



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química

**Determinação de pesticidas em amostras de leite materno por
espectrometria de massas ambiente empregando *paper spray ionization***

Pedro Augusto Barbosa Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves

Goiânia

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o Formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: título de caso ou livrinho sistematiza os outros formatos.

2. Nome completo do autor

Pedro Augusto Barbosa Ferreira

3. Título do trabalho

Determinação de pesticidas em amostras de leite materno por espectrometria de massas ambiente empregando paper spray ionization

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
- novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Rodrigues Chaves, Professora do Magistério Superior**, em 17/12/2024, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Augusto Barbosa Ferreira, Discente**, em 17/12/2024, às 21:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 5009051 e o código CRC: 229C88EA.

Pedro Augusto Barbosa Ferreira

Determinação de pesticidas em amostras de leite materno por espectrometria de massas ambiente empregando *paper spray ionization*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Linha de pesquisa: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves

Goiânia

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ferreira, Pedro Augusto Barbosa

Determinação de pesticidas em amostras de leite materno por espectrometria de massas ambiente empregando paper spray ionization [manuscrito] / Pedro Augusto Barbosa Ferreira. - 2024. LXIII, 63 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Rodrigues Chaves.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2024. Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. glifosato. 2. polímeros molecularmente impressos. 3. material de acesso restrito. 4. leite materno. 5. ionização ambiente. I. Chaves, Andréa Rodrigues, orient. II. Título.

CDU 543



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata Nº 383 da sessão de Defesa de Dissertação de **Pedro Augusto Barbosa Ferreira** que confere o título de **Mestre em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **dezessete dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e quatro**, a partir das **14h:00m**, por **Videoconferência**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação, intitulada **"Determinação de pesticidas em amostras de leite materno por paper spray ionization acoplado à espectrometria de massas"**. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora **Andréa Rodrigues Chaves (IQ - UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora **Francielle Queiroz Soares (IFG - Campus Inhumas)**, Professora Doutora **Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF - UFG)**. Durante a arguição, os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora **Andréa Rodrigues Chaves, Presidente da Banca Examinadora**, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **dezessete dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e quatro**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Determinação de pesticidas em amostras de leite materno por espectrometria de massas ambiente empregando *paper spray ionization*



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Rodrigues Chaves, Professora do Magistério Superior**, em 17/12/2024, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **FRANCIELLE QUEIROZ SOARES, Usuário Externo**, em 17/12/2024, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Augusto Rodrigues De Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2024, às 12:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5008958** e o código CRC **0D8C42F9**.

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Andréa Rodrigues Chaves pelo aceite na orientação de mestrado, por toda a paciência e dedicação. Pela excelente estrutura e materiais fornecidos pelo LaCEM (Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas) coordenado pelos professores Dr. Boniek Gontijo Vaz e Dra. Andréa Rodrigues Chaves. A Central de Análises Multiusuários (CAM-IQ-UFG), ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de alta resolução (LabMic) pelos ótimos serviços prestados. A professora Dra. Flaviana Vely Mendonca Vieira da Faculdade de Enfermagem da UFG, pela parceria e colaboração.

Aos meus pais (*in memoriam*) sempre dedicados a investir em minha formação. À minha irmã pelo apoio incondicional. À minha Mariana, que nos trouxe tantas alegrias desde sua chegada.

A meus colegas e amigos do LaCEM, em especial à turma do almoço e do pão de queijo, sempre dispostos a ajudar e orientar. Aos amigos Dr. Gabriel, Dra. Gesiane, Dr. Nerilson e Me. Giovanni por me hospedarem nesta reta final do trabalho, um agradecimento especial ao Dr. Lucas Silva Machado por me ensinar e acompanhar desde que cheguei ao laboratório, à Dra. Camila Cíntia pela ajuda e orientação nas análises e resultados. Ao amigo Me. Jean Carlos Pereira Sousa por toda ajuda a qualquer hora.

Aos amigos Dr. Vinícius e Dr. Murilo pelo companheirismo desde à época de graduação.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Química (PPG-IQ) da UFG pela oportunidade e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPQ).

SUMÁRIO

Sumário.....	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. Introdução.....	16
1.1 Pesticidas	16
1.2 Espectrometria de massas.....	19
1.3 Fontes de ionização	20
1.4 Ionização ambiente por <i>Paper-spray ionization</i> acoplada ao espectrômetro de massas (PSI-MS)	21
1.5 Polímeros molecularmente impressos (MIP)	23
1.6 Materiais de acesso restrito (RAM).....	24
2. Objetivos.....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. Materiais e métodos.....	26
3.1 Reagentes e padrões.....	26
3.2 Amostras de leite	26
3.3 Síntese da fase de acesso restrito com albumina sérica bovina (RAM-BSA)....	27
3.4 Síntese da fase de acesso restrito com glicidil metacrilato (RAM-GMA)	27
3.5 Síntese de polímero molecularmente impresso (MIP)	28
3.6 Imobilização das fases MIP e RAM no papel cromatográfico.....	29
3.7 Caracterização físico-química dos polímeros sintetizados.....	29
3.8 Análises PSI-MS	30

3.9 Preparo das amostras de Leite	31
3.9.1 Avaliação das fases extratoras	31
3.9.2 Validação analítica	32
3.9.3 Linearidade	32
3.9.4 Precisão e exatidão	33
3.9.5 Limite de detecção (LOD).....	34
3.9.6 Limite de quantificação (LOQ)	34
3.9.7 Efeito matriz	35
4. Resultados e discussão	35
4.1 Caracterização físico-química dos polímeros sintetizados	35
4.2 Análise termogravimétrica/análise termogravimétrica derivada-análise térmica diferencial simultânea (TGA/DTGA-DTA)	40
4.4 Análise de adsorção e dessorção de nitrogênio (ASAP).	43
4.5 Seleção de fases extratoras	44
4.6 Otimização das condições de análise	45
4.7 Validação analítica do método PSI-MS.....	47
4.8 Linearidade	48
4.9 Limite de Detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	50
4.9.1 Exatidão, precisão e recuperação.....	51
4.9.2 Efeito Matriz.....	52
4.9.3 Aplicações em amostras reais de leite materno	53
5. Conclusões e perspectivas	54
6. Referências Bibliográficas.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural do Glifosato.	17
Figura 2. Esquema de funcionamento do espectrômetro de massas.....	19
Figura 3. Fonte de ionização por eletrospray (adaptado conforme NANOTECHNOLOGY SOLUTIONS, 2013).....	21
Figura 4. Estrutura do PSI.	22
Figura 5. Representação esquemática de funcionamento do psi-ms modificado de (LIU et al., 2010).....	22
Figura 6. Representação esquemática da síntese e reconhecimento dos polímeros molecularmente impressos.	24
Figura 7. Representação esquemática para do RAM-BSA.....	25
Figura 8. Fluxograma das etapas reacionais para obtenção da fase RAM-BSA.	27
Figura 9. Fluxograma das etapas reacionais para obtenção da fase RAM-GMA.....	28
Figura 10. Fluxograma das etapas reacionais para obtenção da fase MIP.	29
Figura 11. Aparato para a análise por PSI-MS.....	31
Figura 12. Espectros de FTIR obtido para os polímeros RAM-BSA e sua modificação RAM-BSA-APTES.	37
Figura 13. Espectros de FTIR obtido para os polímeros RAM-GMA e sua modificação RAM-GMA-APTES.....	37
Figura 14. Espectros de FTIR obtido para os polímeros MIP e MIP-APTES.	38
Figura 15. Micrografias da superfície do MIP (A), MIP-APTES (B), RAM-GMA (C) e RAM-BSA (D).	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
Figura 16. Comparação das micrografias do papel sem modificação (E e G) e da modificação com a fase RAM-BSA (F e H).	40
Figura 17. Curvas TGA/DTGA do MIP.....	41
Figura 18. Curvas TGA/DTGA do RAM-BSA.....	42
Figura 19. Curvas TGA/DTGA do RAM-GMA.	43
Figura 20. Avaliação da eficiência das fases extratoras imobilizadas ao papel cromatográfico para análise PSI-MS.....	45
Figura 21. Espectro de massas ESI(-) em modo SRM-168 referente ao Glifosato 1 µg mL ⁻¹	46
Figura 22. Espectro de massas PSI(-)MS/MS para solução Glifosato 10 µg mL ⁻¹	46

Figura 23. Espectro de fragmentação PSI(-)MS/MS para Glifosato 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	47
Figura 24. Espectro do Glifosato em modo SRM 168 - 150.	48
Figura 25. Curva de calibração em matriz leite materno.....	49
Figura 26. Linearidade em solução.....	53
Figura 27. Intercepto curvas de calibração LOD e LOQ.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Técnicas de preparo de amostras e análise empregadas para caracterização e quantificação de analitos em leite.....	18
Tabela 2. Condições de operação do espectrômetro de massas LTQ-XL.....	30
Tabela 3. Atribuição de bandas características presentes nos polímeros sintetizados. ..	36
Tabela 4. Área superficial, volume e diâmetro dos poros.	44
Tabela 5. Avaliação da eficiência das fases desenvolvidas frente a análise PSI-MS para a determinação de pesticidas em amostras de leite materno.	44
Tabela 6. Íon precursor do pesticida glifosato e sua estrutura de fragmentação.....	47
Tabela 7. Linearidade em matriz leite materno.	48
Tabela 8. Dados de regressão referente aos valores médios de intensidade.....	49
Tabela 9. Dados de ANOVA referente aos valores médios de intensidade.	49
Tabela 10. Exatidão, precisão interdias e recuperação para o método PSI-MS em fase RAM-BSA para Glifosato em leite materno.	52
Tabela 11. Teste-t aplicado aos valores dos coeficientes de correlação das curvas em solução e matriz.	52
Tabela 12. Concentrações de Glifosato determinadas em amostras de leite materno submetidas a análises PSI-MS empregando substrato de papel modificado com a fase RAM-BSA. A legislação brasileira não estabelece limites para o leite materno.	53
Tabela 13. Métodos de LC-MS para a detecção de pesticidas em matriz leite materno.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

AIBN – Azobisisobutironitrila

AM – Ácido metacrílico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APTES - (3-aminopropil) trietoxisilano

ASAP – Análise de adsorção e dessorção de nitrogênio

BSA – Albumina sérica bovina

CI – Ionização química

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EGDMA – Dimetacrilato de etilenoglicol

EI – Ionização por elétrons

EM – Espectrometria de massas

ESI – Ionização por *electrospray*

FTIR - Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

GMA - Glicidildimetacrilato

GC – Cromatografia gasosa

LC – Cromatografia líquida

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MeOH – Metanol

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

m/z – Razão massa sobre carga

MIP - Polímeros molecularmente impressos

MS/MS – Espectrometria de massas tandem

PBS – Tampão fosfato salino

PSI – Fonte de ionização ambiente *Paper Spray Ionization*

SPE – Extração em fase sólida

RAM - Materiais de acesso restrito

SRM – Monitoramento de reações selecionadas

SQR – Substância química de referência

TGA – Análise termogravimétrica

RESUMO

O aumento da produção agrícola no Brasil tem impulsionado o uso excessivo e indiscriminado de pesticidas. Esses costumam estar presentes mesmo que em níveis traços, nas mais diferentes matrizes ambientais e alimentares. Entretanto, considerando sua vasta disseminação e persistência nestes ambientes, aliada à exposição humana a esses resíduos, pode-se encontrá-los em diferentes fluidos biológicos, incluindo o leite materno. Dada a complexidade dessa matriz e os níveis baixos dos analitos presentes, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias com relação ao preparo de amostras, a fim de se obter a sensibilidade desejada. Uma das estratégias para superar este desafio encontra-se na espectrometria de massas ambiente empregando a técnica de ionização conhecida como *paper spray ionization* (PSI-MS). A técnica PSI-MS comumente utiliza um suporte de papel cromatográfico cortado de forma triangular para aplicação da amostra. Este substrato permite modificações químicas que podem resultar em um aumento da sensibilidade e seletividade dos métodos desejados. A modificação do papel empregando polímeros molecularmente impressos (MIPs) e os materiais de acesso restrito (RAM) são escolhas promissoras para melhorar a sensibilidade e seletividade das análises por PSI-MS. Os MIPs possibilitam uma extração altamente seletiva dos analitos desejados, enquanto os RAMs ajudam a eliminar os compostos endógenos da matriz que poderiam reduzir a sensibilidade analítica da abordagem PSI-MS. Assim, neste estudo foram sintetizadas e caracterizadas imobilizações de MIP e RAMs para avaliação destes como modificadores para o substrato de papel em PSI-MS aplicada à análise de pesticidas em amostras de leite materno. O MIP foi sintetizado utilizando como molécula molde o Glifosato, como monômero funcional o ácido metacrílico, o dimetacrilato de dietilenoglicol como agente entrecruzador, e a azobisisobutironitrila como iniciador radicalar, em reação por 24 horas a 60 °C em atmosfera de N₂. O RAM foi produzido pelo emprego de partículas de C-18, ao qual foi imobilizada superficialmente a albumina sérica bovina (BSA). Os polímeros desenvolvidos foram caracterizados por análise termogravimétrica/análise termogravimétrica derivada-análise térmica diferencial simultânea (TGA/DTGA-DTA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR). Os resultados apontaram que os materiais foram obtidos em concordância com o esperado. Após caracterização, os polímeros foram imobilizados na superfície do papel e submetidos à análise PSI-MS para determinação do pesticida Glifosato em amostras de leite materno. Dentre as fases modificadoras avaliadas, a maior sensibilidade analítica foi obtida empregando a fase RAM, sendo esta selecionada para os ensaios seguintes. O método PSI-MS desenvolvido apresentou linearidade na faixa de 50 a 600 µg mL⁻¹ com R² = 0,9915. As figuras de mérito: precisão, exatidão, recuperação e efeito matriz foram avaliadas para o método proposto, onde a precisão obtida variou entre 1,3 a 8,7 % e a recuperação na faixa 104,7 a 113,7%. Os resultados preliminares para determinação de Glifosato denotam que os polímeros sintetizados são promissores como modificadores para substratos PSI-MS, podendo ser usados na determinação seletiva do glifosato em estudo em leite materno. Foram avaliadas amostras de leite materno de pacientes voluntárias, nas quais foi detectada a presença de glifosato em níveis quantificáveis na faixa de trabalho em cinco amostras, sendo duas acima do limite de detecção (LOD) e uma abaixo. Em doze amostras, o analito não foi detectado. A metodologia RAM-PSI-MS desenvolvida mostrou-se uma alternativa promissora para a determinação de glifosato em amostras de leite materno.

Palavras-chave: glifosato, polímeros molecularmente impressos, material de acesso restrito, leite materno, amostra biológica, ionização ambiente

ABSTRACT

The increase in agricultural production in Brazil has driven the excessive and indiscriminate use of pesticides. These substances are often present, even at trace levels, in various environmental and food matrices. However, given their widespread dissemination and persistence in these environments, combined with human exposure to these residues, they can be detected in different biological fluids, including breast milk. Due to the complexity of this matrix and the low levels of analytes present, the development of strategies for sample preparation is necessary to achieve the desired sensitivity. One strategy to overcome this challenge lies in ambient mass spectrometry employing the ionization technique known as paper spray ionization (PSI-MS). The PSI-MS technique typically uses a triangularly cut chromatographic paper substrate for sample application. This substrate allows for chemical modifications that can enhance the sensitivity and selectivity of the desired methods. Modifying the paper using molecularly imprinted polymers (MIPs) and restricted access materials (RAMs) are promising choices to improve the sensitivity and selectivity of PSI-MS analyses. MIPs enable highly selective extraction of target analytes, while RAMs help eliminate endogenous matrix compounds that could reduce the analytical sensitivity of the PSI-MS approach. Thus, in this study, MIP and RAM immobilizations were synthesized and characterized to evaluate their use as modifiers for the paper substrate in PSI-MS applied to pesticide analysis in breast milk samples. The MIP was synthesized using glyphosate as the template molecule, methacrylic acid as the functional monomer, diethylene glycol dimethacrylate as the crosslinking agent, and azobisisobutyronitrile as the radical initiator, under reaction conditions of 24 hours at 60°C in a nitrogen atmosphere. The RAM was produced using C-18 particles, onto which bovine serum albumin (BSA) was immobilized on the surface. The polymers developed were characterized by thermogravimetric analysis/derivative thermogravimetric analysis-simultaneous differential thermal analysis (TGA/DTGA-DTA), scanning electron microscopy (SEM), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). The results confirmed that the materials were obtained as expected. After characterization, the polymers were immobilized on the paper surface and subjected to PSI-MS analysis for the determination of glyphosate in breast milk samples. Among the modifying phases evaluated, the highest analytical sensitivity was obtained using the RAM phase, which was selected for subsequent tests. The developed PSI-MS method exhibited linearity in the range of 50 to 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with $R^2 = 0.9915$. The method's figures of merit—precision, accuracy, recovery, and matrix effect—were evaluated. The precision ranged from 1.3% to 8.7%, and recovery ranged from 104.7% to 113.7%. Preliminary results for glyphosate determination indicated that the synthesized polymers are promising as modifiers for PSI-MS substrates, allowing the selective determination of glyphosate in breast milk. Breast milk samples from volunteer patients were analyzed, and glyphosate was detected at quantifiable levels within the working range in five samples, with two above the limit of detection (LOD) and one below. In twelve samples, the analyte was not detected. The developed RAM-PSI-MS methodology proved to be a promising alternative for glyphosate determination in breast milk samples.

