UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

ANA CAROLINA DE OLIVEIRA COSTA
Tese de Doutorado

**Metodologias para determinação de fármacos,
seus metabólitos e desreguladores endócrinos em
águas brutas voltadas ao abastecimento público
utilizando técnicas de separação em meio líquido
(CE/UV, CE-MS, LC-MS/MS)**

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
13/11/2009

ANA CAROLINA DE OLIVEIRA COSTA

**Metodologias para determinação de fármacos,
seus metabólitos e desreguladores endócrinos em
águas brutas voltadas ao abastecimento público
utilizando técnicas de separação em meio líquido
(CE/UV, CE-MS, LC-MS/MS)**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em
Química (Química Analítica)*

Orientador(a): Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo
2009

Ana Carolina de Oliveira Costa

Metodologias para determinação de fármacos, seus metabólitos e desreguladores endócrinos em águas brutas voltadas ao abastecimento público utilizando técnicas de separação em meio líquido (CE/UV, CE-MS, LC-MS/MS)

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Química Analítica

.....

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

À Deus, por estar sempre ao meu lado.

Dedico esta tese aos meus pais.

*Pelo amor, pelo incentivo, pelo apoio
em todos os momentos da minha vida...*

Por acreditarem em mim, obrigada.

Ao meu amor, amigo e companheiro Gustavo.

Eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Marina F. M. Tavares, por ter me recebido, acreditado e confiado em mim desde o começo. Pelas palavras. Pelo exemplo de garra, determinação e coragem.

Aos amigos antigos e novos de laboratório, Alessandra, Edgar, José Luiz, Claudinei, Juliana, Vanessa, Neide, Simone, Viviane, Tatiana e Aline, pelas risadas, pelas conversas e pela boa convivência.

Aos meus irmãos de sangue, Dódo, Tetê e Zeca, e aos meus novos irmãos de coração, Fernando G. Tonin, Marcone A. Leal e Luiz Antonio Zanolli. Vocês são muito importantes para mim.

À minha família de São Paulo, Anadir, Jean, Alex, Pedrinho e Marco, Samantha (e Pedro amado), Neide, Fabíola e Carol.

Ao Sr. Nestor, por acreditar no meu potencial.

A todos os amigos que fiz no IQ.

À FAPESP, pela bolsa e auxílio.

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

Mário Quintana

RESUMO

Costa, A.C.O. **Metodologias para determinação de fármacos, seus metabólitos e desreguladores endócrinos em águas brutas voltadas ao abastecimento público utilizando técnicas de separação em meio líquido (CE/UV, CE-MS, LC-MS/MS).** 2009. 294 p. Tese – Programa de Pós-graduação em Química Analítica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo.

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de métodos analíticos para investigar a presença de fármacos e seus metabólitos, assim como desreguladores endócrinos, em amostras de águas superficiais, utilizando estratégias de “clean up” e enriquecimento de amostra no modo “on line” (“stacking”) e “off line” (extração em fase sólida, SPE), em junção com técnicas de separação avançadas em meio líquido (eletroforese capilar, CE, e cromatografia a líquido, LC, com detecção UV, e seus acoplamentos com espectrometria de massas).

No primeiro Capítulo são discutidos aspectos gerais sobre os produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal e desreguladores endócrinos, bem como a origem e ocorrência destas substâncias no meio ambiente.

O segundo Capítulo aborda o desenvolvimento de um método de separação capaz de determinar oito substâncias entre fármacos de caráter ácido e metabólitos (diclofenaco, bezafibrato, fenoprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno e ácidos gentísico e salicílico) numa única corrida, utilizando eletroforese capilar com enriquecimento em linha da amostra (stacking do analito baseado em grande volume de injeção da amostra) utilizando eletrólito de corrida constituído por 30 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio e 5 mmol L⁻¹ de Brij 35, pH 9,3. O método proposto alcançou limites de detecção que variaram de 2 µg L⁻¹ para o fármaco naproxeno até 80 µg L⁻¹ para o ibuprofeno.

No terceiro capítulo é explorado um método de separação por CE para nove substâncias entre fármacos e hormônios (fluoxetina, trimetoprima, diazepam, carbamazepina, propranolol, clofibrato, fenofibrato, etinilestradiol e estrona). Utilizou-se como estratégia de pré-concentração dos analitos, o modo “stacking” de micelas com grande volume de injeção de amostra. Este método chegou a limites de detecção na ordem de 9 µg L⁻¹ com eletrólito de corrida composto por 30 mmol

L⁻¹ de ácido fosfórico, 40 mmol L⁻¹ de dodecilsulfato de sódio, 20% (v,v) de acetonitrila e 0,1% (v,v) de trietilamina.

No quarto capítulo, foi realizado o estudo de parâmetros físico-químicos que estão relacionados à técnica de extração em fase sólida, tais como tipo do sorvente, volume de capacidade, volume de eluição, lavagem do cartucho de extração, entre outros. As condições ótimas de “clean up” e pré-concentração “off line” da amostra obtidas foram combinadas com as condições ótimas de pré-concentração “on line” e separação descritas nos Capítulos 2 e 3, para todas as substâncias abordadas ali, com o intuito de analisar amostras reais de água superficial coletadas no reservatório Billings (Estado de São Paulo). O método combinado permitiu alcançar concentrações da ordem de 500 ng L⁻¹, com valores de recuperação satisfatórios (58 - 88%), quando levada em consideração a origem complexa da matriz ambiental.

No quinto capítulo, desenvolveu-se um método de análise de *p*-hidroxibenzoatos de alquila, substâncias utilizadas como conservantes em diversos produtos de uso diário, utilizando eletroforese capilar associada a estratégias de concentração “on line” (stacking com injeção de grande volume de amostra) e “off line” (SPE). O método proposto, utilizando eletrólito constituído por 40 mmol L⁻¹ de glicina e 40 mmol L⁻¹ de trietilamina, foi aplicado na análise destas substâncias em amostras de água superficial, alcançando níveis de concentração da ordem de 4 – 6 µg L⁻¹.

O sexto capítulo aborda o desenvolvimento de um método por eletroforese capilar destinada à análise de alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) e homólogos, tensoativo comumente utilizado na composição de detergentes de uso doméstico e industrial. O eletrólito de separação era composto de 60 mmol L⁻¹ TRIS, 30 mmol L⁻¹ HIBA, 15 mmol L⁻¹ Brij 35 e 40% (v,v) acetonitrila. Foi realizada uma etapa de extração em fase sólida (C18), e uma concentração total de LAS na ordem de 1,09 mg L⁻¹ foi encontrada em uma amostra de efluente de estação de tratamento de esgoto.

No capítulo 7 foi desenvolvido um método utilizando eletroforese capilar acoplada a um espectrômetro de massas, com analisador “ion trap”, para a análise dos fármacos cimetidina, propranolol, salbutamol, trimetoprima e metoclopramida. Amostras de água coletadas no reservatório Billings foi fortificada com os fármacos em estudo e submetida a procedimento de extração em fase sólida em cartuchos de poliestireno divinilbenzeno (PS-DVB). O método permitiu a análise das substâncias estudadas na concentração aproximada de 40 µg L⁻¹.

Finalmente, no oitavo capítulo foi explorado um método envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência, hifenada a dois tipos de espectrômetros de massas: um triplo quadrupolo e um triplo quadrupolo com “ion trap” linear. Foram investigados fármacos de diversas classes em amostras de águas brutas coletadas no reservatório Billings, sendo possível encontrar carbamazepina na concentração de 20 ng L⁻¹, com apenas uma etapa de filtração da amostra antecedendo a análise, utilizando o triplo quadrupolo. Cabe destacar que o LOD para este analito foi de 400 fg L⁻¹, sem nenhum tratamento da amostra visando pré-concentração.

Palavras-chave: eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas, extração em fase sólida, fármacos, desreguladores endócrinos.

ABSTRACT

Costa, A.C.O. **Metodologias para determinação de fármacos, seus metabólitos e desreguladores endócrinos em águas brutas voltadas ao abastecimento público utilizando técnicas de separação em meio líquido (CE/UV, CE-MS, LC-MS/MS).** 2009. 294 p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo.

This work presents the development of analytical methods to investigate the presence of pharmaceutical compounds, their metabolites and endocrine disruptors in surface water using on line (stacking) and off line (solid phase extraction) sample clean up and enrichment strategies coupled to advanced separation techniques in liquid medium (capillary electrophoresis and liquid chromatography with UV detection and their hyphenation with mass spectrometry).

In the first Chapter, general aspects on pharmaceuticals, products of personal care and endocrine disruptors are discussed as well as their origin and means of entry to the environment.

Chapter 2 describes the development of a separation method for the determination of eight pharmaceuticals and endocrine disruptors substances with acidic character (diclofenac, bezafibrate, fenoprofen, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, gentisic and salicylic acids) in a single run using capillary electrophoresis with on line sample

enrichment (analyte stacking with large sample volume injection) in electrolytes composed of 30 mmol L⁻¹ sodium tetraborate at pH 9.3 and 5 mmol L⁻¹ Brij 35. The proposed method reached limits of detection between 2 µg L⁻¹ (naproxen) and 80 µg mL⁻¹ (ibuprofen).

In Chapter 3, a CE separation method for the determination of nine pharmaceuticals and hormones with neutral and basic character (fluoxetine, trimethoprim, diazepam, carbamazepine, propranolol, clofibrate, fenofibrate, ethynylestradiol and estrone) was exploited. As preconcentration strategy, micelle stacking with large sample volume injection was performed. Limits of detection in the order of 9 µg L⁻¹ were reached with electrolytes composed of 30 mmol L⁻¹ phosphoric acid, 40 mmol L⁻¹ sodium dodecylsulfate, 20% (v,v) acetonitrile and 0.1% (v,v) triethylamine.

In Chapter 4, the physicochemical parameters associated with the solid phase extraction technique, such as sorbent type, breakthrough volume, elution volume, extraction cartridge rinse, among others, were evaluated. Optimum sample clean up and off line preconcentration conditions combined with the optimum on line preconcentration and separation conditions described in Chapters 2 and 3, for all substances under consideration, were applied to the analysis of real surface water samples collected at the Reservoir Billings (Sao Paulo state, Brazil). The combined method reached concentrations in the order of 500 ng L⁻¹, with satisfactory recoveries (58 – 88%) for complex environmental matrices.

In Chapter 5, a method for the analysis of alkyl *p*-hydroxybenzoates, substances used as preservatives in several products of personal care, was developed using capillary electrophoresis associated with on line (stacking with large volume injection) and off line (SPE) preconcentration strategies. The proposed method, which used 40 mmol L⁻¹ glycine and 40 mmol L⁻¹ triethylamine as electrolyte, was applied to the analysis of alkyl *p*-hydroxybenzoates in surface water, reaching 4 - 6 µg L⁻¹ concentrations.

Chapter 6 describes the development of a CE method for the analysis of linear alkylbenzene sulfonates (LAS) and homologues, surfactants commonly used in the composition of detergents of industrial and domestic use. As separation electrolyte, 60 mmol L⁻¹ TRIS, 30 mmol L⁻¹ HIBA, 15 mmol L⁻¹ Brij 35 and 40% (v,v) acetonitrile was used. A solid phase preconcentration extraction step in C18 was employed and

a total LAS concentration of 1.09 mg L^{-1} was found in a sample obtained from the effluent of a sewage treatment plant.

In Chapter 7, a CE-MS (ion trap) method was developed for the analysis of cimetidine, propranolol, salbutamol, trimethoprim and methoclopramide in fortified surface water samples collected in the Reservoir Billings (Sao Paulo state, Brazil) and previously enriched by SPE (PS-DVB). The method reached concentrations of *c.a.* $40 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Finally, in Chapter 8, a method based on high-performance liquid chromatography coupled with two different mass spectrometers: a triple quadrupole and a triple quadrupole with linear ion trap). Several pharmaceuticals were investigated in surface water samples collected from the Reservoir Billings (Sao Paulo state, Brazil). With the LC-MS/MS (triple quadrupole) system, carbamazepine was found in a non treated sample (just a filtration step prior to injection was performed) in a concentration level of 20 ng L^{-1} . It is worth mentioning that for carbamazepine, a LOD of 400 fg L^{-1} was found, without any preconcentration sample treatment.

