

PROTOCOLO DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM URINA

1. Indicação

Monitoramento biológico de exposição ao glifosato. O glifosato é um herbicida amplamente utilizado na agricultura e o AMPA é o seu principal metabólito ativo, que é metabolizado no ambiente.

2. Princípio

Quantificação de glifosato e AMPA em urina a partir de derivatização com PFBBBr e, em sequência, uma extração líquido-líquido com metil-terc-butil-éter. Após, a fase orgânica é seca em um concentrador, retomada e injetada no cromatógrafo líquido com detector de massas sequencial (LC-MS/MS).

3. Amostra

a. Colher a primeira urina da manhã (de preferência no dia seguinte a aplicação do herbicida); b. Após a coleta, enviar as amostras imediatamente ao laboratório, acomodadas em caixa de isopor, contendo gelo seco, ou armazenadas em ultra-freezer à -70 °C até o momento de sua análise.

4. Processamento da amostra

Em tubo tipo Falcon de 15 mL, são adicionados 100 µL de urina, 20 µL de padrão interno, e derivatização com 2,3,4,5,6-pentafluorobenzil bromide (PFBBBr). Após incubação de 4 horas, é realizada uma extração líquido-líquido utilizando metil terc-butil éter (MTBE). 2,8 mL da fase orgânica é evaporada um concentrador e reconstituídos com 300 µL de 2 mM de acetato de amônio em 40% de acetonitrila. 5 µL são injetados no cromatógrafo líquido de ultra-eficiência Acquity I-Class acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo XEVO TQ-S Micro.

5. Condições cromatográficas

- Coluna Acquity Phenyl-Hexyl (2.1 x 100 mm, 1.7 µm de tamanho de partícula);
- Temperatura da coluna: 50 °C;
- Temperatura do auto amostrador: 10 °C;
- Fases móveis: acetato de amônio 2 mM em água ultrapura (A) e acetato de amônio 2 mM em 99% de ACN (B);
- Fluxo de fase móvel: 0,4 mL/min;
- Tempo total de corrida: 7,5 minutos.

Detector de massa:

- Ionização por electrospray em modo positivo;
- Íon glifosato: 710.1 > 448.1 m/z;
- Íon AMPA: 652.1 > 390.1 m/z;
- Íon glifosato 1,2- ¹³C₂ ¹⁵N: 713.1 > 451.1 m/z;
- Íon AMPA ¹³C¹⁵N: 656.4 > 394.1 m/z;

6. Resultados

- a. Unidade de medida: µg/L.
- b. Interpretação dos resultados: qualquer concentração urinária de glifosato e AMPA indica exposição aos mesmos.

7. Significado clínico

O indicador biológico é capaz de indicar uma exposição, mas não possui, isoladamente, significado clínico ou toxicológico próprio, ou seja, não indica doença, nem está associado a um efeito ou disfunção de qualquer sistema biológico.

8. Referência Bibliográfica

Department of Health and Human Services Food and Drug Administration 2018 (FDA). M10 BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION AND STUDY SAMPLE ANALYSIS Guidance for Industry.

BIENVENU, el. al. Determination of glyphosate, glufosinate and their major metabolites in urine by the UPLC-MS/MS method applicable to biomonitoring and epidemiological studies. Anal Bioanal Chem, v. 413, p. 2225–2234, 5 fev. 2021.