



AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE LIMPEZA PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) DERIVATIZADOS EM URINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A UM DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA (CLAE-FLD)

Heldis B. Oliveira^{1,2}; Vanessa E. Dabkiewicz²; Ana Cristina S. Rosa²; Monica C. Padilha¹

1. *Universidade Federal do Rio de Janeiro- Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD)- Instituto de Química / UFRJ-Ilha do Fundão-Centro de Tecnologia;*
2. *Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana- Laboratório de Toxicologia- Rua Leopoldo Bulhões 1480.*

Palavras-Chave: Derivatização; Extração líquido-líquido; SPE.

Introdução

O glifosato é um agrotóxico utilizado no controle de ervas daninhas, com uso difundido na agricultura de grandes e pequenos produtores. Seu caráter polar aumenta a capacidade de alcance nas diversas matrizes ambientais aquáticas. Ele está associado a danos à saúde, como disruptor endócrino, diabetes, depressão e câncer. A aplicação desse produto nas plantações faz com que ele chegue até a população via contaminação de lençóis freáticos, consumo de água e animais contaminados ou mesmo por contato direto no ambiente. Diante do seu amplo uso, torna-se importante o desenvolvimento de metodologias capazes de detectar esse composto em diversas matrizes (ambientais e biológicas) com o objetivo de fornecer procedimentos melhores à comunidade científica. A técnica de cromatografia líquida é uma das escolhas principais para essa análise, com uso variado de detectores, como o detector de arranjo de díodos (DAD), fluorescência e espectrometria de massas (EM). Um dos principais desafios analíticos na detecção por DAD é o efeito da matriz, através do qual os procedimentos de limpeza da amostra, não eliminam os compostos interferentes com características muito semelhantes ao analito, e quando o procedimento propõe uma alta limpeza, pode resultar em baixas recuperações do analito (SHU et al., 2022). A técnica de fluorescência reduz essa problemática, comparada ao DAD, mas não elimina o efeito matriz com a mesma eficiência da detecção por EM. No entanto, nem sempre a EM está disponível, sendo a fluorescência uma alternativa com bom custo-benefício (CASTAÑEDA et al., 2024). Dessa forma, estudos que apontem melhorias para reduzir o efeito matriz e aumentar as recuperações, são extremamente relevantes (WANG et al., 2016). Esse estudo avaliou diferentes preparações para matriz de urina a fim de minimizar o efeito da matriz na determinação

do Glifosato e AMPA derivatizados, usando a técnica de cromatografia líquida e detecção de fluorescência, somando a extração líquido /líquido e a SPE.

Material e Métodos

O volume de amostra de urina utilizado neste estudo foi de 1 mL. O preparo das amostras e a extração em fase sólida foram realizados em duas etapas distintas: Os cartuchos HLB foram condicionados com 2 mL de metanol acidificado. As amostras foram preparadas adicionando 0,6 mL de acetonitrila. Após a centrifugação, as amostras foram passadas pelos cartuchos HLB sem vácuo e eluidas com 1,5 mL de acetonitrila.

Os cartuchos C18 foram condicionados com 3 mL de acetonitrila e 6 mL de água. O extrato do cartucho C18 foi reconstituído com 1 mL do próprio padrão. Para o preparo das amostras, foram adicionados 0,2 mL de tampão borato (pH 8,98), 0,2 mL de água Milli-Q e 50 µL de acetonitrila. Após 60 minutos, 150 µL de FMOC-Cl foram adicionados, seguidos por mais 60 minutos de repouso, e a mistura foi extraída com 5 mL de diclorometano. Em ambos os processos, os extratos foram evaporados e, posteriormente, reconstituídos e filtrados em filtro PTFE hidrofílico de 0,22 µm.

Os extratos finais foram reconstituídos com 1 mL de padrões de GLY-FMOC e AMPA-FMOC em diferentes concentrações, variando de 6 µg/L a 200 µg/L, além de uma amostra em branco. Este processo visou otimizar a análise de glifosato e seu metabólito AMPA, garantindo maior precisão na detecção e quantificação por cromatografia líquida.

Resultados e Discussão

Os cartuchos HLB e C18 foram avaliados após a derivatização com FMOC-Cl, mas ainda apresentaram interferentes que dificultaram a integração dos picos dos analitos (Glifosato e ácido aminometilfosfônico). Como próxima etapa, será realizada uma avaliação com a adição da extração líquido-líquido antes da derivatização. Espera-se que a remoção desses compostos apolares interferentes seja bem-sucedida com a utilização de um solvente como o DCM (diclorometano), conforme observado em outros métodos de preparo de amostras. O objetivo é adicionar uma etapa extra de limpeza (extração líquido-líquido) sem excluir o uso da SPE, que é crucial para a eficiência da cromatografia, trazendo benefícios como a possibilidade tanto da troca de solventes como a pré-concentração da amostra, além de eliminar interferentes polares.

Os resultados obtidos até o momento são preliminares, e novas análises estão sendo conduzidas. Em breve, teremos mais resultados que poderão fornecer uma visão mais completa sobre a eficácia dessa abordagem.

Esse acréscimo ressalta que a pesquisa está em andamento e que mais dados serão disponibilizados em breve.

Conclusões

Os resultados preliminares indicam que a adição da etapa de extração líquido-líquido antes da reação de derivatização apresenta um grande potencial para melhorar significativamente a remoção de compostos apolares, os quais interferem na integração dos picos dos analitos em estudo. Embora os cartuchos HLB e C18 tenham demonstrado limitações na remoção de interferentes após a derivatização com FMOC-Cl, a introdução dessa etapa adicional pode contribuir para a otimização da análise, minimizando o efeito de interferentes apolares e aumentando a precisão dos resultados. O uso de solventes orgânicos apolares, como o diclorometano (DCM) possa solucionar esse problema, como observado em metodologias semelhantes. O estudo permitirá uma análise mais aprofundada sobre a eficácia dessa abordagem e a melhoria dos métodos de preparo de amostras para a cromatografia líquida com detecção por fluorescência.

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha gratidão à Universidade Federal do Rio de Janeiro e à Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio e recursos oferecidos durante a realização deste estudo.

Referências

CASTAÑEDA, F. N. et al. “New sorbents for sample pretreatment: Development and applications”. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 180, p. 117924, 1 nov. 2024. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993624004072>>. Acesso em: 23 set.2024

SHU, H. et al. Effects of salt matrices on the determination of glyphosate, glufosinate, aminomethylphosphonic acid and 2-aminoethylphosphonic acid using reversed-phase liquid chromatography after fluorescence derivatization. **Microchemical Journal**, v. 179, p. 107659, 1 ago. 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914016306956>>. Acesso em: 20 set.2024.

WANG, S. et al. A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Talanta**, v. 161, p. 700–706, 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914016306956>>. Acesso em: 20 set.2024.