Keywords: capillary electrophoresis, high performance liquid chromatography, mass spectrometry, solid-phase extraction, pharmaceuticals, endocrine disruptors.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução e revisão bibliográfica	17
1. Introdução	18
1.1. Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal	18
1.1.1. Fármacos no ambiente aquático	18
1.1.2. Fontes e ocorrência no meio ambiente	19
1.2. Interferentes ou desreguladores endócrinos	23
1.2.1. Substâncias classificadas como desreguladores endócrinos	23
1.2.2. Principais fontes de desreguladores endócrinos	24
1.3. Efeitos causados pela exposição aos PPCPs e desreguladores endócrinos	25
1.4. Legislação	26
1.5. Análise de fármacos, metabólitos, hormônios e desreguladores endócrinos	27
1.6. Ocorrência de fármacos, metabólitos e desreguladores endócrinos no meio ambiente	28
1.7. Referências bibliográficas	36
 Capítulo 2 – Determinação de fármacos de caráter ácido e metabólitos do ácido acetilsalicílico utilizando eletroforese capilar associada a estratégias de pré-concentração “on line”	 43
2.1. Introdução	44
2.2. Procedimentos experimentais	48
2.2.1. Equipamentos e parâmetros instrumentais	48
2.2.2. Reagentes e soluções	49
2.3. Resultados e discussão	50
2.3.1. Planejamento fatorial	50
2.3.1.1. Experimentos antecedendo o planejamento fatorial	51
2.3.1.2. Mecanismo de separação	52
2.3.2. Planejamento fatorial 2 ² com PC – funções respostas	54
2.3.3. Escolha do padrão interno	60
2.3.4. Avaliação do desempenho do método	64
2.3.4.1. Linearidade do método	64
2.3.4.2. Limites de detecção e quantificação	65
2.3.5. Estratégias de pré-concentração “on line”	67
2.3.5.1. Efeito do volume do plugue de amostra	70
2.3.5.2. Composição do plugue de amostra	71
2.3.5.3. Variações na composição do eletrólito de corrida	72
2.3.5.4. Tensão de “stacking” e valor da corrente para inversão da polaridade	73
2.3.5.5. Procedimento de lavagem entre corridas	74

2.3.5.6.	Avaliação do aumento da sensibilidade no modo LVSS com inversão da polaridade	75
2.3.5.7.	Linearidade, precisão instrumental e limites de detecção e quantificação	77
2.4.	Considerações finais	79
2.5.	Referências bibliográficas	81

Capítulo 3 – Determinação de fármacos de caráter básico e neutro utilizando eletroforese capilar associada a estratégias de concentração “on line”

3.1.	Introdução	85
3.2.	Procedimentos experimentais	87
3.2.1.	Equipamento e parâmetros instrumentais	87
3.2.2.	Reagentes e soluções	88
3.3.	Resultados e discussão	89
3.3.1.	Otimização do eletrólito de separação	89
3.3.1.1.	Escolha do pH do eletrólito	90
3.3.1.2.	Concentração de SDS	90
3.3.1.3.	Efeito da tensão aplicada	90
3.3.1.4.	Escolha do contra-íon do eletrólito de corrida	91
3.3.1.5.	Adição de solventes orgânicos	91
3.3.2.	Composição do solvente utilizado para dissolução dos analitos	92
3.3.3.	Eletrólito de separação	93
3.3.4.	Avaliação do desempenho do método	94
3.3.4.1.	Linearidade do método	94
3.3.4.2.	Limites de detecção e quantificação	95
3.3.5.	Estratégias de pré-concentração “on line”	96
3.3.5.1.	Escolha da do solvente para solubilização dos padrões	98
3.3.5.2.	Efeito da injeção de plugue de água antecedendo a injeção da amostra	99
3.3.5.3.	Avaliação do aumento da detectabilidade no modo de “stacking” com micelas e grande volume de injeção da amostra	100
3.3.5.4.	Linearidade, precisão instrumental e limites de detecção e quantificação	101
3.4.	Considerações finais	103
3.5.	Referências bibliográficas	104

Capítulo 4 – Estudos de extração em fase sólida aplicados a substâncias de caráter ácido, básico e neutro

4.1.	Introdução	106
4.2.	Procedimentos experimentais	106
4.2.1.	Equipamentos e parâmetros instrumentais	106
4.2.2.	Reagentes e soluções	107
4.2.3.	Amostras	108
4.2.4.	Extração em fase sólida	108
4.3.	Resultados e discussão	110
4.3.1.	Experimentos preliminares	110
4.3.1.1.	Compostos de caráter ácido	111
4.3.1.2.	Compostos de caráter básico e neutro	113
4.3.2.	Determinação do volume de capacidade	116
4.3.3.	Estudo da retenção dos ácidos salicílico e gentísico	119
4.3.3.1.	Efeito da vazão	119
4.3.3.2.	Efeito do pH	120
4.3.4.	Determinação dos volumes de lavagem	122
4.3.5.	Determinação do solvente de eluição	123
4.3.6.	Etapa de secagem da amostra	124
4.3.7.	Combinação das técnicas de concentração “on line” e “off line” para os compostos de caráter ácido, básico e neutro	125
4.3.8.	Estudos de recuperação	129
4.3.8.1.	Analitos de caráter ácido	129
4.3.8.2.	Analitos de caráter básico e neutro	130
4.4.	Considerações finais	131
4.5.	Referências bibliográficas	132

Capítulo 5 – Estudos de extração em fase sólida aplicados a substâncias de caráter ácido, básico e neutro **133**

5.1.	Introdução	134
5.2.	Procedimentos experimentais	135
5.2.1.	Equipamentos e parâmetros instrumentais	135
5.2.2.	Reagentes e soluções	136
5.2.3.	Amostras	137
5.2.4.	Metodologias	137
5.3.	Resultados e discussão	138
5.3.1.	Desenvolvimento do método com injeção convencional	138
5.3.1.1.	Aumento da velocidade de separação	139
5.3.1.2.	Determinação da mobilidade iônica dos parabenos	139
5.3.1.3.	Determinação da mobilidade efetiva dos parabenos	141
5.3.1.3.1.	Determinação rápida de μ_{eff} para analitos aniônicos	142
5.3.1.3.2.	Parâmetros para determinação de μ_{eff}	145
5.3.1.4.	Escolha do padrão interno	151

5.3.2.	Avaliação do método desenvolvido	153
5.3.3.	Estratégias empregadas para o aumento da detectabilidade do método	157
5.3.3.1.	Extração em fase sólida	157
5.3.3.1.1.	Escolha da fase de extração	157
5.3.3.1.2.	Determinação do coeficiente de distribuição sólido /líquido	159
5.3.3.1.3.	Determinação do volume morto da coluna e razão entre as fases sólida e líquida	161
5.3.3.1.4.	Determinação do volume de capacidade para a fase PS-DVB	162
5.3.3.1.5.	Seleção do volume e composição do solvente de limpeza da fase a partir de experimentos de eluição	164
5.3.3.1.6.	Avaliação do volume de capacidade	165
5.3.3.1.7.	Determinação do volume de eluição	167
5.3.3.1.8.	Etapas do procedimento de extração	169
5.3.4.	Estratégia de pré-concentração “on line”	170
5.3.4.1.	Determinação do limite de detecção utilizando injeção normal	170
5.3.4.2.	Pré-concentração utilizando grande volume de injeção com remoção da matriz da amostra com inversão da polaridade	172
5.3.4.2.1.	Otimização do procedimento de “stacking”	173
5.3.4.2.2.	Estudo do fenômeno de “stacking” no modo LVSS com inversão da polaridade	177
5.3.5.	Aplicação dos procedimentos de pré-concentração “off-line” e “on line” em amostra de água do Reservatório Billings	184
5.3.5.1.	Recuperação	185
5.4.	Considerações finais	186
5.5.	Referências bibliográficas	187

Capítulo 6 – Determinação de alquilbenzeno sulfonato linear e homólogos por eletroforese capilar aplicados a amostras de efluente e detergentes comerciais

6.1.	Introdução	191
6.2.	Procedimento experimental	193
6.2.1.	Equipamento e procedimento experimental	193
6.2.2.	Reagentes e soluções	193
6.2.3.	Amostras	194
6.2.4.	Condições de análise	194
6.3.	Resultados e discussão	195
6.3.1.	Desenvolvimento do método	195
6.3.2.	Avaliação do desempenho do método	199
6.3.3.	Aplicação do método desenvolvido	200

6.3.3.1.	Amostras de detergentes comerciais	200
6.3.4.	Procedimento de extração em fase sólida	202
6.3.5	Análise de efluentes de ETEs	203
6.4.	Considerações finais	204
6.5.	Referências bibliográficas	206

Capítulo 7 – Análise de fármacos em águas superficiais utilizando CE-MS/MS 208

7.1.	Introdução	209
7.2.	Procedimentos experimentais	210
7.2.1.	Reagentes e soluções	210
7.2.2.	Equipamentos	210
7.2.3.	Condições de análise e parâmetros instrumentais	211
7.2.4.	Procedimento de extração em fase sólida	212
7.3.	Resultados e discussão	212
7.3.1.	Composição do eletrólito de corrida	213
7.3.2.	Parâmetros instrumentais	215
7.3.3.	Resultados qualitativos	216
7.3.4.	Avaliação do desempenho do método	221
7.3.4.1.	Linearidade	221
7.3.4.2.	Extração em fase sólida	222
7.3.4.3.	Recuperação	223
7.4.	Considerações finais	224
7.5.	Referências bibliográficas	226

Capítulo 8 – Determinação de fármacos em águas superficiais utilizando LC-MS/MS 227

8.1.	Introdução	228
8.2.	Procedimentos experimentais	229
8.2.1.	Equipamentos e parâmetros instrumentais	229
8.2.2.	Reagentes e soluções	231
8.2.3.	Amostras	231
8.3.	Resultados e discussão	232
8.3.1.	LC-QTrap/API 5000	232
8.3.1.1.	Resultados para o sistema LC-QTrap	237
8.3.1.2.	Resultados para o sistema API 5000	240
8.3.2.	Análise de amostra de água do reservatório Billings utilizando o sistema LC-MS/MS-API 5000	242
8.3.2.1.	Efeito da matriz na ionização das substâncias	244
8.4.	Considerações finais	245
8.5.	Referências bibliográficas	246

Capítulo 9 – Conclusões	248
Apêndice I	250
Apêndice II	266
Apêndice III	274
Súmula Curricular	292

Capítulo 1

Introdução e revisão bibliográfica

1. Introdução

1.1. Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal

Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (do inglês PPCP, “Pharmaceutical and Personal Care Products”) compreendem um diverso grupo de substâncias químicas, utilizados interna ou externamente, tanto por humanos quanto por animais, incluindo desde excipientes utilizados na formulação de medicamentos, anti-inflamatórios não esteroidais, agentes de diagnóstico (meios de contraste para raio-X) e antimicrobianos, até produtos de uso diário como shampoos, cremes dentais, fragrâncias, cremes, sabonetes, protetores solares, etc. Estes produtos têm sido alvo de muitos estudos em química analítica ambiental devido a sua ocorrência em ambientes aquáticos, tais como águas superficiais e subterrâneas, esgotos, efluentes e, em águas utilizadas para consumo humano. As populações humana e animal utilizam enormes quantidades desses produtos todos os anos, e o aparecimento desses compostos no meio ambiente, ainda que em baixas concentrações, com especial atenção para os fármacos, tem se mostrado como um fator de poluição e atualmente é alvo de numerosos estudos [1 - 4].

1.1.1. Fármacos no ambiente aquático

Dentre os poluentes ambientais considerados emergentes, os fármacos têm recebido atenção especial, pois são utilizados em grandes quantidades em medicina humana e veterinária. Os fármacos são considerados poluentes ambientais emergentes, devido a estas moléculas serem biologicamente ativas, e em sua grande maioria possuir características lipofílicas, apresentando frequentemente baixa biodegradabilidade no meio ambiente. Estas propriedades intrínsecas apresentam um grande potencial para sua bioacumulação e persistência. Os produtos

farmacêuticos representam mais de 4000 substâncias licenciadas no mundo inteiro, em 12000 especialidades diferentes [5-7].

Um dos primeiros relatos sobre a presença de fármacos no meio ambiente foi publicado por Garrison e colaboradores. Em 1976 [8], utilizando cromatografia a gás (GC, do inglês “gas chromatography”) acoplado a um espectrômetro de massas, os autores descreveram a presença de ácido clofíbrico no efluente da estação de tratamento de esgoto (ETE) de um rio localizado na cidade do Kansas (E.U.A.). Uma concentração acima de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido clofíbrico foi determinada no esgoto bruto e tratado. As concentrações encontradas por Garrison e colaboradores corroboraram com os dados publicados pelos pesquisadores Hignite e Azarnoff [9] no final dos anos 70, que reportaram a presença de ácido clofíbrico e ácido salicílico em concentrações superiores a 10 e $96 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, em efluentes. Entretanto, é possível supor que a poluição originária desses compostos antecede sua primeira descoberta. O crescimento exponencial da população, e os avanços tecnológicos na indústria, agricultura, medicina e as facilidades domésticas, gerados a partir destes avanços, têm provocado um correspondente aumento da preocupação, quanto aos efeitos adversos potenciais aos seres humanos e os efeitos ecotóxicos, causados devido à presença de substâncias químicas no meio ambiente [1].

1.1.2. Fontes e ocorrência no meio ambiente

A forma mais importante de entrada destas substâncias no sistema aquático é por meio de efluentes de indústrias farmacêuticas, descarte de fármacos com prazos de validade vencidos, efluentes hospitalares, entre outros [10,11]. No entanto, é importante ressaltar que a maior porta de entrada desses compostos é por meio de excreção, como resultado do uso em medicina humana e veterinária (Figura 1.1).

Após o consumo, os compostos ativos são na maioria das vezes parcial ou completamente metabolizados e convertidos em metabólitos hidrofílicos, entretanto, uma significativa quantidade dessas substâncias é excretada na urina, fezes ou esterco animal em sua forma inalterada, sendo freqüentemente encontrados no esgoto bruto, e muitos deles permanecem no meio ambiente, pois não são completamente removidos durante tratamento nas ETEs [12]. Quando os efluentes são encaminhados para as Estações, três padrões de comportamento podem ser adquiridos pelos fármacos e metabólitos contidos no esgoto [13]: (i) substâncias hidrofílicas (formadas após metabolização, ex. ácido clofíbrico) e persistentes, as quais permanecerão na fase aquosa do tratamento e poderão atravessar a ETE sem alterações, alcançando então o ambiente aquático; (ii) fármacos e metabólitos degradáveis poderão sofrer biotransformação a partir de microorganismos e transformar-se em dióxido de carbono e água (ex. ácido acetilsalicílico); (iii) compostos farmacêuticos e metabólitos de caráter lipofílico serão total ou parcialmente retidos no lodo dos tanques durante o tratamento; essas substâncias serão concentradas neste lodo e utilizadas posteriormente como fertilizantes para enriquecimento de solos; com isso, os fármacos e seus metabólitos biologicamente ativos poderão atingir águas subterrâneas e até mesmo afetar organismos terrestres e aquáticos. Sendo assim, muitos fármacos residuais e metabólitos biologicamente ativos resistem aos processos de tratamento convencional de água.

