS, G.; ABBOTT, R. D.; PETROVITCH, H.; MORENS, D. M.; GRANDINETTI, A.; TUNG, K. H.; TANNER, C. M.; MASAKI, K. H.; BLANCHETTE, P. L.; CURB, J.; POPPER, J. S.; WHITE, L. R. Association of Coffee and Caffeine Intake with the Risk of Parkinson Disease. **Journal of Americam Medical Association**, v. 283, n. 20, p. 2674-2679, 2000.

YOUNG, C.; CONDINA, M. R.; BRIGGS, M. T.; MOH, E. S. X.; KAUR, G.; OEHLER, M. K.; HOFFMANN, P. In-House Packet Porous Graphitic Carbon Columns for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of N-Glycans. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 653959, 2021.

ZHOU, S.; HUANG, Y.; DONG, X.; PENG, W.; VEILLON, L.; KITAGAWA, D. A. S.; AQUINO, A. J. A.; MECHREF, Y. Isomeric Separation of Permethylated Glycans by Porous Graphitic Carbon (PGC)-LC-MS/MS at High-Temperatures. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 12, p. 6590-6597, 2017.

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DE ÉPOCAS SEGURAS DE APLICAÇÃO DO
GLYPHOSATE NA CULTURA DO CAFÉ

RESUMO

A presença de plantas daninhas pode comprometer a produtividade e a colheita dos grãos de café. Este efeito é mais pronunciado quando a infestação ocorre entre os períodos de floração e frutificação do cafeeiro. O controle dessas plantas por herbicidas, como o glyphosate, pode resultar na contaminação da lavoura devido à deriva no momento da pulverização. O herbicida glyphosate, especificamente, quando em contato com a folha, pode ser absorvido e translocado por toda a planta, resultando no acúmulo deste composto nos grãos de café. Neste sentido, este trabalho buscou determinar o estágio de desenvolvimento da cultura cafeeira em que a aplicação do herbicida glyphosate não resultará na contaminação dos grãos de café. Para isto, o glyphosate foi aplicado, seguindo-se as recomendações do fabricante, em 5 estágios distintos, desde a formação dos grãos até a maturação em coloração cereja, sendo que cada planta recebeu somente uma aplicação em cada estágio. Também foram selecionadas testemunhas, as quais não receberam aplicação do herbicida. Após a completa maturação, os grãos foram colhidos, despolidos, secos e posteriormente analisados seguindo-se o método desenvolvido e apresentado no **Capítulo 1**. Os resultados indicaram a presença de resíduos de glyphosate em 4 dos 5 estágios selecionados, em concentrações abaixo do limite máximo de resíduos permitido no Brasil. Desta forma, pode se certificar que ocorre o acúmulo do glyphosate nos grãos de café, a depender do estágio de aplicação do herbicida, podendo comprometer a qualidade dos grãos e inviabilizar a comercialização e/ou exportação deste produto.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo do café brasileiro movimentava a renda de grandes e pequenos produtores, sendo uma das maiores culturas do país. A maior parte da produção nacional, quase 70% do total produzido, refere-se ao café arábica (*Coffea arabica*), sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor desta variedade (CONAB, 2020). No entanto, a alta produtividade da cultura cafeeira pode ser comprometida com a presença de pragas, doenças e plantas daninhas. Em relação a este último grupo, estas plantas, quando em convivência com as plantas de interesse econômico, competem por água, luz, nutrientes, dentre outros fatores (RONCHI e SILVA, 2006). Desta forma, podem causar uma grande redução na produtividade das culturas (RONCHI e SILVA, 2006; SILVA *et al.*, 2013).

O manejo de plantas daninhas pode ser feito por controle mecânico, tanto de modo manual por meio de arranque, capina ou roçada, como de modo mecanizado, com emprego de máquinas específicas (RONCHI, SILVA e FERREIRA, 2001). Além disso, pode-se optar pelo controle físico, com uso de calor (fogo), vapor ou água (inundação) no local infestante; ou controle cultural, por meio de práticas agrícolas como a rotação de culturas. Ademais, o uso de cobertura morta, preparo do solo por meio de arações, entre outros, e o controle biológico, com uso de insetos, fungos, bactérias, ácaros e animais predadores, podem ser utilizados no manejo das plantas daninhas (CONSTANTIN, 2011).

O manejo de plantas daninhas também pode ser feito por controle químico, no qual é feita a aplicação de herbicidas. Neste caso, há uma diversa gama de equipamentos e formulações disponíveis no mercado, com aplicações tanto de modo manual, com uso de pulverizador costal, ou de maneira mecanizada. O modo de aplicação é selecionado de acordo com a cultura, seu estágio de desenvolvimento, as características do terreno em que está localizada e as características da(s) planta(s) daninha(s) infestante(s) (FERREIRA *et al.*, 2008; PITELLI, 2016).

Na cultura de café, o manejo das plantas daninhas é realizado durante os períodos de florescimento e frutificação, nos quais ocorre maior competição entre essas plantas e os cafeeiros (RONCHI, SILVA e FERREIRA, 2001). Durante o ciclo de produção do cafeeiro, há a interferência de diversas espécies

monocotiledôneas e eudicotiledôneas, as quais podem ser controladas com uso do herbicida glyphosate (RONCHI e SILVA, 2006; SILVA *et al.*, 2013).

O glyphosate é a molécula herbicida mais utilizada no Brasil no controle químico de plantas daninhas. Devido à sua ação sistêmica não-seletiva, esse herbicida possui uma ampla gama de efeitos, erradicando diversas espécies de plantas infestantes. No entanto, o uso inadequado deste herbicida pode resultar em danos aos ecossistemas naturais e causar impactos ambientais significativos. Isto ocorre a partir da dissipação deste herbicida no ambiente, devido à exposição não intencional da lavoura à deriva da pulverização (SCHRÜBBERS *et al.*, 2014).

Uma vez na superfície das folhas, o glyphosate normalmente é absorvido pela folha e translocado via floema. Assim, é facilmente distribuído por toda a planta dada a hidrofiliabilidade e capacidade de ionização deste herbicida (OLIVEIRA JR. e BACARIN, 2011). Considerando-se os estágios de floração e frutificação da cultura cafeeira, nos quais há grande mobilização de água e nutrientes para desenvolvimento e expansão dos frutos, é possível que ocorra também a translocação do glyphosate e conseqüente contaminação dos grãos (DaMATTA *et al.*, 2007; MEIRELES *et al.*, 2009).

O que se verifica em condições de campo são apenas fatores referentes às recomendações de uso do glyphosate, de modo a evitar perdas durante a aplicação e possível contaminação ambiental, não existindo a preocupação de se encontrar resíduos deste herbicida nos grãos. Esta preocupação se torna mais evidente visto que alguns fatores, como a deriva e a não observância da época de aplicação, considerando o estágio de desenvolvimento das plantas de café, serem difíceis de ser controlados e/ou são responsáveis pela contaminação direta dos grãos.

Neste sentido, este trabalho se propõe a avaliar o efeito da aplicação de menores doses do glyphosate, em diferentes estágios de crescimento de cafeeiros, como possível ação causadora da bioacumulação do composto nos grãos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o estágio de desenvolvimento da cultura do café (da formação até a maturação dos grãos) em que a aplicação do herbicida glyphosate não resultará em acúmulo de resíduos nos grãos a serem colhidos.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar e quantificar o acúmulo de glyphosate em grãos de café em razão da aplicação do herbicida em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área experimental

O experimento foi instalado no Vale da Agronomia localizado na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais (latitude: 20°46'08,8" S, longitude: 42°52'17,4" O). Foram selecionadas plantas adultas da espécie *Coffea arabica*, as quais foram cercadas, identificadas e adubadas com fertilizante granulado 20-05-20 (NPK). Ao todo, 84 plantas foram selecionadas, entre plantas que receberiam os tratamentos e plantas de bordadura, ocupando uma área de aproximadamente 250 m². O experimento foi iniciado em setembro de 2021, período em que os cafeeiros já haviam iniciado o processo reprodutivo e estavam no estágio de florada, e foi finalizado em maio de 2022, com a completa maturação dos grãos. As plantas foram monitoradas semanalmente ao longo de todo o experimento.