Keywords: glyphosate, molecularly imprinted polymers, restricted-access material, breast milk, biological sample, ambient ionization

1. Introdução

1.1 Pesticidas

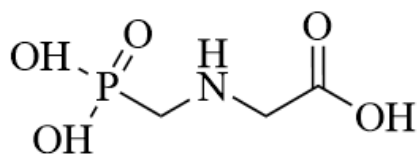
Os pesticidas/agrotóxicos são definidos como compostos orgânicos e inorgânicos utilizados nos setores agrícola e não agrícola, como em residências e empresas, para prevenir doenças ou combater organismos vivos que possam interferir na qualidade e no rendimento da produção (SIQUEIRA et al., 2013). O termo pesticida abrange os compostos que são utilizados contra alvos específicos, sendo esses: herbicidas (ação contra plantas invasoras), inseticidas (insetos), fungicidas (fungos) e outros vetores (BARONAS, 2019).

A legislação brasileira sobre agrotóxicos passou por importantes mudanças ao longo do tempo, começando com a Lei Federal 7.802/1989 e seu Decreto regulamentador 4.074/2002 (BRASIL, 1989), que tratavam do registro, embalagem, armazenamento e fiscalização. Atualmente, a legislação sobre os agrotóxicos no Brasil está sob o controle da lei federal 14.785/23 (BRASIL, 2023).

Assim, os órgãos responsáveis pelo registro, uso e controle no país são: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Ministério do Meio Ambiente (MMA); Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA); cabendo a ANVISA avaliar os impactos desses insumos sobre a saúde e o MAPA avaliar os riscos no meio ambiente (FRIEDRICH et al., 2021). Várias classes de pesticidas são amplamente utilizadas no Brasil, entretanto, destaca-se o Glifosato, que teve seu consumo mundial aumentado nos últimos anos (LEMES DE CAMPOS et al., 2021).

O Glifosato Figura 1, é um organofosforado de fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$, ($169,1 \text{ g mol}^{-1}$), que à temperatura ambiente se apresenta na forma de um sólido cristalino, solúvel em água (POSSIDÔNIO DE AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Foi desenvolvido pela MONSANTO, uma multinacional americana com sede no Brasil, comercialmente conhecido como *Roundup*, é o pesticida mais utilizado no mundo, sua toxicidade e exposição ainda causa controvérsias e merece maiores investigações (LOPES FIALHO et al., 2019).

Figura 1. Representação estrutural do Glifosato.



Fonte: Próprio Autor.

Sabendo do potencial de contaminação dos produtos de origem agrícola, a tendência mundial tem sido a formulação de legislações que possam monitorar esses compostos. Os pesticidas, como o glifosato, têm sido associados a uma série de efeitos tóxicos, como distúrbios hormonais, danos ao sistema nervoso e até mesmo efeitos carcinogênicos em exposições prolongadas. Embora os produtos de origem animal e vegetal sejam alvo de fiscalização quanto a resíduos de glifosato, fluidos biológicos como urina e leite materno têm sido explorados como matrizes alternativas para avaliar o nível de exposição individual a esse pesticida. O leite materno, devido à sua composição rica e complexa, pode refletir a exposição crônica do lactante a esses compostos, tornando-se uma matriz crucial para estudos de bioacumulação e toxicidade em populações vulneráveis.

O leite materno, reconhecido por sua importância nutricional para os recém-nascidos, mas também como um meio capaz de carrear contaminantes. (DE MEDEIROS et al., 2021a). O leite materno é composto por água, proteínas, lipídios e células de defesa, que auxiliam o nascituro em seu desenvolvimento físico e emocional (FIUZA;MORAIS, 2017). Por isso, é essencial um preparo eficiente das amostras para garantir a eficácia do método analítico selecionado. Entre as técnicas de preparo de amostras em matrizes biológicas como o leite materno, destacam-se a extração líquido-líquido (LLE), que permite a separação de pesticidas pela diferença de solubilidade em solventes orgânicos e aquosos, e a extração em fase sólida (SPE), amplamente utilizada pela sua eficiência na concentração e purificação de compostos-alvo. Outras abordagens incluem o uso de técnicas de microextração, como a microextração em fase líquida (LPME) e a microextração em fase sólida (SPME), que oferecem vantagens como redução no uso de solventes e alta sensibilidade analítica. Essas metodologias, associadas a sistemas de cromatografia e espectrometria de massas, têm contribuído para a detecção precisa de resíduos de pesticidas em concentrações extremamente baixas, conforme apontado por GUTIÉRREZ-MARTÍN et al. (2023). O desenvolvimento de métodos para matrizes

complexas exige um preparo de amostras específico. Na Tabela 1, são apresentados alguns exemplos desses procedimentos de preparo.

Tabela 1. Técnicas de preparo de amostras e análise empregadas para caracterização e quantificação de analitos em leite.

Analito	Técnica de preparo da amostra	LOQ	Técnica instrumental	Referências
Micotoxina	SPE	0,1 ng L ⁻¹	LC-MS/MS	(Braun et al., 2020)
Ésteres organofosforados	Online-SPE	0,67 ng L ⁻¹	HPLC-MS/MS	(Chen et al., 2022)
Carbamato	LLE	0,03 µg kg ⁻¹	UHPLC-MS/MS	(Morsi et al., 2024)
Pesticidas	QuEChERS	0,22 a 8,10 µg kg ⁻¹	LC-MS/MS	(Görel-Manav et al., 2020)
Bifenilas policloradas	HF-LPME	33 a 47 ng L ⁻¹	GC-µECD	(Villegas-Álvarez et al., 2020)
Compostos desreguladores endócrinos	SPE	6 a 40 ng kg ⁻¹	GC-MS/MS	(Palacios Colón et al., 2021)
Bifenilas policloradas	QuEChERS	0,15 a 0,55 ng mL ⁻¹	LC-Q-TOF-MS	(Chi et al., 2024)
Pesticidas	DLLME	3,1 a 13 ng mL ⁻¹	GC-FID	(Jouyban et al., 2020)
Progesterona	SPE	0,03 a 1 µg kg ⁻¹	HPLC QE HF HRMS	(Decheng et al., 2021)

Fonte: Próprio Autor.

LLE – *Liquid-Liquid Extraction (Extração Líquido-líquido).*

SPE – *Solid Phase Extraction (Extração em fase sólida).*

QuEChERS - *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and safe (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro).*

DLLME – *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (Microextração Líquido-Líquido Dispersiva).*

HF-LPME - *Hollow fiber supported liquid phase microextraction (Microextração em fase líquida suportada com fibra oca).*

HPLC QE HF HRMS – *Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-high field Orbitrap high-resolution mass spectrometry (Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência acoplada com Espectrometria de Massas de alta resolução Orbitrap de quadrupolo e campo alto)*

UHPLC – MS/MS – *Ultra-high-performance liquid chromatography – Mass Spectrometry (Cromatografia líquida de ultra eficiência com espectrometria de massas).*

GC-FID - *Gas chromatography with flame ionization detector (Cromatografia Gasosa com detector de chama).*

LC-Q-TOF-MS - *Liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Cromatografia Líquida acoplado a quadripolo com tempo de voo).*

1.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica que permite determinar o perfil químico e a composição elementar de uma amostra por meio da detecção e análise de íons gerados a partir de seus compostos. A quantificação é realizada comparando a intensidade dos sinais dos íons detectados com um padrão, estabelecendo uma correlação direta com a concentração dos compostos analisados. (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

No entanto, essa técnica tem se tornado cada vez mais comum devido à sua abrangência em diferentes classes de compostos e suas diversas aplicações, como nas áreas de química, biologia, perícia criminal, petroleômica, dentre outras (DASS C., 2007). Os compostos analisados por espectrometria de massa (EM) passam por um tratamento prévio para que se formem íons, os quais serão posteriormente analisados.

Segundo (DASS C., 2007) a análise por espectrometria de massas (EM) segue basicamente as seguintes etapas: a) a amostra é inserida, geralmente com uma seringa, manualmente ou com o auxílio de uma bomba injetora; este sistema pode ser combinado com equipamentos de cromatografia para uma separação prévia dos compostos; b) ionização dos compostos; c) passagem dos íons e sua discriminação no analisador de massas; d) detecção dos íons e conversão do sinal gerado em corrente elétrica; e) processamento dos dados e conversão do sinal em função da razão m/z , resultando em um espectro de massas a ser interpretado posteriormente.

Um esquema de funcionamento do espectrômetro de massas pode ser observado observando a Figura 2. Esquema de funcionamento do espectrômetro de massas.

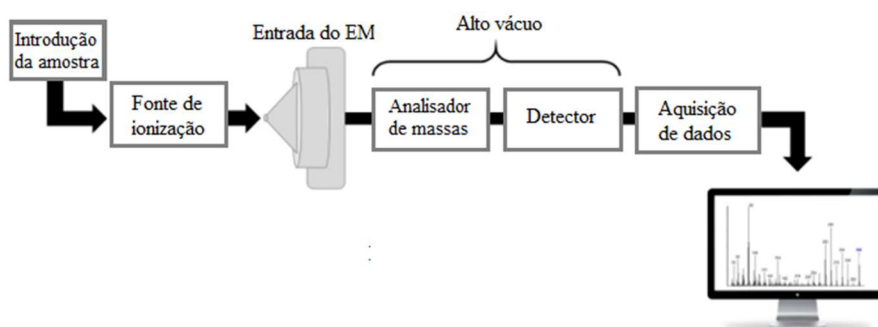
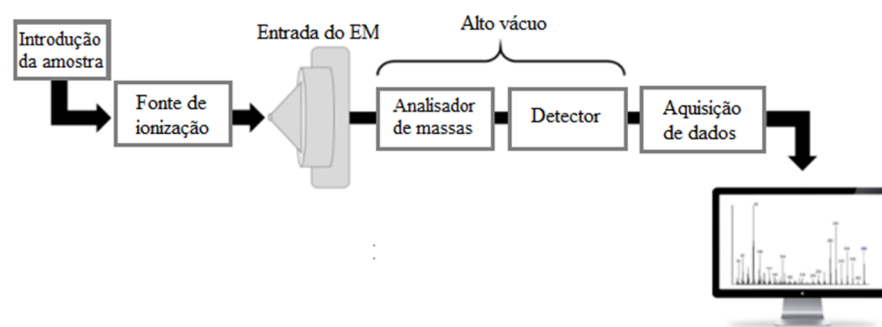


Figura 2. Esquema de funcionamento do espectrômetro de massas.



Fonte: Próprio Autor.

Conforme a Figura 2 o analisador de massas e o detector são mantidos sob alto vácuo para reduzir as colisões entre os íons gerados e as moléculas neutras. No entanto, com o desenvolvimento de sistemas que operam em condições de pressão atmosférica e ambiente, essa exigência já não se aplica ao sistema de ionização. A fonte de ionização é a etapa primordial e inicial da técnica.

1.3 Fontes de ionização

As primeiras fontes de ionização de acordo com (HOFFMANN e STROOBANT, 2007) eram limitadas a operar em alto vácuo e com à aplicação em compostos gasosos de baixa massa molecular, voláteis e termicamente estáveis. A ionização por elétrons (EI) e a ionização química (CI) utilizam bastante energia e provocam extensas fragmentações dificultando a visualização do sinal do íon molecular.

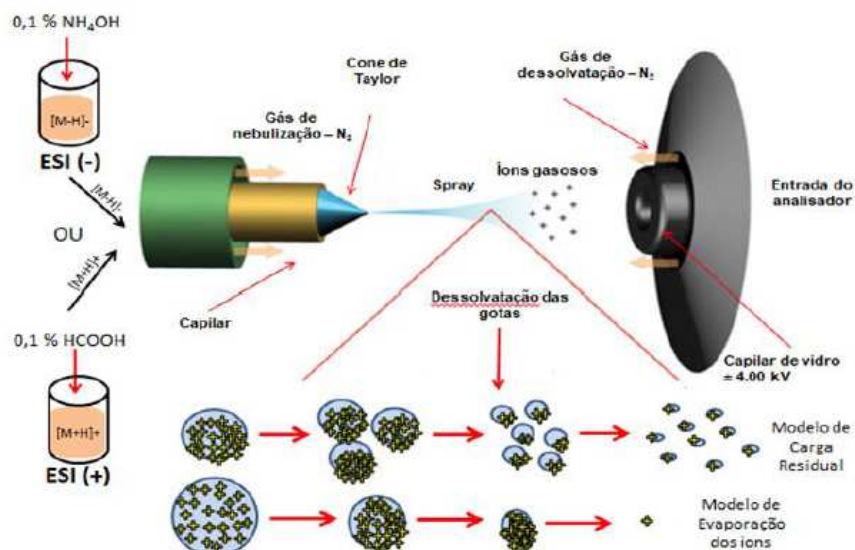
Com o desenvolvimento de novas fontes, como a ionização por *electrospray* (ESI) (PRABAKARAN et al., 2019) e a ionização por pressão atmosférica (API) (Filho et al., 2023), tornou-se possível analisar novas classes de moléculas, incluindo compostos polares e de alta massa molecular, que anteriormente enfrentavam dificuldades para serem introduzidos em condições de alto vácuo (FILHO et al., 2023).

A ionização por *electrospray* (ESI) conforme a Figura 3 também abriu caminho para o desenvolvimento de outras fontes, como a ionização química à pressão atmosférica (APCI) (DE O. SILVA et al., 2019), que opera com três mecanismos principais de ionização: a) ionização de Penning (M^+); b) transferência de prótons ($[M + H]^+$ ou $[M - H]^-$); e c) formação de adutos com o gás reagente ($[M + NH_4]^+$).

As técnicas de ionização/dessorção à pressão ambiente revolucionaram a espectrometria de massas, por apresentar pouco ou nenhum preparo de amostras. Dentre

as quais podemos destacar a análise direta em tempo real (DART) e a ionização por *electrospray* de dessorção (DESI) (PEREIRA et al., 2016).

Figura 3. Fonte de ionização por eletrospray (Adaptado conforme (NANOTECHNOLOGY SOLUTIONS, 2013))



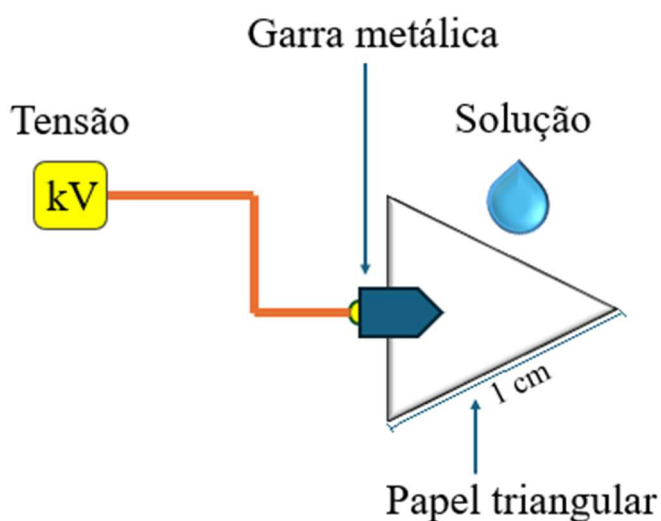
Fonte: Próprio Autor.