Soulet e colaboradores [14] estudaram o comportamento de cinco fármacos de caráter ácido (ácido clofíbrico, ibuprofeno, cetoprofeno, ácido mefenâmico e diclofenaco) em três ETEs localizadas na Suíça, e os resultados indicaram que quatro fármacos (ácido clofíbrico, cetoprofeno, ácido mefenâmico e diclofenaco) não foram totalmente removidos durante o tratamento, permanecendo em valores

aproximados de 86% nos efluentes, e a máxima concentração determinada, para o ácido mefenâmico, no efluente de uma das ETE estudadas foi de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

No Brasil, em 1997, Stumpf e colaboradores [15] estudaram a presença de fármacos antihiperlipêmicos, anti-inflamatórios e alguns metabólitos em efluentes de ETEs e em águas superficiais em pontos distribuídos no estado do Rio de Janeiro. As concentrações médias encontradas nos efluentes das ETEs variaram para a maioria dos fármacos estudados entre $0,1$ e $1 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que nos rios, os valores encontrados situaram-se entre $0,02$ e $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$, como consequência da remoção incompleta dos fármacos durante a passagem pela ETE.

As principais rotas de exposição dos diferentes tipos de fármacos no ambiente podem ser visualizadas na Figura 1.1.

Figura 1.1. Rotas de exposição dos fármacos no meio ambiente (adaptado Ref. 2 e 13)

Como pode ser observado na Figura 1.1 os fármacos apresentam diferentes vias de contaminação ambiental, o que aumenta a possibilidade de detecção destes compostos no meio ambiente.

1.2. Interferentes ou desreguladores endócrinos

O termo PPCPs exclui os chamados ingredientes inertes utilizados em formulações de uso diário (ex. excipientes), entretanto até mesmo estes ingredientes podem possuir efeitos biológicos nos organismos, e incluem tensoativos alquilfenólicos, parabenos, éster de ftalato, dentre outros. Nos últimos anos, uma categoria específica de substâncias químicas presentes no meio ambiente nomeados comumente de desreguladores ou interferentes endócrinos (EDCs, do inglês “endocrine disruptor chemicals”) tem atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa pelo fato destas substâncias serem suspeitas de possuírem propriedades estrogênicas e carcinogênicas [16]. De alguma forma estas substâncias químicas, que potencialmente interferem no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, podem ser de origem antrópica, denominada xenoestrógenos, ou de origem natural, chamados fitoestrógenos [17-19].

Evidências e estudos laboratoriais indicam que ao interferirem no sistema endócrino, os desreguladores endócrinos podem causar diversos efeitos aos organismos vivos, tais como redução da produção de espermatozóides, dimorfismo sexual, má-formação de órgãos reprodutores, câncer de testículos, mama e próstata, disfunção da glândula tireóide e alterações relacionadas ao sistema neurológico, mesmo em concentrações extremamente baixas [18].

1.2.1. Substâncias classificadas como desreguladores endócrinos

Existem basicamente duas classes de substâncias que podem alterar o funcionamento do sistema endócrino: i) os hormônios naturais, que incluem estrogênio, 17 β -estradiol, estrona, estriol, progesterona e testosterona, presentes no corpo humano e nos animais, e os fitoestrógenos, substâncias contidas em algumas plantas, bem como nas sementes de soja, e que apresentam atividade

semelhante aos esteróides hormonais quando ingeridas por um determinado organismo, incluindo genisteína, metaresinol, enterodiol e daidzeína; ii) e as substâncias sintéticas, que incluem os hormônios sintéticos (hormônios idênticos aos naturais, fabricados pelo homem e utilizados como contraceptivos orais e/ou aditivos na alimentação animal), tais como 17 α -etinilestradiol, dietilestilbestrol, etinilestradiol, bem como xenoestrógenos, substâncias produzidas para utilização nas indústrias, na agricultura, e para os bens de consumo; estão incluídos nesta categoria os aditivos plásticos, pesticidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, ésteres de alquil do ácido p-hidroxibenzóico (parabenos), bifenilas policloradas e, ainda, subprodutos de processos industriais, como as dioxinas e furanos [17,20-25]

1.2.2. Principais fontes de desreguladores endócrinos

Tanto os desreguladores endócrinos como outras classes de poluentes ambientais apresentam uma variedade de fontes, entretanto, tais fontes podem ser classificadas em dois grandes grupos: pontuais e não pontuais (ou difusas). As fontes pontuais apresentam um ponto de entrada no meio ambiente bem caracterizado, geralmente através de cursos d'água (ex. descargas de efluentes industriais e esgotos de origem doméstica, derramamentos acidentais, atividades de mineração, enchentes, entre outros). Por outro lado, as fontes não pontuais são mais difíceis de serem controladas, uma vez que o ponto de entrada dos poluentes no ambiente depende do tipo da fonte, da sua localização e, ainda, da combinação de uma série de processos envolvendo a concentração do poluente, sua distribuição no meio ambiente, suas propriedades físico-químicas e as condições ambientais [16,18,26].

Para os seres humanos, a fonte mais importante de contaminação dos interferentes endócrinos é a alimentação, pois estas substâncias são utilizadas durante a produção de alimentos industrializados ou no processo de embalagem

dos mesmos, ou ainda, através da ingestão de água contaminada, já que várias destas substâncias não são totalmente destruídas ou degradadas durante o processo empregado nas estações de tratamento de esgoto [27,28].

1.3. Efeitos causados pela exposição aos PPCPs e desreguladores endócrinos

Diversas evidências suportam o fato de que tanto os PPCPs quanto os desreguladores endócrinos (de forma inalterada, biotransformada ou degradada) tem o potencial de alcançar o meio ambiente de diversas formas.

Recentemente, muitos efeitos causados pelos desreguladores endócrinos têm sido relatados, incluindo anomalias no sistema reprodutivo de animais, tais como feminização de peixes machos, indução ao hermafroditismo, inibição do desenvolvimento das gônadas e declínio na reprodução de répteis, feminização de gaivotas macho, indução da síntese de vitelogenina no plasma de peixes, entre outros; efeitos na saúde de humanos incluem: redução na produção de espermatozóides, aumento da incidência de alguns tipos de câncer, ovários policísticos e endometriose em mulheres, aumento do risco de câncer testicular e de próstata em homens, bem como alterações do sistema endócrino, tanto em homens quanto em mulheres [29-35].

No que diz respeito aos PPCPs, a maior preocupação está relacionada aos agentes antimicrobianos, pois a presença constante destas substâncias no meio ambiente poderia levar ao desenvolvimento de resistência a determinados patógenos, e ainda existem estudos que relatam o possível desencadeamento de reações alérgicas ligadas à presença destes antimicrobianos na água [36]. Outro fator importante é o efeito sinérgico diretamente relacionado a misturas destes compostos potencialmente presentes na água. Embora as concentrações sejam

baixas, seus efeitos ainda são desconhecidos, e eventualmente a exposição a estas substâncias de forma continuada, mesmo que em sub-doses terapêuticas, misturadas a outros produtos químicos, tais como desreguladores endócrinos, gera questionamentos e ainda são escassos estudos que possam fornecer alguma resposta [37,38].

1.4. Legislação

Como ainda são pouco conhecidos os riscos provocados por estes poluentes emergentes aos seres vivos, são quase inexistentes as normas que regulam sua presença no meio ambiente.

A Europa possui algumas normas destinadas à avaliação do risco ambiental provocado pelos PPCPs e desreguladores endócrinos, e em 2005 estas normas foram atualizadas. Nesta regulamentação [39] consta que produtos farmacêuticos ativos devem passar por avaliações de toxicidade crônica. A União Européia possui também uma Diretriz, a qual orienta e estabelece níveis seguros de concentrações de substâncias farmacêuticas de uso veterinário no meio ambiente, não devendo exceder valores de $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ no solo e $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ em efluentes.

Os Estados Unidos por meio da USFDA (United States Food and Drug Administration) regulamentaram a presença de substâncias farmacêuticas no meio ambiente com base nos processos de revisão ambiental requerido por este órgão para a aprovação de novos fármacos. Entretanto, a USEPA (United States Environmental Protection Agency) não possui uma regulamentação oficial para monitoramento de PPCPs em água potável [40].

Um estudo desenvolvido por Müller e colaboradores na Holanda, em 2002 [41], estabelece limites toxicológicos para 13 fármacos em água. Os limites foram baseados em relação a 10% da concentração máxima diária aceitável ou no limite

máximo permitido para resíduos de fármacos veterinários em leite, considerando um peso médio de uma pessoa de 60 kg e a dose diária de ingestão de 2 L de água. Foram estabelecidos os seguintes limites em água potável para os seguintes fármacos: 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de paracetamol, 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de sulfametoxazol, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbamazepina, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de metoprolol, 7,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diclofenaco, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de bisoprolol, 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ de bezafibrato, 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ de eritromicina, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fenofibrato, 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ácido acetilsalicílico, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno e, 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ácido clofíbrico.

1.5. Análise de fármacos, metabólitos, hormônios e desreguladores endócrinos

As baixas concentrações destes poluentes encontrados no meio ambiente, comumente na faixa de ng L^{-1} , $\mu\text{g L}^{-1}$ ou pg g^{-1} , associadas a matrizes complexas (efluentes e afluentes de ETEs, águas superficiais e sedimentos) demandam estudos de igual complexidade, no que diz respeito à determinação destes compostos, acrescentando o fato de que muitas destas substâncias são parcialmente metabolizadas pelo organismo humano, e os metabólitos resultantes podem ser nocivos ao meio ambiente e, portanto devem ser incluídos nas investigações [42].

Um importante desafio é o correto desenvolvimento de procedimentos de extração e métodos analíticos capazes de detectar concentrações tão reduzidas destes compostos, em matrizes de diferentes complexidades [43].

Diversas estratégias utilizadas atualmente com sucesso na rotina analítica de determinação de concentrações traços podem ser aplicadas nestes resíduos. A análise de fármacos, metabólitos, hormônios e desreguladores endócrinos compreende basicamente etapas de extração e pré-concentração dos analitos,

eliminação de interferentes existentes nas matrizes ambientais, separação, detecção e quantificação destas substâncias.

Detalhes das técnicas analíticas e de preparo de amostras utilizadas neste trabalho estão compilados nos Apêndices I, II e III.

1.6. Ocorrência de fármacos, metabólitos e desreguladores endócrinos no meio ambiente

A seguir, a Tabela 1.2 apresenta um resumo de uma seleção de trabalhos publicados na literatura nos últimos anos envolvendo a ocorrência de resíduos de poluentes emergentes no meio ambiente.

Tabela 1.2. Poluentes emergentes encontrados no meio ambiente.

Substâncias	Matriz	Pré-tratamento da amostra	Técnica analítica	LD	Ref.
Carbamazepina	Água de rio, lago e efluente de ETE	SPE	GC-MS	0,95 µg L ⁻¹	[44]
Ácido clofibrico				0,06 µg L ⁻¹	
Diclofenaco				0,99 µg L ⁻¹	
Ibuprofeno				1,3 µg L ⁻¹	
Cetoprofeno				0,18 µg L ⁻¹	
Naproxeno				2,6 µg L ⁻¹	
Naproxeno	Afluente e efluente de ETE	LLE, SPE	CE-ESI-MS	232 ng L ⁻¹	[45]
Ácido clofibrico				248 ng L ⁻¹	
Claritromicina	Água de rio e efluente de ETE	SPE	LC-MS/MS	57 ng L ⁻¹	[46]
Roxitromicina				11 ng L ⁻¹	
Eritromicina				110 ng L ⁻¹	
Ácido salicílico				18 ng L ⁻¹	
Cetoprofeno	Afluente de ETE e água de rio	SPE	LC-ESI-MS	17 ng L ⁻¹	[47]
Naproxeno				17 ng L ⁻¹	
Diclofenaco				17 ng L ⁻¹	
Ibuprofeno				31 ng L ⁻¹	
Gemfibrozil				100 ng L ⁻¹	
				75ng L ⁻¹	
Atenolol	Água potável, sedimento e água de rio	SPE	LC-MS/MS	49,5 ng L ⁻¹	[48]
Bezafibrato				15,1 ng L ⁻¹	
Ácido clofibrico				3,2 ng L ⁻¹	
Ciclofosfamida				2,2 ng L ⁻¹	

Diazepam				0,5 ng L ⁻¹	
Furosemida				85,1 ng L ⁻¹	
Ibuprofeno				90,6 ng L ⁻¹	
Lincomicina				1,2 ng L ⁻¹	
Oleandomicina				0,4 ng L ⁻¹	
Ranitidina				9,4 ng L ⁻¹	
Salbutamol				3,1 ng L ⁻¹	
Ibuprofeno	Efluente de ETE	SPME	GC-MS	200 ng L ⁻¹	[49]
Ibuprofeno	Águas superficiais, afluente e efluente de ETE	SPE	GC-MS	8 ng L ⁻¹	[50]
Ibuprofeno				34 µg L ⁻¹	
Paracetamol				29 µg L ⁻¹	
Cafeína				52 µg L ⁻¹	
Carbamazepina	Afluente de ETE	SPE	GC-MS	0,12 µg L ⁻¹	[51]
Dipirona				4,7 µg L ⁻¹	
Diclofenaco				0,2 µg L ⁻¹	
Codeína				2,8 µg L ⁻¹	
Ibuprofeno				921 ng L ⁻¹	
Paracetamol	Efluente hospitalar	SPE	GC-MS-MS	1080 ng L ⁻¹	[52]
Diclofenaco				37 ng L ⁻¹	
Carbamazepina				1 ng L ⁻¹	
Aspirina				470 ng L ⁻¹	
Ibuprofeno				381 ng L ⁻¹	
Cetoprofeno	Afluente de ETE	SPE	GC-MS	108 ng L ⁻¹	[53]
Naproxeno				38 ng L ⁻¹	
Carbamazepina				15 ng L ⁻¹	
Sulfametoxazol	Afluente de ETE	SPME	LC-MS-MS	1,37 µg L ⁻¹	[54]