3.2 Aplicação do herbicida glyphosate na cultura cafeeira

Para execução do experimento, selecionou-se a formulação comercial Roundup Original® DI, contendo 445 g L⁻¹ de sal de di-amônio de N-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate) e 370 g L⁻¹ do equivalente ácido de N-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate). As aplicações foram realizadas entre as linhas do cafeeiro, utilizando-se um pulverizador costal manual com bico TT 11002 e faixa de aplicação de 1,0 m. A pressão foi mantida a 3 bar. A dose utilizada foi de 2,0 L e. a./ha (e. a., equivalente ácido), com volume de calda de 140 L ha⁻¹.

O experimento foi instalado seguindo-se o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), com 6 tratamentos, 3 repetições e 2 plantas por tratamento. As aplicações foram realizadas em 5 diferentes estágios de desenvolvimento e maturação dos grãos, caracterizando-se os tratamentos do delineamento, além da testemunha (plantas que não receberam a aplicação do herbicida). Desse modo, seguindo a escala das fases fenológicas reprodutivas do cafeeiro apresentada por Morais *et al.* (2008), foram selecionados os seguintes estágios:

F1 (frutos de até 3 mm), F3 (frutos de 4,1 a 5 mm), F5 (frutos de 10 a 15 mm), M2 (frutos iniciando a maturação, com coloração verde-cana) e M3 (frutos em estágio cereja, com coloração vermelho-claro) (Figura 1).

Figura 1 – Estágios de frutificação (F1, F3 e F5) e maturação (M2 e M3) selecionados como tratamento do delineamento experimental, seguindo-se as fases fenológicas do cafeeiro apresentadas por Moraes *et al.* (2008).



Fonte: Paiva, 2022.

Cada estágio recebeu apenas uma aplicação do herbicida na dose previamente determinada. As aplicações foram realizadas quando visualmente constatados os estágios de frutificação e maturação.

Após a completa maturação dos grãos de todos os tratamentos, respeitado o período de carência de 15 dias após a aplicação do glyphosate no estágio M3, os grãos foram colhidos, despolidos e secos em estufa de circulação forçada entre 35 e 40 °C, até atingir umidade entre 9,5 e 10,5%, determinada por um analisador de umidade e impureza G650 Gehaka Agri®. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em freezer até a extração e análise cromatográfica.

Para esta análise, os grãos colhidos foram triturados utilizando-se um processador de alimentos IKA A11 basic (Sovereign, Brasil). Para se evitar qualquer contaminação cruzada, realizou-se a limpeza das lâminas e da câmara de armazenagem dos grãos a cada amostra triturada. Todas as amostras foram fortificadas com solução padrão de glyphosate isotopicamente marcado (^{13}C , ^{15}N) na concentração de $4,0 \text{ mg kg}^{-1}$, utilizado como padrão interno (PI), e imediatamente submetidas à extração empregando-se o método otimizado e validado apresentado no **Capítulo 1**. Cada repetição do delineamento foi analisada em triplicata. Três pontos da curva analítica ($1,0$; $3,0$ e $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$; $4,0 \text{ mg kg}^{-1}$ do PI em cada ponto) também foram preparados e analisados no mesmo dia, para provar a linearidade e repetibilidade do método.

A quantificação dos resíduos de glyphosate foi realizada empregando-se o método previamente otimizado e validado. Para interpretação dos resultados, foi realizada a análise de variância (ANOVA), a nível de 5% de significância, e a comparação entre as épocas de aplicação foi feita empregando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada no software SAEG[®] 9.1.

4 RESULTADOS

Foram tomadas as áreas dos cromatogramas obtidos para cálculo da concentração dos resíduos de glyphosate, empregando-se a curva analítica preparada. Os resultados são apresentados na Tabela 1. Estes dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de significância.

Tratamento	Concentrações (mg kg ⁻¹)			
	Repetições			Média
	A	B	C	
Testemunha	0,00 (< LD)	0,00 (< LD)	0,00 (< LD)	0,00 (< LD)
F1	0,27 (< LQ)	0,19 (< LQ)	0,27 (< LQ)	0,24 (< LQ)
F3	0,38 (< LQ)	0,49	0,23 (< LQ)	0,37 (< LQ)
F5	0,32 (< LQ)	0,27 (< LQ)	0,38 (< LQ)	0,32 (< LQ)
M2	0,54	0,44 (< LQ)	0,23 (< LQ)	0,40 (< LQ)
M3	0,00 (< LD)	0,00 (< LD)	0,00 (< LD)	0,00 (< LD)

< LD: concentração abaixo do limite de detecção;
< LQ: concentração abaixo do limite de quantificação.

Tabela 1 – Concentrações de glyphosate em mg kg⁻¹ obtidas após análise em LC- MS/MS das amostras coletadas do experimento a campo.

Observa-se que as concentrações de glyphosate nos grãos das testemunhas, que representam os cafeeiros que não receberam aplicação do herbicida, e do tratamento M3, referente aos grãos em coloração cereja, foram tomadas como 0,00 mg kg⁻¹. Isso se deve ao fato de que estas amostras não apresentaram resposta cromatográfica no tempo de retenção do glyphosate, ou os resíduos presentes estavam abaixo do limite de detecção do método. Dessa forma, este grupo de dados não foi considerado para análise de variância, uma vez que a comparação de quaisquer valores com estes resultados será estatisticamente significativa. Constata-se, então, que quando aplicado no período de maturação com coloração cereja, os resíduos de glyphosate não se acumularam nos grãos. Finalizado o desenvolvimento dos grãos, o transporte de fotoassimilados para os frutos é reduzido. Além disso, a presença de lipídeos distribuídos no tecido endospermico dos grãos pode dificultar a absorção e acumulação do glyphosate, dada sua polaridade (GOULART *et al.*, 2007).

Por outro lado, a média dos tratamentos F1 a M2 apresentaram concentrações não quantificáveis e analiticamente não acreditáveis considerando-se a metodologia empregada. Contudo, estes dados foram utilizados para a análise estatística. Os resultados indicaram que não há distinção entre as épocas de aplicação F1, F3, F5 e M2 ($p = 0,3989$). Pode-se certificar de que, quando aplicado em cafeeiros cujos grãos apresentam entre 3 mm de comprimento até o completo preenchimento do grão e aspecto de coloração verde-cana, a uma dose de 2,0 L e. a. ha^{-1} , o herbicida glyphosate é translocado pela planta e se acumula nestes grãos. Nestes estágios o glyphosate é transportado juntamente com os fotoassimilados, uma vez que a planta transporta água e nutrientes para garantir o desenvolvimento e crescimento tanto dos frutos quanto de outros pontos do seu crescimento. Os resíduos, no entanto, estão presentes em uma concentração menor que $0,48 \text{ mg kg}^{-1}$, um valor inferior ao limite máximo de resíduo (LMR) permitido no Brasil, de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (ANVISA, 2023).

