

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
TEREZA CRISTINA PIMENTA GONÇALVES CATRINCK

**ESTUDO DA DERIVATIZAÇÃO DE GLYPHOSATE E AMPA UTILIZANDO
FMOC-Cl E BSTFA PARA ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS**

Diamantina
2013

TEREZA CRISTINA PIMENTA GONÇALVES CATRINCK

**ESTUDO DA DERIVATIZAÇÃO DE GLYPHOSATE E AMPA UTILIZANDO
FMOC-Cl E BSTFA PARA ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Fidêncio.

Co-orientador: Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério

**Diamantina
2013**

**ESTUDO DA DERIVATIZAÇÃO DE GLYPHOSATE E AMPA UTILIZANDO FMOC-CL E BSTFA
PARA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA**

Tereza Cristina Pimenta Gonçalves Catrinck

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

APROVADO EM 03 / 07 / 2013

Prof. Flaviano Oliveira Silvério – UFMG

Prof. Otto Domenici Mozzer – Unimontes

Prof. Leandro Rodrigues de Lemos – UFVJM

Prof. Rodrigo Moreira Verly – UFVJM

Prof. Paulo Henrique Fidêncio – UFVJM

Presidente

DIAMANTINA

2013

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 - 2618.

C367e	<p>Catrinck, Tereza Cristina Pimenta Gonçalves</p> <p>Estudo da derivatização de glyphosate e AMPA utilizando FMOC-CL e BSTFA para análises cromatográficas / Tereza Cristina Pimenta Gonçalves Catrinck. – Diamantina: UFVJM, 2013. 69p.</p> <p>Orientador: Paulo Henrique Fidêncio Coorientador: Flaviano Oliveira Silvério</p> <p>Dissertação (Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Química Analítica) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Glyphosate. 2. Derivatização. 3. AMPA. I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;">CDD 547.3</p>
-------	---

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho às pessoas mais presentes em minha vida:

Minha mãe, pelo exemplo de vida que é!

Meu grande amor, André Catrinck, por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos de minha vida.

Isabella, Ester e Sara, meus maiores PRESENTES!

Meus irmãos, pelo incentivo direto ou indireto.

AMO MUITO VOCÊS!

AGRADECIMENTO

Inicio meus agradecimentos por **DEUS**, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

À minha mãe, **Zarita Pimenta**, meu infinito agradecimento. Sempre acreditou em minha capacidade, me achando A MELHOR de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

À meu querido e amado esposo, **André Catrinck**, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Foi ele quem me obrigou, sempre que eu desistia, a continuar. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio e amor, este trabalho pôde ser concretizado. **Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!**

À minha pequena-grande **Bella**, à minha princesa, **Ester** e a minha Toquinho, **Sara** que sempre me inspiram a querer ser mais do que fui até hoje!

Aos meus irmãos, **Zi, Cláudia, Dulce, Bertholdo, Cândida, Rona e Dedé** que são o meu porto seguro, minha fonte de toda força e fé de que tudo vai dá certo, mesmo não dando nada certo! Obrigada pela confiança!

Ao meu cunhado-conselheiro-amigo-confidente **Abílio Carnielle**, meu agradecimento especial pelos sábios conselhos nos momentos mais difíceis.

Aos meus sogros, **Sr. Catrinck e D.Shirley**, pelo incentivo e apoio. Obrigada pelo carinho e pela cobertura com minhas pequenas durante todas as minhas ausências.

Aos meus amigos de mestrado, **Joyce, Juliana, Janaíne, Érica, Dilton, Delton, Neiviane, Gabi e Alysson** pela companhia, amizade e companheirismo!!!. Vocês faziam tudo ser menos doloroso.

Às minhas Brilhantes COLEGAS PESQUISADORAS, **Clara e Amanda**, pela equipe unida que juntas formamos, acreditando e trabalhando sempre com ética e muito respeito. Juntas, nos momentos de ânimo e desânimo, de choro e de risos, de fins de semana, noites de estudo, levando pra casa agora um desafio vencido!!!!. Vencemos!!!! Sem vocês, eu não estaria aqui!!!! Vocês se tornaram verdadeiras amigas e tornaram mais leve meu trabalho. Aos poucos nos tornamos mais que amigas, confidentes! Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês!

Ao meu Orientador, **Prof.º Dr. Paulo Henrique Fidêncio**, que acreditou em meu potencial de uma forma que eu não acreditava ser capaz de corresponder. Obrigada por me aceitar como orientanda. O Sr. é uma referência de profissional íntegro e exemplar e de um amigo sincero. Agradeço por acreditar tanto em mim!

Ao meu Co-orientador, **Prof.º Dr. Flaviano Oliveira Silvério**, pela confiança, disponibilidade, doação integral do ambiente de trabalho, O LPA-UFGM-ICA. Sempre disponível e disposto a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver algum tipo de conhecimento.

Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro.

Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri por abrir as portas para que eu pudesse realizar este sonho que era a minha DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma LIÇÃO DE VIDA!

Ninguém vence sozinho...

OBRIGADA A TODOS!

"...a palavra mais linda que existe, só pode ser SuperAção...
Chega de ficar parado perdido no tempo que já não há
Quero o meu olhar pra frente
Quem foi que disse pra não voar?
A bola está comigo!
... O dia está chegando
As coisas vão mudar...
... Amanhecerá..."

Só Deus sabe a gratidão que tenho hoje no coração, a alegria, a inquietação, principalmente por todas as vezes que pensei que esse dia podia não chegar.

Mas ele... Amanheceu...

RESUMO

Com este trabalho, objetivou-se otimizar simultaneamente metodologias para derivatização de glyphosate (GLY) e ácido aminometilfosfônico (AMPA) para análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV). Além disso, foram otimizadas as condições cromatográficas por CLAE-UV para a análise destes compostos. O GLY foi selecionado para o estudo por ser um herbicida amplamente utilizado para o controle de pragas que, junto ao seu principal metabólito secundário (AMPA) apresenta potencial risco toxicológico para a saúde humana e para o meio ambiente. Devido aos seus efeitos deletérios, alguns métodos analíticos têm sido desenvolvidos a fim de monitorar seus resíduos no meio ambiente. Métodos cromatográficos têm sido preferencialmente usados, contudo as moléculas em estudo apresentam baixa volatilidade e ausência de grupos cromóforos, sendo necessário adicionar etapas de derivatização. Neste trabalho foram avaliadas duas metodologias para derivatização das moléculas de GLY e AMPA: com piririna e *N*-O(bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) para análises por CG-EM e com cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) para análises por CLAE-UV. A utilização de piridina:BSTFA em proporção 60:100, respectivamente, sem vibração ultrassônica e ajuste de pH resultaram em condições ótimas de análises por CG-EM. Já para análises por CLAE-UV, tampão borato 200 mmol L⁻¹, FMOC-Cl 500 mg L⁻¹, homogeneização por 5 minutos, análise imediatamente após a reação e lavagem com éter dietílico promoveram resultados satisfatórios. Finalmente, as condições ótimas de análise por CLAE-UV foram estudadas e determinou-se que a fase móvel composta por acetonitrila/tampão fosfato, comprimento de onda 260 nm, gradiente com proporção de 25:75 v/v (0-2,5 minutos), 65:35 v/v (4,5-10 minutos) e 25:75 v/v (11-12 minutos) apresentaram melhores resultados.

Palavras-chave: AMPA; Derivatização; Glyphosate.

ABSTRACT

This study aimed to optimize both methodologies for derivatization of glyphosate (GLY) and aminomethylphosphonic acid (AMPA) for analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high performance liquid chromatography with ultraviolet detector (HPLC-UV). Moreover, the chromatographic conditions were optimized by HPLC-UV for the analysis of these compounds. The GLY was selected for the study because it is a herbicide widely used for pest control that, with its main secondary metabolite (AMPA) has potential toxicological risk to human health and the environment. Due to the deleterious effects, some analytical methods have been developed to monitor their residues on the environment. Chromatographic methods have been used preferentially, however the molecules in study have low volatility and absence of chromophoric groups being necessary to add derivatization steps. In this work were evaluated two methodologies for derivatization of GLY and AMPA molecules: pyridine and *N*-O(bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) (BSTFA) for analysis by GC-MS and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) for analysis by HPLC-UV. The use of pyridine:BSTFA in ratio 60:100, respectively, without ultrasonic vibration and adjustment pH result in better analyses conditions by GC-MS. Already for analysis by HPLC-UV, borate buffer 200 mmol L⁻¹, FMOC-Cl 500 mg L⁻¹, homogenization for 5 minutes, analysis immediately after reaction and washing with diethyl ether promoted satisfactory results. Finally, the optimal conditions for analysis by HPLC-UV were studied and it was determined that the mobile phase consisting of acetonitrile / phosphate buffer, wavelength 260 nm, ratio gradient 25:75 v / v (0-2.5 minutes), 65:35 v / v (4.5-10 minutes), 25:75 v / v (11-12 minutes) showed better results.

Keywords: AMPA; Derivatization; Glyphosate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.1** - Esquema de degradação do glyphosate com a produção de ácido aminometilfosfônico (AMPA) e sarcosina. 03
- FIGURA 1.2** - Espectros de massa do GLY (A) e AMPA (B) derivatizados com BSTFA 07
- FIGURA 1.3** - Parte do cromatograma da solução de GLY e AMPA 1 mg L⁻¹ obtido ao empregar reagente basificante:BSTFA na proporção 20:200 µL (acetonitrila (A) e piridina (B)). 09
- FIGURA 1.4** - Parte do cromatograma da solução de GLY e AMPA 1 mg L⁻¹ com e sem vibração ultrassônica. 10
- FIGURA 1.5** - Parte do cromatograma obtido para solução de AMPA (A) e GLY (B) 1 mg L⁻¹ usando diferentes volumes de reagente basificante (Piridina) e reagente derivatizante (BSTFA) nas proporções 20:200 e 60:100 µL. 11
- FIGURA 1.6** - Parte do cromatograma da solução de AMPA (A) e GLY (B) obtido ao empregar meio básico (pH 13) e sem ajuste de pH (pH 6). 12
- FIGURA 2.1** - Reação de derivatização do GLY e AMPA utilizando FMOC-Cl, evidenciando os compostos formados para detecção, após emprego do método pré-coluna. 20
- FIGURA 2.2** - Espectros de absorção no ultravioleta do A) FMOC-Cl 50 mg L⁻¹ em acetonitrila; B) FMOC-Cl em meio reacional; C) GLY em meio reacional; D) GLY em meio reacional contendo FMOC-Cl. 24
- FIGURA 2.3** - Espectros no ultravioleta da solução de GLY 10 mg L⁻¹ derivatizada com FMOC-Cl em diferentes concentrações de tampão borato de sódio. A figura inserida mostra a absorção em 210 e 260 nm. As análises espectrofotométricas realizadas no modo *SCAN* demonstraram que há maior absorção dos compostos em 210 e 260 nm. 26
- FIGURA 2.4** - Espectros no ultravioleta da solução de GLY 10 mg L⁻¹ 27

	derivatizada com FMOC-Cl em diferentes concentrações. A figura inserida mostra a absorção em 209, 210 e 260 nm.	
FIGURA 2.5	- Espectros no ultravioleta da solução de GLY 10 mg L ⁻¹ derivatizada com FMOC-Cl em diferentes tempos de homogeneização (A) e diferentes tempos de reação (B).	28
FIGURA 2.6	- Espectros no ultravioleta da solução de GLY 10 mg L ⁻¹ derivatizada com FMOC-Cl e submetida a diferentes solventes de lavagem.	30
FIGURA 3.1	- Equilíbrios e constantes de dissociação do GLY para os diferentes valores de pKa.	42
FIGURA 3.2	- Cromatogramas da solução de GLY 10 mg L ⁻¹ obtidos ao utilizar fase móvel composta por acetonitrila:água e acetonitrila:tampão fosfato e análises por CLAE-UV.	43
FIGURA 3.3	- Espectros no ultravioleta da solução de GLY 10 mg L ⁻¹ (A) e AMPA 10 mg L ⁻¹ (B) obtidas após derivatização com FMOC-Cl.	44
FIGURA 3.4	- Cromatogramas da solução de tampão borato 200 mmol L ⁻¹ obtidos ao utilizar 210 e 260 nm e análises por CLAE-UV.	45
FIGURA 3.5	- Cromatogramas das soluções de tampão borato 2, 20 e 200 mol L ⁻¹ obtidos ao utilizar 260 nm e análises por CLAE-UV.	45
FIGURA 3.6	- Cromatogramas da solução de FMOC-Cl 50 mg L ⁻¹ obtidos ao utilizar 210 e 260 nm para análises por CLAE-UV.	46
FIGURA 3.7	- Cromatogramas de solução de GLY 10 mg L ⁻¹ obtidos ao utilizar fase móvel acetonitrila/tampão fosfato nas proporções de 65:35, 55:45 e 35:65 (v/v).	47
FIGURA 3.8	- Cromatogramas das soluções de AMPA 10, 5 e 1 mg L ⁻¹ obtidos ao utilizar fase móvel acetonitrila/tampão fosfato 55:45 v/v (A) e acetonitrila/tampão fosfato 35:65 V/V (B).	48
FIGURA 3.9	- Cromatograma da solução de GLY e AMPA a 1 mg L ⁻¹ obtidos ao utilizar fase móvel acetonitrila/tampão fosfato 55:45 v/v (A) e acetonitrila/tampão fosfato 35:65 v/v (B).	49
FIGURA 3.10	- Cromatograma da solução mista de GLY e AMPA a 1 mg L ⁻¹ por CLAE-UV utilizando gradiente de fluxo.	50

FIGURA 3.11 - Cromatograma da solução mista de GLY e AMPA a 1 mg L^{-1} por CLAE-UV utilizando gradiente de fase móvel.

50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Variáveis avaliadas na otimização da reação de derivatização de GLY e AMPA.	06
TABELA 2.1 - Parâmetros avaliados na otimização univariada da derivatização de GLY e AMPA.	22
TABELA 3.1 - Volumes de GLY, AMPA e água deionizada utilizados para obter amostras de produto derivatizado nas concentrações de 0,5, 1, 5 e 10 mg L ⁻¹ .	39
TABELA 3.2 - Variáveis avaliadas na otimização das análises de GLY e AMPA por CLAE-UV.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Ácido aminometilfosfônico
BSTFA	<i>N</i> -O(bis(trimetil)silil)trifluoroacetamida
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE	Eletroforese capilar
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massas
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV-Visível
C8	Sílica adsorvida com o grupo octila
C18	Sílica adsorvida com o grupo octadecila
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FMOC-Cl	Cloroformiato de 9-fluorenilmetila
FR	Fase reversa
GLY	Glyphosate
HPLC	High performance liquid chromatography
MIS	Monitoramento de íons seletivos
MTBSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> - <i>tert</i> -butildimetilsililfluoroacetamida
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação ácida
TFAA	Anidrido trifluoroacético
TFE	Trifluoroetanol
TMCS	Trimetilclorosilano
TMS	Trimetilsilano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta e visível

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Estudo da reação de derivatização do glyphosate e do ácido aminometilfosfônico (AMPA) com <i>N</i>-O-(bistrimetilsilil)trifluoroacetamida..	01
Resumo.....	01
Abstract.....	02
1.1. Introdução.....	03
1.2. Materiais e métodos.....	05
1.2.1. Reagentes.....	05
1.2.2. Instrumentação.....	05
1.2.3. Preparo da amostra.....	05
1.2.4. Parâmetros otimizados.....	06
1.3. Resultados e discussão.....	06
1.3.1. Caracterização estrutural do GLY e AMPA derivatizados.....	06
1.3.2. Desenvolvimento e otimização do processo de sililação.....	08
1.3.2.1. Composição do meio reacional.....	08
1.3.2.2. Vibração ultrassônica.....	10
1.3.2.3. Volume BSTFA:Piridina.....	11
1.3.2.4. pH do meio reacional.....	12
1.4. Conclusões.....	12
1.5. Referências.....	13
Capítulo 2 - Estudo espectrofotométrico da reação de derivatização do Glyphosate e ampa com cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl).....	17
Resumo.....	17
Abstract.....	18
2.1. Introdução.....	19
2.2. Materiais e métodos.....	21
2.2.1. Reagentes.....	21
2.2.2. Instrumentação.....	21
2.2.3. Reação de derivatização.....	21
2.2.4. Variáveis avaliadas para a reação de derivatização.....	22

2.3. Resultados e discussão.....	23
2.3.1. Espectro no UV-visível do GLY-FMOC.....	23
2.3.2. Otimização da derivatização.....	26
2.3.2.1. Efeito da concentração da solução de tampão borato.....	26
2.3.2.2. Efeito da concentração da solução de FMOC-Cl.....	27
2.3.2.3. Efeito do tempo de homogeneização.....	28
2.3.2.4. Efeito do tempo de reação.....	29
2.3.2.5. Efeito do solvente de lavagem.....	29
2.4. Conclusões.....	30
2.5. Referências.....	31

Capítulo 3 - Otimização das condições cromatográficas por CLAE-UV para análises de glyphosate e AMPA.....