Trimetoprima				0,46 µg L ⁻¹	
Eritromicina				0,086 µg L ⁻¹	
Claritromicina				1,57 µg L ⁻¹	
Ácido clofíbrico	Efluente de ETE	SPE	GC-MS	5 ng L ⁻¹	[55]
Diclofenaco				10 ng L ⁻¹	
Sotalol				560 ng L ⁻¹	
Fenazona				25 ng L ⁻¹	
Diclofenaco				590 ng L ⁻¹	
Iopamidol	Água de rio	SPE	GC-MS	300 ng L ⁻¹	[56]
Carbamazepina				900 ng L ⁻¹	
Eritromicina				49 ng L ⁻¹	
Sulfametoxazol				410 ng L ⁻¹	
Ciprofloxacina	Efluente hospitalar	SPE	LC-MS/MS	19 µg L ⁻¹	[57]
Ácido clofíbrico				2,4 ng L ⁻¹	
Ibuprofeno				4,9 ng L ⁻¹	
Hidróxi-ibuprofeno				9,5 ng L ⁻¹	
Carboxi-ibuprofeno	Água de rio	SPE	GC-MS	18 ng L ⁻¹	[58]
Diclofenaco				26 ng L ⁻¹	
Cafeína				98 ng L ⁻¹	
Ibuprofeno				213 ng L ⁻¹	
Paracetamol				52 ng L ⁻¹	
Salbutamol	Água de rio	SPE	GC-MS	38 ng L ⁻¹	[59]
Ácido mefenâmico				94 ng L ⁻¹	
Ibuprofeno				30 ng L ⁻¹	
Carbamazepina	Efluente, água de rio e torneira	SPE	CG-MS	420 ng L ⁻¹	[60]
Naproxeno				30 ng L ⁻¹	
Carbamazepina	Efluente de ETE	SPE	LC-fluorescência	12,1 ng mL ⁻¹	[61]

Dihidrocarbamazepina				9,8 ng mL ⁻¹
Diazepam				13 ng mL ⁻¹
Cetoprofeno				9,4 ng mL ⁻¹
Naproxeno				9,4 ng mL ⁻¹
Diclofenaco				8,6 ng mL ⁻¹
Sulfaguanidina				211,1 µg L ⁻¹
Sulfadiazina				111,4 µg L ⁻¹
Sulfametazina				107,1 µg L ⁻¹
Enrofloxacin				23,7 µg L ⁻¹
Ibuprofeno				2,6 µg L ⁻¹
Naproxeno				1,8 µg L ⁻¹
Iopromida				6 µg L ⁻¹
Sulfametoxazol				0,25 µg L ⁻¹
Bezafibrato				0,050 µg L ⁻¹
Ácido clofibrico				0,060 µg L ⁻¹
Genfibrozil				0,090 µg L ⁻¹
Atenolol				0,017 µg L ⁻¹
Sotalol				0,018 µg L ⁻¹
Metoprolol				0,55 µg L ⁻¹
Betaxolol				0,75 µg L ⁻¹
Fenofibrato				1,25 µg L ⁻¹
Ibuprofeno				1,3 µg L ⁻¹
Diclofenaco				1,0 µg L ⁻¹
Naproxeno				0,4 µg L ⁻¹
Bezafibrato				0,9 µg L ⁻¹
Gemfibrozil				1,0 µg L ⁻¹
Ofloxacin				1,6 µg L ⁻¹

Carbamazepina	2,8 µg L ⁻¹				
Primidona	0,9 µg L ⁻¹				
Sulfametazina	0,8 µg L ⁻¹				
Sulfadimetoxina	0,8 µg L ⁻¹				
Sulfametoxazol					
Furosemida	0,1 µg L ⁻¹				
Ácido clofibrico	0,3 µg L ⁻¹				
Bezafibrato	0,1 µg L ⁻¹				
Hidroclortiazida	0,1 µg L ⁻¹				
Cetoprofeno	10 µg L ⁻¹				
Naproxeno	1,0 µg L ⁻¹				
Diclofenaco	0,5 µg L ⁻¹				
Fenoprofeno	0,2 µg L ⁻¹				
Indometacina	0,3 µg L ⁻¹				
Ácido mefenâmico	0,5 µg L ⁻¹				
Ibuprofeno	0,5 µg L ⁻¹				
Diuron	0,1 µg L ⁻¹				
Clorofeno	0,5 µg L ⁻¹				
Gemfibrozil	1,0 µg L ⁻¹				
Enrofloxacin	0,5 µg L ⁻¹				
Oxitetraciclina	0,5 µg L ⁻¹				
Trimetoprima	0,1 µg L ⁻¹				
Metilparabeno	3 µg kg ⁻¹				
Etilparabeno	1,75 µg kg ⁻¹				
Propilparabeno	1,75 µg kg ⁻¹				
Benzilparabeno	2,0 µg kg ⁻¹				
Benzofenona-3	3,0 µg kg ⁻¹				

[66]

[67]

[68]

Triclocarban	1,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$		
Octocrileno	1,25 $\mu\text{g kg}^{-1}$		
Ácido octildimetil-p-aminobenzóico	3,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$		
Metilparabeno	0,2 ng mL^{-1}		
Etilparabeno	0,07 ng mL^{-1}		
n-Propilparabeno	0,06 ng mL^{-1}		
n-Butilparabeno	0,04 ng mL^{-1}		
Benzilparabeno	0,04 ng mL^{-1}		
Triclosan	0,004 ng mL^{-1}		[69]
Triclocarban	0,12 ng mL^{-1}		
Isopropilparabeno	0,02 ng mL^{-1}		
Isobutilparabeno	0,08 ng mL^{-1}		

LD, limite de detecção; ETE, estação de tratamento de esgoto; SPE, extração em fase sólida; SPME, microextração em fase sólida; GC, cromatografia a gás; LC, cromatografia líquida; CE, eletroforese capilar; MEKC, cromatografia eletrocinética micelar; MS, espectrômetro de massas.

É possível observar a partir da Tabela 1.2 que foram diversas as substâncias estudadas ao longo dos últimos anos, em matrizes de diferentes complexidades. Na maioria dos casos, o preparo da amostra envolve uma etapa de extração e pré-concentração das substâncias estudadas por meio da extração em fase sólida, e as metodologias demonstram limites de detecção reduzidos para a determinação desses poluentes.

1.7. Referências bibliográficas

- [1] DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 6, p. 912-944, dec. 1999. Special report.
- [2] HALLING-SØRENSEN, J. B., NIELSEN, S. N., LANZKY, P. F., INGERSLE, F., HOLTEN, L. H. C., JØRGENSEN, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – A Review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357-393, jan. 1998. Review.
- [3] HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K., KRATZ, K-L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **The Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 109-118, jan. 1999.
- [4] BILA, D. M., DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, abr. 2003. Revisão.
- [5] TERNES, T. A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 419-434, aug. 2001.
- [6] JONES, O. A. H., VOULVOULIS, N., LESTER, J. N. Human pharmaceuticals in wastewater treatment processes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 401-427, jul. 2005.
- [7] BEAUSSE, J. Selected drugs in solid matrices: A review of environmental occurrence, determination and properties of principal substances. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, 10-11, p. 3-36, nov. 2004.
- [8] GARRISON, A. W., POPE, J. D., ALLEN, F. R. GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters. In: KEITH, C. H. (ed.) **Identification and analysis of organic pollutants in water**, Ann Arbor Science, Ann Arbor, 1976.
- [9] HIGNITE, C. and AZARNOFF, D. L. Drugs and drug metabolites as a environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. **Life Sciences**, v. 20, n. 2, p. 337-341, jan. 1977.
- [10] SANDERSON, H., JOHNSON, D. J., REITSMA, T., BRAIN, R. A., WILSON, C. J., SOLOMON, K. R. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 158-183, feb. 2004.
- [11] TERNES, T., MEISENHEIMER, M., McDOWELL, D., SACHER, F., BRAUCH, H.-J., HAIST-GLUDE, B., PREUSS, G., WILME, U., ZULEI-SEIBERT, N. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 17, p. 3855-3863, jul. 2002.
- [12] LÖFFLER, D., RÖMBKE, J., MELLER, M., TERNES, T. A. Environmental fate of pharmaceuticals in water / sediment systems. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 14, p. 5209-5218, sep. 2005.
- [13] JØRGENSEN, S. E., HALLING-SØRENSEN, B. Drug in the environment. **Chemosphere**, v. 40, p. 691-699, 2000.

- [14] SOULET, B., TAUXE, A., TARRADELLAS, J. Analysis of acidic drugs in Swiss wastewaters. **International Journal of Environmental analytical chemistry**, v. 82, n. 10, p. 659-667, 2002.
- [15] STUMPF, M., TERNES, T. A., WILKEN, R. D., RODRIGUES, S. V., BRAUMANN, V. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 135-141, jan. 1999.
- [16] BAIRD, C., **Química Ambiental**, 2ª Ed. Bookman: Porto Alegre. 2002. Capítulo 6 e 7.
- [17] BIRKETT, J. W., LESTER, J. N., **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes**, 1ª Ed., IWA Publishing. Lewis Publishers CRC Press LLC: USA, 2003.
- [18] LINTELMANN, J., KATAYAMA, A., KURIHARA, N., SHORE, L., WENZEL, A. Endocrine disruptores in the environment – (IUPAC Technical Report), v. 75, n. 6, p. 631-681, may 2003.
- [19] BILA, M. D., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p.631-667, fev. 2007.
- [20] DE ALDA, M. J. L., BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 911, n. 2, p. 203-210, mar. 2001.
- [21] DE ALDA, M. J. L., DIAZ-CRUZ, S., PETROVIC, M., BARCELÓ, D. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selectred emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 503-526, jun. 2003.
- [22] LOUIE, P. K. K., SIN, D. W. M. A preliminary investigation of persistent organic pollutants in ambient air in Hong Kong. **Chemosphere**, v. 52, n. 9, p. 1397-1403, sep. 2003.
- [23] HUTCHINS, S. R., WARDE, C. H. A predictive laboratory study of trace organic contamination of groundwater – Preliminary results. **Journal of Hydrology**, v. 67, n. 1-4, p. 223-233, 1984.
- [24] FROMME, H., OTTO, T., PILZ, K. Polycyclic musk fragrances in different environmental compartments in Berlin (Germany). **Water Research**, v. 35, n. 1, p. 121-128, jan. 2001.
- [25] FROMME, H., KUCHLER, T., OTTO, T., PILZ, K., MULLER, J., WENZEL, A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. **Water Research**, v. 36, n. 6, p. 1429-1438, mar. 2002.
- [26] CARBALLA, M., OMIL, F., LEMA, J. M., LLOMPART, M., GARCIA-JARES, C., RODRIGUEZ, I., GOMES, M., TERNES, T. Behavior of pharmaceuticals,

cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. **Water Research**, v. 38, n. 12, p. 2918-2926, jul. 2004.

[27] FARNSWORTH, N. R., BINGEL, A. S., CORDELL, G. A., CRANE, F. A., FONG, H. H. S. Potential value of plants as sources of new antifertility agents II. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 5, p. 717-754, may. 1975.

[28] HALLING-SØRENSEN, B., NIELSEN, S. N., LANSKY, P. F., INGERSLEV, F., HOLTEN-LÜTZHØFT, H. C., JØRGENSEN, S. E. Occurrence fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – A review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357-394, jan. 1998.

[29] RODGERS-GRAY, T. P., JOBLING, S., KELLY, C., MORRIS, S., BRIGHTY, G., WALDOCK, M. J., SUMPTER, J. P., TYLER, C. R. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 3, p. 462-470, feb. 2001.

[30] RODGERS-GRAY, T. P., JOBLING, S., MORRIS, S., KELLY, C., KIRBY, S., JANBAKHSH, A., HARRIES, J. E., WALDOCK, M. J., SUMPTER, J. P., TYLER, C. R. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 8, p. 1521-1528, apr. 2000.

[31] KANG, I. J., YOKOTA, H., OSHIMA, Y., TSURUDA, Y., YAMAGUCHI, T., MAEDA, M., IMADA, N., TADOKORO, H., HONJO, T. Effect of 17 beta-estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 47, n. 1, p. 71-80, apr. 2002.

[32] SHIODA, T., WAKABAYASHI, M. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 40, n. 3, p. 239-243, feb. 2000.

[33] FOLMAR, L. C., HEMMER, M., HEMMER, R., BOWMAN, C., KROLL, K., DENSLOW, N. D. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. **Aquatic Toxicology**, v. 49, n. 1-2, p. 77-88, may 2000.

[34] DASTON, G. P. Advances in understanding mechanisms of toxicity and implication for risk assessment. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 2-3, p. 389-396, mar.-jun. 1997.

[35] HARRISON, P. T. C., HOLMES, P., HUMFREY, C. D. N. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? **Science of the Total Environment**, v. 205, n. 2-3, p. 97-106, oct. 1997.

[36] CHISTENSSSEN, F. M. Pharmaceuticals in the environment – a human risk? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 212-221, 1998.

[37] JONES, O. A. H., VOULVOULIS, N., LESTER, J. N. Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active

compounds in the aquatic environment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 335-350, jul. 2004.

[38] JONES, O. A. H., VOULVOULIS, N., LESTER, J. N. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. **Water Research**, v. 36, n. 20, p. 5013-5022, dec. 2002.

[39] ARIESE, F., WILFRIED, H. O. E., DICK, T. H. M., SIJM, C. Natural and synthetic organic compounds in the environment a symposium report. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 65-80, 2001.

[40] KOT-WASIK, A., DEBSKA, J., NAMIES'NIK, J. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 557-568, 2006.

[41] MÜLLER, J. J. A., Toxicological limits of medicines in drinking-water. RIVM Rapport 703719004, p. 35-45, 2002. Disponível em: <www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten>. Acesso em julho de 2008.

[42] HAO, C., ZHAO, X., YANG, P. GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 569-580, 2007.

[43] JORGENSEN, S. E., HALLING-SORENSEN, B. Drugs in the environment. **Chemosphere**, v. 40, n. 2, p. 691-699, 2000.