É importante ressaltar que este valor ainda está acima do LMR vigente na União Europeia (EU), de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (EUROPEAN COMMISSION, 2013). Ainda que o método de determinação de glyphosate empregado não seja capaz de quantificar resíduos nesta faixa de concentração, foi possível evidenciar a presença dos resíduos. Tal fato torna-se um fator importante do ponto de vista de exportação deste produto, principalmente quando é destinado para comercialização na UE.

5 CONCLUSÕES

Foi realizado um estudo para avaliação do efeito da aplicação de menor dose do herbicida glyphosate (dose igual a 2 L e. a./ha) em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura cafeeira. Após análise cromatográfica, verificou-se a presença do glyphosate nos grãos quando aplicado o herbicida entre os estágios F1, representando os grãos com até 5 mm de comprimento, e M2, com grãos apresentando a coloração verde-cana. A concentração verificada estava abaixo do limite de quantificação do método analítico utilizado, de 0,48 mg kg⁻¹, e conseqüentemente, abaixo do LMR permitido para a cultura, de 1,0 mg kg⁻¹ (ANVISA, 2023).

Ainda que as concentrações estejam abaixo do LMR, os resultados evidenciam que a translocação do herbicida na planta resulta no acúmulo do glyphosate nos grãos de café. Novos estudos devem ser realizados a fim de se avaliar qual o efeito obtido após a aplicação de maiores doses deste herbicida nas fases de frutificação e maturação (F1 a M2). Este estudo permitirá determinar se os resíduos acumulados ultrapassam a concentração limite estipulada pelos órgãos regulamentadores.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Monografias de Agrotóxicos - Em Vigência**, 2023. Disponível em: Monografias de Agrotóxicos: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/monografias-de-agrotoxicos>. Acesso: 21 de junho de 2024.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos - Safra 2019/20 - N.12**. CONAB. Brasília, DF, 2020. 33 p.

CONSTANTIN, J. Métodos de Manejo. In: OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba, PR: Omnipax, 2011. Cap. 3, p. 67-78.

DaMATTA, F. M.; RONCHI, C. P.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 485-510, 2007.

EUROPEAN COMMISSION. **EU Pesticides Database - MRLs**. 2013 Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/mrls>. Acesso em: 21 de junho de 2024

FERREIRA, L. R.; VIANA, R. G.; TEIXEIRA, M. M.; SANTOS, L. D. T.; MACHADO, A. F. L. Tecnologia de aplicação de produtos fitossanitários em pequenas propriedades e regiões montanhosas. In: ZAMBOLIN, L.; PICANÇO, M. C.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. A.; JESUS JUNIOR, W. C. **Produtos Fitossanitários (Fungicidas, Inseticidas, Acaricidas e Herbicidas)**. Viçosa, MG: UFV/DFP, 2008. Cap. 15, p. 607-651.

GOULART, P. F. P.; ALVES, J. D.; CASTRO, E. M.; FRIES, D. D.; MAGALHÃES, M. M.; MELO, H. C. Aspectos histoquímicos e morfológicos de grãos de café de diferentes qualidades. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 662-666, 2007.

MEIRELES, E. J. L.; CAMARGO, M. B. P.; PEZZOPANE, J. R. M.; THOMAZIELLO, R. A.; FAHL, J. I.; BARDIN, L.; SANTOS, J. C. F.; JAPIASSÚ, L. B.; GARCIA, A. W. R.; MIGUEL, A. E.; FERREIRA, R. A. **Fenologia do Cafeeiro**: condições agrometeorológicas e balanço hídrico do ano agrícola 2004–2005. 1ª. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 128 p.

MORAIS, H.; CARAMORI, P. H.; KOGUISHI, M. S.; RIBEIRO, A. M. A. Escala fenológica da fase reprodutiva de *Coffea arabica*. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 257-260, 2008.

OLIVEIRA JR., R. S.; BACARIN, M. A. Absorção e Translocação de Herbicidas. In: OLIVEIRA JR., R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba, PR: Omnipax, 2011. Cap. 9, p. 215-241.

PITELLI, R. A. O uso responsável dos herbicidas e sua relação agricultura, meio ambiente e o homem. In: MESCHEDE, D. K.; GAZZIERO, D. L. P. **A Era Glyphosate**. Londrina: Midiograf, 2016. Cap. 4, p. 45-53.

RONCHI, C. P.; SILVA, A. A. Effects of Weed Species Competition on the Growth of Young Coffee Plants. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 3, p. 415-423, 2006.

RONCHI, C. P.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R. **Manejo de Plantas Daninhas em Lavouras de Café**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2001. 94 p.

SCHRÜBBERS, L. C.; VALVERDE, B. E.; SORENSEN, J. C.; CEDERGREEN, N. Glyphosate spray drift in *Coffea arabica* – Sensitivity of coffee plants and possible use of shikimic acid as a biomarker for glyphosate exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 15-22, 2014.

SILVA, V. C.; PERDONÁ, M. J.; SORATTO, R. P.; NEGRISOLI, E. Ocorrência de plantas daninhas em cultivo consorciado de café e noqueira-macadâmica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 441-449, 2013.

CAPÍTULO 3

EFEITO DA TORREFAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DO GLYPHOSATE EM
GRÃOS DE CAFÉ

RESUMO

A torra é a última etapa de tratamento dos grãos de café, sendo fundamental na definição da qualidade da bebida. Uma vez submetidos à altas temperaturas durante a torrefação, os grãos sofrem diversas modificações físico-químicas, que resultam na formação de novos compostos, reduzindo e/ou eliminando outros. Além disso, dadas as condições do processo, pode ocorrer a degradação de contaminantes presentes. Nesse sentido, foi avaliado o efeito da torrefação na degradação do glyphosate em grãos verdes de café contaminados com o herbicida. Para isto, o método desenvolvido foi validado para grãos de café torrado, obtendo-se resultados adequados para as figuras de mérito avaliadas. O método se mostrou seletivo, linear, preciso e exato, com limite de quantificação ($LOQ = 0,44 \text{ mg kg}^{-1}$), similar ao observado em grãos de café verde, e com efeito de matriz significativo (35%). Foram realizadas análises de amostras de café torrado moído adquiridas no comércio local, porém não foram detectados resíduos em nenhuma das amostras selecionadas. O efeito da torrefação na degradação do glyphosate foi avaliado submetendo-se grãos de café verde contaminados em diferentes concentrações à dois níveis de torra: média e escura. Em concentrações mais baixas de glyphosate ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$), a torrefação foi capaz de remover até 23,8% a quantidade de herbicida nos grãos, após torra média, e até 31,1%, após torra escura. Já em concentração mais elevada de glyphosate ($5,0 \text{ mg kg}^{-1}$), observou-se uma maior remoção, de 58 e 74%, respectivamente. Ainda que não tenha removido completamente os resíduos de glyphosate, a torrefação é capaz de reduzir a quantidade de herbicida presente, contribuindo para melhor qualidade dos grãos de café a serem comercializados.

1 INTRODUÇÃO

O café é uma bebida de alto apreço social. Seu mercado consumidor vem crescendo a cada ano, nacional e internacionalmente. Mais de 80% dos brasileiros consomem café diariamente. Do ponto de vista global, a previsão é de consumo de 177,0 milhões de sacas no ano safra 2023/24, representando um crescimento de 2,2% quando comparado a 2022/23 (BRESSANI, 2023; ICO, 2023).