Resumo.....	35
Abstract.....	36
3.1. Introdução.....	37
3.2. Materiais e métodos.....	38
3.2.1. Reagentes.....	38
3.2.2. Instrumentação.....	38
3.2.3. Derivatização do GLY e AMPA com FMOC-Cl.....	39
3.2.4. Delineamento experimental.....	39
3.3. Resultados e discussão.....	41
3.3.1. Composição da fase móvel.....	41
3.3.2. Comprimento de onda.....	44
3.3.3. Modo de eluição.....	46
3.4. Conclusões.....	51
3.5. Referências.....	51
Conclusão Geral.....	55

CAPÍTULO 1

ESTUDO DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DO GLYPHOSATE E DO ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO (AMPA) COM *N*-O-(BISTRIMETILSILIL)TRIFLUOROACETAMIDA

RESUMO

Buscou-se com este trabalho estudar a derivatização do glyphosate e AMPA utilizando *N*-O-(bistrimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) combinado com trimetilclorosilano (TMCS), avaliando a composição do meio reacional, utilização de ultrassom, volume de BSTFA:Piridina e pH do meio reacional. A partir deste estudo inferiu-se que meio reacional composto por piridina:BSTFA em proporção 60:100, respectivamente, sem vibração ultrassônica e ajuste de pH fornecem condições ótimas de análises por CG-EM.

Palavras-chave: Glyphosate; CG-EM; Derivatização.

**STUDY OF THE REACTION DERIVATIZATION GLYPHOSATE AND
AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID (AMPA) WITH
N-O-(BISTRIMETHYLSILYL)TRIFLUOROACETAMIDE**

ABSTRACT

This work aimed to study the derivatization of glyphosate and AMPA using *N*-O-(bistrimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) combined with trimethylchlorosilane (TMCS), evaluating the composition of the reaction medium, use of ultrasound, volume of BSTFA:pyridine and pH of the reaction medium. From this study it was inferred that the reaction medium composed of BSTFA:pyridine in ratio 60:100, respectively, without ultrasonic vibration and pH adjustment provide optimal conditions for analysis by GC-MS.

Keywords: Glyphosate; GC-MS; Derivatization.

1.1. INTRODUÇÃO

O controle químico de ervas daninha foi adotado na segunda metade do século XX levando a um expressivo desenvolvimento na indústria de herbicidas (SANCHES *et al.*, 2003). Dentre estas substâncias, o glyphosate (*N*-fosfometilglicina) tem sido amplamente utilizado devido a seu excelente e efetivo desempenho no controle de pragas (LI *et al.*, 2007). Este composto apresenta-se como uma molécula polar, pós-emergente, não seletiva e de ação sistêmica (CHEN *et al.*, 2013). Pode ser degradado por duas rotas catabólicas (Figura 1.1), produzindo o ácido aminometilfosfônico (AMPA) como o principal metabólito e a sarcosina como intermediário na rota alternativa (KRYUCHKOVA *et al.*, 2013).

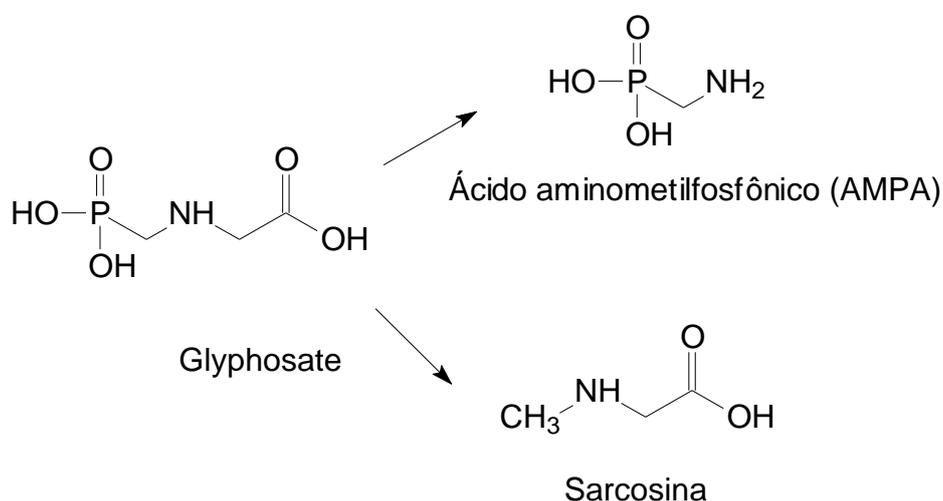


Figura 1.1. Esquema de degradação do glyphosate com a produção de ácido aminometilfosfônico (AMPA) e sarcosina (KRYUCHKOVA *et al.*, 2013).

O glyphosate (GLY) tem sido mundialmente utilizado em diferentes culturas, entretanto seu potencial risco toxicológico para a saúde humana (GUO, CAI & YANG, 2005) e crescente contaminação ambiental (KHROLENKO & WIECZOREK, 2005) têm demonstrado a necessidade de desenvolver metodologias simples, rápidas e sensíveis para monitorar resíduos de GLY e seus metabólitos no ambiente (GUO, CAI & YANG, 2005). Alguns técnicas têm sido utilizadas, incluindo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (KHROLENKO *et al.*, 2005; QIAN *et al.*, 2009), eletroforese capilar (CE) (CHIU *et al.*, 2008) e espectrofotometria na região visível.

Dentre as técnicas propostas, as cromatográficas são frequentemente utilizados por apresentarem alta seletividade e sensibilidade (HANKE, SINGER & HOLLENDER, 2008), Entretanto, a ausência de grupos cromóforos ou fluoróforos (QIAN *et al.*, 2009) e a baixa volatilidade das moléculas de GLY e AMPA dificultam a determinação destes analitos (DRUART *et al.*, 2011), necessitando da utilização de técnicas de derivatização (pré ou pós-coluna) (CHIU *et al.*, 2008).

O procedimento de derivatização consiste em modificar quimicamente um composto, de modo a aumentar a sensibilidade e/ou torná-lo volatilizável (SCHUMMER *et al.*, 2009). Nas análises por cromatografia gasosa, substâncias contendo os grupos funcionais -OH e -NH, como o GLY e o AMPA, podem formar ligações de hidrogênio entre si e/ou com componentes da matriz, dificultado sua volatilização (SCHUMMER *et al.*, 2009). Dessa forma, alguns reagentes podem ser utilizados para reduzir a polaridade do composto substituindo hidrogênios lábeis por grupos alifáticos (SCHUMMER *et al.*, 2009). Dentre os reagentes, *N*-metil-*N*-*tert*-butildimetilsililfluoracetamida (MTBSTFA) (MOTOJYUKU *et al.*, 2008), anidrido trifluoroacético (TFAA) e trifluoroetanol (TFE) (SOUZA *et al.*, 2006) têm sido empregados para a derivatização do GLY.

O *N*-O-(bistrimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) combinado com o trimetilclorosilano (TMCS) é preferencialmente empregado para promover a trimetilsililação de álcoois, aminas, ácidos carboxílicos, dentre outros. Sendo uma alternativa para a análise de compostos de baixa volatilidade por cromatografia gasosa, pois a combinação destes compostos favorece a substituição dos grupos amina e fosfonato susceptíveis de serem encontrados nas estruturas do GLY e AMPA. Já que o TMCS atua como um catalisador, aumentando a força do doador silil (BSTFA) e garantindo maior eficiência para a reação. Contudo, poucos relatos têm sido encontrados na literatura a respeito da derivatização do GLY e AMPA utilizando esta combinação de reagentes.

Com este estudo, buscou-se desenvolver e otimizar uma técnica de derivatização a partir da sililação do GLY e AMPA utilizando uma combinação de BSTFA e TMCS e análises por cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massas (CG-EM).

1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1. Reagentes

Soluções padrão estoque de GLY (99,2 % m/m) e AMPA (99,0 % m/m) obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) foram preparadas em água deionizada com concentração de 500 mg L⁻¹ e armazenadas a 4 °C. Soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque nas concentrações de 15 e 50 mg L⁻¹ no mesmo solvente.

Como solventes utilizou-se piridina (99,8 % v/v) e *N*-O-(bistrimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) com 1 % TMCS, ambos obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Hidróxido de sódio com grau de pureza superior a 97 % m/m (Dinâmica, Brasil) e ácido clorídrico (37 % v/v) adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

1.2.2. Instrumentação

Para as análises cromatográficas foi utilizado cromatógrafo a gás Agilent Technologies (GC 7890A), acoplado a um espectrômetro de massas (MS 5975). Utilizou-se coluna capilar DB-5 MS (Agilent Technologies, fase estacionária 5% fenil e 95% metilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm espessura do filme). Hélio (99,9999 %) foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 3,0 mL min⁻¹. O injetor foi mantido a 280 °C. O sistema inicialmente a 100 °C, aumentou a temperatura com uma taxa de 8 °C min⁻¹ até 300 °C. O volume da amostra introduzido foi de 1 µL no modo de injeção sem divisão de fluxo, *splitless*, utilizando um injetor Combi PAL. O espectrômetro de massas foi operado com ionização por elétrons a 70 eV e um analisador de massas tipo quadrupolo, operado no modo monitoramento de íons seletivos (MIS) (*m/z* 232, 312 e 340 para o GLY e *m/z* 102, 298 e 312 para o AMPA). A interface foi mantida a 300 °C e a fonte de íons a 280 °C.

1.2.3. Preparo da amostra

Os parâmetros otimizados da reação de derivatização do GLY e AMPA são descritos a seguir. Amostras de 10,6 µL da solução padrão de GLY e de AMPA a 15 mg L⁻¹ respectivamente, foram transferidos para *vial* de derivatização (0,3 mL) e submetidos a aquecimento até *secura* (60 °C). Em seguida, adicionou-se 60 µL de piridina e, após cinco

minutos, 100 μL do reagente derivatizante (BSTFA + TMCS 1 %). A mistura foi aquecida a 60 °C por 30 minutos, previamente a análise por CG-EM.

1.2.4. Parâmetros otimizados

Para otimizar a reação de derivatização, os seguintes parâmetros foram avaliados: composição do meio reacional, homogeneização, volume de BSTFA:Piridina e pH do meio reacional conforme observa-se na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Variáveis avaliadas na otimização da reação de derivatização de GLY e AMPA.

Variáveis independentes	Níveis
Composição do meio reacional (v/v)	Acetonitrila/BSTFA; Piridina/BSTFA.
Vibração ultrassônica (min.)	0 e 2.
Volume BSTFA: Piridina (μL)	20:200; 60:100.
pH do meio reacional	1 e 13.

O pH do meio reacional foi ajustado utilizando-se ácido clorídrico concentrado e soluções de hidróxido de sódio com pH 10 e 13 (0,1 e 1,0 mol L⁻¹ respectivamente). Os valores de pH foram obtidos em peagâmetro micro processado da Quimis (São Paulo, Brasil). As melhores condições foram determinadas com base nos espectros de massa obtidos para os compostos em estudo.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Caracterização estrutural do GLY e AMPA derivatizados

Espectros de massas representativos com os principais íons propostos para GLY e AMPA derivatizados podem ser observados na Figura 1.2. A identificação dos derivados destes compostos foi realizada pela interpretação dos espectros de massas com relação a respectiva massa molecular e ordem de eluição esperadas.

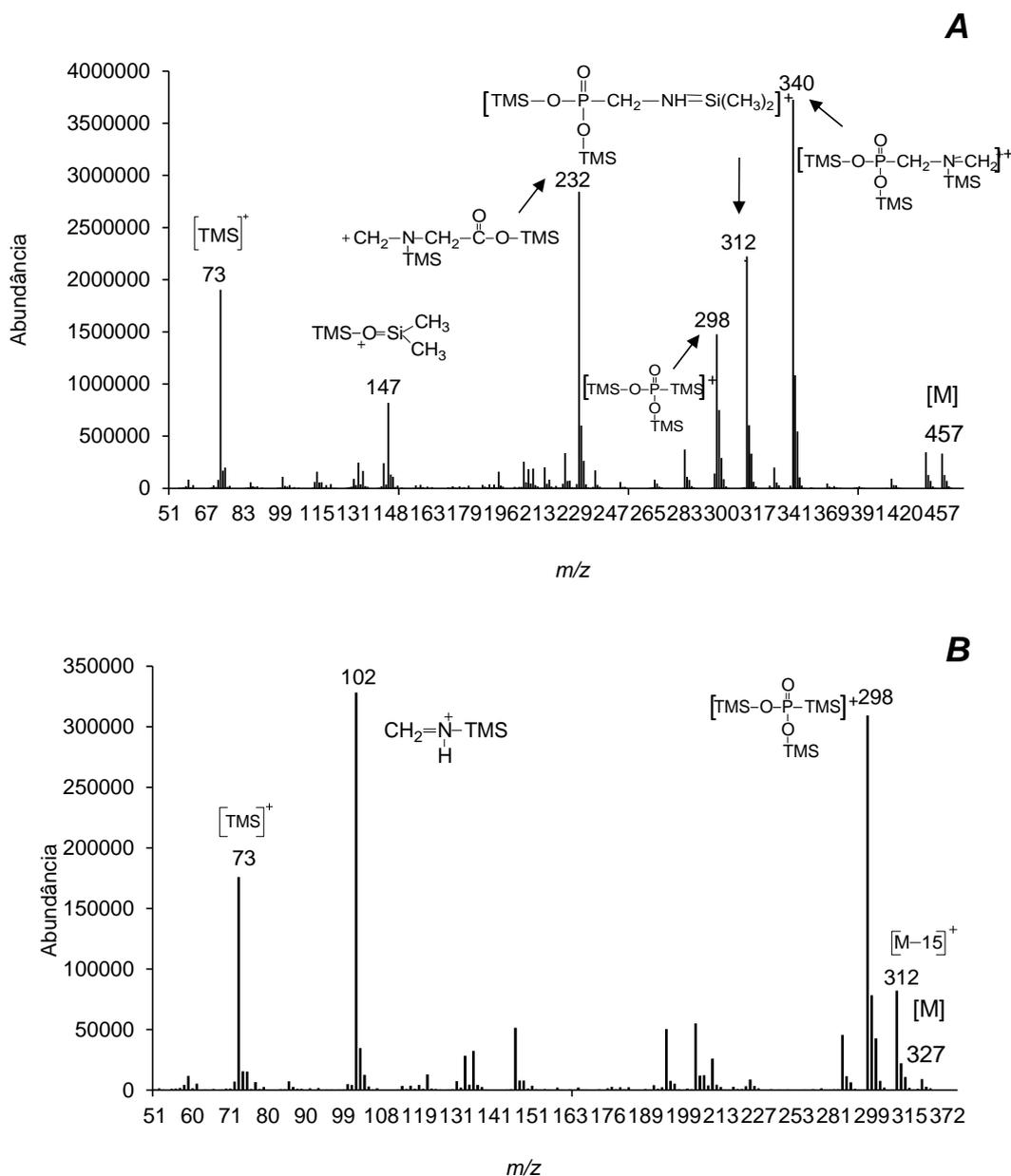


Figura 1.2. Espectros de massa do GLY (A) e AMPA (B) derivatizados com BSTFA.

O espectro de massas para o GLY (Figura 1.2A) após substituição pelos grupos TMS $((\text{CH}_3)_3\text{Si})$ mostrou perfil de fragmentação contendo os principais íons m/z 73 $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$, 147 $[(\text{CH}_3)_3\text{SiOSi}(\text{CH}_3)_2]^+$, 232 $[(\text{CH}_3)_3\text{SiOCOCH}_2\text{N}((\text{CH}_3)_3\text{Si})\text{CH}_2]^+$, 298 $[(\text{CH}_3)_3\text{SiO}(\text{CH}_3)_2\text{PO}(\text{CH}_3)_3\text{Si}]$, 312 $[(\text{CH}_3)_3\text{SiOPOO}((\text{CH}_3)_3\text{Si})\text{CH}_2\text{NH}(\text{Si}(\text{CH}_3)_2)]^+$ e 340 $[(\text{CH}_3)_3\text{SiO}(\text{CH}_3)_2\text{POCH}_2\text{N}((\text{CH}_3)_3\text{Si})\text{CH}_2]^+$. O pico em m/z 73 representa o íon formado pelo grupo trimetilsilano. Os picos em m/z 147, 232, 298, 312 e 340 são produtos de clivagens e rearranjos da estrutura do GLY após a derivatização e impacto de elétrons a 70 eV. Dentre os

principais íons obtidos para o GLY, os picos em m/z 232, 312 e 340 foram selecionados para o monitoramento de íons seletivo (SIM) por apresentarem maior abundância.

Para o AMPA derivatizado, verifica-se os seguintes fragmentos iônicos comuns em m/z 73 $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$, 102 $[(\text{CH}_3)_3\text{SiNHCH}_2]^+$, 298 $[((\text{CH}_3)_3\text{SiO})_2\text{PO}(\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$, 312 $[(\text{CH}_3)_3\text{SiOPOO}((\text{CH}_3)_3\text{Si})\text{CH}_2\text{NH}(\text{Si}(\text{CH}_3)_2)]^+$. Estes íons também foram propostos por Ngim e colaboradores (2011) ao otimizar procedimento para caracterizar impurezas em AMPA utilizando o analito em estado sólido e análises por CG-EM.

1.3.2. Desenvolvimento e otimização do procedimento de sililação

1.3.2.1. Composição do meio reacional

Para favorecer a reação de derivatização com BSTFA, foi adicionado base ao meio. Neste estudo, utilizou-se acetonitrila e piridina, sendo o último mais frequentemente selecionado em reações de derivatização para análises por CG (PESUTO *et al.*, 2009; SILVA, SILVA & DRUZIAN, 2010). Os cromatogramas obtidos ao se utilizar regente basificante:BSTFA na proporção 20:200 μL podem ser observados na Figura 1.3.