[44] TIXIER, C., SINGER, H. P., OELLERS, S., MÜLLER, S. R. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 6, p. 1061-1068, 2003.

[45] MACIÁ, A., BORRULL, F., CALULL, M., AGUILAR, C. Determination of some acidic drugs in surface and sewage treatment plant waters by capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 25, n. 20, p. 3441-3449, oct. 2004.

[46] MCARDELL, C. S., MOLNAR, E., SUTER, M. J.-F., GIGER, W. Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 24, p. 5479-5486, oct. 2003.

[47] FARRÉ, M., FERRER, I., GINEBREDÀ, A., FIGUERAS, M., OLIVELLA, L., TIRAPU, L., VILANOVA, M., BARCELÓ, D. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1-2, p. 187-197, aug. 2001.

[48] ZUCCATO, E., CALAMARI, D., NATANGELO, M., FANELLI, R. Presence of therapeutic drugs in the environment. **The Lancet**, v. 355, n. 9217, p. 1789-1790, may 2000.

[49] MÖDER, M., SCHRADER, S., WINKLER, M., POPP, P. Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of biologically active

substances in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 873, n. 1, p. 95-106, mar. 2000.

[50] BUSER, H.-R., POIGER, T., MÜLLER, M. D. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. **Environmental Science & Technology**, v. 33, n. 15, p. 2529-2535, jun. 1999.

[51] GÓMEZ, J., MARTÍNEZ BUENO, M. J., LACORTE, S., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R., AGÜERA, A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 993-1002, jan. 2007.

[52] GÓMEZ, M. J., AGÜERA, A., MEZCUA, M., HURTADO, J., MOCHOLI, F., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography-tandem mass spectrometry in wastewater. **Talanta**, v. 73, n. 2, p. 314-320, sep. 2007.

[53] NAKADA, N., TANISHIMA, T., SHINOHARA, H., KIRI, K., TAKADA, H. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. **Water Research**, v. 40, n. 17, p. 3297-3303, oct. 2006.

[54] MCCLURE, E. L., WONG, C. S. Solid phase microextraction of macrolide, trimethoprim, and sulfonamides antibiotics in wastewaters. **Journal of Chromatography A**, v. 1169, n.1-2, p.53-62, oct. 2007.

[55] KOUTSOUBA, V., HEBERER, T. FUHRMANN, B., SCHMIDT-BAUMLER, K., TSIPI, D., HISKIA, A. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 51, n. 2, p. 69-75, apr. 2003.

[56] SACHER, F., LANGE, F. T., BRAUCH, H.-J., BLANKENHORN, I. Pharmaceuticals in groundwaters Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1-2, p. 199-210, dec. 2001.

[57] MARTINS, A. F., VASCONCELOS, T. G., HENRIQUES, D. M., FRANK, C. DA S., KÖNIG, A., KÜMMERER, K. Concentration of ciprofloxacin in brazilian hospital effluent and preliminary risk assessment: A case study. **Clean-Soil Air Water**, v. 36, n. 3, p. 264-269, mar. 2008.

[58] WEIGEL, S., KALLENBORN, R., HÜHNERFUSS, H. Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, n. 2, p. 183-195, jan. 2004.

[59] BOUND, P. J., VOORVOULIS, N. Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. **Water Research**, v. 40, n. 15, p. 2885-2892, aug. 2006.

- [60] LIN, W-C., CHEN, H-C., DING, W-H. Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, n. 2, p. 279-285, feb. 2005.
- [61] GONZÁLES-BARREIRO, C., LORES, M., CASAIS, M. C., CELA, R. Simultaneous determination of neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater by high-performance liquid chromatography-post-column photochemically induced induced fluorimetry. **Journal of Chromatography A**, v. 993, n. 1-2, p. 29-37, apr. 2003.
- [62] BABIĆ, S., AŠPERGER, D., MUTAVDŽIĆ, D., HORVAT, A. J. M., KAŠTELAN-MACAN, M. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. **Talanta**, v. 70, n. 4, p. 732-738, nov. 2006.
- [63] CARBALLA, M., OMIL, F., LEMA, J. M., LIOMPART, M., GARCÍA-JARES, C., RODRÍGUEZ, I., GÓMEZ, M., TERNES, T. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. **Water Research**, v. 38, n. 12, p. 2916-2926, jul. 2004.
- [64] HERNANDO, M. D., PETROVIC, M., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R., BARCELÓ, D. Analysis by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for β -blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1046, n. 1-2, p. 133-140, aug. 2004.
- [65] DROVER, V. J., BOTTARO, C. S. Determination of pharmaceuticals in drinking water by CD-modified MEKC: Separation optimization using experimental design. **Journal of Separation Science**, v. 31, v. 21, p. 3740-3748, dec. 2008.
- [66] BUENO, M. J. M., AGÜERA, A., HERNANDO, M. D., GÓMEZ, M. J., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Evaluation of various liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry operation modes applied to the analysis of organic pollutants in wastewaters. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 32, p. 5995-6002, aug. 2009.
- [67] AŠPERGER, D., BABIĆ S., PAVLOVIĆ, D. M., DOLAR, D., KOŠUTIĆ, K., HORVAT, A. J. M., KAŠTELAN-MACAN, M. SPE-HPLC/DAD determination of trimethoprim, oxytetracycline and enrofloxacin in water samples. **Internation Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 89, n. 8-12, p. 809-819, jan. 2009.
- [68] NIETO, A., BORRULL, F., MARCÉ, R. M., POCURULL, E. Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 30, p. 5619-5625, jul. 2009.
- [69] GONZÁLEZ-MARIÑO, I., QUINTANA, J. B., RODRÍGUEZ, I., CELA, R. Simultaneous determination of parabéns, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry.

Rapid Communications in Mass Spectrometry, v. 23, n. 12, p. 1756-1766, may 2009.

Capítulo 2

Determinação de fármacos de caráter ácido e metabólitos do ácido acetilsalicílico utilizando eletroforese capilar associada a estratégias de pré-concentração “on line”

2.1. Introdução

Assim como muitos outros poluentes, os fármacos vêm ganhando espaço nos últimos anos por intermédio de pesquisas relacionadas a seus possíveis efeitos adversos ao meio ambiente. Até pouco tempo atrás, substâncias terapeuticamente ativas não eram consideradas como potencialmente tóxicas, provavelmente devido as quantidades de compostos farmacêuticos e seus metabólitos bioativos serem introduzidos no meio ambiente em baixas concentrações. Entretanto, a contínua entrada dessas substâncias no meio ambiente, principalmente aquático, tem promovido contínuos, mas não totalmente esclarecidos, efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres. Além disso, seus efeitos podem ser cumulativos e lentos ao ponto que essas mudanças permaneçam indetectáveis até se tornarem irreversíveis [1].

Todos os dias, toneladas de substâncias farmacologicamente ativas são utilizadas em medicina humana, diagnóstico, tratamento ou prevenção ao redor do mundo. Em animais e peixes de cativeiros, existe um uso exacerbado de substâncias (geralmente administradas como aditivos alimentares), utilizados para prevenção de doenças, como promotores do crescimento ou até mesmo como antiparasitários. Consequentemente, fármacos são continuamente despejados no meio ambiente, principalmente como resultado de processos industriais, pela eliminação de produtos não utilizados, com validade vencida ou simplesmente como produto de excreção.

Com exceção dos antimicrobianos e antineoplásicos, o propósito da maioria das substâncias farmacêuticas empregadas mundialmente é para o controle de sintomas, mas não para condições de cura reais. Como tal, muitas drogas são administradas por longos períodos de tempo, e como conseqüências, estas substâncias são excretadas de forma não metabolizada ou como metabólitos ativos,

e na maioria das vezes não ocorre a eliminação por meio das etapas de tratamento realizadas nas estações de tratamento de esgotos (ETEs), com isso estas substâncias são introduzidas no meio ambiente [2].

Fármacos classificados como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são utilizados em baixas doses, devido aos seus efeitos analgésicos, tanto em humanos quanto em animais. Os AINEs são disponibilizados sem prescrição médica, sendo, portanto vendidos à população sem qualquer tipo de controle. Com isso, a excreção destes fármacos e seus metabólitos bem como a falta de tratamento de esgotos tem mostrado nos últimos anos concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ destas substâncias em águas superficiais. Mesmo após as águas residuais terem sido testadas em ETEs, a entrada de algumas destas substâncias com alta estabilidade no meio ambiente não pode ser evitada. Estes fármacos não são totalmente eliminados e podem alcançar o ambiente aquático em diversas concentrações [3]. Macià e colaboradores avaliaram a presença de um grupo de AINEs (ibuprofeno, fenoprofeno, naproxeno, cetoprofeno e diclofenaco) em águas superficiais utilizando eletroforese capilar no modo cromatografia eletrocínética em microemulsão associada a técnicas de pré-concentração “on line” e obtiveram limites de detecção na ordem de 100 ng L^{-1} [4].

O ácido acetilsalicílico (AAS) é facilmente degradado em sua forma mais ativa, o ácido salicílico. Outros dois metabólitos também foram identificados no ambiente aquático, os ácidos orto-hidroxihipúrico e gentísico. Ternes e colaboradores investigaram a presença destes três compostos em amostras de esgoto bruto, e ácido salicílico, orto-hidroxihipúrico e gentísico foram detectados nas concentrações de 54, 6,8 e 4,6 mg L^{-1} , respectivamente [5,6]. Alguns estudos demonstram que estes três metabólitos podem ser efetivamente eliminados durante o tratamento na ETE. Entretanto somente o ácido salicílico pode ser detectado em concentrações muito reduzidas em águas de esgoto e rios [6]. Além disso,

concentrações maiores, acima de 13 mg L⁻¹ para resíduos de ácido salicílico foram encontrados na Espanha [7] e 2 mg L⁻¹ na Grécia [8].

Fibratos são um grupo de agentes antihiperlipêmicos amplamente utilizados no tratamento de diferentes formas de hiperlipidemias e hipercolesterolemia. Estes compostos são derivados do ácido 2-fenoxi-2-metilpropanóico e incluem bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato, ácido clofíbrico, fenofibrato e genfibrozil. Na literatura existem poucos estudos relacionados à determinação destes compostos utilizando eletroforese capilar. Ahler e colaboradores descreveram uma metodologia para determinação de bezafibrato e ácido clofíbrico (entre outros fármacos) em amostras de águas superficiais utilizando eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas. As amostras foram submetidas a um pré-tratamento com etapas de extração em fase sólida associada a extração líquido-líquido e foram alcançados limites de detecção para o bezafibrato e ácido clofíbrico de 33 e 27 µg L⁻¹, respectivamente [9].

Usualmente, a análise de resíduos de substâncias farmacêuticas em águas superficiais é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, normalmente associada à espectrometria de massas [8,10-12]. Para a utilização desta técnica analítica, as amostras de água devem ser pré-tratadas para eliminação dos componentes da matriz e enriquecimento dos analitos. A forma usual de realizar este pré-tratamento é pela extração em fase sólida. Diversos autores analisaram resíduos de fármacos em águas utilizando SPE-HPLC-MS alcançando limites de detecção na ordem de µg L⁻¹ [10,12] e ng L⁻¹ [8].

Os fármacos de caráter ácido estudados aqui foram diclofenaco, ibuprofeno, cetoprofeno, fenoprofeno, naproxeno, bezafibrato e dois metabólitos do AAS, ácido gentísico e salicílico. A Figura 2.1 mostra a estrutura química e os valores de

pKa destes compostos que estão entre 3 e 7; portanto, em valores de pH maiores que 7 estas substâncias se apresentam principalmente na sua forma aniônica.

Ácido salicílico, pKa 3,1
pKa 7,3

Diclofenaco, pKa 3,9

Fenoprofeno,

pKa 4,2
Cetoprofeno, pKa 4,0

Ibuprofeno, pKa 4,6

Naproxeno,

Ácido gentísico, pKa 2,9

Bezafibrato, pKa 3,6

Figura 2.1. Estrutura química dos compostos de caráter ácido.

A versatilidade da eletroforese capilar permite que seja desenvolvido um método seletivo para compostos de caráter aniônico num dado valor de pH. O interesse em se desenvolver métodos seletivos é o de tentar reduzir a presença de interferentes da matriz da amostra.

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um método baseado em CZE para a separação de um grupo de fármacos e dois metabólitos do AAS por meio de um planejamento fatorial 2^2 com ponto central (PC). Serão estudadas também estratégias de pré-concentração on-line “stacking” desses analitos a fim de se alcançar valores de LOQ e LOD reduzidos.

2.2. Procedimentos experimentais

2.2.1. Equipamento e parâmetros instrumentais

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos e “software” (HP ChemStation, rev A.06.01) para tratamento e aquisição de dados. O aparelho possui sistema de refrigeração do capilar por circulação de ar, e a temperatura foi mantida constante.

Os capilares utilizados foram de sílica fundida (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, E.U.A.), revestidos externamente com poli-imida, 75 µm de diâmetro interno, 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector. As lavagens de condicionamento inicial do capilar, com pressão de 940 mbars, foram realizadas diariamente com 15 minutos de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹, seguidos de 15

minutos de água desionizada e 15 minutos de eletrólito de corrida. No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com lavagens de 2 minutos de eletrólito e no término das análises 15 min de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} e 15 minutos de água desionizada para a limpeza do capilar.

2.2.2. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram grau analítico e a água desionizada (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Padrões dos fármacos diclofenaco, bezafibrato, fenoprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno, e os metabólito ácido gentísico e ácido salicílico foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, WI, E.U.A.), e ácido difenilacético, adquirido da Acros (Morris Plains, NJ, E.U.A.). Soluções padrão estoque foram preparadas em metanol com concentração aproximada de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e armazenadas sob refrigeração (4°C). Foram preparadas soluções estoque dos eletrólitos tetraborato de sódio (TBS), ácido fosfórico (H_3PO_4), dodecil-sulfato de sódio (SDS) (Merck, Rio de Janeiro, RJ), poli-etilenoglicol docecil-éter (Brij 35), ácido 2-N-morfolino etanossulfônico (MES) e tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS) (Aldrich, Milwaukee, WI, E.U.A.) nas concentrações de 100 mmol L^{-1} cada. Os eletrólitos utilizados nas análises foram preparados diariamente.