Outra fonte que tem se destacado é a ionização ambiente por *paper spray ionization* (PSI) (LIU et al., 2010) esta técnica tem ganhado destaque devido a facilidade por apresentar pouco ou nenhum preparo de amostras.

1.4 Ionização ambiente por *Paper-spray ionization* acoplada ao espectrômetro de massas (PSI-MS)

Desenvolvida por (LIU et al., 2010), a técnica de ionização ambiente para espectrometria de massas empregando *paper spray ionization* (*paper-spray ionization mass spectrometry* (PSI-MS) pode ser diretamente aplicada em um papel triangular (equilátero), em geral de 1 cm. O papel é fixado em uma garra metálica ligada à uma fonte de alta tensão e posicionado na entrada do espectrômetro de massas. Ao papel é então aplicado uma tensão que pode variar entre 2 e 4 kV e com auxílio de solvente de dessorção forma-se um spray contendo os íons, os quais são atraídos para o espectrômetro de massas devido a diferença de potencial existente entre a fonte de ionização e o espectrômetro de massas (SANTOS et al., 2022) conforme observado na Figura 4.

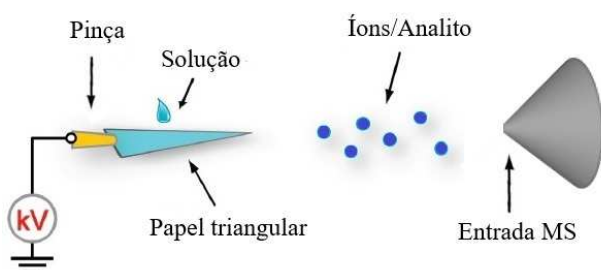
Figura 4. Estrutura do PSI.



Fonte: Próprio Autor.

Geralmente uma voltagem de (3-4 kV) é aplicada ao papel que contém a amostra previamente depositada e seca, utilizando um clipe condutor (tipo pinça). Posteriormente, a solução de dessorção é ajustada para ser ácida ou básica, dependendo do modo de ionização utilizado (DE O. SILVA et al., 2019) que consiste na ação capilar e à porosidade do papel, os íons se concentram na ponta em forma de *spray*, resultando na formação do cone de Taylor, como ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Representação esquemática de funcionamento do PSI-MS modificado de (LIU et al., 2010)



Fonte: Próprio Autor.

Desta maneira, a eficácia da técnica está intimamente relacionada ao tipo de material ou substrato empregado no processo de ionização. O papel tem sido o substrato mais comumente empregado nas análises PSI-MS. No entanto, o papel apresenta baixa seletividade e para alguns compostos pode até apresentar uma elevada adsorção o que dificulta a ionização destes compostos. Assim, o papel cromatográfico tem sido avaliado

frente às modificações superficiais a fim de aumentar a seletividade para a técnica PSI-MS. Estas modificações podem ocorrer aplicando diferentes materiais, entretanto têm-se destacado o uso dos polímeros molecularmente impressos (MIP) e os materiais de acesso restrito (RAM) por garantirem maior seletividade (DAMON et al., 2019).

1.5 Polímeros molecularmente impressos (MIP)

Os polímeros molecularmente impressos (MIPs) são desenvolvidos para replicar posições específicas da molécula molde (*template*), visando aprimorar sua seletividade. Seu funcionamento é baseado no modelo chave-fechadura, e eles são aplicados em diversas classes, como pesticidas, alimentos e drogas (SELLERGREEN;ALLENDER, 2005).

Diferentes rotas sintéticas são reportadas pela literatura, com a mais comum a aplicação de um monômero funcional, uma molécula molde (*template*), um reagente de entrecruzamento (cross-linker) e um agente de iniciação. Inicialmente, o processo de síntese do MIP ocorre pela formação de um agregado polimerizável que contém o monômero funcional e a molécula *template*. Posteriormente, na presença do reagente de entrecruzamento e do agente de iniciação, sob condições adequada como irradiação com luz UV, calor ou pressão, a rede polimérica é formada. Após essa etapa, o *template* é removido da matriz polimérica, resultando em uma estrutura que apresenta sítios de ligação seletivos para reconhecimento de ligações semelhantes às realizadas entre o polímero e o *template*, conforme ilustrado na Figura 6. Representação esquemática da síntese e reconhecimento dos polímeros molecularmente impressos.

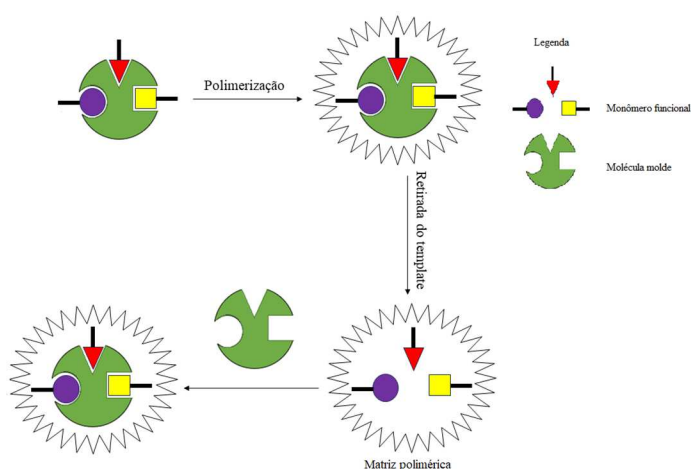
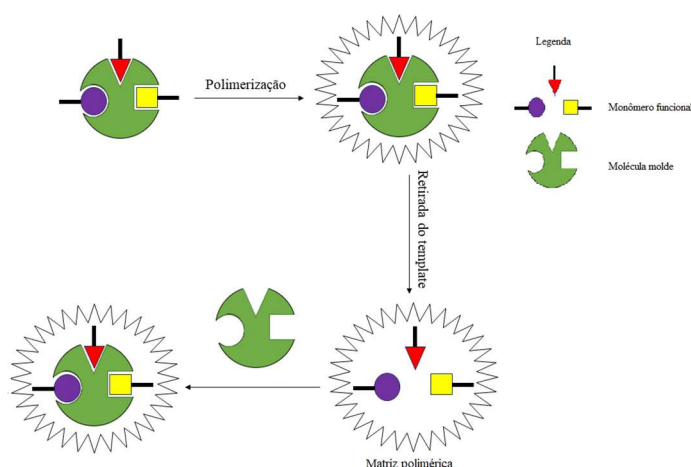


Figura 6. Representação esquemática da síntese e reconhecimento dos polímeros molecularmente impressos.



Fonte: Próprio Autor.

Os MIPs podem ser adequadamente sintetizados para o reconhecimento químico de uma molécula de interesse, variando em tamanhos e grupos funcionais (YANG et al., 2011). Modificações adicionais nos MIPs têm permitido expandir o alcance a diferentes classes de compostos e grupos específicos. Entre essas estruturas destacam-se os materiais de acesso restrito (RAM), que têm se mostrado promissores na identificação e reconhecimento de moléculas.

1.6 Materiais de acesso restrito (RAM)

Os materiais de acesso restrito (RAM) é uma classe de materiais sorventes que visam a remoção de macromoléculas, como é o caso das proteínas, que podem causar interferência na resposta analítica (WANG et al., 2019). Este material pode ser composto de sílica ou outros materiais comerciais como: fases hidrofóbicas de proteína imobilizada, fase reversa de superfície interna (ISRP, *Internal Surface Reversed-Phase*), superfícies semi-permeáveis (SPS, *Semi-Permeable Surface*), fases hidrofóbicas protegidas (SHP, *Shielded Hydrophobic Phases*) e suas modificações podem ainda incluir recombinação com MIP ou albumina sérica bovina (BSA) (DESILETS et al., 1991). O material RAM hidrofóbico com proteína imobilizada pode combinar os mecanismos de extração por barreira de exclusão e partição. Enquanto as macromoléculas interagem com a superfície hidrofóbica, os analitos de interesse reagem com a parte interna, conferindo seletividade ao material, conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7. Representação esquemática para do RAM-BSA.



Fonte: Adaptado de (MULLETT, 2007)

Assim, as modificações superficiais do papel cromatográfico por MIP e RAM apresentam se como promissora alternativa para aumentar a seletividade da técnica PSI-MS para determinação de pesticida glifosato em amostras de leite materno.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente estudo buscou o desenvolvimento e validação de metodologia para determinação do pesticida glifosato em amostras de leite materno através da técnica de PSI-MS. Para tanto foi avaliada a síntese e a modificação do substrato de papel cromatográfico com as fases MIP e RAM.

2.2 Objetivos específicos

Otimização das condições de análise por espectrometria de massas para o pesticida em estudo.

Síntese das fases MIP e RAM para modificação do substrato de papel cromatográfico.

Caracterização físico-química dos polímeros sintetizados.

Avaliação da eficiência dos polímeros sintetizados frente a modificação do substrato de papel cromatográfico para análises de glifosato em amostras de leite materno por PSI-MS.

Validação analítica do método analítico frente a legislação vigente.

Aplicação da metodologia em amostras de leite materno de doadoras voluntárias.

3. Materiais e métodos

3.1 Reagentes e padrões

Metanol, acetonitrila e 2-propanol grau HPLC foram adquiridos da J.T. Baker (Phillipsburg, USA). Fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico, azida de sódio e acetato de amônio foram adquiridos da Mallinckrodt (Cidade do México, México). Cloreto de potássio e glutaraldeído 50% foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro). Ácido metacrílico (AM), albumina sérica bovina (BSA), dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA), azobisisobutironitrila (AIBN), glicidil metacrilato (GMA), brometo de cobre I (CuBr) e cobre II (CuBr₂) e bipyridina foram adquiridos da Sigma Aldrich (Alemanha). Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi adquirido da LabSynth produtos para laboratório LTDA (São Paulo, Brasil). (3-Aminopropil)trietoxissilano (APTES), ácido fórmico, Glifosato e hidróxido de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, EUA. Cartucho de SPE C-18 foi adquirido da Supelco (São Paulo, Brasil). Papel cromatográfico 3mm 200x200, foi adquirido de Whatman (Whatman International Ltd., Maidstone, England). Água purificada por sistema Gehaka, apresentando condutividade 18,2 MΩ.

3.2 Amostras de leite

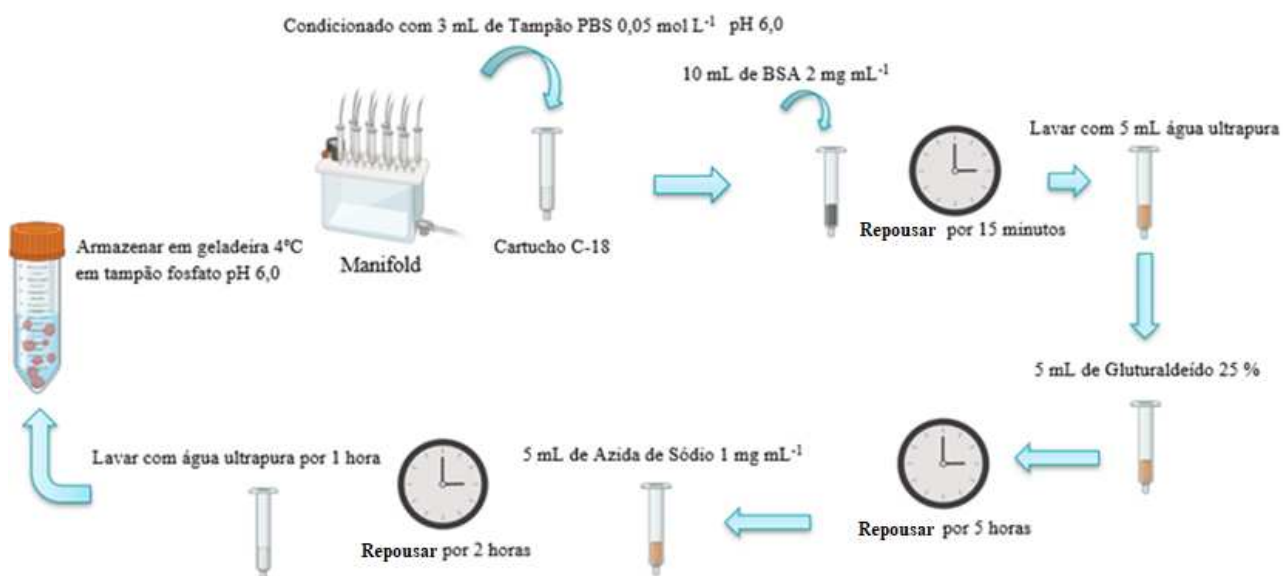
As amostras de leite materno foram cedidas pela Profa. Dra. Flaviana Vieira da Faculdade de Enfermagem da UFG de pacientes em estudo com livre consentimento segundo comitê de ética em pesquisa registrado na Plataforma Brasil sob o número de registro CAAE 40822620.0.0000.5078. As amostras foram mantidas congeladas a -20°C até o momento da análise, sendo analisada imediatamente após o descongelamento. Foram coletadas 59 amostras em maternidades públicas da cidade de Goiânia, Goiás, e no domicílio das participantes. Com os seguintes critérios de inclusão: residir na cidade do estudo; idade igual ou maior que 18 anos; ser passível de contato por telefone; estar no período pós-parto imediato; estar amamentando. Como critérios de exclusão foram adotados os seguintes parâmetros: neonatos com malformações congênitas, internação materna em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e neonatal em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN); mulheres com doenças crônicas: hipertensão, diabetes mellitus, distúrbios da tireoide, hepatites, asma, doença renal crônica e doenças cardiovasculares; mulheres em uso de medicamentos para auxílio do sono; mulheres com quadro de infecções agudas. Ao total foram analisadas 100 amostras.

3.3 Síntese da fase de acesso restrito com albumina sérica bovina (RAM-BSA)

A fase RAM-BSA foi sintetizada segundo protocolo descrito por Chaves e colaboradores (CHAVES et al., 2015).

A fase foi sintetizada empregando um cartucho SPE contendo fase extratora C-18, o qual foi condicionado com 3 mL de tampão PBS 0,05 mol L⁻¹, a pH 6,0. Em seguida, foi adicionado 10 mL de solução aquosa contendo albumina soro bovina (BSA) a uma concentração de 2 mg mL⁻¹ e deixado em repouso para contato por 15 minutos. Posteriormente, a fase foi lavada com 5 mL de água ultrapurificada, seguido pela adição de 5 mL de glutaraldeído a 25% e mantido em repouso nesta solução por 5 horas. Após esse período, 5 mL de azida de sódio a 1 mg mL⁻¹ foi eluída pela fase mantido em repouso com este reagente por 2 horas. Em seguida, foi lavado por 1 hora com água ultrapura e armazenado em tampão fosfato, pH 6,0, em geladeira (4°C).

Figura 8. Fluxograma das etapas reacionais para obtenção da fase RAM-BSA.



Fonte: Próprio Autor.