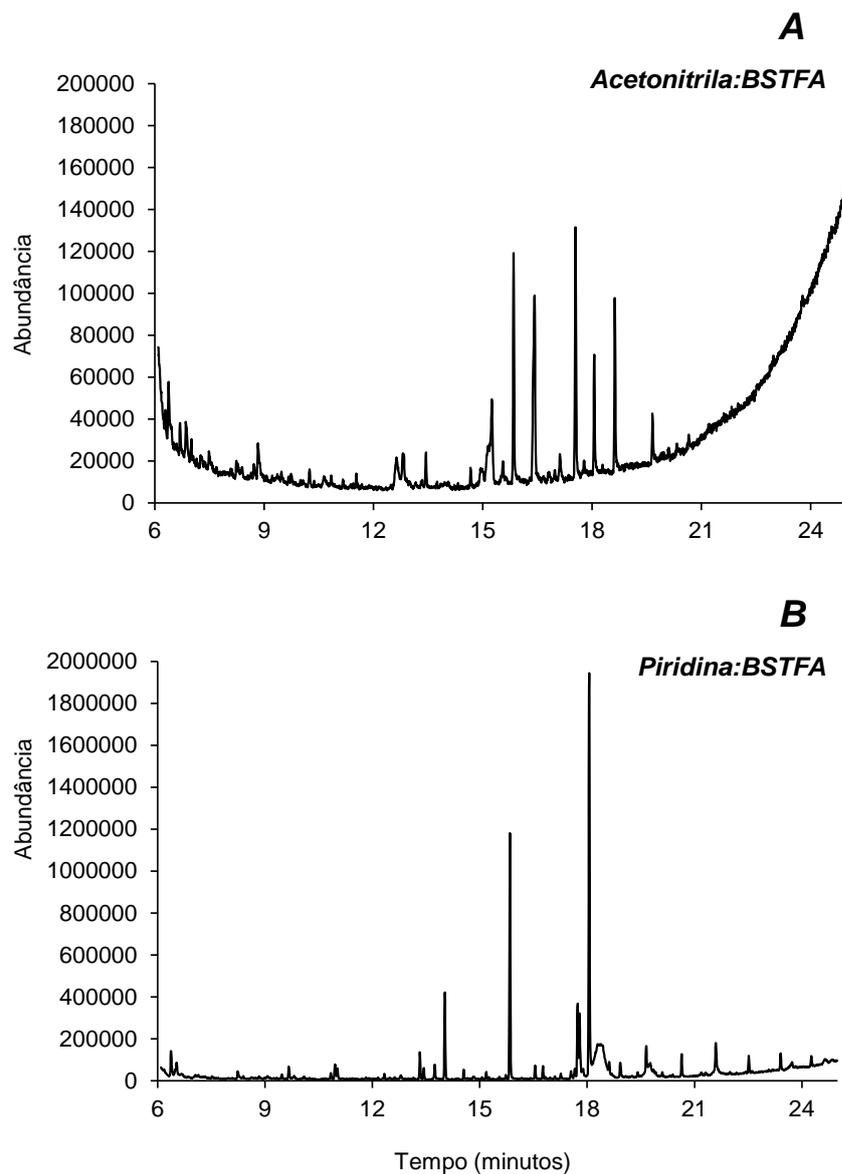


Figura 1.3. Parte do cromatograma da solução de GLY e AMPA 1 mg L^{-1} obtido ao empregar reagente basificante:BSTFA na proporção 20:200 μL (acetonitrila (A) e piridina (B)).

Nos cromatogramas obtidos não se observa sinal dos compostos em estudo. Contudo este foi o primeiro parâmetro avaliado na otimização do método possibilitando observar que a utilização de acetonitrila favoreceu na derivatização de algumas impurezas presentes no meio representadas principalmente pelos compostos entre 12 e 20 min. (Figura 1.3). Já a utilização de piridina proporcionou um cromatograma com menor número de interferentes. Estes resultados diferem dos encontrados para análises de aminoácidos em que a utilização de

acetonitrila favoreceu na derivatização do analito (SHEN *et al.*, 2006). Dessa forma, a combinação piridina e BSTFA foi selecionada para os próximos experimentos.

1.3.2.2. Vibração ultrassônica

As ondas ultrassônicas criam, aumentam e implodem cavidades de vapor e gases em um líquido, promovendo a ativação em reações químicas (GARBELLINI, SALAZAR-BANDA & AVACA, 2008). Este processo gera energia térmica suficiente para favorecer clivagem homolítica dos compostos presentes (GARBELLINI, SALAZAR-BANDA & AVACA, 2008). Para avaliar este parâmetro, utilizou-se banho ultrassônico e dois minutos como tempo de vibração ultrassônica como se observa na Figura 1.4.

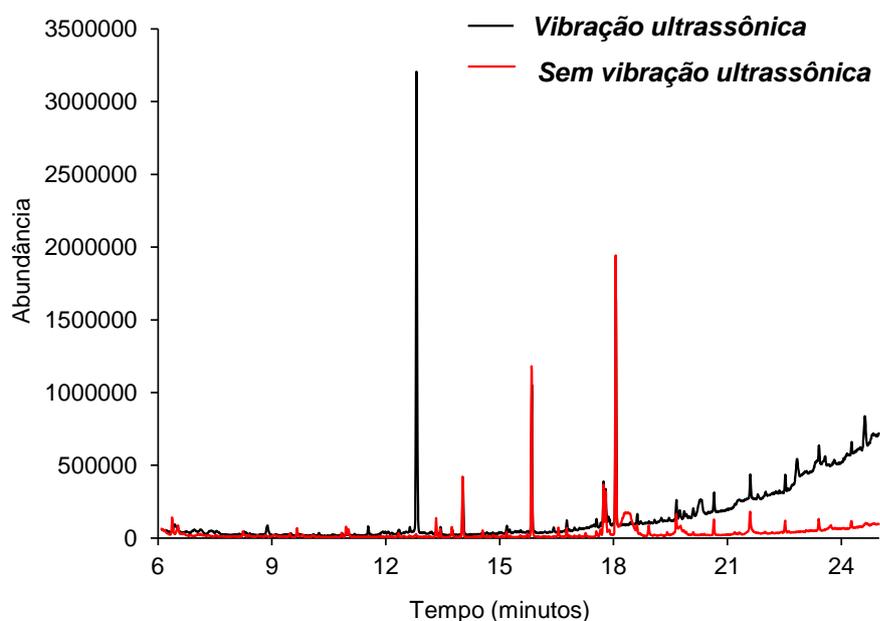


Figura 1.4. Parte do cromatograma da solução de GLY e AMPA 1 mg L^{-1} com e sem vibração ultrassônica.

Os cromatogramas obtidos demonstraram que as vibrações ultrassônicas não favoreceram na derivatização dos analitos. Isso ocorre porque durante o processo de cavitação, algumas espécies radiculares podem ser formadas (GARBELLINI, SALAZAR-BANDA & AVACA, 2008) interferindo negativamente no processo de derivatização. Contudo, este resultado diverge do encontrado para a derivatização com BSTFA de ácido

carboxílico em que a homogeneização com ultrassom favoreceu em 14 % na resposta cromatográfica (PRATA, EMÍDIO & DOREA, 2012).

1.3.2.3. Volume BSTFA: Piridina

A relação entre o volume do reagente basificante (Piridina) e do reagente derivatizante (BSTFA) também foi avaliada e os resultados podem ser verificados na Figura 1.5.

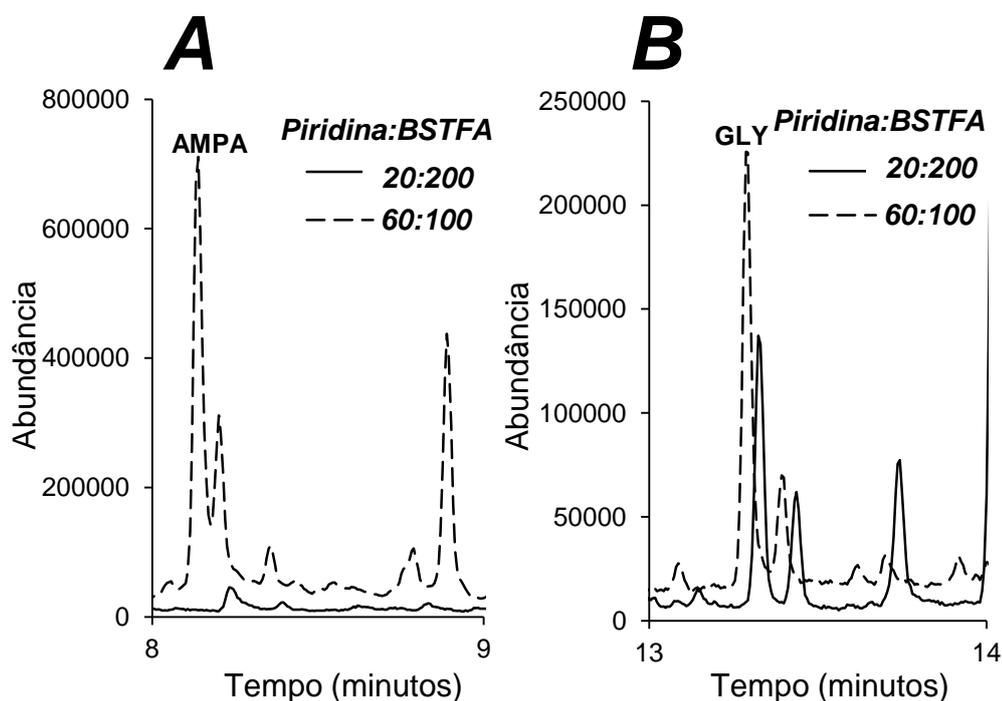


Figura 1.5. Parte do cromatograma da solução de AMPA (A) e GLY (B) 1 mg L⁻¹ usando diferentes volumes de reagente basificante (Piridina) e reagente derivatizante (BSTFA) nas proporções 20:200 e 60:100 μ L.

Menores volumes de piridina (20 μ L) não foram suficientes para basificar o meio e favorecer a reação de derivatização (Figura 1.5). Observa-se que a reação de derivatização apenas foi promovida ao se utilizar proporção piridina:BSTFA 60:100 μ L. Nestas condições o AMPA em 8.2 min. e o GLY eluiu em 13.4 min. Esta proporção também tem tido eficiência para a derivatização de extratos vegetais com piridina e BSTFA (RODRIGUES *et al.*, 2010).

1.3.2.4. pH do meio reacional

O GLY possui equilíbrios químicos secundários tendo sua estrutura alterada de diversas formas em determinado pH do meio (COUTINHO & MAZO, 2005). Neste trabalho, utilizou-se pH 1,00 para garantir completa protonação da molécula e pH 13,0 promovendo total desprotonação da mesma.

A utilização de meio ácido não favoreceu a derivatização dos analitos e nenhum sinal correspondente aos compostos foi observado nos cromatogramas obtidos. Ao utilizar meio básico, ocorreu derivatização do GLY, entretanto, o sinal obtido apresentou menor intensidade e nesta condição a derivatização do AMPA não foi favorecida (Figura 1.6). Dessa forma, a etapa de ajuste do pH do meio reacional não foi inserida na metodologia otimizada.

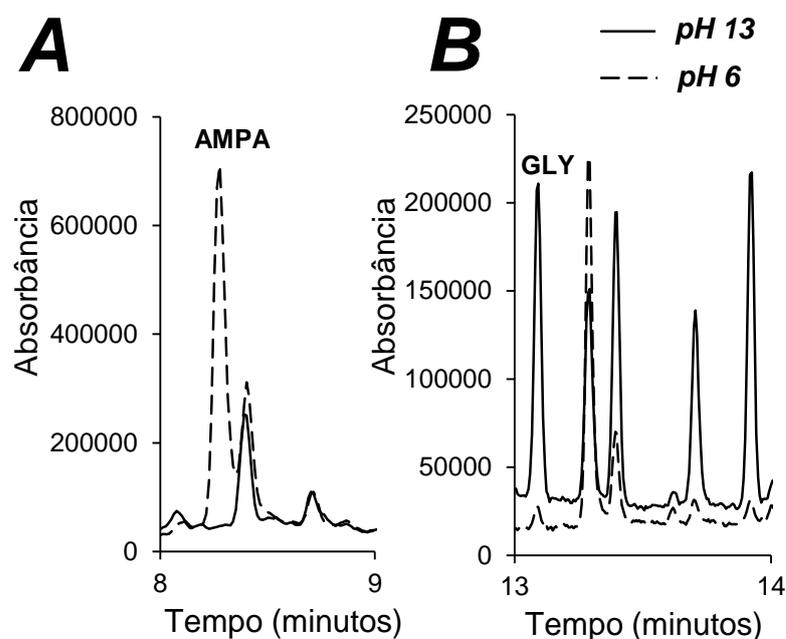


Figura 1.6. Parte do cromatograma da solução de AMPA (A) e GLY (B) 1 mg L⁻¹ obtido ao empregar meio básico (pH 13) e sem ajuste de pH (pH 6).

1.4. Conclusões

A otimização da técnica de derivatização do GLY e AMPA resultou em uma metodologia simples e rápida para a análise destes compostos por CG-EM. Foi observado que o processo de derivatização ocorreu mais favoravelmente ao se utilizar piridina:BSTFA nas

proporções 60:100 μL , respectivamente, sem a necessidade de adicionar etapas para vibração ultrassônica ou ajuste do pH do meio reacional.

1.5. Referências

CHEN, M-X.; CAO, Z-Y. JIANG, Y.; ZHU, Z-W. Direct Determination of Glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1272, p. 90-99, 2013.

CHIU, H-Y.; LIN, Z-Y.; TU, H-L.; WHANG, C-W. Analysis of Glyphosate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, p. 195-198, 2008.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida Glyphosate: revisão. **Química Nova**, v. 28, p. 1038-1045, 2005.

DRUART, C.; DELHOMME, O.; VAUFLEUTY, A.; NTCHO, E.; MILLET, M. Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of Glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 1725-1732, 2011.

GARBELLINI, G. S.; SALAZAR-BANDA, G. R.; AVACA, L. A. Aplicação do ultra-som em sistemas eletroquímicos: considerações teóricas e experimentais. **Química Nova**, v. 31, p. 123-133, 2008.

GUO, Z-X.; CAI, Q.; YANG, Z. Determination of Glyphosate and phosphate in water by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, p. 160-167, 2005.

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

KHROLENKO, M. V.; WIECZOREK, P. P. Determination of Glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with *p*-toluenesulphonyl chloride. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, p. 111-117, 2005.

KRYUCHKOVA, Y. V.; BURYGIN, G. L.; GOGOLEVA, N. E.; GOGOLEV, Y. V.; CHERNYSHOVA, M. P.; MAKAROV, O. E.; FEDOROV, E. E.; TURKOVSKAYA, O. V. Isolation and characterization of a Glyphosate-degrading rhizosphere stain, *Enterobacter cloacae* K7. **Microbiological Research**, 2013 (*In Press*)

LI, B.; DENG, X.; GUO, D.; JIN, S. Determination of Glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in foods using high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 25, p. 486-490, 2007.

MOTOJYUKU, M.; SAITO, T.; AKIEDA, K.; OTSUKA, H.; YAMAMOTO, I.; INOKUCHI, S. Determination of Glyphosate, Glyphosate metabolites, and glufosinate in

human serum by chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 875, p. 509-514, 2008.

NGIM, K. K.; GREEN, J.; CUZZI, J.; OCAMPO, M., GU, Z. Optimized derivatization procedure for characterizing (Aminomethyl)phosphonic acid impurities by GC-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, p. 8-14, 2011.

QIAN, K. Q.; TANG, T.; SHI, T.; WANG, F.; LI, J.; CAO, Y. Residue determination of Glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. **Analytical Chimica Acta**, v. 635, p. 222-226, 2009.

PESSUTO, M. B.; COSTA, I. C.; SOUZA, A. B.; NICOLI, F. M.; MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; LUFTMANN, H. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, v. 32, p. 412-416, 2009.

PRATA, V. M.; EMÍDIO, E. S.; DOREA, H. S. New catalytic ultrasound method for derivatization of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine, with analysis by GC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, p. 625-632, 2012.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A.; DEMUNER, A. J. Prospecção química de compostos produzidos por *Senna alata* com atividade alelopática. **Planta Daninha**, v. 28, p. 1-12, 2010.

SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53-58, 2003.

SHEN, X.; DENG, C.; WANG, B.; DONG, L. Quantification of trimetilsilyl derivatives of amino acid disease biomarkers in neonatal blood samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 931-938, 2006.

SHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B.M.R.; WENNIG, R.; MILLET, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**, v. 77, p. 1473-1482, 2009.

SILVA, J. R.; SILVA, L. T.; DRUZIAN, J. I. Otimização e validação intralaboratorial de método para análise de resíduos de cloranfenicol em leite caprino por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG/DCE). 2010. **Química Nova**, v. 33. p. 90-96.

SOUZA, T. A.; MATTA, M. H. R.; MONTAGNER, É.; ABREU, A. B. G. Estudo de recuperação de Glyphosate e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. **Química Nova**, v. 29, p. 1372-1376, 2006.