O processo de torra, além das características naturais dos grãos verdes, define a qualidade final do café e o tipo de bebida gerada. Os níveis de torra são classificados de acordo com a coloração dos grãos após o processo, podendo variar de muito clara a muito escura. Ainda, a coloração é dependente da temperatura empregada no momento da torra (PIRES *et al.*, 2021; BRESSANI, 2023). De modo geral, a torrefação é realizada em temperaturas entre 190 e 240 °C (BONNLÄNDER *et al.*, 2005).

Outro fator que influencia nas características do café são os modelos de torradores empregados no processo. Existem no mercado torradores que variam no tipo de torrefação (horizontal, vertical, circular, de pás rotativas, entre outros), modo de transferência de calor (condução, convecção e radiação) e modo de operação (contínuo ou descontínuo) (BONNLÄNDER *et al.*, 2005; BRESSANI, 2023). A depender das condições utilizadas e do torrador empregado, a bebida apresentará maior ou menor acidez, maior ou menor corpo, que confere a sensação de “peso” na boca ao ingerir o café, e aroma pouco ou muito pronunciado.

Considerando as características físico-químicas, o processo de torrefação provoca diversas mudanças na composição e na estrutura dos grãos. Redução da umidade, perda de massa, aumento da porosidade, além da expansão dos grãos. Também ocorre a redução de polissacarídeos, geração e aprisionamento de CO₂, produção de melanoidinas (responsáveis pela coloração dos grãos torrados) e produção de compostos voláteis (BONNLÄNDER *et al.*, 2005; WANG e LIM, 2015). Esses são alguns dos fatores que conferem cor, aromas e sabores característicos ao café (Tabela 1).

	Grão verde	Grão torrado
Características		
Massa (g)	0,15	0,13
Densidade (g mL ⁻¹)	1,2-1,4	0,7-0,8
Volume (mL)	0,11-0,13	0,16-0,19
Porosidade	< 0,1	0,5
Componentes (g / 100g massa seca)		
Água	8-12	0-5
Polissacarídeos	43-45	38
Sacarose	6,2-8,4	0
Proteínas	8,5-12	7,5
Lipídeos	15-18	17
Aminoácidos	0,2-0,8	0
Cafeína	0,8-1,4	1,3
Melanoidinas	-	23
Compostos voláteis	traços	0,1
Minerais	3-5,4	4,5

Tabela 1 - Características e composição físico-química de grãos de café arábica verdes e torrados. Adaptado de Bonnländer *et al.* (2005) e Wang e Lim (2015).

Contudo, dadas as altas temperaturas em que o processo de torrefação é realizado, é possível que ocorra a degradação de contaminantes, dentre eles, o glyphosate. Em estudo realizado por Chen, Zhou e Li (2012), para avaliação da decomposição térmica do glyphosate, foi observado que a molécula começa a se decompor em temperaturas superiores a 198 °C. Desse modo, os processos de torrefação podem afetar a estabilidade deste herbicida, reduzindo a concentração em grãos de café contaminados.

Delatour *et al.* (2023) avaliaram o efeito da torrefação na degradação do glyphosate. Os pesquisadores verificaram uma redução de até 56% na concentração do herbicida. Contudo, estes estudos empregaram análises por cintilação líquida para quantificação do analito, valendo-se de padrão analítico de glyphosate isotopicamente marcado, e somente um nível de fortificação foi avaliado.

Visando avaliar melhor a influência da torrefação na degradação deste herbicida, esta pesquisa se propõe a determinar o efeito de duas intensidades de torra (torra média e torra escura) na degradação do glyphosate em grãos de café contaminados em diferentes níveis de concentração. Para tal, o método de extração do glyphosate previamente desenvolvido foi validado para análises em café torrado, uma vez que pouco se tem relatado na literatura sobre a análise deste composto em café torrado por LC-MS/MS. Além disso, o método validado foi aplicado na análise de amostras de café comercializadas na cidade de Viçosa, em Minas Gerais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da torrefação na degradação do herbicida glyphosate em grãos de café contaminados com diferentes concentrações do herbicida.

2.1 Objetivos Específicos

- Validar o método de extração de glyphosate para detecção e quantificação de resíduos do herbicida em café torrado do tipo *Coffea arabica*;
- Aplicar o método validado na análise de amostras de café torrado moído adquiridas no comércio local de Viçosa, Minas Gerais;
- Avaliar o efeito da torrefação na degradação do glyphosate submetendo-se grãos de café verde contaminados em cinco níveis de concentração (0; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg kg⁻¹) à torra média e a à torra escura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Soluções

Acetonitrila e metanol, ambos de grau LCMS, foram adquiridos da Sigma Aldrich. Ácido fórmico (> 98%, Sigma Aldrich), ácido medrônico (\geq 99%, Sigma Aldrich), diclorometano (grau HPLC > 99,8%, Sigma Aldrich), formiato de amônio (98%, Carlo Erba) e hidróxido de amônio (28 - 30%, Synth) também foram utilizados nos experimentos. Soluções padrão estoque e de trabalho de glyphosate (pureza de 99 % m/m – Sigma Aldrich) foram preparadas em água ultrapura e acetonitrila na proporção 90:10 (% v/v) em diferentes concentrações. Todos os reagentes foram utilizados sem nenhuma etapa de purificação adicional.

3.2 Instrumentação

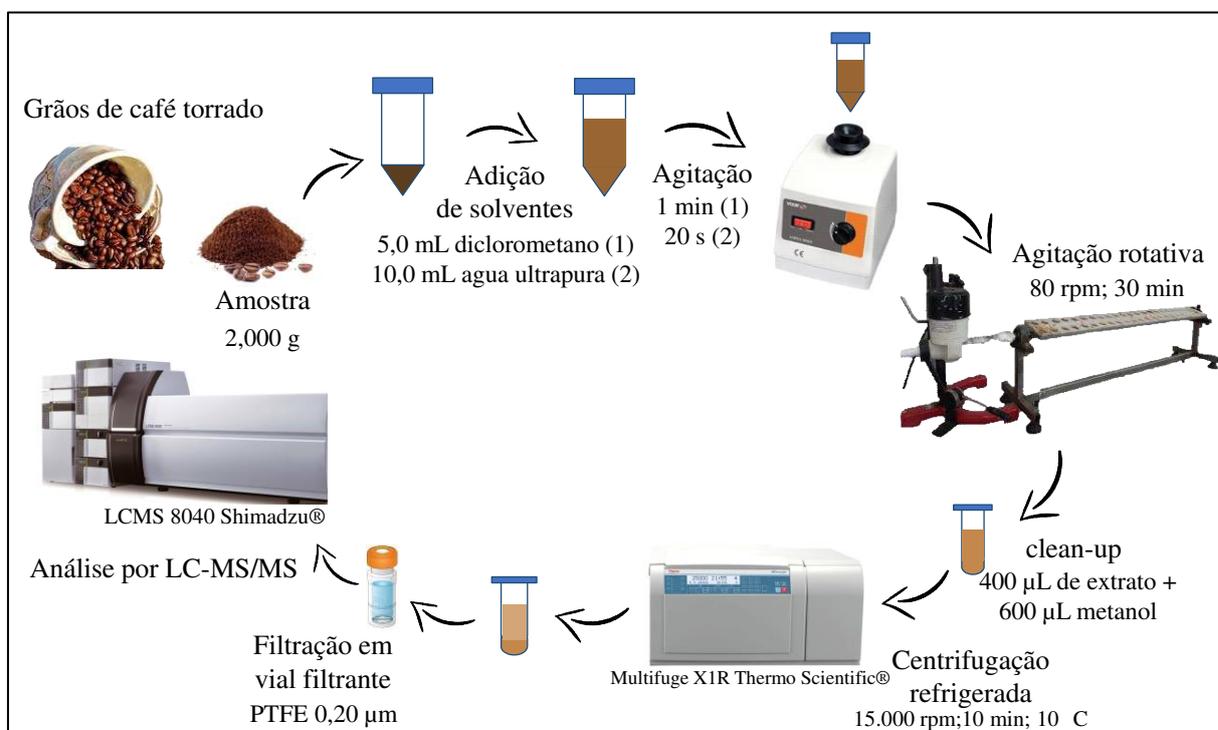
As análises de glyphosate foram realizadas em cromatógrafo a líquido acoplado ao espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo modelo LCMS 8040 Shimadzu® (LC-MS/MS), equipado com injetor automático SIL-10Ai, forno CTO 20A e fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Para separação cromatográfica foi empregada uma coluna Restek® Raptor Polar X (30 mm L x 2,1 mm I.D. x 2,7 μ m).