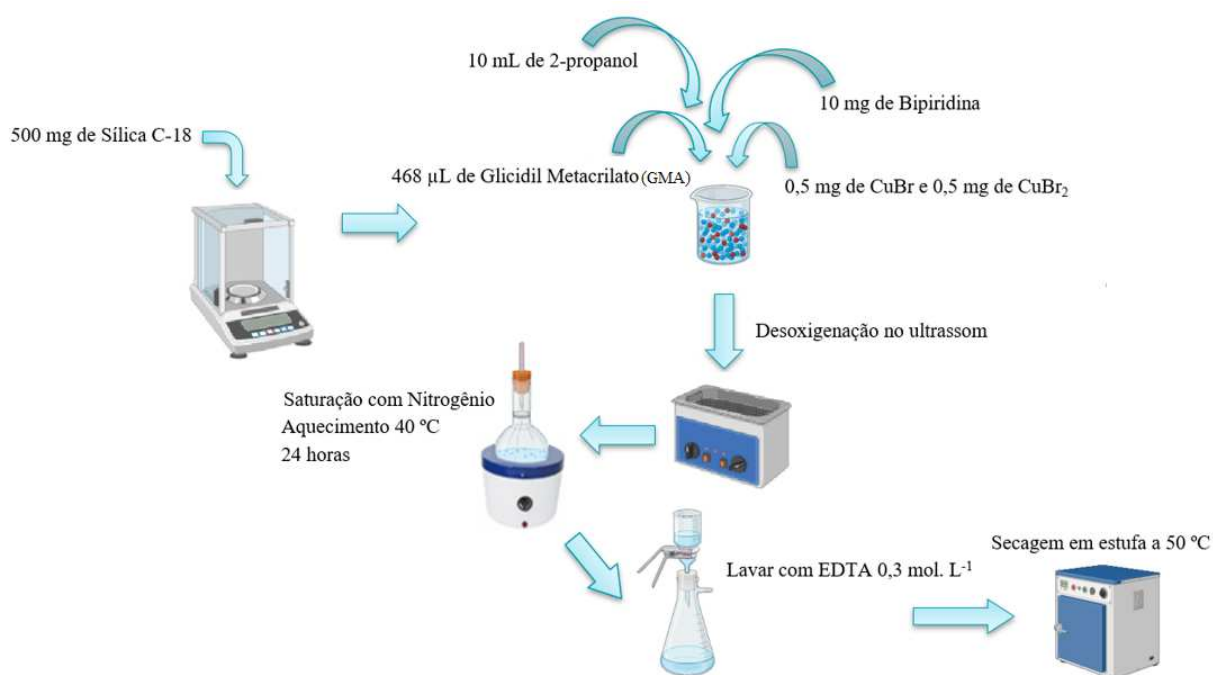
3.4 Síntese da fase de acesso restrito com glicidil metacrilato (RAM-GMA)

A fase RAM-GMA foi sintetizada a partir do protocolo descrito por Wang e colaboradores (WANG et al., 2014).

Para a fixação do glicidil metacrilato (GMA) na superfície da sílica modificada com C-18 e da sílica gel convencional, as reações foram conduzidas utilizando 0,5 g de

sílica (C-18 ou gel), 468 μL de GMA, 0,5 mg de CuBr, 0,5 mg de CuBr₂ e 10 mg de bipyridina, em 10 mL de 2-propanol como solvente. Em seguida, o sistema foi desoxigenado com o auxílio de ultrassom e saturado com gás inerte (nitrogênio), a reação foi realizada à 40 °C por 24 horas sob agitação suave. Após a reação, a fase sintetizada foi lavada com 20 mL de uma solução 0,3 mol L⁻¹ de EDTA para remover resíduos de íons Cu⁺ e Cu²⁺. O protocolo de síntese é sumarizado no fluxograma apresentado na Figura 9.

Figura 9. Fluxograma das etapas reacionais para obtenção da fase RAM-GMA.



Fonte: Próprio Autor.

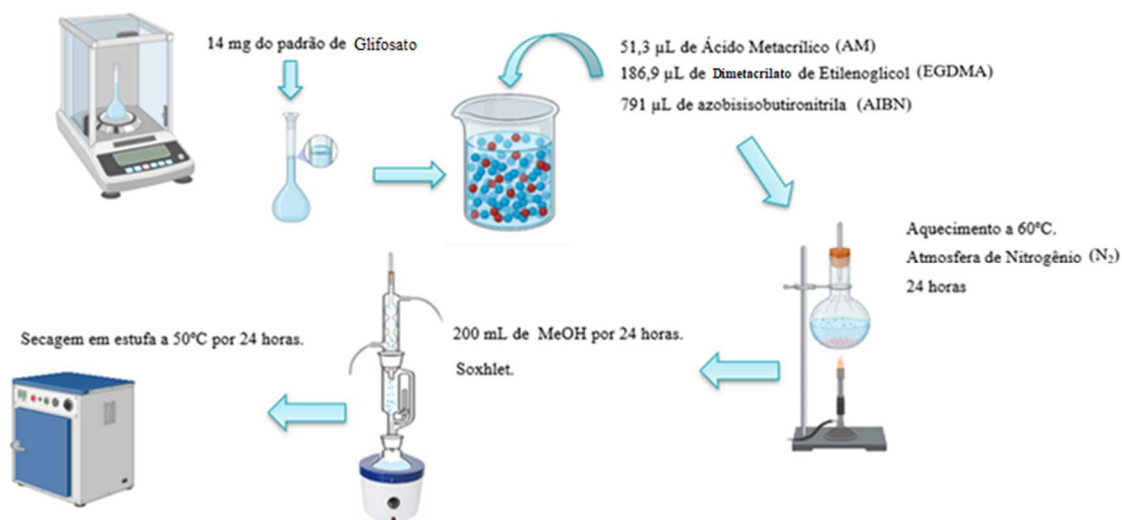
3.5 Síntese de polímero molecularmente impresso (MIP)

A síntese do MIP foi adaptada a partir da proposta de Martins e colaboradores (MARTINS et al., 2020).

Para tanto, foi adicionado 14,0 mg do padrão analítico de Glifosato (template) em um balão de 10,0 mL sendo solubilizado com água ultrapura, em seguida adicionou-se 51,3 μL de ácido metacrílico (AM) e 186,9 μL de dimecrilato de etilenoglicol (EGDMA) funcionando como agente entrecruzador e 791,0 μL de azobisisobutironitrila (AIBN) como iniciador radicalar, o sistema foi aquecido a 60°C em atmosfera de nitrogênio por 24 horas e em seguida lavado em soxhlet com 200,0 mL de metanol por 24 horas para a

retirada do *template*. Posteriormente, foi seco em estufa à 50°C também por 24 horas. Após secagem foi empregado como substrato nas análises PSI-MS. Este processo é representado no fluxograma da Figura 10.

Figura 10. Fluxograma das etapas reacionais para obtenção da fase MIP.



Fonte: Próprio Autor.

3.6 Imobilização das fases MIP e RAM no papel cromatográfico

Os papéis foram submetidos à imersão em uma solução de metanol (MeOH) contendo 5% (m/m) do polímero a ser fixado (MIP, RAM-GMA ou RAM-BSA) e 3% (m/m) de APTES em MeOH, permanecendo nessa condição por 24 horas. Após a imersão, os papéis foram lavados com 1 mL de MeOH e deixados para secar à temperatura ambiente. Para a fixação específica da fase RAM-BSA no substrato de papel, seguiu-se o protocolo descrito por FERNANDES et al. (2020), que recomenda a imersão dos papéis em uma solução metanólica contendo 5% (m/v) da fase sintetizada e 3% (m/v) de APTES. Após a secagem da solução metanólica em condições ambientes (22°C), os papéis foram mantidos em repouso e posteriormente secados em estufa a 50°C, concluindo a imobilização da fase RAM-BSA no papel. Após este processo, os papéis estavam prontos para uso.

3.7 Caracterização físico-química dos polímeros sintetizados

Todos os materiais sintetizados foram caracterizados por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), o equipamento utilizado foi o Spectrum Frontier da Perkin Elmer com resolução de 4 cm⁻¹

na faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . A estrutura morfológica dos polímeros foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura, Jeol, JSM 6610, Thermoscientific NSS Spectral Imaging. A porosidade dos polímeros analisada por adsorção e dessorção de nitrogênio, usando o aparelho de adsorção física Micromeritics, modelo ASAP-2010, o cálculo da área superficial específica foi determinada pela equação de BET (Brunauer-Emmett-Teller) e o volume total de poros, o diâmetro médio dos poros e a distribuição de tamanho de poros foram obtidos pelo método BJH (Barrett-Joyner-Halenda). As análises de FTIR e de adsorção e dessorção de nitrogênio foram realizadas pela Central Analítica Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. As análises de MEV foram realizadas pelo Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), presente no Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás.

3.8 Análises PSI-MS

Para as análises PSI-MS foi utilizado o espectrômetro de massas LTQ-XL (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). Os parâmetros relativos à análise do analito glifosato foram inicialmente otimizadas empregando a fonte de ionização por *electrospray* no modo negativo ESI (-) na faixa de massa/carga variando de 100 a 1000 Da, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Condições de operação do espectrômetro de massas LTQ-XL.

Parâmetros	Perfil
Modo de ionização	Negativo
Tensão no spray	3,5 kV
Tensão do capilar	- 23 V
Voltagem S-lens	- 42 V
Temperatura do capilar	275 °C

Fonte: Próprio Autor.

Após a otimização dos parâmetros para melhor determinação dos analitos por espectrometria de massas, a fonte de ionização por *electrospray ionization* (ESI) foi substituída pelo aparato necessário para ionização por PSI, conforme ilustrado na Figura 11. As variáveis PSI-MS foram otimizadas, sendo zerados os gases de secagem, auxiliar e contra corrente, sendo os parâmetros obtidos apresentados na Tabela 2.

Figura 11. Aparato para a análise por PSI-MS.



Fonte: Próprio Autor.

3.9 Preparo das amostras de Leite

O leite materno é extremamente nutritivo, contendo proteínas, gorduras, aminoácidos e células imunológicas (FIUZA; MORAIS, 2017). Por isso, o tratamento adequado das amostras é essencial para prevenir contaminações, evitar danos irreversíveis ao sistema analítico e minimizar o efeito de supressão do sinal do analito em estudo por espectrometria de massas. Nesse contexto, realizou-se uma precipitação proteica com solvente nas amostras de leite, utilizando acetonitrila (ACN) em baixa temperatura (10°C) na proporção 1:2 v/v (ACN:leite). Em um tubo Eppendorf de 2 mL, foram adicionados 1,3 mL de leite e 700 µL de ACN, agitados por 30 segundos em um vórtex e centrifugados a 1500 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, 900 µL do sobrenadante foram transferidos, e 100 µL de uma solução padrão de glifosato (10 mg mL⁻¹) foram adicionados. Por fim, a amostra foi submetida ao PSI-MS para análise após a secagem.

3.9.1 Avaliação das fases extratoras

A avaliação das fases extratoras que recobriram o papel cromatográfico, foi realizada considerando a intensidade de íons extraídos, para cada uma das três modificações propostas neste estudo: RAM-BSA, RAM-GMA e MIP.

3.9.2 Validação analítica

A validação analítica do método proposto foi realizada segundo normativa prevista pelo órgão regulatório do Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da RDC nº 166 de 25 de julho de 2017 . A curva de calibração segundo a ANVISA deve incluir, no mínimo, seis pontos de concentração, com cada ponto medido em triplicata. Os testes de validação mais comuns são: Linearidade, seletividade, precisão e exatidão, recuperação, efeito matriz, entre outros.

3.9.3 Linearidade

A linearidade em um método analítico é caracterizada pela capacidade de gerar respostas proporcionais às diferentes concentrações do analito presentes em uma amostra (BRASIL, 2017). Recomenda-se o uso de pelo menos cinco concentrações diferentes, analisadas no mínimo em triplicata. A análise dos resultados deve incluir parâmetros mínimos previstos pela legislação, como a avaliação do coeficiente de correlação linear (r) e do coeficiente de determinação (r^2).

Essencialmente, a legislação estabelece que o coeficiente de correlação deve ser igual ou superior a 0,990, com um nível de significância estatística de 5% e um coeficiente angular distinto de zero.

Segundo (LEITE, 2008) o coeficiente de correlação pode ser calculado de acordo com a Equação 1.

$$R = \frac{n \sum x_1 y_1 - \sum x_1 \sum y_1}{\sqrt{n \sum x_1^2 - (\sum x_1)^2} \sqrt{n \sum y_1^2 - (\sum y_1)^2}} \quad \text{Equação 1}$$

Nos métodos analíticos, frequentemente correlacionamos as respostas dos detectores com as concentrações do analito nas amostras utilizando uma relação de primeira ordem, que é linear. Essa correlação é expressa pela equação de regressão linear $y = ax + b$, onde 'a' representa a inclinação da reta, e 'b' indica o ponto em que a curva intercepta o eixo y (PENG; CHIOU, 1990).

O coeficiente de correção ao quadrado, também conhecido como coeficiente de determinação ou " r^2 ", varia entre 0 e 1. Conforme mencionado anteriormente, o valor aceito pela legislação é 0,990.

3.9.4 Precisão e exatidão

De acordo com a legislação vigente, a precisão refere-se à proximidade entre os dados obtidos e a exatidão, que é definida como o grau de concordância desses dados. A precisão pode ser avaliada entre diferentes dias (interdias) ou dentro do mesmo dia (intradias) para garantir a conformidade das análises realizadas. Além disso, a precisão pode ser verificada por diferentes analistas. O cálculo da precisão é realizado de acordo com a Equação 2.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação - 2}$$

Onde:

DPR = Desvio Padrão Relativo

DP = Desvio Padrão

CMD = Concentração Média Determinada

Entre os critérios de determinação de repetibilidade, a utilização de 9 determinações, contemplando a determinação de linearidade do método, com 3 níveis de concentração, baixa, média e alta, em triplicata para cada nível ou 6 réplicas a 100% da concentração.

A exatidão reflete a concordância entre os valores encontrados e os valores reais. Ela pode ser calculada com base em pelo menos 9 determinações realizadas em 3 níveis diferentes: baixo, médio e alto, sendo cada nível analisado em triplicata. O resultado é expresso como a taxa de recuperação do analito adicionado à matriz, determinada pela relação entre a concentração real e a concentração teórica (LANÇAS, 2004). O cálculo da exatidão pode ser realizado com a Equação 3.

$$E (\%) = \frac{CME}{CT} \times 100 \quad \text{Equação - 3}$$

Onde:

CME = Concentração Média Experimental

CT = Concentração Teórica

3.9.5 Limite de detecção (LOD)

Segundo (ANVISA., 2017) o limite de detecção é definido como a menor quantidade de analito que pode ser detectada na amostra, não necessariamente devendo ser quantificada. O limite de detecção (LOD) é calculado pelo produto 3,3 pelo desvio padrão (σ), que pode ser calculado de três maneiras, dividido pela inclinação da curva de calibração (IC) . Seu cálculo é demonstrado pela Equação 4.

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \sigma}{\text{IC}} \quad \text{Equação - 4}$$

Onde:

LOD = Limite de Detecção

σ = Desvio Padrão

IC = Inclinação da Curva de Calibração

De acordo com a (ANVISA., 2017) as três maneiras de se obter o desvio padrão, são:

“I - A partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção;

II – A partir do desvio padrão residual da linha de regressão;

III - A partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco.”

3.9.6 Limite de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação (LOQ) pode ser definido como o menor valor de concentração detectável com precisão e exatidão de acordo com a legislação vigente (ANVISA., 2017). Devendo ser calculada através do produto fator 10 pelo desvio padrão, dividido pela inclinação da curva de calibração. Seu cálculo segue a Equação 5.

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \sigma}{\text{IC}} \quad \text{Equação - 5}$$

Onde:

LOQ = Limite de Quantificação

σ = Desvio Padrão

IC = Inclinação da Curva de Calibração

Assim como no LOD o valor de desvio padrão pode ser calculado de três maneiras possíveis, segundo a legislação vigente:

“I – A partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção;

II – A partir do desvio padrão residual da linha de regressão;

III – A partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco.”

3.9.7 Efeito matriz

O mérito efeito matriz deverá ser avaliado quando houver a análise em amostras complexas (ANVISA., 2017). Seu valor será determinado através da comparação entre os coeficientes angulares das retas geradas pela substância química de referência (SQR) em solvente e pela fortificação da (SQR) com o analito. A avaliação da interferência pela matriz será calculada por teste estatístico com intervalo de confiança em 5%.