CAPÍTULO 2

ESTUDO ESPECTROFOTOMÉTRICO DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DO GLYPHOSATE E AMPA COM CLOROFORMIATO DE 9-FLUORENILMETILA (FMOC-Cl)

RESUMO

Neste estudo buscou-se confirmar a reação de derivatização utilizando cloroformiato de 9-fluorenilmetila e otimizá-la por meio dos estudos da concentração do tampão borato (2, 20 e 200 mmol L⁻¹), concentração do cloroformiato de 9-fluorenilmetila, FMOC-Cl (200 e 500 mg L⁻¹), tempo de homogeneização (5, 10 e 30 minutos), tempo de reação (0, 4 e 8 horas), comprimento de onda (210 e 260 nm) e solvente de lavagem (éter dietílico e acetato de etila). A reação de derivatização foi promovida com sucesso e as condições ótimas foram utilizando tampão 200 mmol L⁻¹, homogeneização por 5 minutos, FMOC-Cl 500 mg L⁻¹, análise imediatamente após a reação e lavagem com éter dietílico.

Palavras-chave: FMOC-Cl; Glyphosate; Derivatização.

**STUDY SPECTROPHOTOMETRIC OF THE DERIVATIZATION REACTIVE OF
GLYPHOSATE AND AMPA WITH CHLOROFORMATE 9-FLUORENYLMETHYL
(FMOC-Cl)**

ABSTRACT

This study sought to confirm the derivatization reaction using 9-chloroformate fluorenylmethyl and optimize it by studies of borate buffer concentration (2, 20 and 200 mmol L⁻¹) concentration of 9, FMOC-Cl (200 and 500 mg L⁻¹) homogenization time (5, 10 and 30 minutes), reaction time (0, 4 and 8 hours), wavelengths (210 and 260 nm) and wash solvent (diethyl ether and ethyl acetate). The derivatization reaction was successfully promoted, and the optimal conditions were buffer 200 mmol L⁻¹, homogenization for 5 minutes, FMOC-Cl 500 mg L⁻¹, analysis immediately after reaction and washing with diethyl ether.

Keywords: FMOC-Cl; Glyphosate; Derivatization.

2.1. INTRODUÇÃO

Herbicidas são substâncias químicas utilizadas nas práticas agrícolas para remover plantas competidoras nos primeiros anos do desenvolvimento de determinada cultura (VEIGA *et al.*, 2001). O uso destes produtos tem aumentado ao longo dos anos devido ao intenso desenvolvimento da agricultura, tornando-se necessário conhecer seu comportamento e efeitos no ambiente (VEIGA *et al.*, 2001). O glyphosate (*N*-fosfometilglicina), GLY, é um herbicida de amplo espectro, usado como princípio ativo do *Roundup*[®] no controle de plantas daninhas (PERUZZO, PORTA & RONCO, 2008). Este herbicida é não seletivo, sistêmico e pós-emergente, representando 60 % do mercado mundial de herbicidas não seletivos (SOUZA *et al.*, 2006). Nos diversos tipos de plantio, é comumente pulverizado, podendo ser absorvido pelas folhas da planta e caulículos novos sendo transloucado para todas as partes da mesma através da rota dos produtos da fotossíntese (AMARANTE JÚNIOR *et al.*, 2002). Em sua via de degradação, ocorre a clivagem das moléculas gerando seu principal metabólito secundário, o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (BERNAL *et al.*, 2012).

O GLY e o AMPA têm sido citados como pouco tóxicos para mamíferos (JAN *et al.*, 2009). Entretanto, seus resíduos altamente solúveis ficam retidos no solo podendo ser transportados para águas superficiais, subterrâneas e serem bioacumulados em animais (GUO, CAI & YANG, 2005). Com o intuito de monitorar a aplicação deste herbicida, alguns órgãos reguladores estabeleceram limites máximos desses resíduos no meio ambiente (AMARANTE JÚNIOR *et al.*, 2002). Dessa forma, métodos analíticos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), estão sendo desenvolvidos a fim de quantificá-los em amostras ambientais (DRUART *et al.*, 2011).

Nos sistemas de detecção convencionais, como detector por UV-Visível, é necessário que a molécula apresente características detectáveis, como a presença de grupos cromóforos (QIAN *et al.*, 2009). Entretanto, as moléculas de GLY e AMPA apresentam-se com baixa volatilidade e ausência de grupos cromóforos (CHEN *et al.*, 2013), dificultando sua detecção por cromatografia gasosa (CG) e análises espectrofotométricas no ultravioleta (UV) (KHROLENKO & WIECZOREK, 2005). Dessa forma, faz-se necessário realizar uma reação de derivatização para tornar esses compostos sensíveis às análises.

A derivatização é um processo químico que gera novos produtos com melhores propriedades cromatográficas (SHUMMER *et al.*, 2009). A derivatização do GLY e AMPA pode ser evidenciada tanto para análises por CG, UV-Vis ou outros métodos. A análise por

cromatografia líquida (CL) é preferível devido ao caráter iônico do composto em estudo (QIAN *et al.*, 2009). Além disso, análises por CG demandam de grande tempo e maior manipulação da amostra (IBANEZ *et al.*, 2005). A derivatização empregada para CL pode ser pré-coluna ou pós-coluna (PATSIAS, PAPADOPOULOU & PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, 2001). O método pré-coluna mais empregado é a reação com o agente derivatizante cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) (AULING *et al.*, 2009), cujos produtos formados podem ser observados na Figura 2.1.

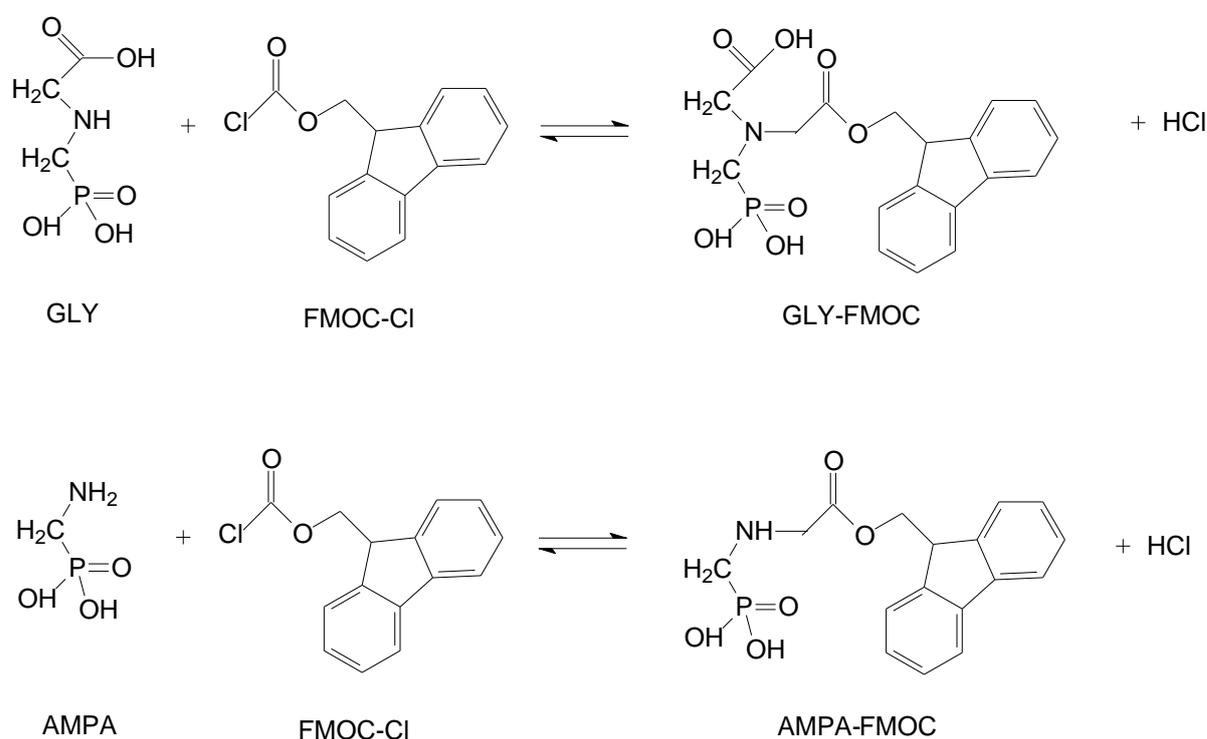


Figura 2.1. Reação de derivatização do GLY e AMPA utilizando FMOC-Cl, evidenciando os compostos formados para detecção, após emprego do método pré-coluna (BERNAL *et al.*, 2012).

No processo, ocorre substituição do átomo de hidrogênio do grupo amina presente nas moléculas do GLY e AMPA por anéis aromáticos contendo duplas alternadas (BERNAL *et al.*, 2012). Dessa forma, com este estudo, buscou-se otimizar uma técnica rápida, fácil e eficiente para derivatização de GLY e AMPA utilizando FMOC-Cl e análises por espectrofotometria UV-Vis.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Reagentes

Soluções padrão estoque de GLY (99,2 % m/m) e AMPA (99,0 % m/m) obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) foram preparadas em água deionizada com concentração de 500 mg L⁻¹ e armazenadas a 4 °C. Soluções de trabalho individuais foram preparadas a partir da solução estoque na concentração de 50 mg L⁻¹ no mesmo solvente.

Como solventes utilizou-se acetonitrila grau HPLC obtida da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Como agente derivatizante utilizou-se cloroformiato de 9-fluorenilmetil (FMOC-Cl) (97% m/m) obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Borato de sódio (99% m/m) obtido de QM (São Paulo, Brasil) também foi utilizado.

2.2.2. Instrumentação

O espectro de absorção das amostras foi obtido por análises em espectrofotômetro UV-Visível Cary 60 (Agilent, Austrália) com leituras na região de 190 a 340 nm.

2.2.3. Reação de derivatização

Para garantir que a metodologia de derivatização proposta gere informações confiáveis, fez-se necessário confirmar se durante o processo está ocorrendo a derivatização dos compostos em estudo. Os seguintes experimentos foram realizados conforme a metodologia que segue: o meio reacional foi transferido para balão de fundo redondo (25 mL) e homogeneizados no vórtex por 30 minutos. O extrato obtido foi lavado com 7,50 mL de éter dietílico (duas vezes) e 750 µL do derivatizado foi diluído em 2,25 mL do tampão borato e analisados por espectrômetro UV-Vis logo em seguida.

1) Absorção do FMOC-Cl: solução de FMOC-Cl a 50 mg L⁻¹ preparada em acetonitrila foi analisada no ultravioleta.

2) Absorção do FMOC-Cl em meio reacional sem GLY: preparou-se derivatização do meio reacional composto por 3,750 mL de água deionizada, 1,875 mL de tampão borato e 3,750 mL de FMOC-Cl 500 mg L⁻¹ em acetonitrila.

3) **Absorção do GLY em meio reacional sem FMOC-Cl:** preparou-se derivatização do meio reacional composto por 3,750 mL de GLY 500 mg L⁻¹ em água deionizada, 1,875 mL de tampão borato e 3,750 mL de acetonitrila.

4) **Absorção do GLY em meio reacional com FMOC-Cl:** preparou-se derivatização do meio reacional composto por 3,750 mL de GLY 500 mg L⁻¹ em água deionizada, 1,875 mL de tampão borato e 3,750 mL de FMOC-Cl 500 mg L⁻¹ em acetonitrila.

2.2.4. Variáveis avaliadas para a reação de derivatização

As variáveis avaliadas para a derivatização são apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Parâmetros avaliados na otimização univariada da derivatização de GLY e AMPA.

Variáveis	Níveis
Concentração do tampão (mmol L ⁻¹)	2, 20 e 200
Concentração de FMOC-Cl (mg L ⁻¹)	200 e 500
Tempo de homogeneização (min.)	5, 10 e 30
Tempo de reação (h após reação)	0, 4 e 8
Comprimento de onda (nm)	210 e 260
Solvente de lavagem	Éter dietílico e acetato de etila

Em balão de fundo redondo de 25 mL, 3,750 mL solução padrão de GLY 500 mg L⁻¹, 1,875 mL de tampão borato de sódio e 3,750 mL de solução de FMOC-Cl em acetonitrila foram adicionados nesta ordem e submetidos a homogeneização em vórtex. Para remover o excesso do agente derivatizante (FMOC-Cl) foram realizadas duas lavagens sucessivas utilizando solvente orgânico. Após esta etapa, 750 µL da amostra obtida foi diluída em 2,250 mL do tampão borato de sódio e analisada por espectrofotômetro UV-Visível. As melhores condições foram determinadas de acordo as absorbâncias encontradas nos espectros do UV-Vis.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma eficiente reação de derivatização do GLY e AMPA é necessária devido às características moleculares destes compostos que diminuem sua sensibilidade a técnicas analíticas como cromatografia gasosa e análises por UV-Vis (QIAN *et al.*, 2009). A reação de derivatização utilizando FMOC-Cl é uma alternativa devido a elevada sensibilidade deste composto a região do ultravioleta. Durante o estudo, a eficiência da derivatização foi comprovada e parâmetros para aumentar a sensibilidade foram avaliados conforme resultados a seguir.

2.3.1. Espectro no UV-visível do GLY-FMOC

Para confirmar o sucesso da reação de derivatização, alguns procedimentos foram realizados e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 2.2.

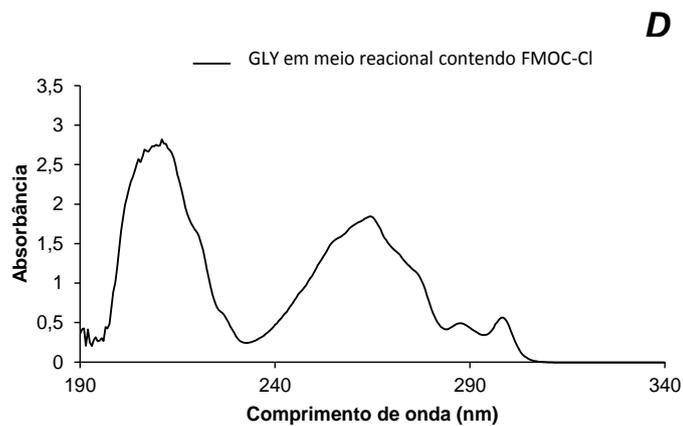
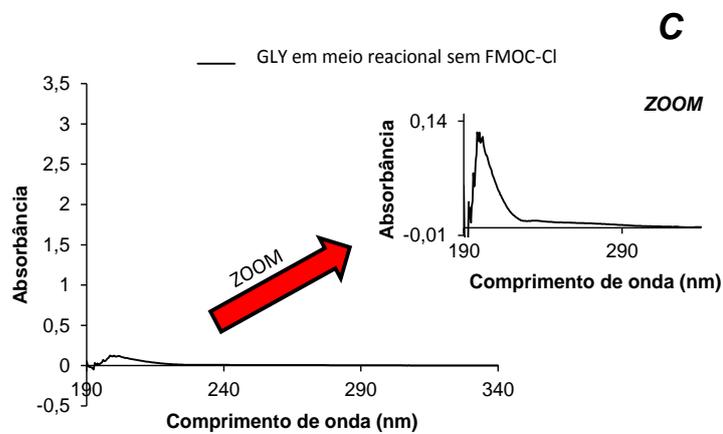
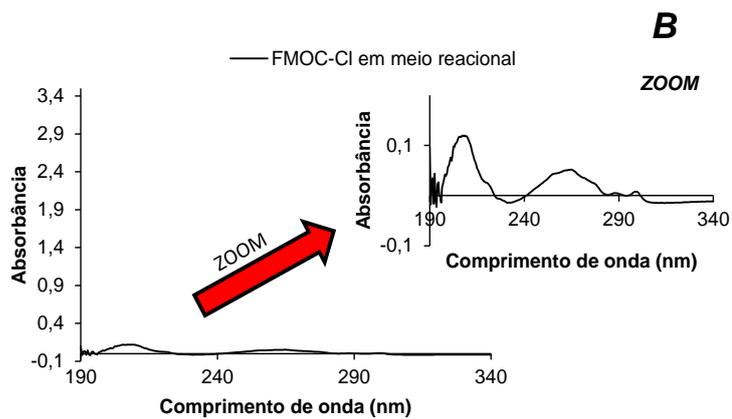
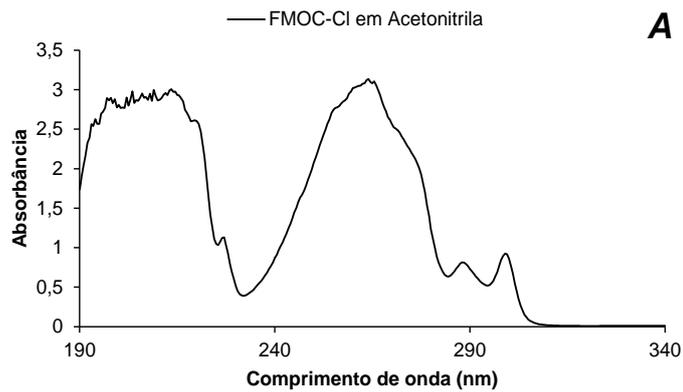


Figura 2.2. Espectros de absorção no ultravioleta do A) FMOC-Cl 50 mg L⁻¹ em acetonitrila; B) FMOC-Cl em meio reacional; C) GLY em meio reacional; D) GLY em meio reacional contendo FMOC-Cl.

Ao avaliar os resultados obtidos, verifica-se que o FMOC-Cl em solvente puro apresenta acentuada absorção no UV-Vis (Figura 2.2A). Observa-se que a solução de 50 mg L⁻¹ originou em um espectro contendo duas regiões de maior absorbância (210 e 260 nm). Com o estudo da absorção do FMOC-Cl em meio reacional sem os analitos (GLY e AMPA) observou-se mesmo perfil de sinais para o FMOC-Cl em solvente puro, entretanto sua absorbância máxima (em 210 nm) ficou em torno de 0,1 (Figura 2.2B). A diminuição significativa na absorbância do FMOC-Cl ocorreu devido à lavagem com solvente orgânico (éter dietílico) que promoveu a remoção do excesso deste composto. Neste caso, provavelmente todo o FMOC-Cl adicionado foi removido durante o processo.