Eletrólito de corrida: o eletrólito de corrida otimizado (após realização de planejamento fatorial 2^2 com ponto central) para análise dos fármacos de caráter ácido foi constituído por 30 mmol L^{-1} de TBS, 5 mmol L^{-1} de Brij 35 e 10 % de metanol (v/v). O eletrólito utilizado para a concentração dos analitos, utilizando “stacking” para aumento da sensibilidade do método foi composto por 30 mmol L^{-1} de TBS e 5 mmol L^{-1} de Brij 35.

Preparo dos padrões: os padrões foram diluídos numa solução contendo 5 mmol L⁻¹ de TBS em metanol:água (20:80, v/v) para posterior injeção.

2.3. Resultados e discussão

Uma ferramenta atrativa no desenvolvimento de métodos analíticos é a utilização de planejamentos fatoriais o que possibilita uma sistematização da otimização e uma redução do número de experimentos realizados.

2.3.1. Planejamento Fatorial

Esse tipo de otimização permite avaliar o efeito de cada variável individualmente bem como o efeito da interação entre elas. Inicialmente deve-se determinar qual ou quais as variáveis de interesse, bem como qual o intervalo estudado. O intervalo pode ser avaliado em dois níveis, denominados de nível baixo (-1) e nível alto (+1). Escolhidas as variáveis e os níveis são executados todos os experimentos que são gerados a partir das combinações destas variáveis. Esse tipo de fatorial é conhecido como fatorial completo. Desse modo são executados para um planejamento fatorial com “n” variáveis e 2 níveis, “2ⁿ” experimentos. Um outro tipo de planejamento fatorial é conhecido como planejamento fatorial com ponto central, onde são realizados experimentos no chamado nível “0” da variável, esse nível é um nível médio entre as variáveis de nível (+1) e (-1). A adição de um ponto central é comumente feita a fim de se determinar os erros do modelo aplicado [13].

2.3.1.1. Experimentos antecedendo o planejamento fatorial

Uma abordagem inicial para a separação dos compostos em estudo foi a utilização de eletroforese capilar em solução livre devido ao caráter aniônico das substâncias estudadas (Figura 2.1), utilizando-se como variáveis: pH do eletrólito de corrida (MES, pH 6; fosfato, pH 7; TRIS, pH 8,5 e TBS, pH 9,3); concentração do eletrólito de corrida; adição de diferentes tipos de solvente (metanol, etanol, acetonitrila e isopropanol) e concentração dos mesmos (5-20 %). Também foram variados parâmetros instrumentais, tais como tensão aplicada (15-25 kV); temperatura (15-30 °C) e comprimento do capilar (32 e 48,5 cm). Entretanto a separação não foi alcançada em nenhum dos experimentos realizados, fato atribuído à semelhança de mobilidade aparente entre os compostos ibuprofeno, fenoprofeno e naproxeno em todas as condições aplicadas (dados não mostrados).

Uma segunda abordagem foi a utilização de meio micelar durante a separação, para isso foi utilizado um tensoativo aniônico (SDS) como componente do eletrólito de corrida contendo TBS (pH 9,3). Com isso, esperava-se explorar uma possível diferenciação das mobilidades eletroforéticas dos compostos que apresentaram co-migração nas condições anteriores. Entretanto a separação não foi alcançada, ou seja, os analitos não apresentaram variação de mobilidade significativa, fato atribuído a uma possível repulsão eletrostática entre os analitos e as micelas de SDS.

A adição de Brij 35 (tensoativo neutro) ao eletrólito, juntamente com metanol mostrou influenciar a mobilidade daqueles compostos que co-migravam durante as tentativas de separação anteriores. Utilizou-se então um planejamento

fatorial 2^2 com PC com o objetivo de alcançar a separação de todos os compostos.

Apesar da concentração do eletrólito exercer influência principalmente na velocidade do fluxo eletrosmótico e, conseqüentemente, no tempo de migração de cada analito, podendo ser então considerado um fator de otimização da separação, quando em presença dos demais componentes do eletrólito a variação da concentração de TBS não apresentou influência significativa. Portanto, o objetivo dos experimentos foi o de avaliar a influência das seguintes variáveis: concentração de solvente orgânico e micela neutra com concentração fixa de tetraborato em 30 mmol L⁻¹.

Sendo assim, as condições do planejamento fatorial foram aplicadas mantendo-se constante a concentração de TBS em 30 mmol L⁻¹, tensão de 20 kV (polaridade positiva), injeção hidrodinâmica, 50 mbar, durante 3 segundos e temperatura do capilar mantida em 25 °C. As variáveis e níveis utilizados durante o planejamento fatorial estão descritos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2^2 com ponto central, com concentração fixa de 30 mmol L⁻¹ de TBS no eletrólito de corrida.

NÍVEL	Brij 35 (mmol L ⁻¹)	MeOH (% v/v)
-1	5	10
0	7,5	15
+1	10	20

2.3.1.2. Mecanismo de separação

O pH no interior do tubo capilar é ditado pelo pH do eletrólito de corrida (pH >9), portanto quando a polaridade positiva é aplicada na extremidade de injeção, os analitos (dissociados e carregados negativamente) migrarão no modo contra-eletrosmótico, sendo o fluxo eletrosmótico (que migra em direção ao catodo) responsável por conduzi-los até o detector. No modo contra-eletrosmótico, os analitos com mobilidade eletroforética menor são os primeiros a passar pelo detector.

A migração dos compostos de estudo foi modulada pela presença de micelas neutras, que possuem a mesma mobilidade do fluxo eletrosmótico, e pelo metanol. Os analitos carregados negativamente migram eletroforicamente em direção ao anodo e são retardados pela interação com as micelas; portanto, quanto maior a interação dos analitos com as micelas neutras, maior será a velocidade final/aparente de migração dos mesmos, na direção do catodo.

A presença de metanol no eletrólito de corrida foi responsável por modificações nas propriedades físico-químicas do meio, causando uma diminuição na mobilidade do fluxo eletrosmótico. Já os analitos terão seus raios de hidratação alterados em relação ao meio aquoso e, poderão também apresentar uma mudança em seu comportamento de dissociação. Ainda, a estrutura da micela pode ser alterada em meio não aquoso. Assim, tanto os analitos quanto as fases micelar e aquosa experimentam modificações, o que acarreta em alterações nas interações entre as micelas e os compostos de estudo.

Todos esses fatores somados foram os responsáveis pelas modificações nas mobilidades dos compostos, o que altera a seletividade e pode proporcionar a separação dos analitos.

2.3.2. Planejamento fatorial 2² com PC – funções respostas

Para a avaliação dos eletroferogramas obtidos a partir do planejamento fatorial foram escolhidas algumas funções respostas comumente utilizadas na classificação de cromatogramas e seleção de métodos de separação:

Resolução dos pares críticos

$$Rs_{i,i+1} = \frac{2(t_{i+1} - t_i)}{w_{bi} + w_{bi+1}}$$

(2.1)

A resolução R_s entre as bandas de dois solutos adjacentes é definida pela diferença entre o tempo de migração t_i , dividida pelo valor médio entre as larguras de base de cada banda w_b , expressas nas mesmas unidades de tempos [14].

CRS (“chromatographic resolution statistic”) [15], que é definida pela expressão

$$CRS = \left\{ \sum_{i=1}^{np} \left\{ \frac{R_{i,i+1} - R_{ótima}}{R_{i,i+1} - R_{min}} \right\} \frac{1}{R_{i,i+1}} + \sum_{i=1}^{np} \frac{R_{i,i+1}^2}{np R_m^2} \right\} \frac{t_f}{n}$$

(2.2)

Onde, R_m a resolução média de todos os pares de solutos, $R_{ótima}$ a resolução ótima desejada, R_{min} a resolução mínima aceitável, t_f o tempo de migração do último soluto e n o número de solutos na amostra. O primeiro termo da CRS é a

medida da separação entre picos adjacentes e se aproxima de zero quando todos os picos se aproximam de um valor de resolução definido como ótimo. O segundo termo da CRS mede a uniformidade do espaçamento entre os picos e o valor aproxima-se à unidade quando a soma da resolução dos pares de picos individuais é igual ao valor médio das resoluções. Eletroferogramas com picos bem resolvidos e uniformemente espaçados minimizam o valor de CRS.

Também foram considerados como funções resposta, o número de picos com resolução em linha base e o tempo total de análise. A seguir são apresentados os eletroferogramas correspondentes aos experimentos do planejamento fatorial realizado (níveis na Tabela 2.1). Todos os compostos foram injetados em concentração aproximada de 20 mg L⁻¹.

Figura 2.2. Eletrolito 1 (-1-1). Separação de mistura padrão: 1, diclofenaco; 2, fenoprofeno; 3, ibuprofeno; 4, cetoprofeno; 5, naproxeno; 6, ácido salicílico; FEO, fluxo eletrosmótico.

Figura 2.3. Eletrolito 2 (+1-1). Separação de mistura padrão: 1, diclofenaco; 2, fenoprofeno; 3, ibuprofeno; 4, cetoprofeno; 5, naproxeno; 6, ácido salicílico.

Figura 2.4. Eletrolito 3 (-1+1). Separação de mistura padrão: 1, diclofenaco; 2, fenoprofeno; 3, ibuprofeno; 4, cetoprofeno; 5, naproxeno; 6, ácido salicílico.

Figura 2.5. Eletrólito 3 (+1+1). Separação de mistura padrão: 1, diclofenaco; 2, fenopropeno; 3, ibuprofeno; 4, cetoprofeno; 5, naproxeno; 6, ácido salicílico.

Figura 2.6. Eletrólito 3 (0 0). Separação de mistura padrão: 1, diclofenaco; 2, fenopropeno; 3, ibuprofeno; 4, cetoprofeno; 5, naproxeno; 6, ácido salicílico.

A comparação dos eletroferogramas obtidos com os eletrólitos 1 e 2, indicam que o aumento da concentração de Brij 35 de 5 para 10 mmol L⁻¹, com concentração de metanol constante (10 %) provocou redução no tempo de análise, porém os analitos cetoprofeno e naproxeno apresentaram co-migração. Os eletroferogramas mostrados nas Figuras 2.2 e 2.4 quando comparados, sugerem que o aumento na concentração de metanol de 10 para 20 % (5 mmol L⁻¹ de Brij 35 constante) causou diminuição da mobilidade do FEO, acarretando uma redução da mobilidade aparente dos analitos e conseqüentemente um aumento do tempo final de corrida. Também se observa um pronunciado alargamento da banda correspondente ao ácido salicílico, e co-migração dos compostos ibuprofeno e cetoprofeno. O experimento referente ao eletroferograma da Figura 2.4 quando comparado ao da Figura 4.5, em que a quantidade de metanol é mantida em 20 % e a concentração de Brij 35 aumenta de 5 para 10 mmol L⁻¹ indica novamente uma diminuição no tempo de migração e mais uma vez a co-migração do cetoprofeno e naproxeno. Os eletroferogramas das Figuras 2.3 e 2.5, em que houve um aumento da concentração de metanol de 10 para 20 % e concentração de 10 mmol L⁻¹ do tensoativo neutro, indicaram um alargamento da banda do ácido salicílico e um aumento significativo do tempo final de corrida. O ensaio correspondente ao ponto central não indica ganhos na qualidade da separação, quando comparados aos eletroferogramas das Figuras 2.3, 2.4 e 2.5.

A Tabela 2.2 resume os valores obtidos para cada função resposta e a composição do eletrólito para cada experimento.

Tabela 2.2. Valores das funções resposta para os experimentos do fatorial 2^2 com ponto central, concentração constante de 30 mmol L^{-1} de TBS.

Eletrólito	[Brij 35]	% MeOH	CRS	nº picos resolvidos	t _{análise} (min)	Rs _{i,i+1}
1	5	10	62	6	7,6	0,5
2	10	10	70	5	7,4	0
3	5	20	114	5	12,9	0
4	10	20	105	5	12,5	0
PC	7,5	15	75	5	9,8	0

(PC, ponto central; R, resolução; pc, pares críticos).

As 3 respostas utilizadas apontam para o eletrólito 1 como ótimo, Tabela 2.2. Como a separação foi alcançada utilizando-se um dos experimentos realizados, os resultados obtidos foram utilizados apenas qualitativamente. As condições ótimas de separação dos 5 fármacos e do metabólito do ácido salicílico, determinadas a partir de vários parâmetros instrumentais, juntamente à análise de funções respostas provenientes do planejamento fatorial foram: 30 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio (pH 9,3), 10 % de metanol (v/v), 5 mmol L^{-1} de Brij 35, tensão aplicada de 20 kV (polaridade positiva), comprimento do capilar, 48,5 cm, comprimento efetivo, 40 cm, $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno, janela de detecção, 3 mm e temperatura constante de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 2.2).

2.3.3. Escolha do padrão interno

A utilização de um padrão interno melhora substancialmente a precisão dos resultados, minimizando possíveis erros de injeção do equipamento. Conseqüentemente, quando escolhido corretamente, ocorre uma melhoria na linearidade do método, o que compensa possíveis flutuações provenientes da composição da matriz [16].

A escolha do padrão interno baseou-se na semelhança estrutural com os compostos de estudo e, conseqüentemente, na semelhança da mobilidade eletroforética.

Foram testados como padrão interno os compostos: ácido benzóico; ácido 3,5-dihidroxibenzóico, sacarina e o ácido difenilacético. Nas Figuras 2.7, 2.8, 2.9 e 2.10 são mostrados os eletroferogramas obtidos para as quatro substâncias testadas.