4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização físico-química dos polímeros sintetizados

A caracterização de grupos funcionais presentes na estrutura química é essencial para compreensão de novos materiais desenvolvidos. Para tanto, a técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é aplicada rotineiramente, pois permite que haja a avaliação da presença de determinados grupos químicos presentes no material. Assim, os polímeros sintetizados foram submetidos a análise por FTIR e os valores das bandas observadas estão apresentados na Tabela 3, e nas Figuras Figura 12 a Figura 14.

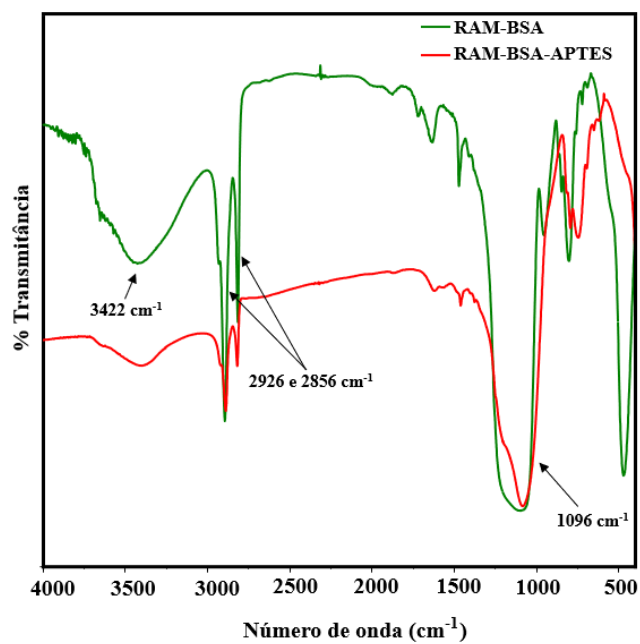
Tabela 3. Atribuição de bandas características presentes nos polímeros sintetizados.

Grupos	Bandas	Polímero
(O-H)	3422 cm^{-1} ; 3500 cm^{-1}	Todas as imobilizações.
(C-H)	2989 cm^{-1} e 2957 cm^{-1}	RAM-BSA, MIP e imobilizações.
(C-O)	1096 cm^{-1} ; 1257 cm^{-1}	RAM-BSA, MIP e imobilizações.
(C=O)	1725 cm^{-1}	MIP e imobilização.
(C-O-C)	1160 cm^{-1}	MIP
(N-H)	1640 cm^{-1}	MIP e imobilização.

Fonte: Próprio Autor.

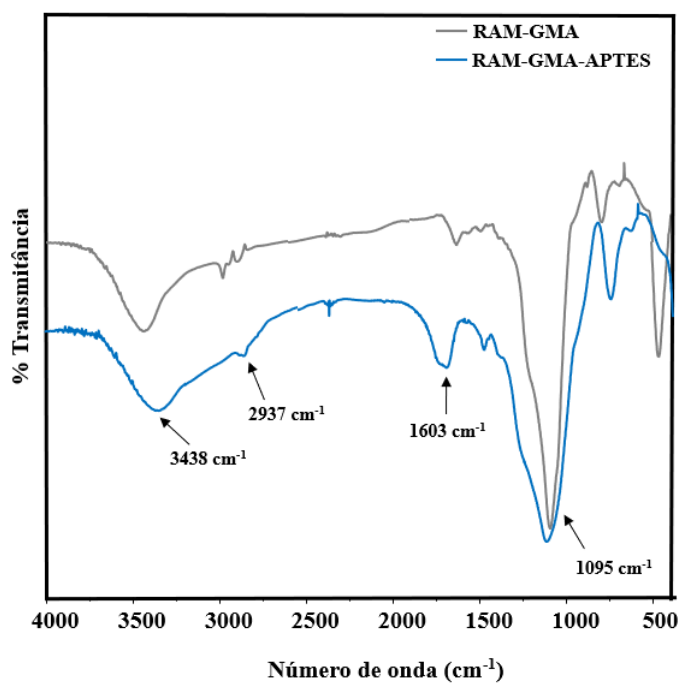
Observando a Figura 12, é apresentada a comparação entre a fase RAM-BSA e sua imobilização RAM-BSA-APTES, com a demonstração das bandas e grupos funcionais característicos desses materiais. A partir dessa análise, podemos concluir que algumas bandas estão presentes em mais de um polímero. Por exemplo, a fase RAM-BSA apresenta bandas semelhantes à fase MIP, como o grupo (O-H) em aproximadamente 3500 cm^{-1} . Observa-se também uma supressão de sinal e o alargamento do pico em 1096 cm^{-1} . De acordo com a literatura especializada (PAVIA et al., 2010), este estiramento está relacionado ao grupo (C-O) e pode ser explicado pelo tamanho da estrutura e pelo tipo de síntese realizada.

Figura 12. Espectros de FTIR obtido para os polímeros RAM-BSA e sua imobilização RAM-BSA-APTES.



Fonte: Próprio Autor.

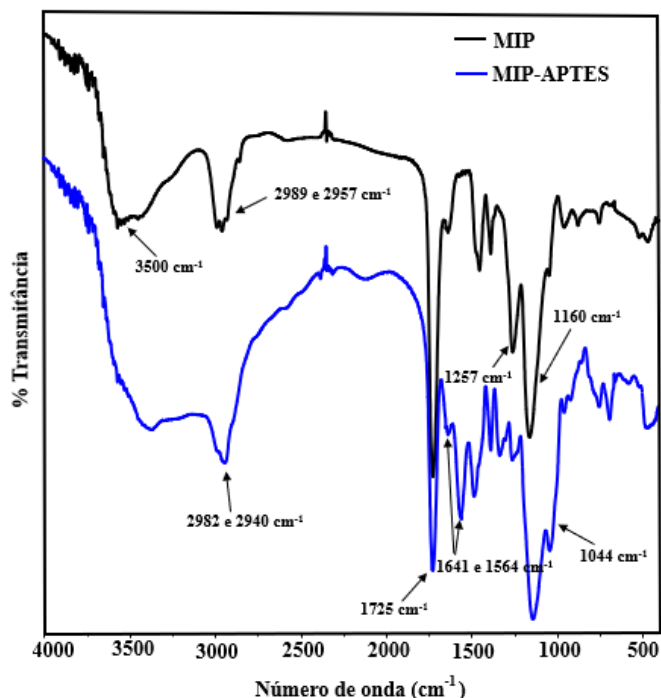
Figura 13. Espectros de FTIR obtido para os polímeros RAM-GMA e sua imobilização RAM-GMA-APTES.



Fonte: Próprio Autor.

A Figura 13 segue características semelhantes com estiramentos comuns nesta imobilização, como a presença do grupo (O-H), (C-H) e (C-O)

Figura 14. Espectros de FTIR obtido para os polímeros MIP e MIP-APTES.



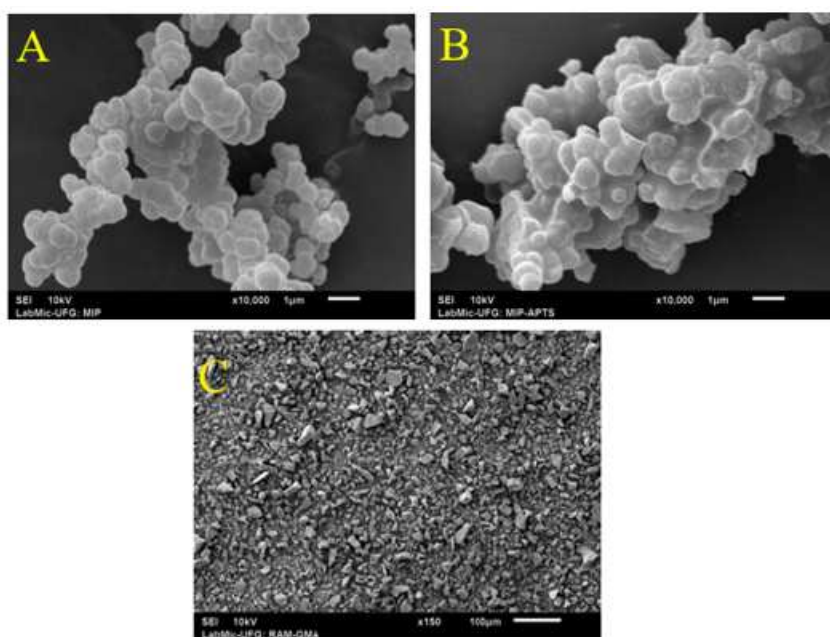
Fonte: Próprio Autor.

Conforme apresentado na Figura 14, os espectros FTIR para o polímero MIP e sua imobilização MIP-APTES é possível verificar a presença de uma banda em 3500 cm^{-1} característica do grupo (O-H) e também pode ser observado no polímero modificado. O APTES foi utilizado para a imobilização da fase MIP particulada no papel, tendo como alongamento típico o grupamento amina (NH_2) pela absorção da radiação no comprimento de onda 1641 a 1564 cm^{-1} e ainda o estiramento em 1044 cm^{-1} característica das bandas de (C-O-C) conforme observado na Figura 14. O MIP e sua imobilização utilizaram o EGDMA como agente entrecruzador (*crosslinker*), e as bandas 1725 , 1257 e 1160 cm^{-1} são características dos grupos (C-O) (C=O) e (C-O-C) podendo também ser observadas as bandas relacionadas aos estiramentos (C-H) em 2989 e 2957 cm^{-1} (FOGUEL et al., 2017).

4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Conforme observado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, a micrografia das fases MIP e RAM e suas imobilizações apresentam morfologia característica destes materiais. As modificações na superfície do papel cromatográfico visam uma melhor seletividade para aplicações de quantificação ou identificação de compostos, para análises PSI-MS podendo ser inseridos grupos funcionais específicos ou alteração no tamanho e volume dos poros.

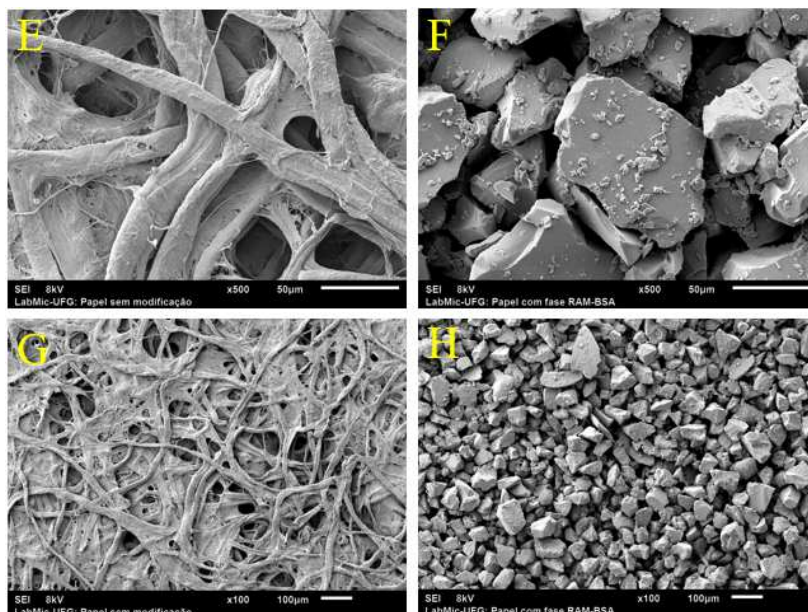
Figura 15. Micrografias da superfície do MIP (A), MIP-APTES (B), RAM-GMA (C).



Fonte: Próprio Autor.

Podemos verificar os efeitos na morfologia dos polímeros RAM-BSA-APTES quando submetidos à etapa de imobilização do papel cromatográfico, conforme exibido na Figura 16. Os polímeros sintetizados podem conferir uma maior seletividade na determinação de compostos específicos, permitindo uma análise mais precisa e com maior sensibilidade para os analitos presentes na amostra. Segundo a Figuras 16 (F) e (H) é evidenciada a modificação morfológica do papel submetido ao processo de imobilização da fase RAM-BSA por APTES. As imagens da Figura 16 nos permite inferir não somente o sucesso no processo de imobilização, mas também como a possível eficiência do substrato na técnica PSI-MS está relacionado ao polímero empregado, uma vez que o mesmo se encontra totalmente recoberto.

Figura 16. Comparação das micrografias do papel sem imobilização (E e G) e da imobilização com a fase RAM-BSA (F e H).



Fonte: Próprio Autor.

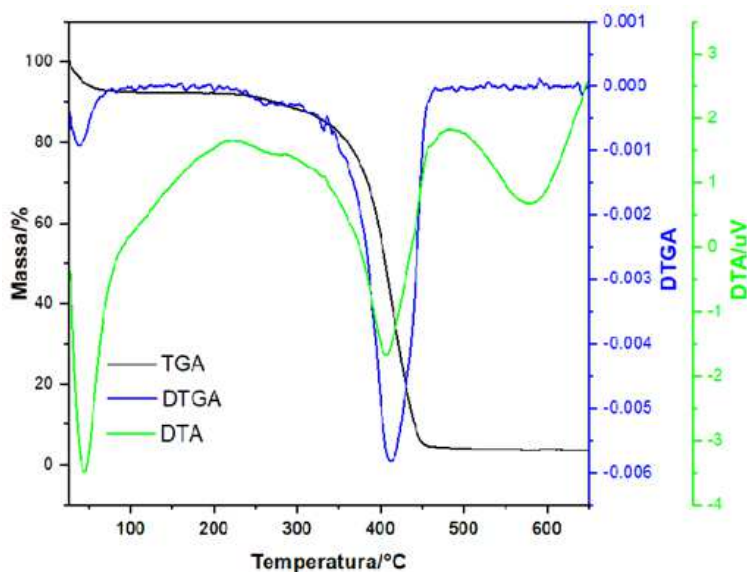
O papel imobilizado com a fase RAM-BSA demonstrou melhor resposta analítica, para o método proposto, como será apresentado adiante, justificando o porquê da não adição das demais fases ao teste de microscopia eletrônica de varredura.

4.3 Análise termogravimétrica/análise termogravimétrica derivada-análise térmica diferencial simultânea (TGA/DTGA-DTA)

Os polímeros sintetizados foram submetidos à análises termogravimétricas. As curvas TGA/DTGA-DTA estão apresentadas na Figura 17. O MIP apresentou pelo menos duas etapas de perda de massa consecutivas com $\Delta_{mTGA} = 95,80\%$ até $482\text{ }^{\circ}\text{C}$ nas curvas TGA/DTGA. A primeira etapa de perda de massa na curva TGA ocorreu entre $26\text{-}221\text{ }^{\circ}\text{C}$ com $\Delta_{mTGA} = 8,05\%$. Já, a segunda etapa de perda de massa na curva TGA ocorreu entre $221\text{-}482\text{ }^{\circ}\text{C}$ com $\Delta_{mTGA} = 87,75\%$. Na curva DTGA foi observado dois picos em $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $413\text{ }^{\circ}\text{C}$, isso confirma a sugestão das duas etapas de perdas de massa na curva TGA. Ainda, foram evidenciados três picos endotérmicos em $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, $407\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $578\text{ }^{\circ}\text{C}$ na curva DTA, sendo o primeiro evento térmico atribuído a desidratação térmica e os demais eventos térmicos foram atribuídos à decomposição térmica. Os resultados de TGA/DTGA-DTA indicaram que o MIP apresentou-se hidratado no estado sólido e na forma anidra possui estabilidade térmica até $221\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vale ressaltar que não foi visualizada a decomposição completa do MIP por TGA/DTGA-DTA nas condições

empregadas para a análise. Embora, podemos observar uma pequena $\Delta_{mTGA} = 0,76\%$ entre 482-650 °C na curva TGA. A Figura 17 indica o início de uma provável terceira etapa, essa sugestão da terceira etapa não pode ser confirmada devido a temperatura de aquecimento que foi até 650 °C, e neste intervalo de temperatura a perda de massa foi constante na curva TGA e isto não permitiu visualizar alguma alteração na curva DTG.

Figura 17. Curvas TGA/DTGA do MIP.