A molécula de GLY possui ligações C=O e P=O que ocasionam em pequena absorção no ultravioleta. Dessa forma, observou-se absorção de ~0,1 ao se analisar a absorção de GLY em meio reacional (Figura 2.2C). Estes resultados indicam que os outros componentes do meio reacional não influenciam na absorção deste e confirmam a necessidade de derivatização da molécula de GLYphosate para aumentar a sensibilidade a técnicas analíticas como o UV-Vis.

Já para a análise do GLY em meio reacional contendo FMOC-Cl observa-se um espectro com mesmo perfil de absorção obtido para o FMOC-Cl em solvente puro (Figura 2.2D). Esta análise confirma que o FMOC-Cl reage com as moléculas de GLY, gerando um composto com menor caráter hidrofóbico. Dessa forma, durante a lavagem com solvente orgânico apenas o excesso de FMOC-Cl (aquele que não reagiu com moléculas de GLY) é retirado na lavagem e o composto FMOC-GLY mantém-se no meio gerando o perfil de absorção característico do FMOC-Cl.

2.3.2. Otimização da derivatização

2.3.2.1. Efeito da concentração da solução de tampão borato

Para verificar se a concentração de tampão borato no meio reacional interfere diretamente na reação de derivatização, três concentrações de tampão borato (2, 20 e 200 mmol L⁻¹) foram avaliadas e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 2.3.

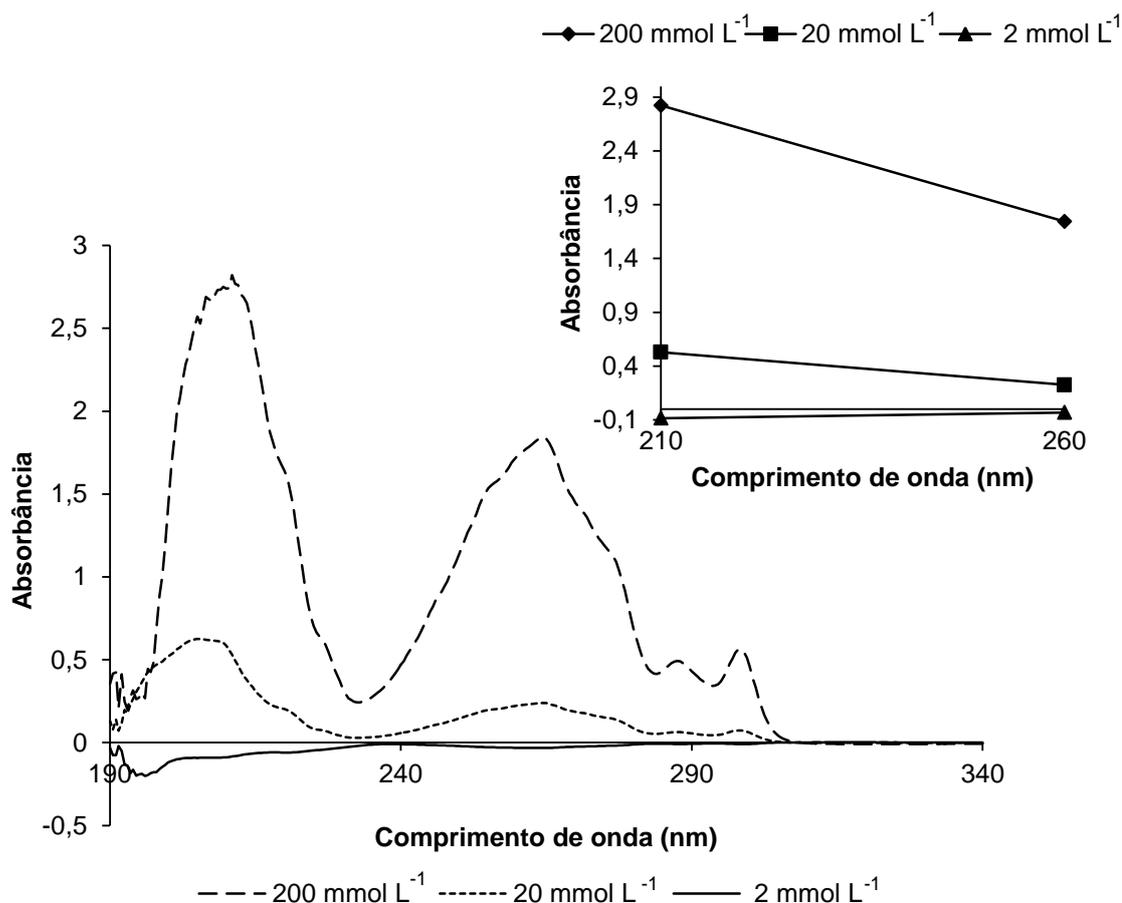


Figura 2.3. Espectros no ultravioleta da solução de GLY 10 mg L⁻¹ derivatizada com FMOC-Cl em diferentes concentrações de tampão borato de sódio. A figura inserida mostra a absorção em 210 e 260 nm. As análises espectrofotométricas realizadas no modo *SCAN* demonstraram que há maior absorção dos compostos em 210 e 260 nm.

Observa-se que em menores concentrações (2 mmol L⁻¹) a reação de derivatização não foi provida (Figura 2.3). Contudo, a resposta do instrumento foi elevada com o aumento da concentração do tampão borato. Concentração de 20 mmol L⁻¹ apresentou absorção máxima (260 nm) de ~0,5, enquanto que a 200 mmol L⁻¹ ~3 foi obtido como absorbância. Verifica-se

que o aumento da concentração de tampão no meio promove a reatividade da função amina e estabiliza a solubilidade do reagente derivatizante em acetonitrila (GHANEN *et al*, 2007) favorecendo o processo de derivatização. Dessa forma solução de borato de sódio a 200 mmol L⁻¹ foi selecionada para testes posteriores.

2.3.2.2. Efeito da concentração da solução de FMOC-Cl

A proporção estequiométrica ótima entre o analito e o reagente derivatizante garante efetiva formação do produto derivatizado (NEDELKOSKA & LOW, 2004). Estudos anteriores indicaram que a proporção 1:1 não foi efetiva para a reação (NEDELKOSKA & LOW, 2004). Dessa forma, neste estudo foi utilizado FMOC-Cl a 200 e 500 mg L⁻¹, representando as proporções de 1:2 e 1:5 para o analito e o FMOC-Cl, respectivamente.

O comportamento espectral das proporções utilizadas pode ser observado na Figura 2.4, que apresenta também uma figura mostrando a queda da absorção com o aumento do comprimento de onda nas proporções 1:2 e 1:5 de GLY:FMOC-Cl.

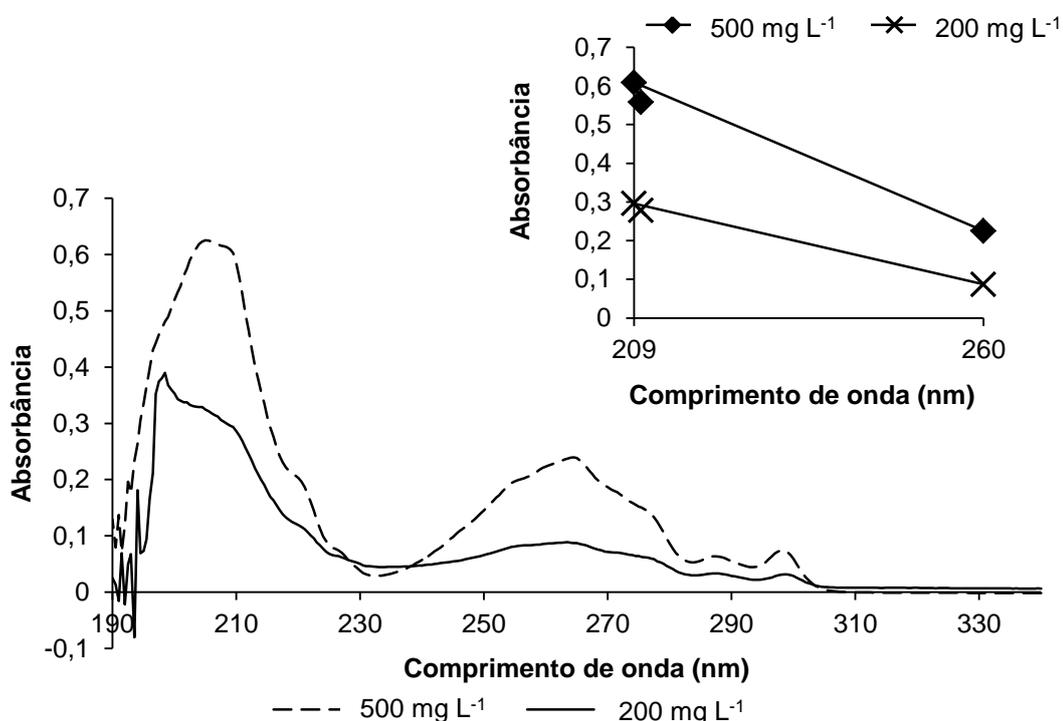


Figura 2.4. Espectros no ultravioleta da solução GLY a 10 mg L⁻¹ derivatizada com FMOC-Cl em diferentes concentrações. A figura inserida mostra a absorção em 209, 210 e 260 nm.

Pelos resultados obtidos verificou-se que maior proporção de agente derivatizante (1:5) aumentou a absorção máxima (210 nm) em 40 % (Figura 2.4). Em altas concentrações, o excesso do agente derivatizante adicionado, que se converte em FMOC-OH, não interfere intensivamente nas análises, pois o excesso é removido do sistema utilizando extração com solventes orgânicos (NEDELKOSKA & LOW, 2004). Já para menores concentrações do reagente derivatizante a detecção dos analitos torna-se mais frágil (BERNAL *et al.*, 2012) (Figura 2.4) uma vez que a menor concentração de moléculas diminui a probabilidade de ocorrer a reação. Sendo assim, a concentração de 500 mg L⁻¹ mostrou-se mais eficiente neste trabalho.

2.3.2.3. Efeito do tempo de homogeneização

A homogeneização proporciona maior interação do analito com o reagente derivatizante. Entretanto, elevados tempos podem tornar o procedimento demorado. Neste estudo, os tempos de 5, 10 e 30 minutos foram estudados conforme se observa na Figura 2.5A.

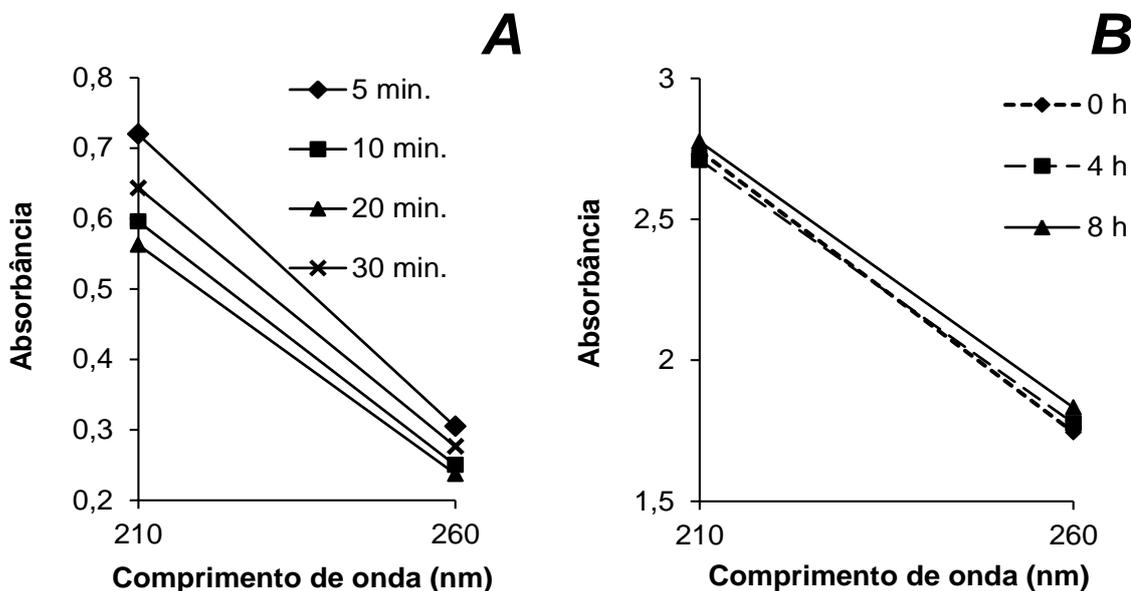


Figura 2.5. Espectros no ultravioleta da solução GLY a 10 mg L⁻¹ derivatizada com FMOC-Cl em diferentes tempos de homogeneização (A) e diferentes tempos de reação (B).

Maiores tempos de homogeneização não proporcionaram aumento significativo do produto derivatizado, GLY-FMOC (Figura 2.5A). Absorção máxima (0,7) foi obtida para o produto derivatizado com homogeneização por cinco minutos (Figura 2.5A). Dessa forma, cinco minutos foram selecionados por garantir uma metodologia eficiente e rápida.

2.3.2.4. Efeito do tempo de reação

O tempo de reação é definitivo para garantir a derivatização pois neste período de tempo ocorre a substituição do cloro presente na estrutura do FMOC-Cl pela molécula do GLYphosate. Entretanto, estudos da literatura indicam tempos de 4 a 24 h, não havendo padronização (LI *et al.*, 2007; PERUZZO *et al.*, 2008). Dessa forma, os tempos de 0, 4 e 8 horas foram avaliados e os resultados encontram-se na Figura 2.5B.

A análise espectrofotométrica imediatamente após a reação (0 min.), quatro e oito horas após o processo demonstrou que não ocorreu variação nas absorbâncias obtidas em função dos diferentes tempos (Figura 2.5B). Portanto, conclui-se que a reação é cessada imediatamente após a homogeneização e, dessa forma, análises imediatamente após o procedimento foram realizadas.

2.3.2.5. Efeito do solvente de lavagem

Para diminuir o excesso de FMOC-Cl na amostra foram feitas duas lavagens sucessivas com solvente orgânico, sendo utilizados o éter dietílico e o acetato de etila. A Figura 2.6 apresenta os resultados obtidos.

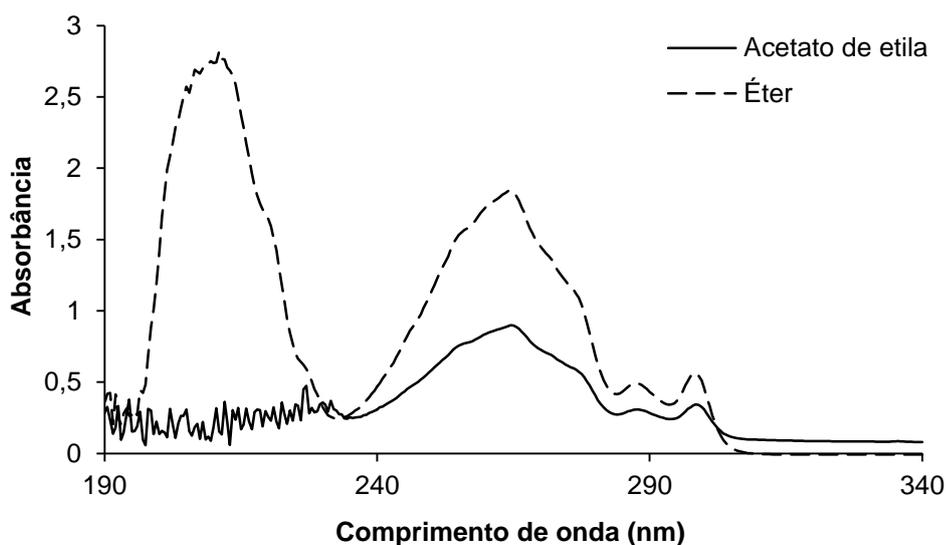


Figura 2.6. Espectros no ultravioleta da solução de GLY a 10 mg L^{-1} derivatizado com FMOC-Cl e submetido a diferentes solventes de lavagem.

Pela Figura 2.6, análises no UV-visível indicaram que ao se utilizar éter dietílico o espectro apresenta duas regiões de maior absorbância (210 e 260 nm), já o acetato de etila origina em um espectro com apenas um sinal de maior absorbância (260). Os sinais em mesmo comprimento de onda apresentaram diferenças na absorção (Figura 2.6). Observa-se que o composto resultante após a lavagem com éter apresentou maior absorção sendo este selecionado como solvente para lavagem, neste estudo.

2.4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, a técnica de derivatização foi otimizada com sucesso para análises de GLY e AMPA por espectrometria no ultravioleta. As condições ótimas foram homogeneização em vórtex (5 min.) utilizando tampão borato a 200 mmol L^{-1} e FMOC-Cl a 500 mg L^{-1} . A reação foi cessada imediatamente após a lavagem com éter dietílico e o comprimento de onda ideal para as análises é de 260 nm.

A confirmação da derivatização apresentou resultados satisfatórios e mostrou que a reação foi de fato promovida.

A otimização da derivatização utilizando FMOC-Cl resultou em um método simples, eficaz e mais rápido. As condições foram otimizadas e confirmadas pelo espectrofotômetro no UV-Visível.

2.5. REFERÊNCIAS

AMARANTE JÚNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. GLYphosate: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação. **Química Nova**, v. 25, p. 589-593, 2002.