Figura 2.7. Separação para escolha do padrão interno nas condições otimizadas de separação. PI, ácido benzóico ($10,4 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Figura 2.8. Separação para escolha do padrão interno nas condições otimizadas de separação. PI, ácido 3,5 dihidróxi-benzóico ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Figura 2.9. Separação para escolha do padrão interno nas condições otimizadas de separação. PI, sacarina ($11,2 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Figura 2.10. Separação para escolha do padrão interno nas condições otimizadas de separação. PI, ácido difenilacético ($9,9 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Os eletroferogramas mostrados acima indicaram que o ácido difenilacético mostrou-se adequado como padrão interno, pois entre todos os compostos testados foi o único que não implicou em aumento no tempo de análise.

A inserção de novos padrões, ácido gentísico e bezafibrato (problema ocasionado devido a tramites de importação) não ocasionou nenhum problema com relação a uma possível co-migração dos analitos adicionados na condição já otimizada. A boa resolução obtida era esperada, pois a diferença estrutural dos novos padrões e os compostos incluídos inicialmente é pronunciada, e a resolução entre os AINEs já havia sido alcançada.

A Figura 2.11 mostra o eletroferograma dos 6 fármacos (cetoprofeno, ibuprofeno, naproxeno e fenoprofeno, diclofenaco, bezafibrato), 2 metabólitos do AAS (ácido salicílico e gentísico) e padrão interno (ácido difenilacético) na condição de análise otimizada.

Figura 2.11. Separação dos analitos de caráter ácido. Condições de análise: 30 mmol L⁻¹ de TBS, 5 mmol L⁻¹ de Brij 35, 10 % de MeOH; injeção hidrodinâmica com pressão de 50 mbar durante 3 segundos; tensão, +20 kV; comprimento do capilar 48,5 cm (efetivo 40 cm) e 75 µm de diâmetro interno; temperatura, 25 °C. Analitos: 1, diclofenaco; 2, bezafibrato; 3, fenoprofeno; 4, ibuprofeno; 5, cetoprofeno; 6, naproxeno; 7, ácido gentísico; 8, ácido salicílico; PI, ácido difenilacético.

Definidos a composição do eletrólito e o padrão interno, o método foi submetido à avaliação de linearidade, limites de detecção e limites de quantificação.

2.3.4. Avaliação do desempenho do método

2.3.4.1. Linearidade do método

Os padrões de diclofenaco, fenoprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno, ácido salicílico, ácido gentísico e bezafibrato foram injetados em intervalos de concentrações adequadas e os resultados são apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Parâmetros das curvas analíticas para diclofenaco, bezafibrato, fenoprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno, ácido gentísico e ácido salicílico.

ANALITO	Faixa linear (mg L ⁻¹)	a	b	F	R ²	ERRO PADRÃO DA REGRESSÃO
Diclofenaco	1,30 – 13,00	0,052 ± 0,001	-0,004 ± 0,008	2671	0,9989	0,1756
Bezafibrato	1,28 – 12,75	0,082 ± 0,001	0,017 ± 0,009	5544	0,9995	0,1195
Fenoprofeno	1,25 – 12,50	0,080 ± 0,001	0,006 ± 0,007	6944	0,9996	0,1047
Ibuprofeno	1,30 – 13,00	0,059 ± 0,001	0,003 ± 0,005	9328	0,9997	0,0940
Cetoprofeno	1,29 – 12,88	0,071 ± 0,001	0,006 ± 0,007	5948	0,9995	0,1166
Naproxeno	1,30 – 13,00	1,850 ± 0,030	-0,038 ± 0,234	3890	0,9992	0,1455
Ácido gentísico	1,36 – 13,63	0,137 ± 0,002	0,003 ± 0,020	3184	0,9991	0,0216
Ácido salicílico	1,34 – 13,38	0,231 ± 0,004	-0,004 ± 0,033	3240	0,9991	0,1641

a e b, coeficiente angular e linear da equação $A=aC+b$, onde A = área em unidade arbitrária e C = concentração em µg mL⁻¹; R², coeficiente de determinação, n=6.

As curvas de regressão apresentaram bons coeficientes de determinação ($R^2 \geq 0,9989$), F (significância da regressão) elevados, erros de regressão baixos e os gráficos de resíduos não apresentam tendências, ou seja os resíduos estão distribuídos aleatoriamente ao redor de zero (não mostrado).

2.3.4.2. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (do inglês LOD, “limit of detection”) e quantificação (do inglês LOQ, “limit of quantification”) do método foram estimados pela relação sinal/ruído, calculada a partir da média de valores medidos em três eletroferogramas, sendo a concentração que gera $S/N=3$, o LOD e a que gera $S/N=10$, o LOQ, e pelo método baseado em parâmetros da curva analítica [17].

O LOD pode ser determinado como:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (2.3)$$

onde s é a estimativa do erro padrão da regressão e S é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica.

O LOQ pode ser encontrado a partir da equação:

$$LD = 10 \frac{s}{S} \quad (2.4)$$

A Tabela 2.4 contém os valores de limite de detecção e quantificação estimados pelos dois métodos citados.

Tabela 2.4. Limites de detecção e determinação obtidos pela relação sinal/ruído e pela curva analítica.

ANALITO	RELAÇÃO SINAL RUÍDO		CURVA ANALÍTICA	
	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Diclofenaco	0,26	0,87	0,46	1,53
Bezafibrato	0,26	0,85	0,31	1,04
Fenoprofeno	0,29	0,98	0,27	0,91
Ibuprofeno	0,41	1,38	0,24	0,82
Cetoprofeno	0,37	1,22	0,30	1,01
Naproxeno*	0,07	0,23	0,38	1,26
Ácido gentísico	0,41	1,36	0,44	1,47
Ácido salicílico	0,40	1,34	0,43	1,43

LD, limite de detecção; LQ, limite de quantificação; CV, coeficiente de variação (n=3); *230 nm.

Os limites de detecção calculados pelos dois métodos são próximos para o fenoprofeno, ácido gentísico e ácido salicílico, enquanto para a maioria os limites de detecção estimados pela relação sinal/ruído são menores quando comparados ao método da curva analítica, exceto para o fenoprofeno, ibuprofeno e cetoprofeno. Comparando os valores calculados para os limites de quantificação é possível observar que apenas o fármaco fenoprofeno possui valor próximo para os dois métodos, e os valores estimados para o restante dos analitos apresentam maior discrepância. É importante ressaltar que o fármaco naproxeno teve seus valores, tanto em relação à performance do método, quanto para limites de detecção e quantificação calculados por intermédio dos sinais obtidos em 230 nm, comprimento de onda de máxima absorção deste analito, sendo assim mais seletivo.

2.3.5. Estratégia de pré-concentração “on-line”

Eletroforese capilar apresenta inúmeras vantagens frente a outras técnicas cromatográficas, destacando pelo seu alto poder de separação, eficiência, custos de operação reduzidos, entre outras. Entretanto, as outras técnicas cromatográficas (quando utilizados detectores UV-Vis) a superam no que diz respeito à sensibilidade, devido ao pequeno volume injetado no capilar e também devido ao reduzido caminho ótico. A diminuição dos valores de limite de quantificação e detecção pode ser obtida utilizando-se procedimentos de pré-concentração “on-line”. Para a pré-concentração “on-line” de analitos iônicos ou ionizáveis em eletroforese capilar, comumente são utilizadas estratégias analíticas que envolvem: “stacking” amplificado por campo (FASS, do inglês “field-amplified sample stacking”), injeção de grande volume de amostra (LVSS, do inglês “large-volume sample stacking”), “stacking” mediado por pH (do inglês “pH-mediated stacking”), isotacoforese transiente (ITP, do inglês “isotachopheresis”), entre outros. Estas estratégias destacam-se por sua simplicidade e economia, pois não são necessárias modificações na instrumentação [18].

No método desenvolvido, os constituintes do eletrólito de corrida, a natureza dos analitos (considerando que todas as moléculas estão ionizadas no pH de separação), e a condição do fluxo eletrosmótico (alto no sentido catódico) permitiu que fosse utilizada a estratégia LVSS com “inversão da polaridade” para uma melhora na sensibilidade do método. Este modo de “stacking” consiste na injeção de um grande volume de amostra no capilar, cuja matriz apresente condutividade menor que a condutividade do eletrólito de corrida. Em seguida é aplicada uma tensão com polaridade negativa na extremidade da injeção, o fluxo eletrosmótico migra do pólo positivo em direção ao pólo negativo, removendo a matriz da amostra. A remoção da matriz da amostra é acompanhada por um

aumento da corrente elétrica, e quando a corrente atinge um valor entre 90 e 99% do valor da corrente quando o capilar está preenchido apenas com o eletrólito de corrida, a polaridade é então invertida e a análise efetuada. A Figura 2.12 ilustra o procedimento.

Figura 2.12. Representação esquemática do modo de “stacking” LVSS com inversão da polaridade. (A) um grande volume de amostra é injetada hidrodinamicamente no capilar e um pequeno plugue do eletrólito de corrida foi injetado; (B) a tensão foi aplicada com polaridade invertida (fluxo eletrosmótico migra na direção inversa), a matriz da amostra é empurrada para fora do capilar pelo fluxo eletrosmótico; (C) os analitos de caráter aniônico foram concentrados na fronteira entre a zona da amostra e o eletrólito de corrida, na porção final do capilar; (D) a polaridade então é invertida novamente para o modo normal de separação e a tensão correta de separação foi aplicada para que os analitos migrem em direção ao detector e a separação ocorra de fato.

Uma condição necessária para que a pré-concentração ocorra como esquematizada na Figura 2.12, é que a velocidade eletroforética do ânion no plugue

da amostra seja maior que a velocidade do fluxo eletrosmótico. Essa condição normalmente é alcançada, já que a condutividade no plugue é baixa, resultando em um campo elétrico alto [19].

LVSS foi selecionada como estratégia de concentração “on line” por três razões principais: (i) é uma técnica que requer injeção por pressão, o que evita um desequilíbrio de cargas, que está sempre associado a injeção eletrocinética; (ii) a quantidade de analito que é carregada para dentro da coluna capilar é grande (que pode ser tão alta quanto maior for a coluna); e (iii) não é necessário qualquer tipo de modificação instrumental no equipamento de eletroforese capilar. Com esta estratégia de concentração “on line” é esperado uma redução nos valores de limite de detecção.

Inicialmente foi utilizado o mesmo eletrólito de corrida, pois, como explicado anteriormente, a composição e o pH do eletrólito de corrida favorecia a escolha do modo LVSS. Portanto, foram estudadas como variáveis de otimização desta metodologia: (a) o tamanho do plugue de injeção da amostra no capilar; (b) a composição do plugue de amostra; (c) possíveis variações no eletrólito de corrida; (d) tensão de “stacking” e valor de corrente para inversão da polaridade; (e) lavagem do capilar entre as corridas. Todos os experimentos foram realizados visando sempre um aumento de detectabilidade do método proposto anteriormente.

2.3.5.1. Efeito do volume do plugue de amostra

Uma solução de padrões contendo as oito substâncias estudadas na concentração aproximada de $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ foram injetadas hidrodinamicamente no capilar em diferentes intervalos de tempo com pressão de 50 mbar. Foram avaliados os tempos de 20, 40, 80, 120, 160, 200 e 220, correspondentes a aproximadamente 10, 20, 35, 50, 70, 85 e 95% do volume total do capilar. As alturas dos picos foram proporcionais para tempos de injeção entre 20 e 120 segundos para os analitos diclofenaco, bezafibrato e fenoprofeno, entre 20 e 160 segundos para ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno e ácido gentísico e entre 20 e 200 segundos para o ácido salicílico, enquanto que as áreas dos picos foram proporcionais para os tempos de injeção entre 20 e 160 segundos. Foi observado que quanto maior o tempo de injeção, os picos correspondentes ao ibuprofeno e cetoprofeno ficam deformados, reduzindo a eficiência, portanto o tempo de 120 segundos com pressão de 50 mbar não comprometeu significativamente o formato dos picos e a eficiência do stacking, Figura 2.13.

Figura 2.13. Separação dos analitos de estudo submetidos ao “stacking” no modo LVSS na concentração de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e perfil da corrente. Eletrólito de corrida contendo 30 mmol L⁻¹ TBS, 5 mmol L⁻¹ Brij 35, 10% metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar/120 segundos; tensão de stacking -15 kV; tensão de separação +20 kV, inversão da polaridade em aproximadamente 95% do valor normal da corrente; detecção em 200 nm para todos os analitos, exceto naproxeno (230 nm). Analitos: 1, diclofenaco; 2, bezafibrato; 3, fenoprofeno; 4, ibuprofeno; 5, cetoprofeno; 6, naproxeno; 7, ácido gentísico; 8, ácido salicílico.

2.3.5.2. Composição do plugue de amostra

Uma variável muito importante a ser estudada é o solvente em que a amostra é diluída, pois este deve possuir uma grande diferença de condutividade em relação ao eletrólito de corrida, para que seja alcançada uma maior concentração dos analitos. Não foi mais considerada a adição de 5 mmol L⁻¹ de TBS no plugue de injeção, pois isto diminuiria a eficiência do “stacking”, já que a condutividade no plugue seria maior quando comparado apenas à adição de solventes orgânicos. A

fim de comparar o efeito na concentração foi avaliada a presença de metanol e acetonitrila nas proporções de 10, 20 e 30% para a dissolução dos analitos. A adição de água não foi testada, pois poderia diminuir a solubilidade dos analitos no plugue de amostra, enquanto que além de diminuir a condutividade na zona da amostra, os solventes metanol e acetonitrila promovem um aumento na solubilidade dos compostos estudados. Os resultados demonstraram uma perda na resolução dos picos quando utilizado acetonitrila no plugue de amostra. Foi escolhido metanol como solvente de composição da zona de amostra na proporção de 30%, pois nesta concentração percebeu-se um aumento na eficiência do “stacking”. Concentrações acima de 30% de metanol na prática comprometeriam a análise, pois a aplicação de altos valores de tensão associados a longos períodos de injeção (em zonas de baixa condutividade) são limitados pelo efeito Joule devido a um aumento da temperatura no interior do capilar, gerando a queda na corrente e interrupção da corrida, possivelmente por evaporação do solvente e formação de bolhas.