Para preparo das amostras foi utilizado um processador de alimentos IKA A11 basic (Sovereign Brasil). A torrefação do café foi realizada em reator de alumínio sob agitador magnético com aquecimento K40-1810H (KASVI). Ainda, foram utilizadas balança de precisão analítica AY220 (Shimadzu®), agitador rotativo acoplado a um motor com rotação controlada (Fisatom) e centrífuga refrigerada Multifuge X1R (Thermo Scientific).

3.3. Determinação de glyphosate em café torrado

O método de extração de glyphosate desenvolvido e apresentado no **Capítulo 1** foi empregado para extração do herbicida em café torrado (Figura 1). O método consiste em adicionar 2,000 g de amostra de grãos torrados e moídos a um tubo de polipropileno do tipo Falcon de 50 mL, seguido da adição de 5,0 mL de diclorometano e agitação em vórtex por 1 min. Em sequência são adicionados 10,0 mL de água ultrapura, sendo este sistema novamente submetido à agitação em vórtex por 20 s e à agitação em agitador rotativo (360°) a 80 rpm por 30 min. A seguir, 400 µL do sobrenadante são adicionados a um novo tubo do tipo *ependorf* com capacidade para 1,5 mL, juntamente com 600 µL de metanol. O sistema é agitado em vórtex por 10 s e centrifugado em centrífuga refrigerada a 10 °C por 10 min, a 15.000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em *vial* filtrante PTFE 0,20 µm para melhor limpeza do extrato final e preservação do sistema cromatográfico.

Figura 1 – Esquema do método de extração de glyphosate em grãos de café torrados e moídos.



Fonte: Paiva, 2023.

3.3.1 Validação do método de determinação de glyphosate em café torrado

De modo análogo ao realizado em café verde, a quantificação de glyphosate em café torrado foi realizada utilizando-se o método de superposição de matriz. O guia de validação SANTE/11312/2021 (2022), disponibilizado pela União Europeia, e a Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 166, disponibilizada pela ANVISA em 2017, foram novamente utilizados para validação do método. Foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), efeito de matriz, cromatograma de íons extraídos (XIC) e proporção da intensidade dos íons.

Todos os parâmetros foram avaliados como descrito no tópico **3.4.3 Validação do método de determinação de glyphosate em grãos de café verde** do **Capítulo 1**.

3.4 Aplicação do método na análise de amostras de café torrado moído

Após a validação do método, este foi aplicado na análise de amostras de café torrado e moído. Foram adquiridas 6 amostras distintas no comércio local de Viçosa, em Minas Gerais, Brasil.

As amostras foram preparadas em triplicata, seguindo-se o método de extração apresentado no tópico **3.3** deste **Capítulo 3**. Os extratos foram analisados por LC-MS/MS e as respostas, em concentração, foram obtidas usando-se uma curva analítica (0,5 a 6,0 mg kg⁻¹) preparada no mesmo dia em matriz isenta do analito.

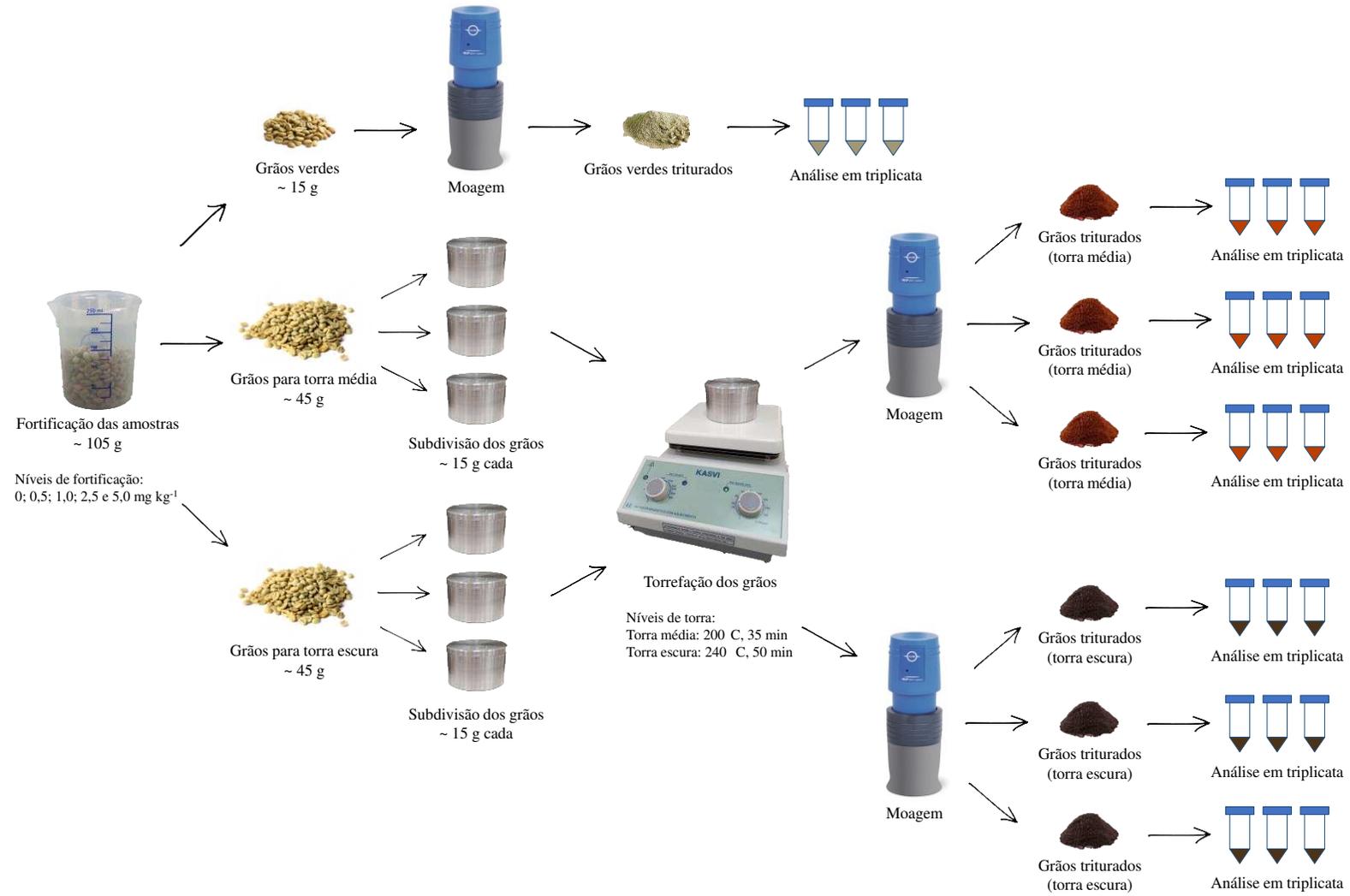
3.5 Avaliação do efeito da torrefação na degradação do glyphosate em grãos de café

O efeito da torrefação na degradação do glyphosate foi avaliado por submissão dos grãos contaminados à dois níveis de torra: média e escura. Para isto, foram medidas 5 amostras de grãos de café verde, isentas do herbicida, de aproximadamente 105 g cada amostra. As amostras foram transferidas para béqueres de plástico, com capacidade para 250 mL, nos quais adicionou-se 70,00 mL de soluções padrão de glyphosate preparadas em acetonitrila em diferentes concentrações (0,75; 1,50; 3,75 e 7,50 mg L⁻¹), de modo que todos os grãos ficassem submersos, além de uma amostra imersa em acetonitrila pura, isenta de herbicida. Após imersão, as amostras foram deixadas em capela com exaustão até completa evaporação do solvente orgânico, obtendo-se as concentrações finais de 0; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg kg⁻¹ de glyphosate nos grãos.