AULING, R. Development of LC-MS Method for Determination of Glyphosate Residues in Wheat. Masther's thesis. University of Tartu.Tartu, 2009.

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

CATANHO, M.; MALPASS, G. R. P.; A. J. MOTHEO. Avaliação dos tratamentos eletroquímico e fotoeletroquímico na degradação de corantes têxteis. **Química Nova**, v. 29, p. 983-989, 2006.

CHEN, M-X.; CAO, Z-Y. JIANG, Y.; ZHU, Z-W. Direct Determination of Glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1272, p. 90-99, 2013.

DRUART, C. DELHOMME, O.; VAUFLEURY, A.; NTCHO, E.; MILLET, M. Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of Glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 1725–1732, 2011.

GHANEM, A.; BADOS, P.; KERHOAS, L.; DUBROCA, J.; EINHORN, J. Glyphosate and AMPA Analysis in Sewage Sludge by LC-ESI-MS/MS after Fmoc Derivatization on Strong Anion-Exchange Resin as Solid Support. **Analytical Chemistry**, V. 79, p. 3794-3801, 2007.

GUO, Z.; CAI, Q.; YANG, Z. Determination of Glyphosate and phosphate in water by ion chromatography—inductively coupled plasma mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, p. 160–167, 2005.

IBÑÁNÉZ, M.; POZO, O.J.; SANCHO, J.V.; LÓPEZ, F.J.; HERNÁNDEZ, F. Residue determination of Glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, p. 145-155, 2005.

JAN, M.R.; SHAH, J.; MUHAMMAD, M.; ARA, B. Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 742-745, 2009.

KHROLENKO, M. V.; WIECZOREK, P.P.; Determination of Glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with *p*-toluenesulphonyl chloride. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, p. 111–117, 2005.

LI, B.; DENG, X.; GUO, D.; JIN, S. **Determination of Glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in foods using high performance liquid**

chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, v. 25, p. 486-490, 2007.

PATSIAS, J.; PAPADOPOULOU, A. ; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Automated trace level determination of Glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 932, p. 83–90, 2001.

NEDELKHOSKA, T.V.; LOW, G.K-C. High performance liquid chromatographic determination of Glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenmethyl chloroformate. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, p. 145-153, 2004.

PERUZZO, P.J.; PORTA, A.A.; RONCO, A.E. Levels of Glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, p. 61-66, 2008.

QIAN, K.; TANG, T.; SHI, T.; LI, P.; LI, J.; CAO, Y. Solid-phase extraction and residue determination of Glyphosate in apple by ion-pairing reverse-phase liquid chromatography with pre-column derivatization. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 2394-2400, 2009.

SHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B.M.R.; WENNIG, R.; MILLET, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**, v. 77, p. 1473-1482, 2009.

SOUZA, T.A.; MATTA, M.H.R.; MONTAGNER, E.; ABREU, A.B.G. Estudo de recuperação de glyphosate e ampa derivados em solo utilizando-se resinas nacionais. **Química Nova**, v. 29, nº 6, p. 1372-1376, 2006.

VEIGA, F.; ZAPATA J.M.; MARCOS M.L.F.; ALVAREZ E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in galicia, north-west Spain. **The Science of the Total Environment**, v. 271, p. 135-144, 2001.

CAPÍTULO 3

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS POR CLAE-UV PARA ANÁLISES DE GLYPHOSATE E AMPA

RESUMO

Neste trabalho determinou-se as melhores condições cromatográficas para analisar o GLY e AMPA por CLAE-UV, estudou-se a composição da fase móvel (acetonitrila/água e acetonitrila/tampão fosfato), comprimento de onda (210 e 260 nm) e modo de eluição (isocrático, gradiente de fluxo e gradiente de proporção), sendo que estes parâmetros foram avaliados a partir de soluções de GLY e AMPA 0,5, 1, 5 e 10 mg L⁻¹. A fase móvel acetonitrila/tampão fosfato, comprimento de onda 260 nm, gradiente com proporção de 25:75 v/v (0-2,5 minutos), 65:35 v/v (4,5-10 minutos) e 25:75 v/v (11-12 minutos) apresentaram melhores resultados, resultando em uma metodologia mais viável e de alta sensibilidade.

Palavras-chave: CLAE-UV; Glyphosate; Condições cromatográficas;

OPTIMIZATION OF CROMATOGRAPHIC CONDITIONS BY HPLC-UV FOR ANALYSES OF GLYPHOSATE AND AMPA

ABSTRACT

In this study aimed the best conditions for chromatographic analysis of GLY and AMPA by HPLC-UV, studied the composition of the mobile phase (acetonitrile / water and acetonitrile / phosphate buffer), wavelength (210 nm and 260) and elution mode (isocratic, gradient and flow gradient ratio), since these parameters were evaluated from solutions of GLY and AMPA 0.5, 1, 5 and 10 mg L⁻¹. The mobile phase acetonitrile / phosphate buffer, wavelength 260 nm, ratio gradient 25:75 v / v (0-2.5 minutes), 65:35 v / v (4.5-10 minutes) and 25: 75 v / v (11-12 minutes) showed better results, resulted in a method more feasible and high sensitivity.

Keywords: HPLC-UV; Glyphosate; Cromatography condition.

3.1. INTRODUÇÃO

O glyphosate (GLY) é classificado como um herbicida pós-emergente, sistêmico e mais utilizado em todo o mundo devido a elevada eficiência na remoção de ervas daninhas (NEDELKOSKA & LOW, 2004), sendo o ácido aminometilfosfônico (AMPA) citado como seu principal produto de degradação (LI *et al.*, 2007). Apesar de ser considerado como pouco tóxico para os que o manipulam (JAN *et al.*, 2009), há estudos que indicam efeitos deletérios do GLY em seres humanos devido a contaminação ambiental (GUO, CAI & YANG, 2005). Além disso, em sua formulação pode haver componentes tóxicos, como aditivos ou subprodutos do método de síntese (KIM *et al.*, 2007). Dessa forma, surge a necessidade de controlar a aplicação deste composto no meio ambiente através do monitoramento de resíduos (IBÁÑEZ *et al.*, 2005).

Dentre as metodologias utilizadas na análise de resíduos destacam-se os métodos cromatográficos por sua seletividade e sensibilidade (HANKE, SINGER & HOLLENDER, 2008). A cromatografia líquida tem sido mais preferencialmente utilizada devido a capacidade de ionização do GLY e AMPA (NEDELKOSKA & LOW, 2004; QIAN *et al.*, 2009), alta polaridade (AMARANTE JÚNIOR *et al.*, 2002) e baixa volatilidade (IBÁÑEZ *et al.*, 2005). Entretanto, para análises por cromatografia líquida utilizando os detectores convencionais, como UV-visível e fluorescência, é necessário derivatizar as moléculas devido a ausência de grupos cromóforos e/ou fluoróforos (QIAN *et al.*, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa (FR) tem tido intenso desenvolvimento nas últimas décadas, principalmente devido a sua elevada aplicabilidade (MALDANER, COLLINS & JARDIM, 2010). As fases estacionárias empregadas neste sistema são compostas por camada apolar, como o octil (C8) e o octadecil (C18) que são consideradas fases estacionárias (FE) clássicas (MALDANER, COLLINS & JARDIM, 2010). Estas FE apresentam as vantagens de permitirem a utilização de solventes menos tóxicos e de menor custo para a fase móvel (FM); rápido equilíbrio da coluna após mudança de FM; facilidade para empregar eluição por gradiente; análises rápidas e boa reprodutibilidade nos tempos de retenção (TONHI *et al.*, 2002).

A utilização do CLAE com detector de fluorescência tem sido escolhida devido a rapidez, utilização de colunas de alta resolução e a sensibilidade do detector (AFSAH-HEJRI, JINAP & MIRHOSSEINI, 2013). Entretanto, sua utilização é limitada, pois os solventes mais comumente utilizados como fase móvel apresentam absorção nesta região, interferindo na

análise (LANÇAS, 2009). Dessa forma, a espectroscopia eletrônica (UV-vis) que se baseia em transições intra-atômicas ou moleculares levando a absorção da radiação na região do ultravioleta (TREVISAN & POPPI, 2006) tem sido utilizada para análises de diversas substâncias devido ao relativo baixo custo, robustez (OLIVEIRA *et al.*, 2001) e grande aplicabilidade (LANÇAS, 2009).

Com este estudo, objetivou-se determinar a condição cromatográfica ótima para análises de GLY e AMPA por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por UV-vis através de uma técnica mais viável que as comumente utilizadas para a análise destes compostos, entretanto com elevada sensibilidade.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Reagentes

Soluções padrão estoque de GLY (99,2 % m/m) e AMPA (99,0 m/m %) obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) foram preparadas em água deionizada com concentração de 500 mg L⁻¹ e armazenadas a 4 °C. Solução individual de trabalho foi preparada a partir da solução estoque na concentração de 50 mg L⁻¹ no mesmo solvente.

Como solventes utilizou-se acetonitrila grau HPLC obtida da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Cloroformiato de 9-fluorenilmetila (99,8 % v/v) e fosfato de sódio monobásico (99 % m/m) obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), borato de sódio com grau de pureza superior a 99 % (m/m) obtido da QM (Rio de Janeiro, Brasil) e hidróxido de sódio 97 % (m/m) da Dinâmica (São Paulo, Brasil) também foram utilizados.

3.2.2. Instrumentação

Para as análises cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência, Varian ProStar (325 LC), acoplado a detector UV-Vis e injetor com alça de amostragem de 20 µL. Utilizou-se coluna analítica de fase reversa (Varian, fase reversa C18, 15 cm x 4,60 mm d.i. x 5µm). A temperatura foi mantida a 25 °C.

3.2.3. Derivatização do GLY e AMPA com FMOC-Cl

Para o processo de otimização das condições cromatográficas foram utilizadas soluções padrões de GLY e AMPA derivatizadas com FMOC-Cl a 10, 5, 1 e 0,5 mg L⁻¹. Para o processo de derivatização, determinados volumes dos padrões de GLY e AMPA (Tabela 3.1), foram transferidos para balão de fundo redondo (25 mL) de modo a obter 3,750 mL. Adicionou-se 1,875 mL de tampão borato de sódio 200 mmol L⁻¹ e 3,750 mL de solução de FMOC-Cl 500 mg L⁻¹ preparada em acetonitrila. A mistura foi homogeneizada em vórtex (30 minutos) e submetida a lavagem com 7,500 mL de éter dietílico para remover o excesso do reagente derivatizante. Da amostra obtida, 750 µL foram diluídos em 2,250 mL de tampão borato (200 mmol L⁻¹) e submetidos a análise por CLAE-UV.

Tabela 3.1. Volumes de GLY, AMPA e água deionizada utilizados para obter amostras de produto derivatizado nas concentrações de 0,5, 1, 5 e 10 mg L⁻¹.

	Volumes em mL			
	0,5 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	5 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹
GLY 50 mg L ⁻¹	0,09375	0,1875	0,9375	1,875
AMPA 50 mg L ⁻¹	0,09375	0,1875	0,9375	1,875
Água deionizada	3,5625	3,375	1,875	0,000
Total	3,750	3,750	3,750	3,750

Este mesmo procedimento foi realizado para preparar a derivatização de soluções individuais destes compostos.

3.2.4. Delineamento experimental

Alguns fatores avaliados foram: composição da fase móvel, comprimento de onda e modo de eluição foram otimizadas conforme Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Variáveis avaliadas para otimização das análises de GLY e AMPA por CLAE-UV.

Variáveis	Níveis
Composição da fase móvel (v/v)	Acetonitrila/Água; Acetonitrila/Tampão Fosfato.
Comprimento de onda (nm)	210 e 260.
Modo de eluição (v/v)	Acetonitrila/Tampão Fosfato:
<i>Isocrático</i>	(65:35); (55:45); (35:65);
<i>Gradiente (Fluxo)</i>	Acetonitrila/Tampão Fosfato (30:70): 0,5 mL min ⁻¹ (0-5 min.), 1,0 mL min ⁻¹ (6-15 min.) e 0,5 mL min ⁻¹ (16-20 min.);
<i>Gradiente (Proporção)</i>	Acetonitrila/Tampão Fosfato (Fluxo: 1 mL min ⁻¹): 25:75 (0-2,5 min.), 65:35 (4,5-10 min.), 25:75 (11- 12 min.);

Os parâmetros propostos foram avaliados a partir de análises das soluções de GLY e AMPA derivatizados nas concentrações de 0,5, 1, 5, e 10 mg L⁻¹. Para avaliação da composição da fase móvel, todos os solventes utilizados foram filtrados em membrana de nylon 0,22 µm. Tampão fosfato foi utilizado a 50 mmol L⁻¹ e seu pH foi ajustado com hidróxido de sódio para 5,5 e medido em pH metro micro processado da Quimis (São Paulo, Brasil). A avaliação da eficiência da condição cromatográfica foi determinada em função da intensidade e área dos sinais obtidos nos cromatogramas.

A escolha das proporções utilizadas no modo isocrático foram pré definidas com base em trabalhos realizados para análise de GLY por cromatografia líquida (PERUZZO, PORTA

& RONCO, 2008; VEIGA *et al.*, 2001). O planejamento das proporções utilizadas para o modo gradiente foi realizado com base nos resultados obtidos no modo isocrático associado a estudos da literatura (LLASERA *et al.*, 2005; QIAN *et al.*, 2009)

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A otimização das condições operacionais do aparelho é essencial para o desenvolvimento e validação da metodologia analítica e, dessa forma, parâmetros indispensáveis para uma análise por CLAE como comprimento de onda, composição e forma de eluição da fase móvel foram otimizados.

3.3.1. Composição da fase móvel

A composição da fase móvel interfere diretamente no tempo de retenção e na seletividade em CLAE-FR (AGRAFIOTOU *et al.*, 2011). Pois, compostos com equilíbrios químicos podem existir de diversas formas em determinado meio aquoso (AFSAH-HEJRI, JINAP & MIRHOSSEINI, 2013). De acordo com sua composição, o analito modifica seu estado de ionização (AGRAFIOTOU *et al.*, 2011). A estrutura do GLY é afetada pelo pH do meio, pois este composto apresenta os seguintes equilíbrios de ionização, conforme mostrados na Figura 3.1.

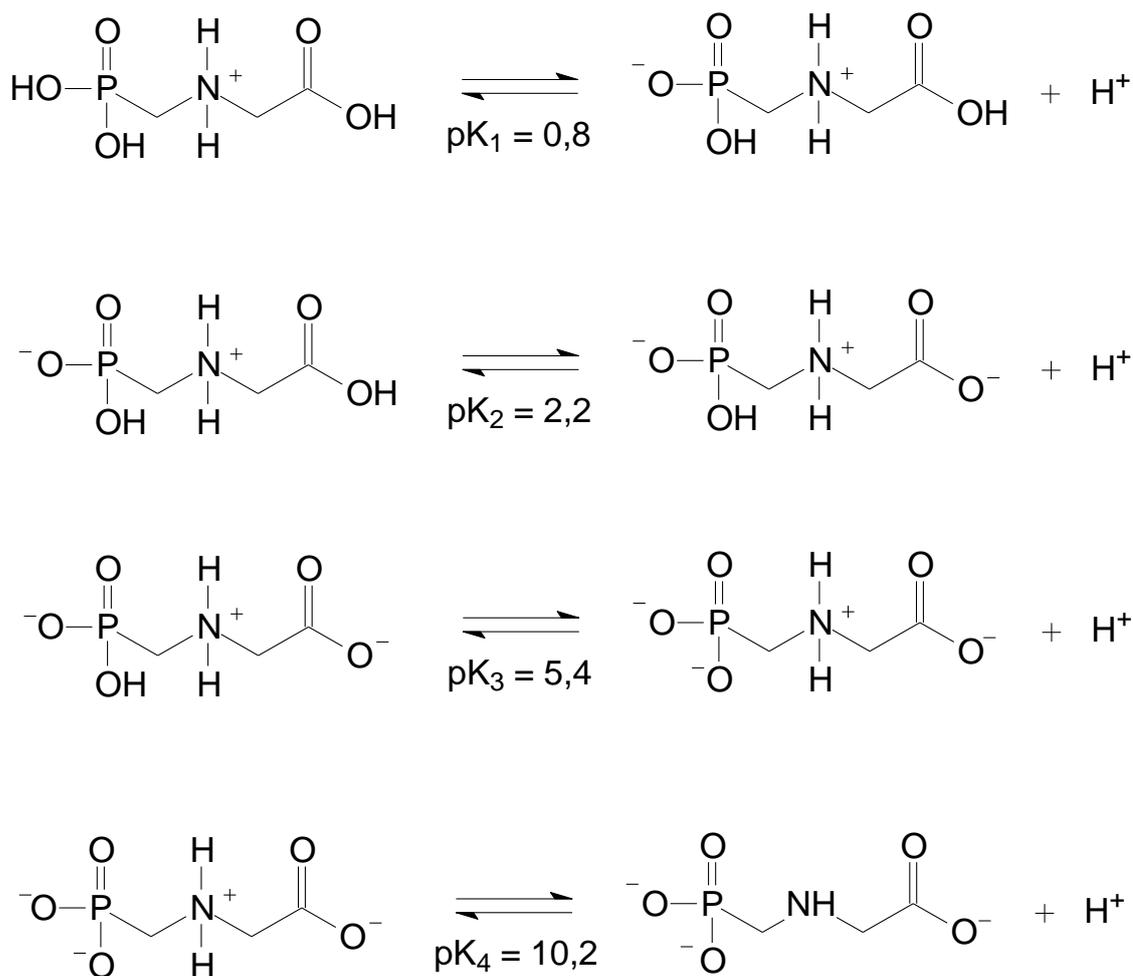


Figura 3.1. Equilíbrios e constantes de dissociação do GLY para os diferentes valores de pKa (AMARANTE JÚNIOR *et al.*, 2002).