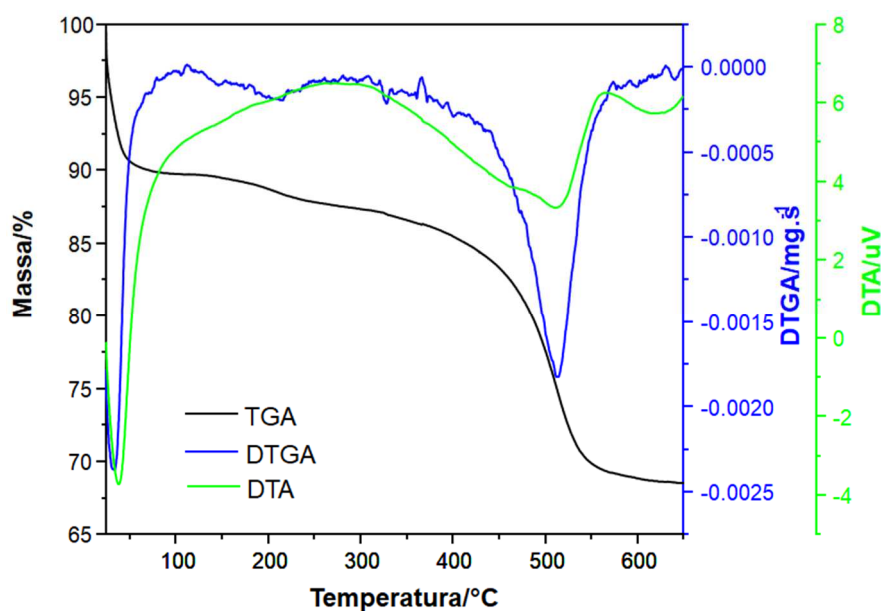


Fonte: Próprio Autor.

O perfil térmico do RAM-BSA por TGA/DTGA-DTA encontra-se na Figura 18. Nas curvas TGA/DTGA foram visualizadas três etapas de perda de massa para o RAM-BSA com $\Delta_{mTGA} = 31,49\%$ até 650 °C. A primeira e segunda etapas de perda de massa na curva TGA ocorreram entre 25-112 °C e 112-282 °C com $\Delta_{mTGA} = 10,32\%$ e 2,19% totalizando 12,51%, já a terceira etapa de perda de massa na curva TGA foi observada entre 282-650 °C com $\Delta_{mTGA} = 87,49\%$. A curva DTGA apresentou três picos em 32 °C, 215 °C e 513 °C que confirmaram a sugestão das etapas de perda de massa na curva TGA. Percebe-se que o RAM-BSA apresentou pelo menos três etapas de perda de massa nas curvas TGA/DTGA quando analisado até 650 °C, sendo que não foi observado a decomposição térmica completa em decorrência provavelmente das condições empregadas na análise. Ainda, na curva DTA foi evidenciado um pico endotérmico em 38 °C que foi atribuído ao evento de desidratação térmica e ao processo de desnaturação que na ocasião existe a possibilidade de liberar o gás sulfídrico, ressalta-se que este evento térmico se encontra no intervalo de temperatura da primeira e segunda etapas de perda de massa evidenciados nas curvas TGA/DTGA, isto indica que houve a sobreposição destes

eventos térmicos na curva DTA. O outro pico endotérmico em 510 °C e o início de um evento térmico a partir de 564 °C visualizados na curva DTA foram atribuídos a decomposição térmica. A sugestão de desnaturação é devido a amostra conter a proteína BSA imobilizada, pois sabe-se que as proteínas quando submetidas ao calor podem sofrer modificações na estrutura terciária ocasionando na desnaturação e na reorganização de sua estrutura (DE QUEIROZ LAFETA et al., 2022). Diante disso, os resultados de TGA/DTGA-DTA indicaram que o RAM-BSA se apresentou hidratado no estado sólido e estabilidade térmica até 38 °C. Esta temperatura foi delimitada devido ser a temperatura de pico do evento térmico e em consequência da presença da proteína BSA que ocasiona a desnaturação por calor.

Figura 18. Curvas TGA/DTGA do RAM-BSA.

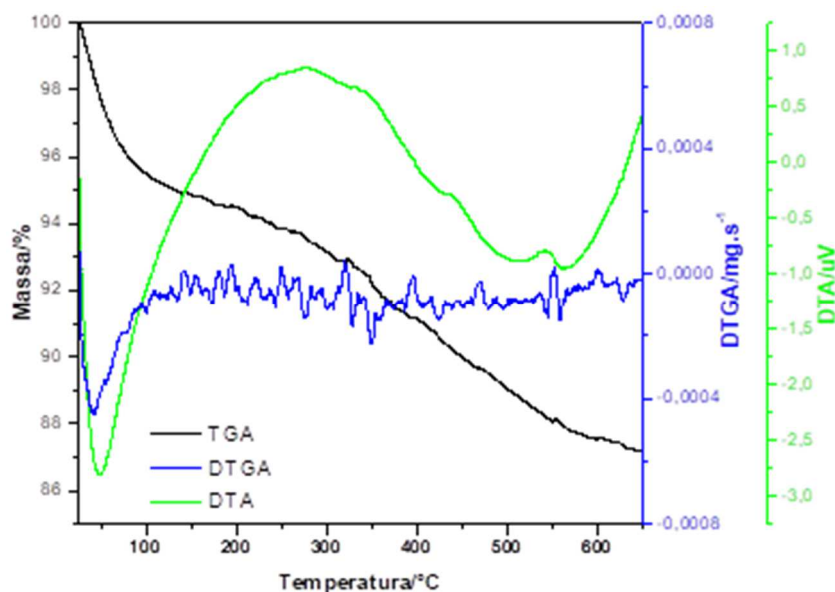


Fonte: Próprio Autor.

As curvas TGA/DTGA-DTA do RAM-GMA estão apresentadas na Figura 19. No RAM-GMA foi constatado pelo menos duas etapas de perdas de massa nas curvas TGA/DTGA com $\Delta_{mTGA} = 12,82\%$ até 650 °C. Em que a primeira etapa de perda de massa na curva TGA ocorreu entre 25-141 °C com $\Delta_{mTGA} = 5,11\%$ e a segunda etapa entre 141-650 °C com $\Delta_{mTGA} = 7,71\%$. Na curva DTGA foi evidenciado um pico em 42 °C concernente a primeira etapa de perda de massa. Destaca-se que nenhum pico foi visualizado na curva DTGA no intervalo de temperatura entre 141-650 °C devido a perda de massa ser constante, embora foi constatado uma pequena variação de massa na curva TGA. Além disso, na curva DTA foi visualizado o pico endotérmico em 47 °C que foi

atribuído a desidratação térmica e entre 277-650 °C foi notado a sobreposição dos eventos térmicos que foram atribuídos a decomposição térmica. Os dados termo analíticos indicaram que o RAM-GMA se apresentou hidratado no estado sólido e a estabilidade térmica até 141°C na forma anidra.

Figura 19. Curvas TGA/DTGA do RAM-GMA.



Fonte: Próprio Autor.

Ademais, ao comparar o perfil térmico dos materiais por TGA/DTGA-DTA foi notado que o MIP foi o mais estável termicamente na forma anidra. Além disso, os resultados mostram que a decomposição térmica incompleta no RAM-BSA e RAM-GMA até 650 °C é devido a presença dos grupos silanos na sílica C-18 utilizada na síntese das fases, bem como, da influência das condições de análises empregadas.

4.4 Análise de adsorção e dessorção de nitrogênio (ASAP).

Os polímeros MIP e RAM-BSA foram analisados por adsorção e dessorção de nitrogênio, apresentando valores de área superficial, volume de poros médios e diâmetro dos poros, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Área superficial, volume e diâmetro dos poros.

Amostra	Área superficial (m ² g ⁻¹)	Volume dos poros (cm ³ g ⁻¹)	Diâmetro dos poros (Å)
MIP	29,07	0,10	135,49
RAM-BSA	167,95	0,27	65,25

Fonte: Próprio Autor.

O valor da área superficial da fase extratora RAM-BSA, conforme indicado na Tabela 4, é aproximadamente seis vezes maior do que o do polímero MIP. Esta diferença pode variar bastante, devido as diferentes rotas sintéticas empregadas e os participantes da síntese. A maior área superficial confere a este polímero uma maior superfície de contato e interação com os analitos de interesse, sendo muitas vezes as fases que apresentam maiores índices de recuperação e eficiência de extração quando empregadas em técnicas de preparo de amostras. Devido às limitações instrumentais, a fase RAM-GMA foi excluída do teste de ASAP.

4.5 Seleção de fases extratoras

As fases MIP e RAM sintetizadas foram avaliadas frente a análise PSI-MS para Glifosato em amostras de leite materno. A eficiência destas fases quando submetidas a modificação do substrato de papel foi avaliada considerando a intensidade dos íons obtidos, sendo a maior intensidade o resultado mais favorável. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Avaliação da eficiência das fases desenvolvidas frente a análise PSI-MS para a determinação de pesticidas em amostras de leite materno.

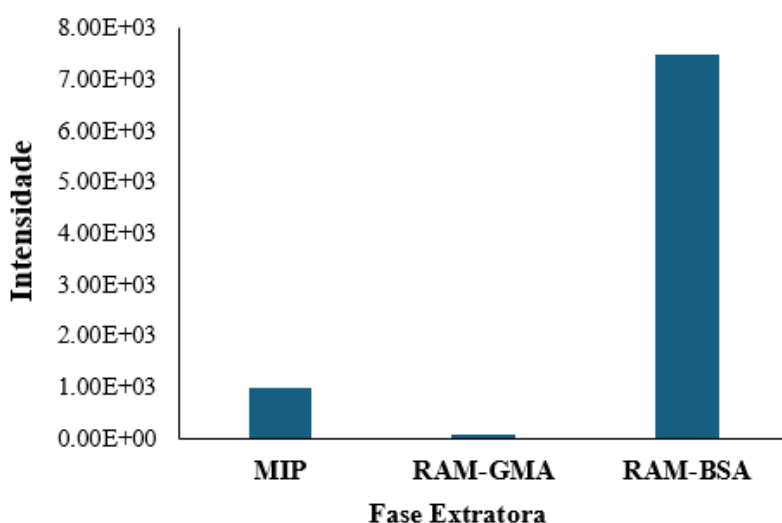
Fase modificadora	Intensidade do sinal (N=3)
MIP	9,80E+02
RAM-GMA	6,82E+01
RAM-BSA	7,48E+03

Fonte: Próprio Autor.

A eficácia do MIP foi inicialmente testada e, de acordo com os resultados, o polímero não se mostrou eficiente. Como o MIP não apresentou o desempenho esperado para a análise proposta, o polímero não-impresso molecularmente (NIP) não foi sintetizado.

A reação de síntese do MIP foi ampliada em 10 vezes para melhorar o aproveitamento dos reagentes utilizados. No entanto, o resultado não foi satisfatório, indicando que é mais adequado realizar reações sucessivas em vez de aumentar o fator de multiplicação dos reagentes. A fase RAM-BSA demonstrou melhor desempenho devido sua seletividade e sensibilidade analítica, sendo a fase ideal para recobrimento do papel cromatográfico.

Figura 20. Avaliação da eficiência das fases extratoras imobilizadas ao papel cromatográfico para análise PSI-MS.



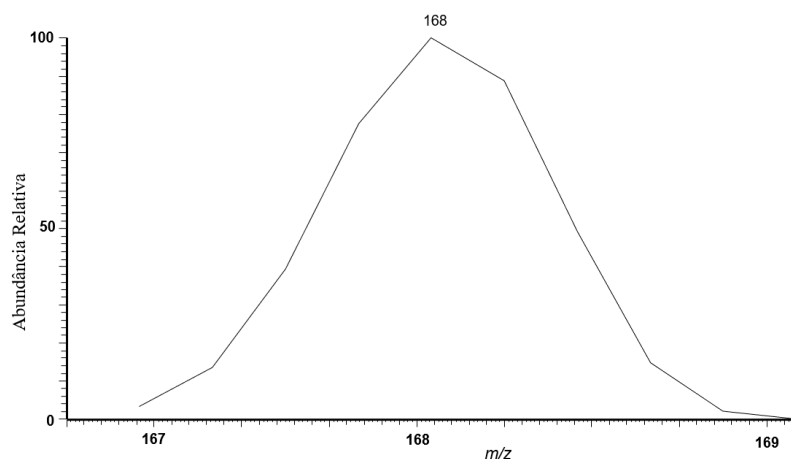
Fonte: Próprio Autor.

Assim, a fase RAM-BSA foi utilizada para modificar o papel nas análises de PSI-MS seguintes, sendo empregada tanto na validação do método analítico quanto na análise de amostras de leite materno de pacientes em estudo.

4.6 Otimização das condições de análise

A importância de haver equipamentos analíticos sensíveis o bastante para detectar concentrações baixas de analitos como glifosato em matrizes complexas, como o leite materno, é essencial para o biomonitoramento e a nível de exposição dos indivíduos ao pesticida. Inicialmente para identificação do analito Glifosato foi realizada infusão direta com concentração $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em matriz leite materno, utilizando fonte (ESI) com modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM), como mostra a Figura 21.

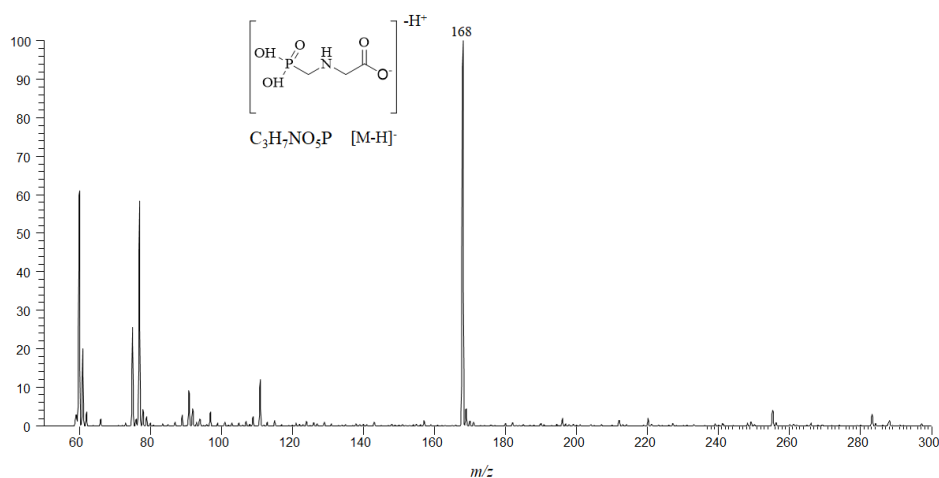
Figura 21. Espectro de massas ESI(-) em modo SRM-168 referente ao Glifosato 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: Próprio Autor.

O espectro de massas relativo à análise do Glifosato pode ser visualizado na Figura 22 na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, podendo ser observado a m/z 168 referente ao íon desprotonado.

Figura 22. Espectro de massas PSI(-)MS/MS para solução Glifosato 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: Próprio Autor.

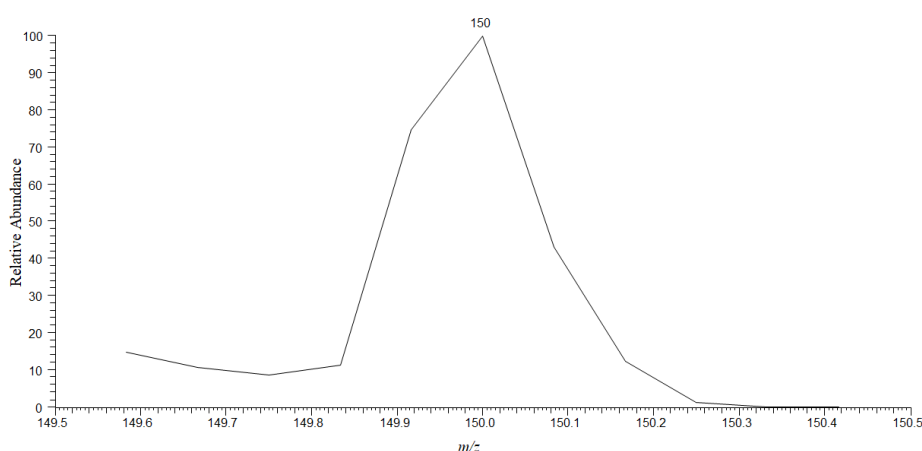
Para confirmação do íon de m/z 168 ser referente ao analito, foi realizada o estudo de fragmentação empregando energia de colisão de 30 eV, conforme a Tabela 6. A confirmação da estrutura do Glifosato pode ser visualizada na Figura 23, segundo a literatura há a perda de água e a formação de uma estrutura estável com íon fragmento de m/z 150 (YUSÀ et al., 2021).