Os grãos contaminados foram separados em 3 porções: grãos verdes (15 g), grãos submetidos à torra média (45 g) e grãos submetidos à torra escura (45 g) (Figura 2).

Os grãos verdes foram triturados utilizando-se um processador de alimentos IKA A11 basic (Sovereign, Brasil). As lâminas e o compartimento para alocação dos grãos foram limpos a cada amostra, para evitar qualquer contaminação cruzada. Uma vez triturados, foram pesados 2,000 g de amostra em tubo Falcon com capacidade para 50 mL, sendo os tubos submetidos ao processo de extração otimizado e validado apresentado no **Capítulo 1**. As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração estudada. Os extratos finais foram analisados em LC-MS/MS e as áreas de glyphosate obtidas foram utilizadas para obtenção da curva analítica.

Figura 2 – Esquema do processo de fortificação, partição e torrefação em diferentes níveis de amostras de grãos de café.



A torrefação dos grãos foi realizada em agitador magnético com aquecimento. Para isto, cada porção de grãos foi subdividida em três novas porções, para que a torrefação fosse realizada em triplicata. Primeiramente, os reatores, com capacidade aproximada de 335 mL, foram posicionados sob o agitador na temperatura pré-definida, sem os grãos, por 5 min, para atingir a temperatura requerida. Em sequência, os reatores foram abertos, os grãos foram alocados e o reator foi novamente fechado. Para a torra média, os grãos foram submetidos à temperatura de 200 °C, por 35 min, com agitação constante por barra magnética a 20 rpm. Para a torra escura, os grãos foram submetidos à temperatura de 240 °C, por 50 min, mantida a mesma agitação (20 rpm).

Após a torrefação, os grãos foram triturados utilizando-se um processador de alimentos IKA A11 basic (Sovereign, Brasil), mantendo-se a limpeza das lâminas e do compartimento de grãos a cada amostra triturada. Após este processo, novamente 2,000 g de amostra foram pesados em tubo Falcon com capacidade para 50 mL, e os tubos foram submetidos ao processo de extração apresentado neste capítulo. As análises foram realizadas em triplicata para cada amostra submetida à torra, média ou escura (Figura 2). Os extratos finais foram analisados em LC-MS/MS e a áreas de glyphosate foram utilizadas como resposta. A concentração remanescente do herbicida após a torra foi estimada utilizando-se a curva analítica obtida após análise dos grãos verdes contaminados e a porcentagem de degradação do glyphosate foi determinada.

4 RESULTADOS

4.1 Validação do método de determinação de glyphosate em café torrado

De modo análogo ao realizado para café verde, a quantificação do glyphosate em café torrado foi realizada pelo método de superposição de matriz. A Tabela 2 contém os resultados obtidos para todas as figuras de mérito avaliadas.

Pode-se observar que o método apresentou seletividade, ainda que tenha ocorrido um deslocamento do pico do glyphosate, com novo tempo de retenção t_R igual a 3,8 min. Como não foi empregada uma coluna de guarda, estima-se que a modificação no tempo de retenção do glyphosate ocorreu devido ao processo de deterioração e modificação da coluna após as centenas de injeções realizadas ao longo deste trabalho. Essa diminuição do tempo de retenção é um processo natural tendo em vista o uso constante da coluna, e já foi relatada pela empresa fabricante (RESTEK, 2021). Ainda que este tipo de alteração indique uma modificação nas condições de trabalho da coluna, não houve comprometimento do trabalho desenvolvido.

O método manteve a linearidade para a mesma faixa de concentração estudada em café verde (0,5 – 6,0 mg kg⁻¹), com coeficiente de determinação $r^2 = 0,9993$. Além disso, obteve-se desvio percentual entre a concentração real e a concentração calculada entre 0,9 e 16,5%, valores estes de acordo com o exigido pelo guia de validação ($\leq 20\%$) (EUROPEAN COMMISSION, 2022). Os limites de detecção e quantificação obtidos foram 0,14 e 0,44 mg kg⁻¹, respectivamente, valores estes próximos aos obtidos anteriormente para análise do glyphosate em café verde, de 0,16 e 0,48 mg kg⁻¹.

O método apresentou repetibilidade, precisão intermediária e recuperação adequados, de acordo com o exigido pelo guia de validação (CV < 20%; %R entre 70 e 120%) (EUROPEAN COMMISSION, 2022). Ao longo de todas as análises, a recuperação do método foi monitorada, e os valores de %R permaneceram entre 80,42 e 115,27%, atedendo às exigências do guia para validação do método.

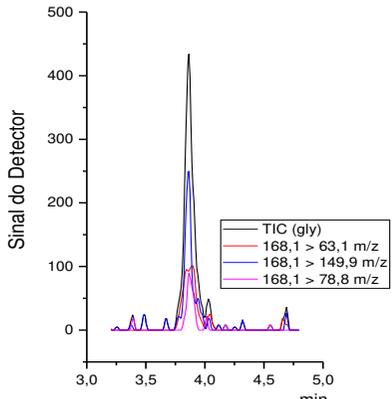
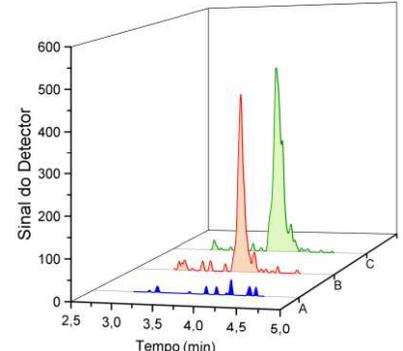
Parâmetros validados para determinação de glyphosate em café torrado								
	Faixa de trabalho (mg kg ⁻¹)	Limite de detecção (mg kg ⁻¹)	Limite de quantificação (mg kg ⁻¹)	Efeito de Matriz (%)	NF (mg kg ⁻¹)	Repetibilidade CV (%)	Precisão Intermediária CV (%)	Recuperação (%R)
Linearidade	0,5 – 6,0	0,14	0,44	35,14	1,0	11,45	15,98	105,91
A = 2160,1218 C(gly) + 96,1497 r ² = 0,9993					5,0	10,34	6,96	96,00
Intensidade Relativa dos íons				Cromatograma de íons extraídos			Seletividade	
glyphosate m/z	Solução padrão	Extrato da matriz	Erro %					
63,1	95,0	88,7	-6,6					
78,8	38,7	43,7	12,7					
149,9	100,0	100,0	0,0					

Tabela 2 – Parâmetros da validação do método: Regressão linear, coeficiente de determinação (r^2), faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, efeito de matriz, nível de fortificação (NF), precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária expressos pelo coeficiente de variação (CV), exatidão em termos de porcentagem de recuperação (%R), intensidade relativa dos íons 63,1; 78,8 e 149,9 m/z em solução padrão e no extrato da matriz, cromatograma de íons extraídos e seletividade (A = branco do extrato da matriz; B = extrato da matriz fortificada com glyphosate a 1,0 mg kg⁻¹ e C = solução padrão de glyphosate a 100 µg L⁻¹) para determinação de glyphosate em café torrado.