A adição de tampão na fase móvel tem sido utilizada para aumentar a sensibilidade, garantir que o composto estará em apenas uma fórmula e obter maximização da detecção, sendo aconselhável utilizar valores de $\text{pH} = \text{pKa} \pm 1$ (COLLINS, BRAGA & BONATO, 2006).

A utilização de tampões, além de controlar o pH do meio aumenta a força iônica da fase móvel (AFSAH-HEJRI, JINAP & MIRHOSSEINI, 2013). Pois a presença de eletrólitos no meio altera a retenção dos analitos, interferindo em sua constante de ionização (AFSAH-HEJRI, JINAP & MIRHOSSEINI, 2013). Moléculas na forma ionizada apresentam maior afinidade pela fase móvel, ficando menos retidas na fase reversa e, conseqüentemente, ocorrendo maior detectibilidade para o analito.

Dessa forma, fases móveis compostas por acetonitrila/água e acetonitrila/tampão fosfato foram utilizadas a 15:85 v/v (acetonitrila/meio aquoso) analisando-se solução padrão de GLYphosate 1 mg L⁻¹ derivatizada com FMOC-Cl. Os cromatogramas obtidos encontram-se na Figura 3.2.

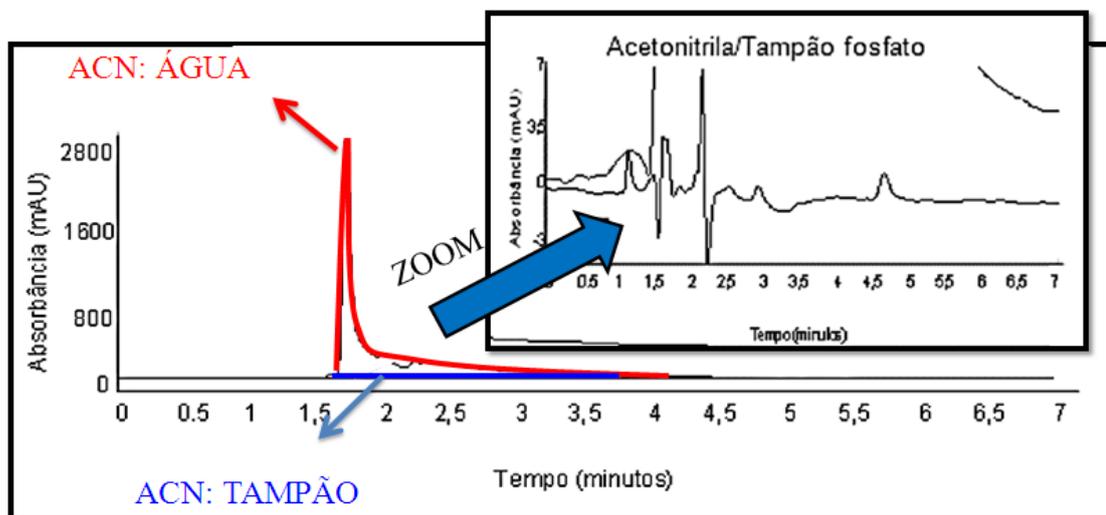


Figura 3.2. Cromatogramas da solução de GLY 10 mg L⁻¹ obtidos ao utilizar fase móvel composta por acetonitrila:água e acetonitrila:tampão fosfato e análises por CLAE-UV.

Nas condições cromatográficas utilizadas não foi observado sinal do analito em estudo, pois as condições utilizadas não favoreceram na eluição de/ou detecção deste. Entretanto, verificou-se que a fase móvel composta por 85 % de água favoreceu a absorção de compostos do meio reacional, como resíduos do tampão borato, com sinal cromatográfico em 1,8 min. (Figura 3.2). Já a fase móvel composta por 85 % de tampão, apresentou um cromatograma com interferentes de menor absorção (<7 mAU). Portanto, foi selecionada para testes adicionais por promover cromatograma com menor influencia de interferentes do meio reacional.

3.3.2. Comprimento de onda

A seleção do comprimento de onda de máxima absorbância para os compostos em estudo permite elevar a sensibilidade do detector e a eliminação de picos de interferentes (COLLINS, BRAGA & BONATO, 2006). Dessa forma, foram realizadas análises em espectrofotômetro na faixa de 190 a 340 nm e os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.3.

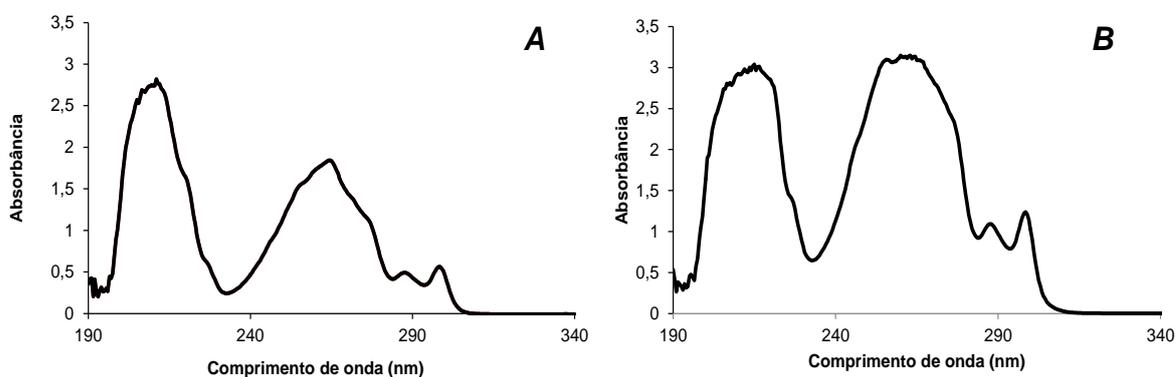


Figura 3.3. Espectros no ultravioleta da solução de GLY 10 mg L⁻¹ (A) e AMPA 10 mg L⁻¹ (B) obtidas por derivatização com FMOC-Cl.

Verificaram-se duas regiões de maior absorbância (210 e 260 nm) para os analitos em estudo. Para determinar qual o comprimento de onda ideal para as análises, foram realizadas injeções no CLAE-UV dos constituintes do meio reacional isoladamente. Foi avaliado o comportamento do tampão borato de sódio e do FMOC-Cl. O tampão borato foi submetido a análise em fase móvel contendo acetonitrila/água (15:85 v/v) com fluxo de 1 mL min⁻¹ e os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.4.

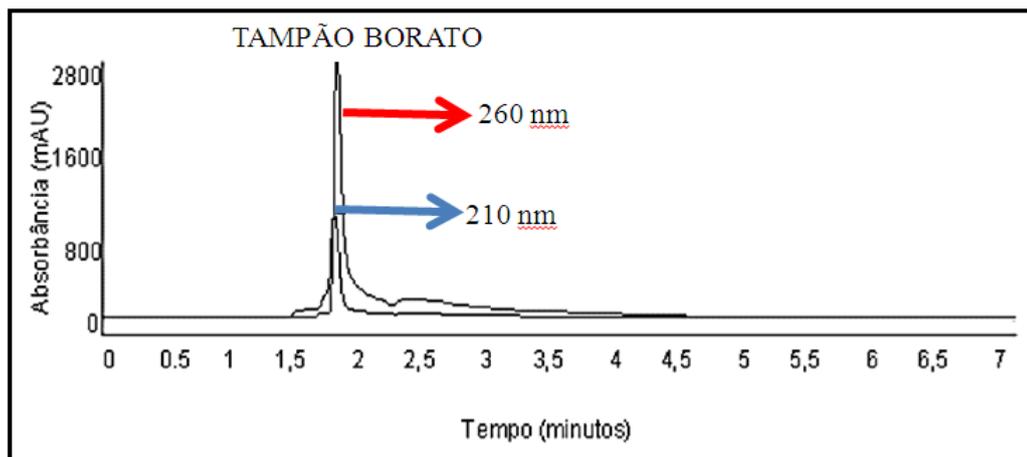


Figura 3.4. Cromatogramas da solução de tampão borato 200 mmol L^{-1} obtidos ao utilizar 210 e 260 nm e análises por CLAE-UV.

A intensa absorção (2800 mAU) de altas concentrações de tampão borato (200 mmol L^{-1}) no ultravioleta a 260 nm pode estar relacionada a presença de elétrons não compartilhados ou não ligados em sua estrutura (LANÇAS, 2009). Entretanto, em baixas concentrações (2 e 20 mmol L^{-1}) este efeito não foi observado, pois verifica-se apenas o sinal referente a acetonitrila em $2,3$ minutos conforme cromatograma presente na Figura 3.5.

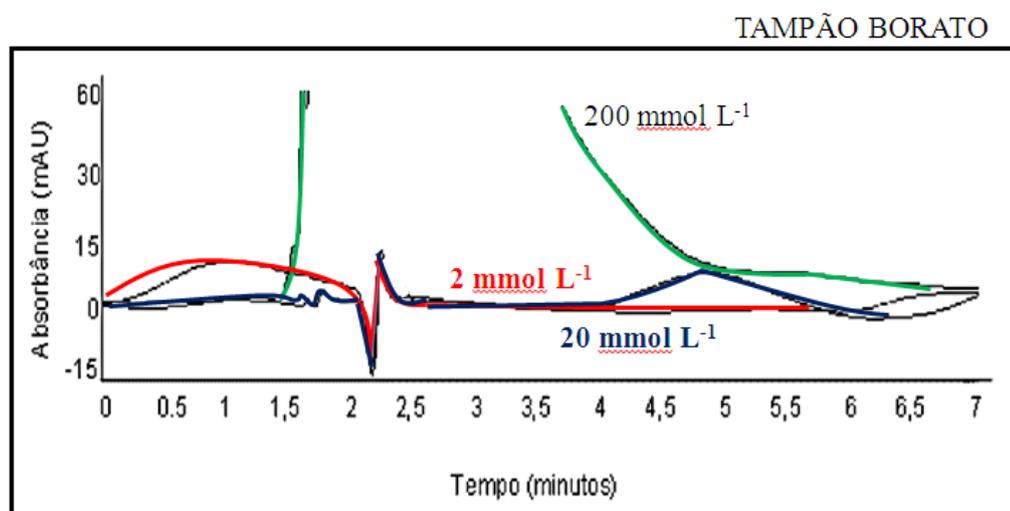


Figura 3.5. Cromatogramas das soluções de tampão borato 2 , 20 e 200 mmol L^{-1} obtidos ao utilizar 260 nm e análises por CLAE-UV.

Para as análise do Fmoc-Cl utilizou-se como fase móvel 100% de acetonitrila e fluxo de 1 mL min^{-1} . Os cromatogramas obtidos encontram-se na Figura 3.6.

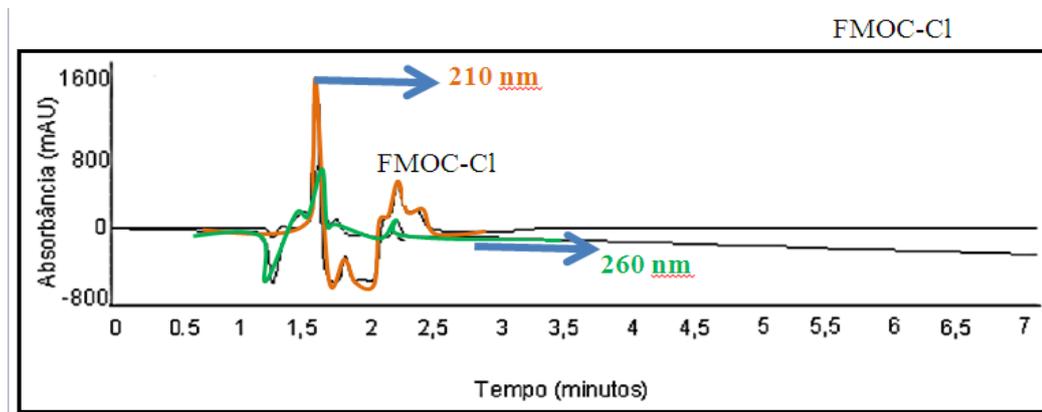


Figura 3.6. Cromatogramas da solução de FMOCl 50 mg L⁻¹ obtidos ao utilizar 210 e 260 nm para análises por CLAE-UV.

O FMOCl apresenta em sua estrutura insaturações alternadas responsáveis por sua absorção no UV-vis. Este grupo cromóforo tende a apresentar máxima absorção em 260 nm. Entretanto, este perfil não foi observado neste estudo (Figura 3.6). Nas condições cromatográficas utilizadas, o FMOCl eluiu em 2,1 min e apresentou absorção em 210 nm de 21,4, cerca de 1,7 vezes maior que a obtida em 260 nm. Contudo, ao utilizar 210 nm, observa-se o favorecimento na absorção de interferentes entre 1,5 e 2 minutos de análise (Figura 3.6).

Dessa forma, como 260 nm apresentou menor absorção para interferentes do meio reacional e para o tampão borato ao se utilizar baixas concentrações, este comprimento de onda foi selecionado. Este resultado difere de dado encontrado na literatura, pois trabalho recente tem indicado 206 como comprimento de onda ideal para análises de GLY e AMPA por CLAE após derivatização com FMOCl (PERUZZO, PORTA & RONCO, 2008).

3.3.3. Modo de eluição

Para avaliar qual o modo de eluição mais adequado para análise de GLY e AMPA por CLAE-UV, inicialmente, análises foram realizadas no modo isocrático e os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.7.

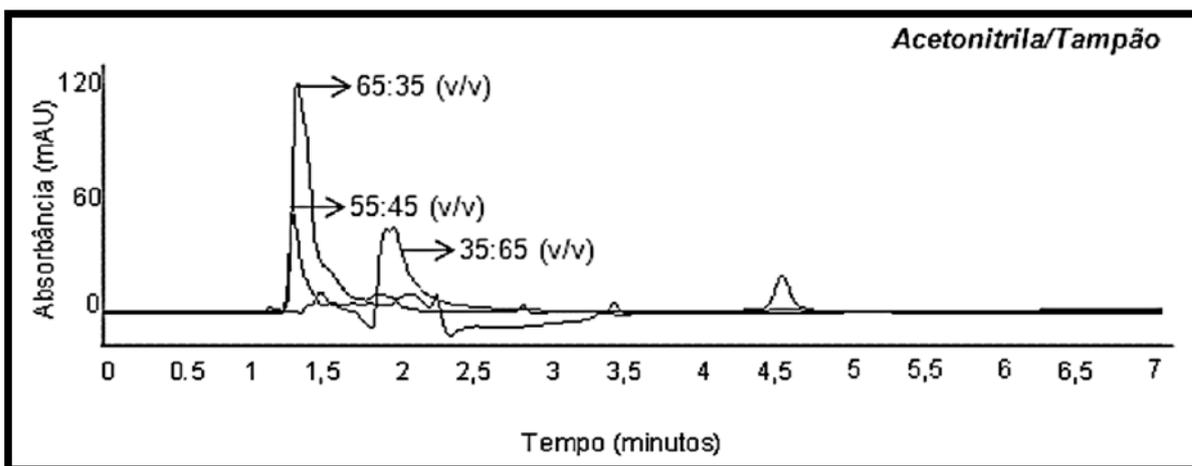


Figura 3.7. Cromatogramas de solução de GLY 10 mg L⁻¹ obtidos ao utilizar fase móvel acetonitrila/tampão fosfato nas proporções de 65:35, 55:45 e 35:65 (v/v).

Maiores proporções de solvente orgânico (acetonitrila) favoreceram a eluição dos analitos, pois ocorre maior interação deste com a região estrutural derivada do FMOC-Cl (apolar). Nestas condições, o GLY que elui em 1,3 minutos apresentou alta resolução e sensibilidade do detector, com absorção superior a 110 mAU, conforme Figura 3.7. Entretanto, o analito eluiu do sistema antes de dois minutos de análise, o que não é favorável em estudos destes compostos em matrizes complexas (alimentos, solo, plantas), pois os componentes da matriz como metabólitos secundários, impurezas ou produtos de degradação, podem co-eluir junto ao analito interferindo detecção deste (CHAMBERS *et al.*, 2007).

O aumento gradativo da proporção de tampão fosfato favoreceu a retenção do analito na coluna cromatográfica (Figura 3.7), dessa forma o t_R do GLY variou de 1,3 para 1,9 minutos e o t_R do AMPA variou de 1,7 para 2,8 minutos, com gradiente 45 e 65 % de tampão fosfato, respectivamente, conforme Figura 3.7 e 3.8. Contudo, maiores proporções de tampão fosfato interferiram diretamente na resolução e sensibilidade variando de 120 mAU em 35 % de tampão para 47 e 46 mAU em 45 e 65 % de tampão fosfato, respectivamente.