4.8 Linearidade

Para atender a capacidade do método em obter uma resposta proporcional à concentração do analito, foi desenvolvida uma curva analítica com concentrações determinadas.

Para determinação da razão entre a m/z utilizou-se o modo monitoramento de reações selecionadas (SRM) (Figura 24), o acompanhamento do analito glifosato 168 com sua fragmentação e o monitoramento de seu fragmento mais intenso, com m/z 150, sendo utilizado os valores referentes às intensidades do sinal gerado.

Figura 24. Espectro do glifosato em modo SRM 168 - 150.



Fonte: Próprio Autor.

A linearidade do método foi estabelecida pelos pontos 50, 100, 200, 300, 400 e 600 $\mu\text{g L}^{-1}$. Após o tratamento das amostras de leite, as mesmas foram fortificadas com o padrão de glifosato nas concentrações especificadas anteriormente. Cada ponto utilizado foi analisado em quintuplicata ($N = 5$) e sua média utilizada para a plotagem do gráfico referente à curva de calibração como demonstrado na Figura 24.

Tabela 7. Linearidade em matriz leite materno.

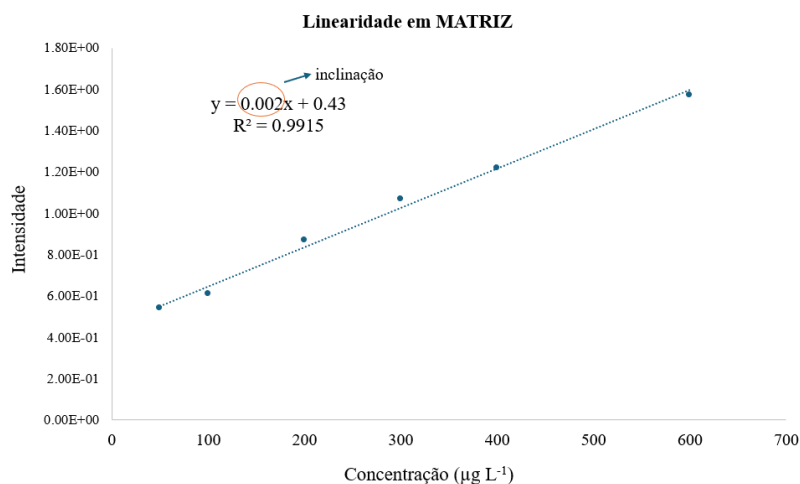
Linearidade						
Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	50	100	200	300	400	600
Média das intensidades	0,54	0,61	0,87	1,07	1,22	1,57

Fonte: Próprio Autor.

Os valores referentes à Tabela 7 foram utilizados para a plotagem do gráfico de barras e a equação da reta calculada de acordo com (PENG; CHIOU, 1990), $y = ax + b$,

conforme a Figura 25. A linearidade apresentou boa proporcionalidade com o coeficiente de correlação ao quadrado ficando acima de 0,990, estando em concordância com as exigências da legislação atual.

Figura 25. Curva de calibração em matriz leite materno.



Fonte: Próprio Autor.

Podemos verificar a regressão dos valores estabelecidos na linearidade nas Tabela 8 e Tabela 9 abaixo.

Tabela 8. Dados de regressão referente aos valores médios de intensidade.

Regressão	
R múltiplo	0.99656
R-Quadrado	0.99314
R-quadrado ajustado	-1.5
Erro padrão	0.036005

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 9. Dados de ANOVA referente aos valores médios de intensidade.

ANOVA				
	gl	SQ	MQ	F
Regressão	6	0.751214	0.1252	579.4586
Resíduo	4	0.005185	0.0013	
Total	10	0.75640		

Fonte: Próprio Autor.

Os valores referentes à linearidade na curva de calibração também foram testados em concentrações superiores a $600 \mu\text{g L}^{-1}$, como: 1, 2 e 5 mg L^{-1} , foi observado a

saturação da concentração analítica no detector do espectrômetro de massas, como visualizado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Figura 26. Linearidade em solução.

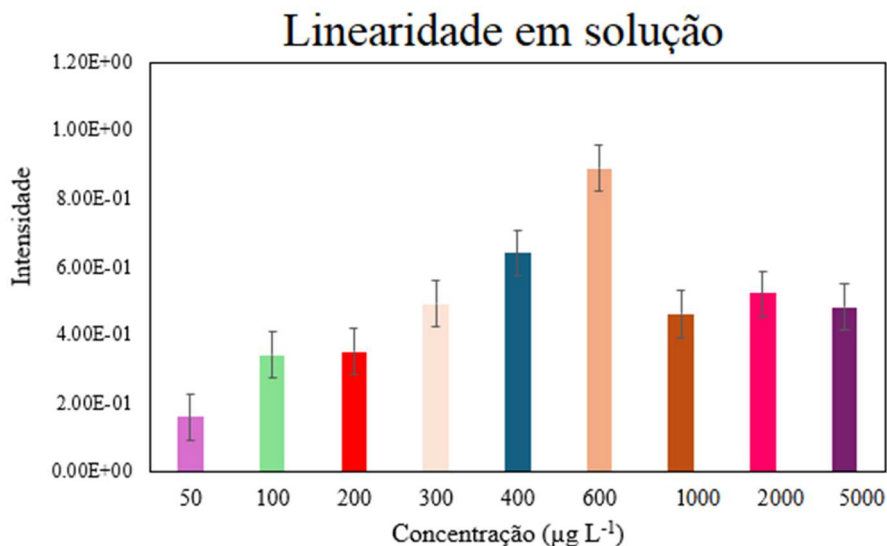


Figure Próprio Autor.

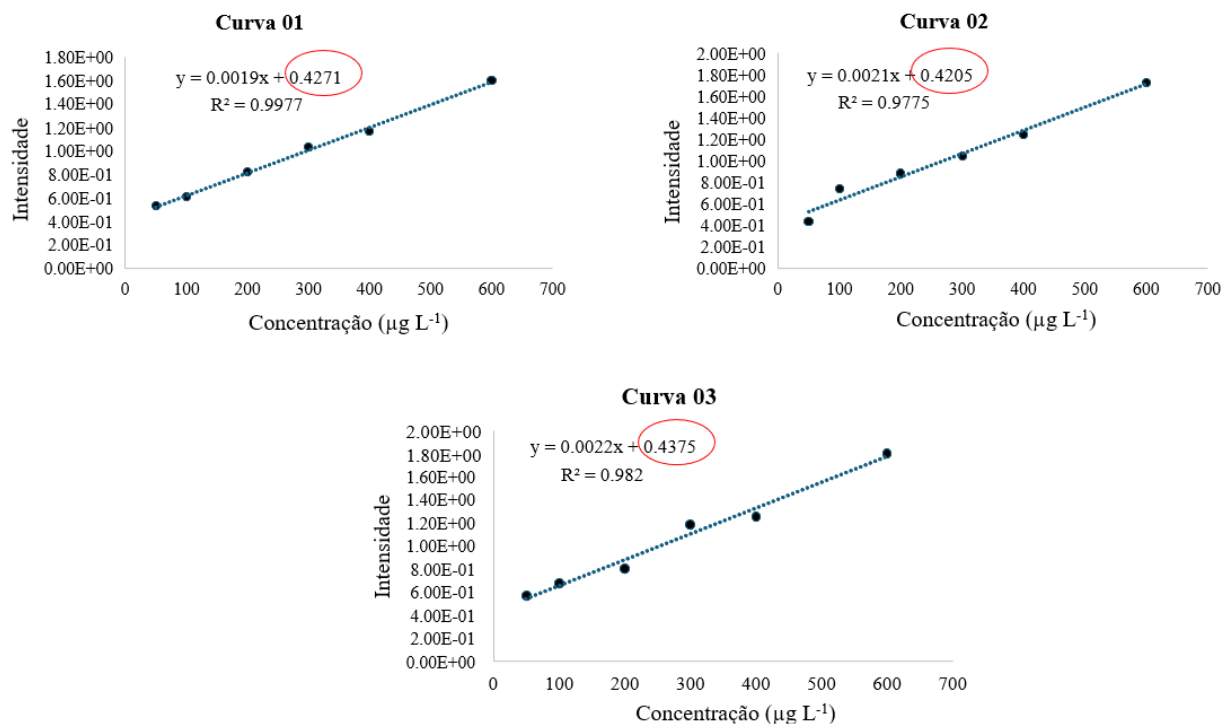
Para contornar o problema enfatizado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** foi estabelecido 6 pontos de concentração, obedecendo a legislação vigente.

4.9 Limite de Detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) é a medida que permite diferenciar o ruído presente na linha de base do espectrômetro do menor sinal de analito que pode ser detectado. O cálculo do valor de LOD está descrito na Equação 4 deste trabalho e se baseará no item “I” da legislação de validação vigente: “I - a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção;”

As curvas de calibração geradas bem como seus coeficientes lineares podem ser observados na Figura 27.

Figura 27. Intercepto curvas de calibração LOD e LOQ.



Fonte: Próprio Autor.

Os valores teóricos de LOD e LOQ obtidos foram 14,14 e 42,85 $\mu\text{g L}^{-1}$, foram calculados conforme já demonstrado na Equação 4 e 5, observados os dados da Figura 27. Entretanto, os autores estabeleceram o LOQ experimental em 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ devido às limitações do equipamento em relação à sensibilidade analítica, haja vista que os valores teóricos são considerados estimativas.

4.9.1 Exatidão, precisão e recuperação

Os cálculos de exatidão, precisão interdiária e recuperação utilizarão as Equações 2 e 3 descritas na seção Materiais e Métodos. Na Tabela 10 encontra-se os valores referentes à exatidão, precisão e recuperação para a análise de glifosato por PSI-MS em fase RAM-BSA, foram selecionadas três concentrações: baixa, média e alta, onde as mesmas foram enriquecidas com o pesticida glifosato e analisadas em quintuplicata ($N = 5$).

Segunda a legislação vigente (ANVISA., 2017), os resultados aceitáveis para a exatidão e precisão não devem extrapolar 15% e a faixa aceitável para a recuperação deverá conter o intervalo (80 – 120) %. Neste trabalho foram obtidas recuperações na faixa de 104,67 a 113,75%.

Tabela 10. Exatidão, precisão interdias e recuperação para o método PSI-MS em fase RAM-BSA para glifosato em leite materno.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exatidão	Precisão (%)	Recuperação
	(%)	Interdias	(%)
50	1,3	12,3	104,7
200	5,8	14,4	112,5
400	8,7	10,8	113,8

Fonte: Próprio Autor.

4.9.2 Efeito Matriz

O teste de efeito matriz é aplicado às matrizes biológicas segundo a (ANVISA., 2017), sendo determinado com a comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração em solvente e em matriz.

O paralelismo das retas geradas será avaliado para verificar a influência dos constituintes da matriz no analito. A análise estatística do método adotará o nível de significância de 5% em relação aos resultados.

Tabela 11. Teste-t aplicado aos valores dos coeficientes de correlação das curvas em solução e matriz.

Teste-t: duas amostras em par para médias		
	Solução	Matriz
Média	0.001366667	0.002066667
Variância	2.33333E-08	2.33333E-08
Observações	3	3
Correlação de Pearson	0.142857143	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-6.062177826	
P(T<=t) uni-caudal	0.013074159	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0.026148319	
t crítico bi-caudal	4.30265273	

Fonte: Próprio Autor.

O teste t confirmou que o efeito matriz é significativo para o analito glifosato em amostras de leite materno. Esse resultado já era esperado, pois a matriz contém vários interferentes e compostos endógenos que dificultam a quantificação do analito em questão. Entretanto, o uso de matriz para realização dos ensaios de quantificação, a chamada curva em matriz enriquecida pela solução padrão do analito em estudo,

minimiza os efeitos de matriz identificados. Esta estratégia é aceita e recomendada pela legislação vigente.

Aplicações em amostras reais de leite materno

As amostras de leite materno, coletadas em parceria com a Faculdade de Enfermagem da UFG, foram submetidas ao tratamento aplicado às matrizes complexas (descrita na seção 3.9), e adicionadas ao papel cromatográfico modificado com a fase RAM-BSA, sendo analisadas pelo método anteriormente desenvolvido e validado segundo a legislação vigente.

Na Tabela 12 é possível observar as concentrações obtidas através das análises PSI-MS de amostras de leite materno de pacientes voluntárias, para tanto as concentrações foram determinadas com base na equação da reta obtida pela curva analítica (descrita na seção 5.9).

Tabela 12. Concentrações de glifosato determinadas em amostras de leite materno submetidas a análises PSI-MS empregando substrato de papel modificado com a fase RAM-BSA. Amostras de pacientes voluntárias. A legislação brasileira não estabelece limites para valores de Glifosato em leite materno.

Amostra	Intensidade média	Concentração de glifosato determinada ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Amostra 6	0,590	80,0
Amostra 7	0,551	60,5
Amostra 24	0,665	117,5
Amostra 67	0,471	20,5
Amostra 62	0,502	36,0
Amostra 15	0,530	50,0
Amostra 34	0440	5,0
Amostra 20	0,671	120,5

Fonte: Próprio Autor.

Uma análise dos resultados apresentados na Tabela 12 revela que as amostras 67, 62, 34 apresentaram valores abaixo do limite de detecção (LOD). O ponto preocupante é a exposição das participantes do estudo ao pesticida glifosato, como observado nas amostras 24, 20, 6, 7 e 15, cujos valores de concentração ficaram dentro da faixa de

linearidade. Foram escolhidas aleatoriamente 20 amostras dentre as 100 analisadas, 12 amostras não apresentaram concentrações do analito.

Mesmo em concentrações baixas, esses dados servem como um alerta para os órgãos de fiscalização sobre as formas de exposição às quais essas lactantes e os bebês estão submetidas.

Dessa forma, ao observarmos a Tabela 13 referente aos métodos de LC-MS apresentam sensibilidade e especificidade com LOQ na faixa de ng L^{-1} ou ainda pg L^{-1} , mas podem ter custos mais elevados em termos de equipamentos, manutenção e insumos (como solventes e padrões isotópicos).

Tabela 13. Métodos de LC-MS para a detecção de pesticidas em matriz leite materno.

Analito	Técnica Instrumental	Referências
Neonicotinóide	LC-ESI-MS/MS	(SHODA et al., 2023)
Carbamatos	UPLC-MS/MS	(PEDERSEN et al., 2021)
DDT	LC-MS	(RACHMAWATI et al., 2021)
Polifenol	LC-MS/MS	(BERGER et al., 2024)
Bisfenol	LC-MS/MS	(HOSSAIN et al., 2024)
Multiresíduos	UHPLC	(ARNNOK et al., 2020)
Glifosato	LC-MS/MS	(STEINBORN et al., 2016)

Fonte: Próprio Autor.

A técnica de PSI-MS, se demonstra vantajosa devido ao tempo menor de preparo de amostras e as quantidades mínimas de solventes utilizados, o que torna o método bastante viável para aplicação em diversas instituições e órgãos.

5. Conclusões e perspectivas

A investigação de pesticidas em matrizes complexas utilizando o método PSI-MS em papel modificado com a fase RAM-BSA demonstrou ser uma ferramenta promissora e eficaz para o biomonitoramento. Além da versatilidade da técnica, a ausência ou a necessidade mínima de preparo de amostras destaca-se como um diferencial em termos de tempo e agilidade.