Observou-se um efeito de matriz expressivo nas análises em café torrado, com um valor de %EM = 35,14%, diferente do que foi observado em café verde. Este resultado indica que os coextrativos presentes na amostra causam um aumento do sinal do glyphosate, quando comparado à resposta do analito em mistura de solventes (água ultrapura e acetonitrila 90:10 %(v/v)). Além disso, o efeito de matriz observado pode estar associado à deterioração do sistema cromatográfico, mais especificamente à coluna. Apesar da filtração do extrato em filtro PTFE 0,20 µm, esta não foi suficiente para remover os pigmentos, indicando a presença de coextrativos que podem ter interagido com a coluna e afetado a resposta do glyphosate, ainda que não tenham causado um aumento da pressão do sistema cromatográfico.

Quanto ao cromatograma de íons extraídos, observou-se que os picos das transições monitoradas para análise do glyphosate mantiveram a sobreposição, e o erro percentual referente à diferença das intensidades relativas ao analisar soluções padrão e extratos da matriz variou entre -6,6 e 12,7 % mantendo-se dentro do exigido pelo guia de validação SANTE/11312/2021 (2022), de $\pm 30\%$.

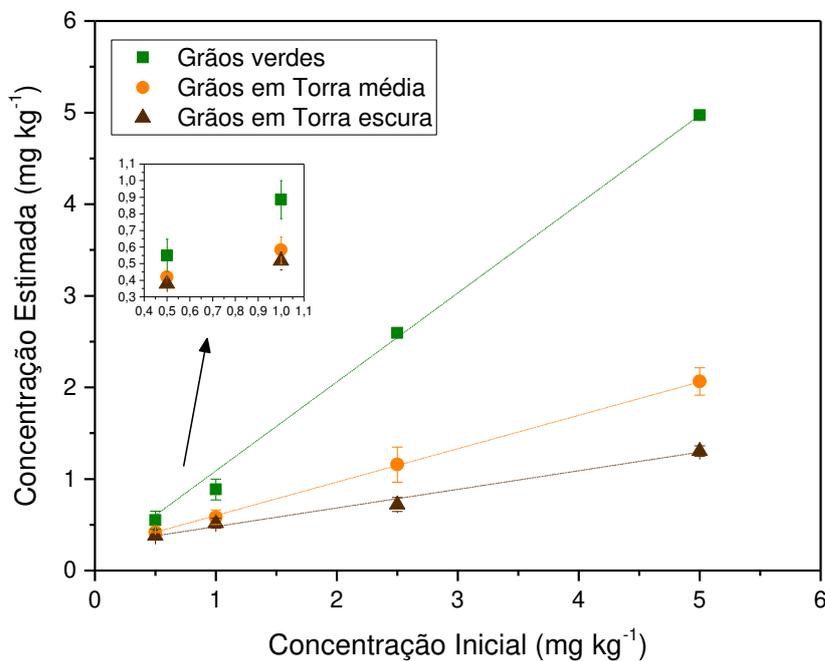
4.2 Análise de amostras de café torrado moído

Foram analisadas 6 amostras distintas coletadas no comércio local de Viçosa, MG, não sendo detectados resíduos de glyphosate em nenhuma das amostras analisadas (< LD).

4.3 Avaliação do efeito da torrefação na degradação do glyphosate em grãos de café

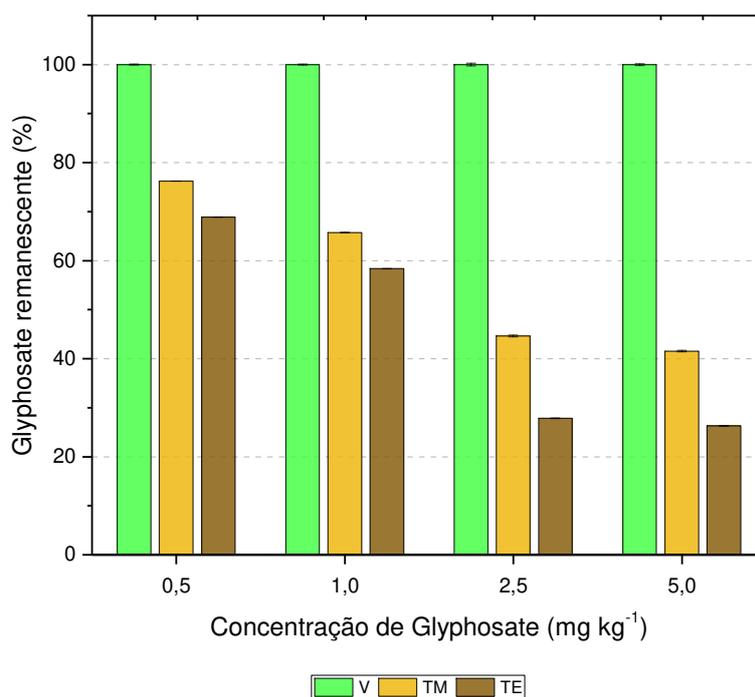
As áreas dos cromatogramas obtidas após análise dos grãos de café verdes contaminados foram utilizadas para elaboração de uma curva analítica ($A = 5065,8844 C(\text{gly}) - 1329,4898$; $r^2 = 0,9980$), a qual foi empregada na determinação da concentração de glyphosate nas amostras de café submetidas às torras média e escura (Figura 3).

Figura 3 – Concentração inicial versus concentração estimada de glyphosate em grãos de café verde e em grãos de café após torrefação em torra média e torra escura.



Observa-se que o processo de torrefação foi capaz de reduzir a concentração de glyphosate nos grãos, sendo esta redução mais acentuada em grãos mais contaminados (maior concentração inicial de glyphosate). Após torra média, obteve-se de 23,8 a 58,5% de redução na concentração de glyphosate, enquanto após torra escura, esta redução variou de 31,1 a 73,8%. A redução de glyphosate nos grãos após os processos de torra empregados pode ser mais bem observada na Figura 4.

Figura 4 – Glyphosate remanescente (%) em grãos de café verde e grãos submetidos à torra média e torra escura após fortificação em diferentes níveis de concentração.



Legenda:

V: grãos de café verde

TM: grãos de café submetidos à torra média

TE: grãos de café submetidos à torra escura

Foram observadas maiores reduções de glyphosate, tanto após a torra média quanto após a torra escura, quanto maior a concentração inicial do herbicida nos grãos. Estima-se que isto ocorreu devido ao fato de que nessas situações maiores quantidades do herbicida estavam expostas ao calor e à superfície do reator, facilitando sua degradação. No entanto, dado o modo de fortificação utilizado, e ao fato de que a extração do glyphosate é feita após a moagem do café, não se pode confirmar se a molécula do herbicida foi absorvida ou adsorvida, ou mesmo se ocorreram ambos os processos.