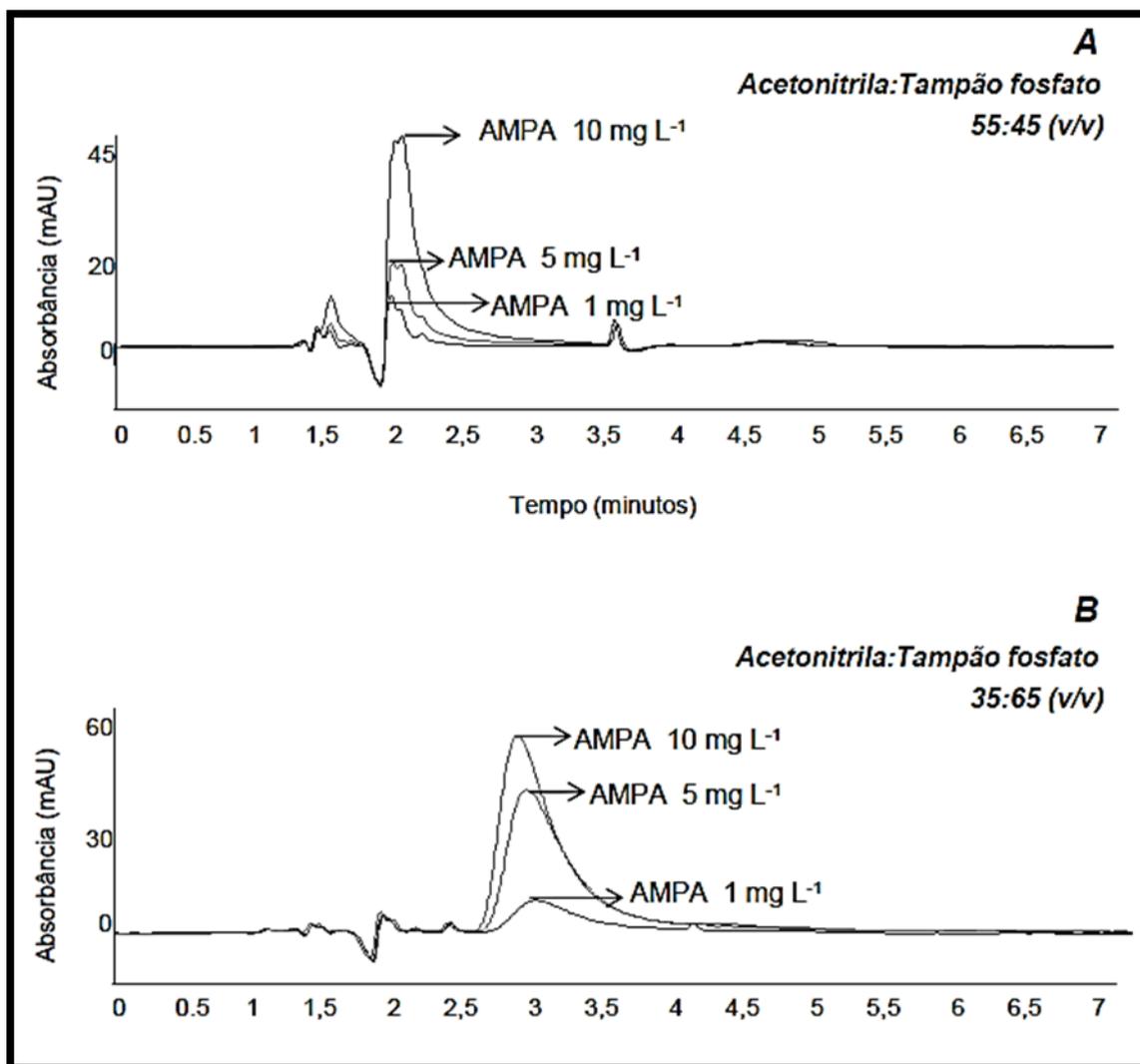


Figura 3.8. Cromatogramas das soluções de AMPA 10, 5 e 1 mg L⁻¹ obtidos ao utilizar fase móvel acetonitrila/tampão fosfato nas proporções de 55:45 v/v (A) e 35:65 v/v (B).

Apesar do deslocamento dos analitos promovido pelo acréscimo de tampão fosfato à fase móvel, observa-se que estas condições cromatográficas não apresentaram boa resposta do detector para o AMPA quando se analisa solução de 1 mg L⁻¹, com absorção inferior a 10 mAU. Além disso, ao analisar a solução contendo os dois analitos a 1 mg L⁻¹, nestas condições, observa-se que há pequena separação entre a eluição de cada composto (Figura 9). A proximidade dos sinais prejudica a análise destes compostos em amostras complexas, além disso, a junção dos sinais do GLY e AMPA na Figura 3.9 na proporção 55:45 (v/v) acetonitrila:tampão interfere na quantificação destes analitos.

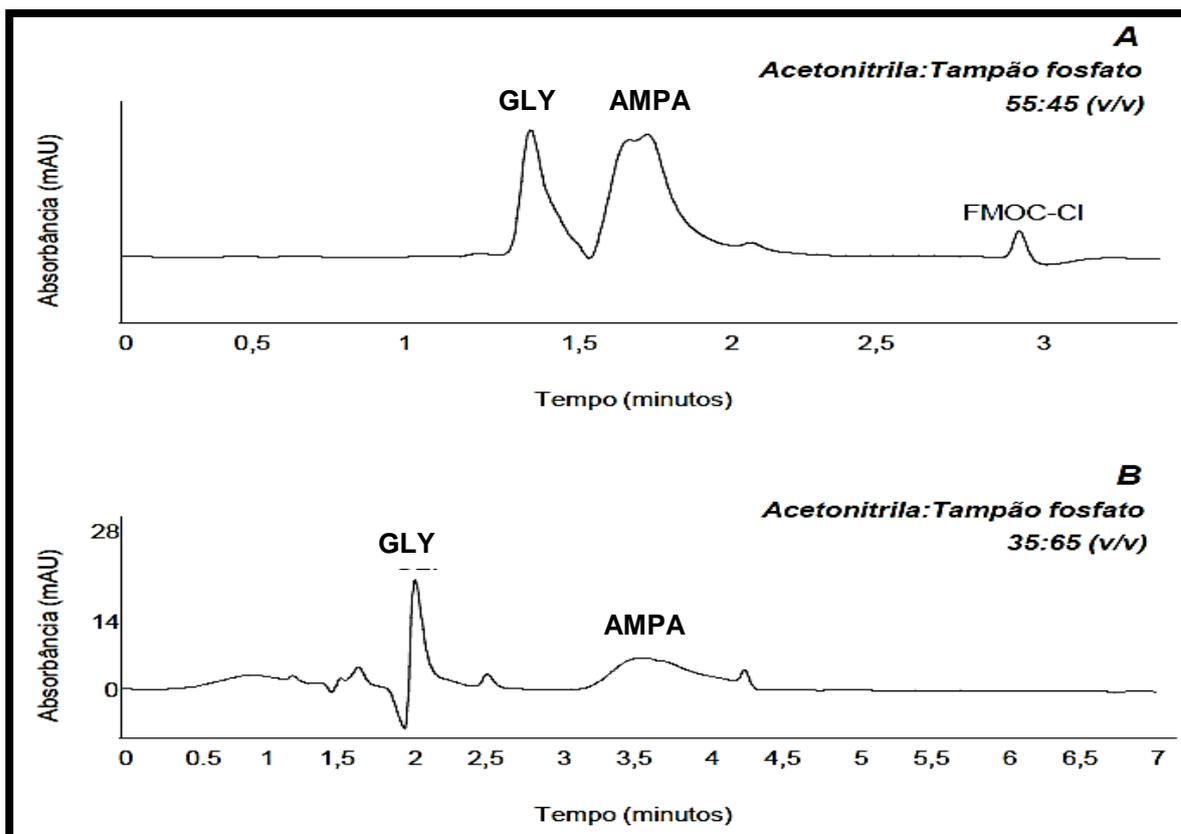


Figura 3.9. Cromatogramas da solução de GLY e AMPA 1 mg L^{-1} obtidos ao utilizar fase móvel acetonitrila/tampão fosfato nas proporções de 55:45 v/v (A) e 35:65 v/v (B).

Para promover o deslocamento e melhorar a resolução do AMPA, o gradiente de fluxo iniciando com $0,5\text{ mL min}^{-1}$ até 5 minutos, $1,0\text{ mL min}^{-1}$ até 15 minutos e $0,5\text{ mL min}^{-1}$ até 20 minutos e com fase móvel composta por acetonitrila/tampão fosfato 30:70 (v/v) foi realizado e o cromatograma obtido encontra-se na Figura 3.10.

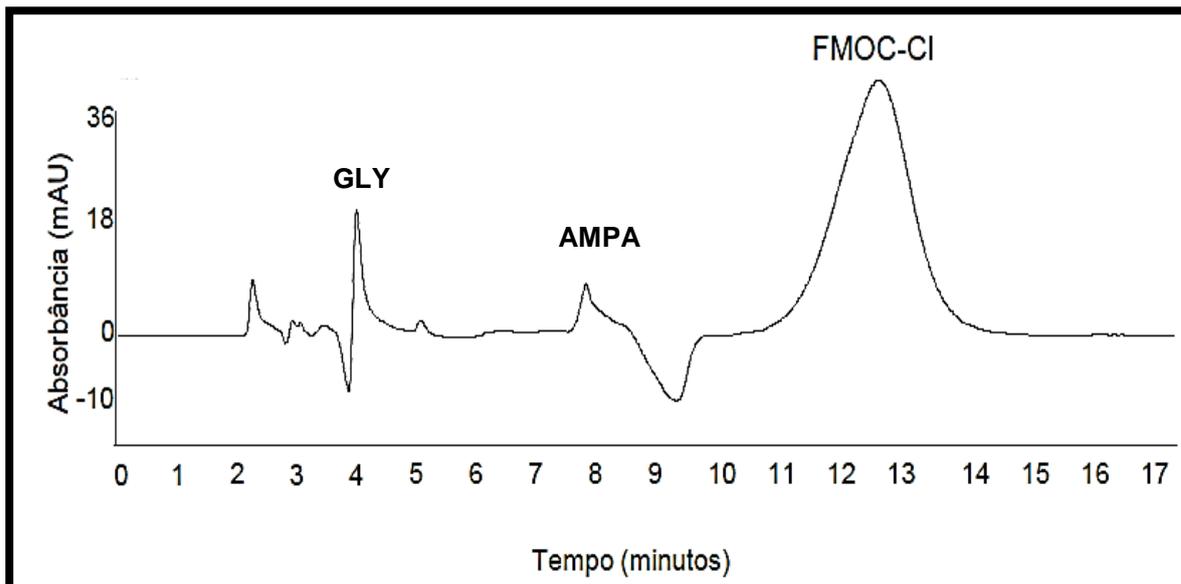


Figura 3.10. Cromatograma da solução de GLY e AMPA 1 mg L^{-1} por CLAE-UV utilizando gradiente de fluxo.

Nestas condições, observou-se elevada resolução dos sinais obtidos, entretanto, a sensibilidade aos analitos é $<10 \text{ mAU}$. Uma alternativa é a utilização de gradientes para a fase móvel. Dessa forma, a proporção acetonitrila:tampão variou de 0-2,5 minutos (25:75 v/v), 4,5-10 minutos (65:35 v/v) e 11-12 minutos (25:75 v/v). O cromatograma obtido é apresentado na Figura 3.11.

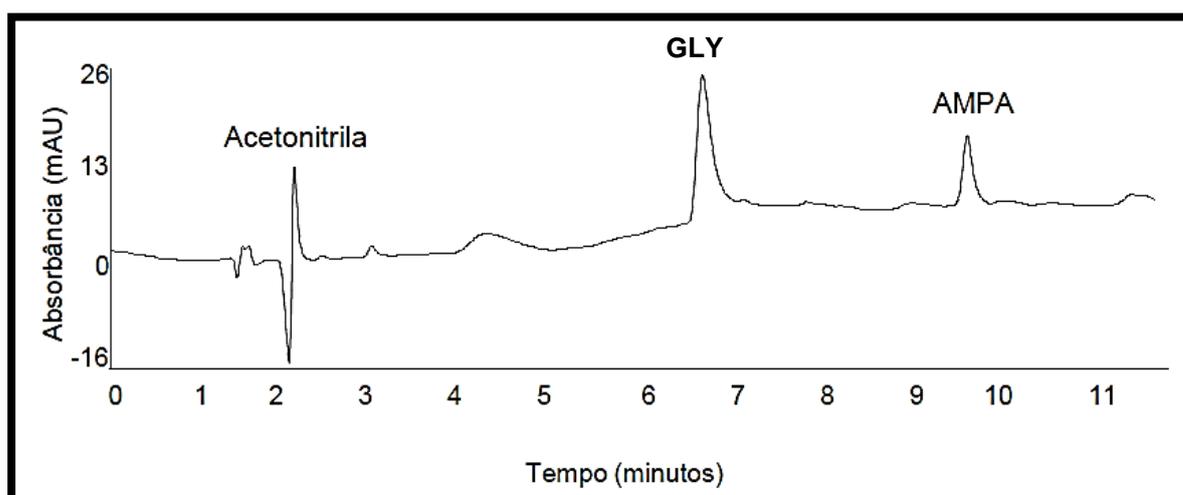


Figura 3.11. Cromatograma da solução de GLI e AMPA 1 mg L^{-1} por CLAE-UV utilizando gradiente de fase móvel.

Nesta condição cromatográfica, os analitos apresentaram resolução inferior a 0,5 minutos e os analitos apresentaram absorção superiores a 10 e 15 mAU, respectivamente.

3.4. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a detecção de GLY e AMPA foi influenciada pelas variáveis de CLAE-UV (composição da fase móvel, comprimento de onda e forma de eluição). Sendo as condições ótimas de análise obtidas ao se utilizar 260 nm e fase móvel composta por acetonitrila/tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ e pH 5,5 com proporção de 25:75 v/v (0-2,5 minutos), 65:35 v/v (4,5-10 minutos) e 25:75 v/v (11-12 minutos).

A reação de derivatização com FMOC-Cl e separação dos analitos por CLAE-UV resultou em um método rápido e simples. Além disso, a separação dos analitos ocorreu com elevada sensibilidade utilizando CLAE –UV com fase reversa.

3.5. REFERÊNCIAS

AGRAFIOTOU, P.; RÀFOLS, C.; CASTELLS, C.; BOSCH, E.; ROSÉS, M. Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition in the chromatographic retention of ionizable compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4995-5009, 2011.

ALFAH-HEJTI, L.; JINAP, S. MIRHOSSEINI, H. Influence of different mobile phase compositions on detection of ochratoxin A. **Food Control**, v. 31, p. 244-250, 2013.

AMARANTE JÚNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glyphosate: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação. **Química Nova**, v. 25, p. 589-593, 2002.

CHAMBERS, E.; WAGROWSKI, D. M. W-D.; LU, Z. MAZZEO, J. R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. **Journal of Chromatography B**, v. 852, p. 22=34, 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas – SP: Editora da UNICAMP , 2009, 453 p.

GUO, Z-X.; CAI, Q.; YANG, Z. Determination of Glyphosate and phosphate in water by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, p. 160-167, 2005.

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

IBÁÑEZ, M.; POZO, Ó. J.; SANCHO, J. V.; LÓPEZ, F. J.; HERNÁNDEZ, F. Residue determination of Glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, p. 145-155, 2005.

JAN, M. R.; SHAH, J.; MUHAMMAD, M.; ARA, B. Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 742-745, 2009.

KIM, M.; STRIPEIKIS, J.; IÑÓN, F.; TUDINO, M. A simplified approach to the determination of *N*-nitro GLYphosate in technical Glyphosate using HPLC with post-derivatization and colorimetric detection. **Talanta**, v. 75, p. 1054-1058, 2007.

LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida moderna. Campinas – SP: Editora Átomo, 2009, 382p.

LASSERA, M. P. G.; GÓMEZ-ALMARAZ, L.; VERA-AVILA, L. E.; PEÑA-ALVAREZ, A. Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of Glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, p. 139-146, 2005.

LI, B.; DENG, X.; GUO, D.; JIN, S. Determination of Glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in foods using high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 25, p. 486-490, 2007.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, p. 1559-1568, 2010.

NEDELKOSKA, T. V.; LOW, G. K-C. High-performance liquid chromatographic determination of Glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, p. 145-153, 2004.

OLIVEIRA, M. C.; NOGUEIRA, R. F. P.; NETO, J. A. G.; JARDIM, W. F.; ROHWEDDER, J. J. R. Sistema de injeção em fluxo espectrofotométrico para monitorar peróxido de hidrogênio em processo de fotodegradação por reação foto-fenton. **Química Nova**, v. 24, p. 188-190, 2001.

PERUZZO, P.J.; PORTA, A.A.; RONCO, A.E. Levels of Glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, p. 61-66, 2008.

QIAN, K.; TANG, T.; SHI, T.; WANG, F.; LI, J.; CAO, Y. Residue determination of Glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 222-226, 2009.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, p. 616-623, 2002.

TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. Química analítica de processos. **Química Nova**, v. 29, p. 1065-1071, 2006.

VEIGA, F.; ZAPATA J.M.; MARCOS M.L.F.; ALVAREZ E. **Dynamics of Glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in galicia, north-west Spain**. The Science of the Total Environment, v. 271, p. 135-144, 2001.

CONCLUSÃO GERAL

Com este trabalho foi possível otimizar duas metodologias para derivatização de glyphosate e AMPA utilizando como reagentes derivatizantes FMOC-Cl e BSTFA. Estas metodologias resultaram em métodos simples, rápidos e de baixo custo. Sendo que a metodologia utilizando BSTFA é inédita, pois se utilizou os padrões em solução.

Também foi realizado uma otimização inédita das condições cromatográficas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector no ultravioleta e coluna de fase reversa para análises de glyphosate e AMPA após derivatização com FMOC-Cl.