Seguindo os parâmetros de validação analítica, o método mostrou-se adequado para os testes realizados, apresentando boa seletividade e limites de detecção (LOD) e

quantificação (LOQ) que permitem a identificação e quantificação precisa de pesticidas em matrizes complexas. A modificação do papel cromatográfico com a fase RAM-BSA combina rapidez e eficiência, tornando o processo ainda mais produtivo e promissor.

Além disso, o método analítico desenvolvido pode ser aplicado a outros pesticidas e contaminantes emergentes, e combinado com diferentes matrizes complexas, ampliando suas possibilidades de uso.

6. Referências Bibliográficas

ANVISA. 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC N. 166, 25 de julho de 2017.

ARNNOK, et al. 2020. Multi-residue analysis method based on QuEChERS coupled with UHPLC for pesticides and effect of the biological matrices on diode array detection: Application on paired-serum and breast milk from breastfeeding mothers residing in agricultural community of Thailand. 2020.

BARONAS, L. R. 2019. Agrotóxico versus pesticida: notas de leitura sobre polêmica e amemória discursiva. Bakhtiniana: Revista de Estudos Do Discurso, 14(2), 62–87. <https://doi.org/10.1590/2176-457339267>. 2019.

BERGER, S., OESTERLE, I., AYENI, K. I., EZEKIEL, C. N., ROMPEL, A., & WARTH, B. 2024. Polyphenol exposure of mothers and infants assessed by LC–MS/MS based biomonitoring in breast milk. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 416(7), 1759–1774. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05179-y>. 2024.

BRASIL. 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial Da República Federativa Do Brasil, 11537. 1989.

BRASIL. 2023. Altera as Leis nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre os agrotóxicos, seus componentes e afins, e nº 9.972, de 25 de maio de 2000, que institui o Sistema de Classificação de Produtos Vegetais, Subprodutos e Resíduos de Valor Econômico. Diário Oficial Da República Federativa Do Brasil. 2023.

BRASIL, R. nº 166. 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. 2017.

BRAUN, D., EZEKIEL, C. N., MARKO, D., & WARTH, B. 2020. Exposure to Mycotoxin-Mixtures via Breast Milk: An Ultra-Sensitive LC-MS/MS

Biomonitoring Approach. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00423>. 2020.

CHAVES, A. R., MOURA, B. H. F., CARIS, J. A., RABELO, D., & QUEIROZ, M. E. C. 2015. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. *Journal of Chromatography A*, 1399, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.027> 2015.

CHEN, M., KOEKKOEK, J., & LAMOREE, M. 2022. Organophosphate ester metabolites in human breast milk determined by online solid phase extraction coupled to high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environment International*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.107049>. 2022.

CHI, Z. H., LIU, L., ZHENG, J., TIAN, L., CHEVRIER, J., BORNMAN, R., OBIDA, M., GOODYER, C. G., HALES, B. F., & BAYEN, S. 2024. Biomonitoring of bisphenol A (BPA) and bisphenol analogues in human milk from South Africa and Canada using a modified QuEChERS extraction method. *Environmental Pollution*, 348. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123730>. 2024.

DAMON, E. D., MAHER, S. Y., ALLEN, M. D., BAKER, J., CHANG, S. B., MAHER, S., THUO, M. M., & BADU-TAWIAH, K. A. 2019. Determining Surface Energy of Porous Substrates by Spray Ionization. *Langmuir*, 35(43), 13853–13859. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02419>. 2019.

DASS C. 2007. *Fundamental of contemporary mass spectrometry*. 2007.

DE MEDEIROS, J. F., ACAYABA, R. D. A., & MONTAGNER, C. C. 2021a. The chemistry in the human health risk assessment due pesticides exposure. *Química Nova*, 44(5). <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170699>. 2021a.

DE MEDEIROS, J. F., ACAYABA, R. D. A., & MONTAGNER, C. C. 2021b. The chemistry in the human health risk assessment due pesticides exposure. *Química Nova*, 44(5). <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170699>. 2021b.

DE O. SILVA, R., DE MENEZES, M. G. G., DE CASTRO, R. C., DE A. NOBRE, C., MILHOME, M. A. L., & DO NASCIMENTO, R. F. 2019. Efficiency of ESI and APCI ionization sources in LC-MS/MS systems for analysis of 22 pesticide residues

in food matrix. *Food Chemistry*, 297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.06.001> 2019.

DE QUEIROZ LAFETA, J. A., PINHEIRO, M. F., POLESCA, C. M., DE CASSIA SUPERBI, R., & DOS REIS COIMBRA, J. S. 2022. Effect of Temperature on the Separation and Purification of Whey Proteins Using Aqueous Two-Phase Systems. *Revista Virtual de Química*, 14(2), 123–135. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20210111> 2022.

DECHENG, S., XIA, FAN, ZHIMING, X., SHULIN, W., SHI, W., & PEILONG, W. 2021. Trace analysis of progesterone and 21 progestins in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled with high-field quadrupole-orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, 361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130115> 2021.

DESILETS, P. C., ROUNDSB, A. M., & REGNIER, E. F. 1991. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. In *Journal of Chromatography* (Vol. 544). 1991.

FERNANDES, A. R., BERNARDO, R. A., SOUSA, J. C. P., GEORG, R. DE C., VAZ, B. G., & CHAVES, A. R. 2020. Restrict access material for paper spray ionization mass spectrometry: A versatile tool for catecholamines and antidepressants determination in plasma samples. *Microchemical Journal*, 158, 10. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105245> 2020.

FILHO, J. F. A., PIRES, B. C., SANTOS, N. A., DIONISIO, S. J. I., DOS CONCEIÇÃO, N. S., FEU, A. E., DE SOUZA BORGES, W., LACERDA, V., & ROMÃO, W. 2023. Application of paper spray ionization mass spectrometry and related techniques in the direct analysis of biological matrices for detection of drugs - a review. *Química Nova*, 46(10), 972–982. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20230074> 2023.

FIUZA, C., & MORAIS, B. P. 2017. Leite materno fatores imunogênicos e imunglobulinas. 2017.

FOGUEL, M. V., PEDRO, N. T. B., WONG, A., KHAN, S., ZANONI, M. V. B., & SOTOMAYOR, M. DEL P. T. 2017. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective adsorption and quantification of Acid Green 16

textile dye in water samples. *Talanta*, 170, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.013> 2017.

FRIEDRICH, K., DA SILVEIRA, G. R., AMAZONAS, J. C., DO MONTE GURGEL, A., DE ALMEIDA, V. E. S., & SARPA, M. 2021. International regulatory situation of pesticides authorized for use in Brazil: Potential for damage to health and environmental impacts. In *Cadernos de Saúde Publica* (Vol. 37, Issue 4). Fundação Oswaldo Cruz. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00061820> 2021.

GÖREL-MANAV, Ö., DINÇ-ZOR, Ş., AKYILDIZ, E., & ALPDOĞAN, G. 2020. Multivariate optimization of a new LC–MS/MS method for the determination of 156 pesticide residues in milk and dairy products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(13), 4808–4817. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10540> 2020.

GUTIÉRREZ-MARTÍN, D., RESTREPO-MONTES, E., GOLOVKO, O., LÓPEZ-SERNA, R., AALIZADEH, R., THOMAIDIS, N. S., MARQUÈS, M., GAGO-FERRERO, P., & GIL-SOLSONA, R. 2023. Comprehensive profiling and semi-quantification of exogenous chemicals in human urine using HRMS-based strategies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(29–30), 7297–7313. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04998-9> 2023.

HOFFMANN, E; & STROOBANT, V. 2007. *Mass spectrometry: principles and applications*. Chichester: John Wiley & Sons. 2007.

HOSSAIN, M. Z., FEUERSTEIN, M. L., GU, Y., & WARTH, B. 2024. Scaling up a targeted exposome LC-MS/MS biomonitoring method by incorporating veterinary drugs and pesticides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416(19), 4369–4382. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05374-x> 2024.

JOUYBAN, A., FARAJZADEH, M. A., & AFSHAR MOGADDAM, M. R. 2020. In matrix formation of deep eutectic solvent used in liquid phase extraction coupled with solidification of organic droplets dispersive liquid-liquid microextraction; application in determination of some pesticides in milk samples. *Talanta*, 206. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120169> 2020.

LANÇAS, F. M. 2004. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos, RiMa, 46. 2004.

LEITE, F. 2008. *Validação em análise química*. 3^a edição, 357. 2008.

LEMES DE CAMPOS, A., REGINA ALVES IGNÁCIO, Á., SOBREIRA OLIVEIRA JUNIOR, E., & LOPES LÁZARO, W. 2021. Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, Maringá – PR. O avanço do agrotóxico no Brasil e seus impactos na saúde e no ambiente Pesticides in Brazil and their impacts on health and the environment. Revista Em Agronegócio e Meio Ambiente. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2021v14n1.e007934> 2021.

LIU, J., WANG, H., MANICKE, N. E., LIN, J. M., COOKS, R. G., & OUYANG, Z. 2010. Development, characterization, and application of paper spray ionization. Analytical Chemistry, 82(6), 2463–2471. <https://doi.org/10.1021/ac902854g> 2010.

LOPES FIALHO, M., PREGNOLATO REIS, K., & BEZERRA DE OLIVEIRA, R. 2019. O uso de glifosato (Roundup) em plantações de milho, no sudoeste goiano-um risco para a saúde humana, animal e ambiental. <https://www.google.com/search?q=o+que+%C3%A9+randup%3F&ie=utf-> 2019.

MARTINS, R. O., GOMES, I. C., MENDONÇA TELLES, A. D., KATO, L., SOUZA, P. S., & CHAVES, A. R. 2020. Molecularly imprinted polymer as solid phase extraction phase for condensed tannin determination from Brazilian natural sources. Journal of Chromatography A, 1620. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460977> 2020.

MORSI, R., GHOUDI, K., AYYASH, M. M., JIANG, X., & MEETANI, M. A. 2024. Detection of 11 carbamate pesticide residues in raw and pasteurized camel milk samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry: Method development, method validation, and health risk assessment. Journal of Dairy Science, 107(4), 1916–1927. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23512> 2024.

MULLETT, W. M. (2007). Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. In Journal of Biochemical and Biophysical Methods (Vol. 70, Issue 2, pp. 263–273). <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.10.001> 2007.

NANOTECHNOLOGY SOLUTIONS. 2013. Electrospray Ionization (ESI). <<https://Nanotechnologysolutions.Wordpress.Com/Category/>>. Acesso Em: 21 August. 2024. 2013.

PALACIOS COLÓN, L., RASCÓN, A. J., HEJJI, L., AZZOUZ, A., & BALLESTEROS, E. 2021. Validation and Use of an Accurate, Sensitive Method for Sample Preparation and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Determination of Different Endocrine-Disrupting Chemicals in Dairy Products. <https://doi.org/10.3390/foods> 2021.

PAVIA, et al. 2010. Introdução à Espectroscopia. Introdução à Espectroscopia, 4^a ed. 2010.

PEDERSEN, T. L., SMILOWITZ, J. T., WINTER, C. K., EMAMI, S., SCHMIDT, R. J., BENNETT, D. H., HERTZ-PICCIOTTO, I., & TAHA, A. Y. 2021. Quantification of Nonpersistent Pesticides in Small Volumes of Human Breast Milk with Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(23), 6676–6689. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05950> 2021.

PENG, G. W., & CHIOU, W. L. 1990. Review Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. In *Journal of Chromatography* (Vol. 531). 1990.

PEREIRA, I., RODRIGUES, S. R. M., DE CARVALHO, T. C., CARVALHO, V. V., LOBÓN, G. S., BASSANE, J. F. P., DOMINGOS, E., ROMÃO, W., AUGUSTI, R., & VAZ, B. G. 2016. Rapid screening of agrochemicals by paper spray ionization and leaf spray mass spectrometry: which technique is more appropriate? *Analytical Methods*, 8(31), 6023–6029. <https://doi.org/10.1039/c6ay01154c> 2016

POSSIDÔNIO DE AMARANTE JUNIOR, O., RODRIGUES, T. C., & SANTOS, D. 2002. GLIFOSATO: PROPRIEDADES, TOXICIDADE, USOS E LEGISLAÇÃO. In *Quim. Nova* (Vol. 25, Issue 4). 2002.

PRABAKARAN, M., CHUNG, I. M., SON, N. Y., CHI, H. Y., KIM, S. Y., YANG, Y. J., KWON, C., AN, Y. J., AHMAD, A., & KIM, S. H. 2019. Analysis of selected phenolic compounds in organic, pesticide-free, conventional rice (*Oryza sativa* L.) using LC-ESI-MS/MS. *Molecules*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/molecules24010067> 2019.

RACHMAWATI, I., HERNAWATI, S., SULISTYANINGSIH, E., & MUHAMMAD, A. C. 2021. STRADA Jurnal Ilmiah Kesehatan Risk Factors for

Contamination of Pesticide Residues in Women's Breast Milk Farmers in Agricultural Areas STRADA Jurnal Ilmiah Kesehatan. 10(1), 596–604. <https://doi.org/10.30994/sjik.v10i1.675> 2021.

SANTOS, A. M. S., FARIA, R. C., PEREIRA, I., DE LIMA, L. A. S., LEAL, C. M., NASCIMENTO, A. R., SIMAS, R. C., LIMA, N. M., & VAZ, B. G. 2022. Paper spray ionization mass spectrometry applied for quantification of pesticides and discrimination from tomato varieties (*Solanum lycopersicum*). Journal of Food Composition and Analysis, 109. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104467> 2022.

SELLERGRÉN, B., & ALLENDER, C. J. 2005. Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 57, Issue 12, pp. 1733–1741). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.010> 2005.

SHODA, A., NISHI, M., MURATA, M., MANTANI, Y., YOKOYAMA, T., HIRANO, T., IKENAKA, Y., & HOSHI, N. 2023. Quantitative elucidation of the transfer of the neonicotinoid pesticide clothianidin to breast milk in mice. *Toxicology Letters*, 373, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.10.006> 2023.

SIQUEIRA, F. D., MOURA, M. R., LAURENTINO, C. E. G., ARAÚJO, J. A., & CRUZ, L. S. 2013. Análise da exposição de trabalhadores rurais a agrotóxicos. *Revista Brasileira Em Promoção Da Saúde*, 26, 182–191. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=40828920005> 2013.

STEINBORN, A., ALDER, L., MICHALSKI, B., ZOMER, P., BENDIG, P., MARTINEZ, S. A., MOL, H. G. J., CLASS, T. J., & COSTA PINHEIRO, N. 2016. Determination of Glyphosate Levels in Breast Milk Samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(6), 1414–1421. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05852> 2016.

VILLEGAS-ÁLVAREZ, M. C., CALLEJÓN-LEBLIC, B., RODRÍGUEZ-MORO, G., GÓMEZ-ARIZA, J. L., ARIAS-BORREGO, A., & GARCÍA-BARRERA, T. 2020. Optimization of hollow-fiber liquid phase microextraction for polychlorinated biphenyls in human breast milk. *Journal of Chromatography A*, 1626. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461381> 2020.

WANG, C., LI, M., XU, H., & WEI, Y. 2014. Preparation of an internal surface reversed-phase restricted-access material for the analysis of hydrophobic molecules in biological matrices. *Journal of Chromatography A*, 1343, 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.074> 2014.

WANG, X., ZHAO, L., SUN, Z., & GONG, B. 2019. Preparation of Ofloxacin-Restricted Access Media–Molecularly Imprinted Polymers for Its Selective Recognition of Ofloxacin in Milk Samples. *Chromatographia*, 82(7), 1041–1050. <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03738-5> 2019.

YANG, Y., LIU, X., GUO, M., LI, S., LIU, W., & XU, B. 2011. Molecularly imprinted polymer on carbon microsphere surfaces for adsorbing dibenzothiophene. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 377(1–3), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.01.032> 2011.

YUSÀ, V., SANCHÍS, Y., DUALDE, P., CARBONELL, E., & COSCOLLÀ, C. 2021. Quick determination of Glyphosate and AMPA at sub $\mu\text{g/L}$ in drinking water by direct injection into LC-MS/MS. *Talanta Open*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100061> 2021.