Ainda assim, é fato que o processo de torrefação é capaz de reduzir a concentração de glyphosate em grãos de café. Um estudo semelhante foi realizado por Delatour *et al.* (2023), com avaliação da remoção do glyphosate em grãos de café robusta e arábica após diferentes níveis de torra e análise por cintilação líquida. Em café arábica, os pesquisadores verificaram uma redução

de até 56% após torrefação a 200 °C por 10 min. Neste mesmo estudo, os pesquisadores investigaram o mecanismo de degradação do glyphosate com uso de padrões isotopicamente marcados (^{14}C). As análises indicaram uma descarboxilação da molécula, com liberação de CO_2 , predominante no início do processo de torrefação. Além disso, estudos indicam que a degradação da fração contendo o grupo fosfometil ocorre principalmente por perda de ácido fosfórico (MACKIE e KENNEDY, 2019).

Contudo, é difícil prever o quanto de glyphosate pode ser removido no processo de torrefação, uma vez que esta redução é dependente do tipo de café, da temperatura e do tempo de torra, sendo estes dois últimos fatores influenciados pela torrefadora empregada no processo. Novos estudos podem ser realizados para investigar os fatores mencionados.

5 CONCLUSÕES

Um método proposto para determinação de resíduos de glyphosate em grãos de café verde foi eficazmente aplicado na análise de café torrado. O método de extração foi validado para a nova matriz de acordo com os guias regulamentadores SANTE/11312/2021 (2022) e ANVISA (2017), apresentando seletividade, linearidade ($r^2 = 0,9993$), precisão ($CV < 16\%$), exatidão (%R entre 96 e 106%), com limites de detecção e quantificação satisfatórios (0,14 e 0,44 mg kg⁻¹, respectivamente) e efeito de matriz significativo (35%). O método foi aplicado na análise de amostras adquiridas no comércio local, porém nenhum resíduo foi detectado.

Observou-se que o processo de torrefação foi capaz de reduzir a concentração de glyphosate nos grãos de café, sendo a torra escura mais eficiente na degradação do herbicida que a torra média. Contudo, a remoção se mostrou dependente da concentração. Obteve-se 58,5 e 72,8% de remoção em torra média e escura, respectivamente, em concentrações mais elevadas de glyphosate (5,0 mg kg⁻¹), enquanto em concentrações mais baixas (0,5 mg kg⁻¹) essa remoção foi de 23,8 e 31,1%, respectivamente. Ainda que não seja capaz de remover completamente o glyphosate, a torrefação reduz significativamente a concentração do herbicida nos grãos, a níveis de concentração abaixo do LMR, contribuindo para a melhor qualidade do produto e segurança alimentar.

PERSPECTIVAS

Um novo método foi proposto para determinação de glyphosate em grãos de café verde e torrado. Os resultados se mostraram satisfatórios, possibilitando a quantificação de resíduos do herbicida abaixo do limite máximo permitido tanto no Brasil, como em outros países. Contudo, tem-se por perspectivas realizar novos estudos e modificações no método, de modo a se quantificar resíduos de glyphosate abaixo do LMR permitido na União Europeia ($\text{LMR} = 0,01 \text{ mg kg}^{-1}$). Dentre estas modificações, pode-se destacar a alteração da fase estacionária da coluna cromatográfica, uma vez que a coluna empregada apresentou baixa vida útil e alta capacidade de retenção do herbicida. Além disso, pode-se estudar uma alteração do modo de fortificação dos grãos, uma vez que a fortificação de grãos inteiros resultou em maior sinal cromatográfico (maior área), efeito observado nos estudos de torrefação, quando comparado à fortificação de grãos já moídos.

Quanto à contaminação dos grãos de café na lavoura, novos estudos a campo podem ser conduzidos, verificando-se o grau de contaminação dos grãos quando utilizadas diferentes doses do produto comercial contendo glyphosate, o uso de diferentes formulações comerciais e a aplicação em diferentes estágios reprodutivos do cafeeiro. Neste sentido, é interessante estudar a aplicação no período de florada, buscando-se o efetivo controle das plantas daninhas, porém sem o acúmulo de resíduos nos grãos.

Quanto à torrefação, ainda que tenha se observado sua capacidade de reduzir a quantidade de glyphosate nos grãos, novos estudos podem ser desenvolvidos empregando-se diferentes torradores. Como o processo de torra é bastante diverso, tanto em relação ao torrador utilizado, quanto em relação ao grau de torra do grão, distintos equipamentos e tempos de torra podem influenciar na degradação do glyphosate.

Por fim, tem-se por perspectiva a otimização das condições de análise para que se possa realizar o monitoramento do AMPA, o principal metabólito do glyphosate. Alguns ensaios foram conduzidos e verificou-se que o sinal do AMPA não era observado nos cromatogramas dos extratos da matriz fortificados com este analito. Resultados semelhantes foram obtidos por Cutillas e Fernández-Alba (2021) ao analisar glyphosate e AMPA em diferentes matrizes alimentares, também empregando uma coluna Restek® Raptor Polar X. Os

autores verificaram que nos extratos de laranja e marmelo nenhum sinal de AMPA era observado. Este problema foi sanado utilizando-se uma coluna de maior comprimento (5 cm) disponível no mercado. Analisar o AMPA em grãos de café permite verificar a presença deste metabólito em amostras comercializadas, avaliar se ocorre sua formação após aplicação do glyphosate nas lavouras e durante a maturação dos grãos, ou mesmo se seus resíduos permanecem nos grãos após o processo de torrefação e/ou o quanto eles são reduzidos neste processo.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. ANVISA. Brasília, DF, 2017. 21 p.

BONNLÄNDER, B.; EGGERS, R.; ENGELHARDT, U. H.; MAIER, H G. Roasting. In: ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso Coffee: The Science of Quality**. Elsevier Academic Press, 2005. Cap. 4, p. 417.

BRESSANI, E. **Guia do Barista: da origem ao café perfeito**. 6ª. ed. São Paulo: Café Editora, 2023. 236 p.

CHEN, F. X.; ZHOU, C. R.; LI, G. P. Study on thermal decomposition and the non-isothermal decomposition kinetics of glyphosate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 109, p. 1457-1462, 2012.

CUTILLAS, V.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. Analysis by LC-MS/MS of polar pesticides in fruits and vegetables using new hybrid stationary phase. **MethodsX**, v. 8, p. 101306, 2021.

DELATOUR, T.; BADOUD, F.; SEVERIN, K.; BÜCKING, M.; GÖCKENER, B.; THEURILLAT, V. Degradation of glyphosate along coffee roasting: Do residue levels in green mirror exposure derived from coffee consumption? **Food Chemistry**, v. 403, p. 134355, 2023.

EUROPEAN COMMISSION. **Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, Document N° SANTE/11312/2021**. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. 2022. 57 p.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO). **Coffee Market Report: November 2023**. International Coffee Organization. 2023. 11 p.

MACKIE, J. C.; KENNEDY, E. M. Pyrolysis of Glyphosate and Its Toxic Products. **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 23, p. 13742-13747, 2019.

PIRES, F. C.; PEREIRA, R. G. F. A.; BAQUETA, M. R.; VALDERRAMA, P.; ROCHA, R. A. Near-infrared spectroscopy and multivariate calibration as an alternative to the Agtron to predict roasting degrees in coffee beans and ground coffees. **Food Chemistry**, v. 365, p. 130471, 2021.

RESTEK. **Separate a Wide Variety of Polar Analytes with a Novel Hybrid Stationary Phase**. Restek Corporation. USA, 2021. 12 p.

WANG, X.; LIM, L. T. Physicochemical Characteristics of Roasted Coffee. In: _____ **Coffee in Health and Disease Prevention**. Academic Press, 2015. p. 247-254.

APÊNDICE

Mecanismos de fragmentação do glyphosate. Adaptado de: Goodwin, Startin, Goodall e Keely, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, v. 18, p. 37-43, 2004.