2.3.5.3. Variações na composição do eletrólito de corrida

A influência da concentração de TBS no eletrólito de corrida foi avaliada entre 10 e 40 mmol L⁻¹, sendo mantidas as concentrações de Brij 35 e metanol em 5 mmol L⁻¹ e 10%, respectivamente. Em valores de 10 e 20 mmol L⁻¹ de TBS, o tempo de análise diminuiu quando comparado a 30 mmol L⁻¹, entretanto este fenômeno foi acompanhado de uma redução significativa da área dos picos, ainda assim, na concentração de 10 mmol L⁻¹ de TBS a resolução entre os picos relativos ao ibuprofeno e cetoprofeno foi afetada. Na concentração de 40 mmol L⁻¹ de TBS houve o aumento do tempo de análise e não ocorreu um aumento da área ou altura dos picos que justificassem a sua escolha. Valores abaixo de 10 mmol L⁻¹ não

foram avaliados devido ao comprometimento da capacidade tamponante do eletrólito de corrida e acima de 40 mmol L⁻¹ poderia gerar um aumento do efeito Joule e, conseqüentemente uma diminuição do desempenho do método. Portanto, foi mantida a concentração de 30 mmol L⁻¹ de TBS no eletrólito de corrida.

A presença de metanol no meio de separação proporciona uma menor diferença de condutividade entre a zona de amostra e do eletrólito, já que na composição do plugue de amostra existem 30% de metanol. Portanto foi avaliada a retirada do metanol que fazia parte do eletrólito na proporção de 10%, verificando se haveria um comprometimento na resolução dos picos ou na eficiência do “stacking” e os resultados obtidos apontaram para um aumento, tanto dos valores de área quanto de altura dos picos de todos os analitos e, conseqüentemente, um aumento na resolução dos mesmos.

2.3.5.4. Tensão de “stacking” e valor da corrente para inversão da polaridade

A escolha do momento exato da inversão da polaridade durante o procedimento de LVSS é muito importante, para que seja evitada a perda dos analitos juntamente com a eliminação da matriz durante a inversão da polaridade, ainda assim, a injeção de um pequeno plugue do eletrólito de corrida após a injeção da amostra auxilia para que este fenômeno não aconteça. Durante o procedimento de “stacking” a aplicação de tensões moderadas é a melhor estratégia [20], pois assim um aquecimento devido ao efeito Joule é evitado, principalmente nas zonas de baixa condutividade. Portanto, a aplicação de um valor baixo de tensão de “stacking” pode garantir tempo suficiente para a completa eliminação da matriz da amostra do capilar sem qualquer perda dos analitos. Além disso, torna-se mais

preciso o monitoramento do momento exato da inversão da polaridade, a qual acontece de uma forma menos brusca em valores baixos de tensão. Neste estudo, a tensão de “stacking” selecionada foi de -15 kV, que produziu uma corrente estável de aproximadamente 65 μA . Quando a corrente atingiu 95% da corrente inicial (65 μA), a polaridade dos eletrodos foi invertida, e a tensão de 15 kV (polaridade positiva) foi aplicada para a análise dos compostos de estudo.

2.3.5.5. Procedimento de lavagem entre as corridas

Durante a otimização do “stacking” foi verificado que o procedimento de lavagem entre as corridas era um fator importante. Quando o LVSS foi aplicado, a lavagem com HCl pareceu ser necessário para o re-equilíbrio do capilar. Caso contrário, era observado um comprometimento do formato dos picos e resolução dos analitos após aproximadamente 3 corridas. Também observou-se que este problema não era resolvido apenas com o aumento do tempo de lavagem com o eletrólito entre as corridas. A razão pode ser devido ao efeito que um grande plugue de amostra pode causar quando introduzido no capilar, pois a parede interna do mesmo pode ser bloqueada ou saturada pelo excesso dos analitos. Portanto quando HCl na concentração de 0,5 mol L⁻¹ foi utilizado entre as corridas, seguido de água e eletrólito de corrida, observou-se um aumento na repetibilidade do tempo de migração dos analitos e uma maior estabilidade na linha de base.

O eletroferograma da Figura 2.14 indica os resultados para a injeção dos analitos na concentração aproximada de 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dissolvidos em metanol:água (30:70, v/v), com o eletrólito do método proposto inicialmente sem a adição de metanol. A inversão da polaridade foi realizada quando 95% da corrente normal foi alcançada com tensão de “stacking” de -15 kV.

Figura 2.14. Procedimento de “stacking” no modo LVSS. Eletrólito de corrida 30 mmol L⁻¹ TBS, 5 mmol L⁻¹ Brij 35 (pH 9,3); injeção hidrodinâmica de 50 mbar durante 120 segundos, tensão de stacking -15 kV até corrente aproximada de 62 μ A, então foi aplicada inversão da polaridade e tensão de separação de 15 kV; comprimento do capilar 48,5 cm (efetivo 40 cm) e 75 μ m de diâmetro interno; temperatura 25 °C; comprimento de onda de detecção 200 nm para todos os analitos exceto naproxeno (230 nm). Analitos: 1, diclofenaco; 2, bezafibrato; 3, fenoprofeno; 4, ibuprofeno; 5, cetoprofeno; 6, naproxeno; 7, ácido gentísico; 8, ácido salicílico; PI, ácido difenilacético.

2.3.5.6. Avaliação do aumento da sensibilidade no modo LVSS com inversão da polaridade

De acordo com a literatura [21], o fator de aumento da sensibilidade (FAS) em termos de altura do pico pode ser calculado de acordo com a seguinte Equação:

$$\text{FAS} = \frac{\text{altura do pico obtida com "stacking"} \times \text{diluição}}{\text{altura do pico obtida com injeção normal (CZE)}} \quad (2.3)$$

De acordo com a Equação mencionada acima, o aumento da sensibilidade para os analitos estudados variou de 28 a 61 vezes, quando estes foram submetidos ao modo LVSS de "stacking" na concentração de $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ e comparados com o procedimento de injeção convencional, em que os padrões na concentração de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram dissolvidos em 5 mmol L^{-1} de TBS e 20% de metanol e injetada hidrodinamicamente durante 3 segundos com pressão de 50 mbar. A Tabela 2,5 mostra os resultados de enriquecimento alcançados no modo de "stacking" LVSS para cada analito estudado.

Tabela 2.5. Valores de enriquecimento alcançados pelo "stacking" no modo LVSS para cada analito.

Analitos	Dic.	Bez.	Fen.	Ibu.	Cet.	Nap.	Gen.	Sal.
FAS	37	28	29	30	32	31	45	61

A Figura 2.15 mostra o eletroferograma referente a injeção dos padrões injetados no modo convencional (50 mbar/3segundos) e o eletroferograma dos analitos submetidos ao "stacking" no modo LVSS.

Figura 2.15. (A) Injeção dos padrões na concentração de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ pelo modo convencional de injeção hidrodinâmica durante 3 segundos com pressão de 50 mbar; **(B)** Procedimento de “stacking” no modo LVSS, com os padrões na concentração de $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ e injeção hidrodinâmica de 50 mbar durante 120 segundos, e inversão da polaridade. Eletrólito de corrida e outras condições de análise, consultar Fig. 2.14.

2.3.5.7. Linearidade, precisão instrumental e limites de detecção e quantificação

Foram avaliados parâmetros de desempenho do método no modo de “stacking” LVSS, a precisão instrumental e linearidade foram avaliados com e sem padrão interno (ácido difenilacético) e os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir de soluções contendo os oito padrões em concentrações apropriadas. A Tabela 2.6 resume os resultados obtidos.

Tabela 2.6. Precisão instrumental, linearidade e limites de detecção e quantificação para o modo LVSS.

	Analitos							
	Dic	Bez	Fen	Ibu	Cet	Nap	Gen	Sal
Precisão instrumental (n = 6, padrões na concentração de 0,08 µg mL ⁻¹) ^a								
Tempo de migração ^a	1,22	1,18	1,13	1,13	1,10	1,09	0,89	0,88
Área do pico ^a	5,66	6,51	6,23	7,52	5,50	2,48	8,33	4,34
Altura do pico ^a	17,97	15,53	10,46	9,51	11,69	12,46	12,65	11,05
Tempo de migração relativa ^a	0,34	0,22	0,09	0,10	0,06	0,05	0,22	0,30
Área do pico relativa ^a	3,60	3,35	4,46	5,12	2,24	4,68	4,47	2,76
Altura do pico relativa ^a	5,67	4,85	3,03	4,28	2,40	1,64	1,99	3,02
Linearidade								
<i>Área</i>								
R ²	0,9902	0,9901	0,9919	0,9939	0,9965	0,9977	0,9946	0,9957
a (coeficiente angular)	3,1128	5,0643	5,1877	4,0032	4,2485	11,722	7,9187	12,171
b (coeficiente linear)	-0,0082	-0,0076	-0,022	-0,0183	0,0131	-0,0037	0,0175	0,0788
F	302	300	370	486	853	1323	557	689
Erro padrão da regressão	0,0074	0,0118	0,0106	0,0075	0,0059	0,0132	0,0144	0,0196
<i>Altura</i>								
R ²	0,9913	0,9915	0,9960	0,9979	0,9987	0,9999	0,9946	0,9966
a (coeficiente angular)	8,2034	5,5676	6,2571	4,2045	5,1014	14,634	6,2079	8,1488
b (coeficiente linear)	-0,0123	0,0206	-0,0089	0,003	-0,011	-0,0376	0,0208	0,0451
F	227	234	502	950	1506	16361	371	578
Erro padrão da regressão	0,0158	0,0103	0,0078	0,0039	0,0037	0,0033	0,0098	0,0101
Limites de detecção e quantificação^b								
LOD ^b (relação sinal/ruído)	0,004	0,006	0,006	0,008	0,007	0,002	0,005	0,004
LOQ ^b (relação sinal/ruído)	0,015	0,020	0,020	0,028	0,024	0,005	0,018	0,013

Faixa de concentração 0,04 – 0,09 µg mL⁻¹; cinco níveis; A=aC+b, onde A = área em unidade arbitrária e C = concentração em µg mL⁻¹; R², coeficiente de determinação, n=3; tempo, área e altura do pico relativa = tempo analito/tempo PI; área analito/área PI; altura analito/altura PI.

^a CV%; ^b µg mL⁻¹.

Os valores de precisão instrumental foram obtidos por intermédio de seis injeções de uma solução contendo os padrões na concentração aproximada de 0,08 µg mL⁻¹. Os valores alcançados foram referentes ao coeficiente de variação (%) entre as seis injeções para valores de tempo de migração, área e altura do pico, considerando ou não o uso do padrão interno. Os resultados obtidos com a utilização do padrão interno para correção dos valores demonstram um melhor

desempenho do método quando comparado apenas aos resultados sem a utilização do padrão interno.

O estudo da linearidade do método foi estabelecido com cinco níveis de calibração na faixa de concentração que variou entre 0,04 e 0,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada composto e cada concentração foi injetada em triplicata. Foi adicionado o padrão interno ácido difenilacético como padrão interno na concentração de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e os resultados obtidos foram avaliados com relação à área e altura, utilizando a razão entre estes valores e os valores do padrão interno. Considerando a variabilidade do momento de inversão da polaridade, a qual é realizada manualmente a cada corrida, apenas através do monitoramento da corrente, os valores de coeficientes de determinação obtidos ($R^2 > 0,99$) foram satisfatórios, tanto quando utilizada altura ou a área dos picos. Os valores obtidos para o erro padrão da regressão de cada analito foram baixos e os valores de F mostram a significância da metodologia.

Os limites de detecção e quantificação alcançados foram satisfatórios. É importante ressaltar que o fármaco naproxeno teve seus valores tanto em relação a performance do método quanto para limites de detecção e quantificação calculados através dos sinais obtidos em 230 nm, comprimento de onda de máxima absorção deste analito, o que mostrou uma maior seletividade e limites de detecção e quantificação melhores quando comparados aos outros analitos determinados em 200 nm.

2.4. Considerações finais

O eletrólito otimizado através de planejamento fatorial pode ser utilizado na separação em linha de base de 6 fármacos e 2 metabólitos do AAS com tempo de

análise inferior a 11 minutos. Entretanto, os limites de detecção alcançados ainda não eram suficientes para a busca desses fármacos em amostras de água, sendo assim, foi estudado o aumento da detectabilidade do método através da aplicação de estratégias de concentração “on line”, utilizando-se o “stacking” no modo LVSS. Foram portanto alcançados limites de detecção e quantificação na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, considerados valores mais adequados para a análise destas substâncias em amostras de água. Contudo, se faz necessário o uso de etapas de extração ou pré-concentração, através de metodologias complementares que auxiliem no “clean up” das amostras.

A extração dos compostos exige estudos mais aprofundados que leve em consideração a complexidade da matriz devido à presença de matéria orgânica presente em alta concentração, já que, não apenas os analitos passam por essas etapas, mas todos aqueles contidos nas amostras que se encontram em uma concentração ainda maior. Estes estudos serão apresentados nos próximos capítulos. O uso em análise de rotina do método proposto em amostras de água de abastecimento público é promissor e exige estudos complementares.

2.5. Referências bibliográficas

[1] DÍAZ-CRUZ, S.; BARCELÓ, D. Occurrence and analysis of selected pharmaceuticals and metabolites as contaminants present in waste waters, sludge and sediments. **The Handbook of Environmental Chemistry**, v. 5, part I, p. 227-260, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: USA, 2004.

[2] HALLING-SØRENSEN, J. B., NIELSEN, S. N., LANZKY, P. F., INGERSLE, F., HOLTEN, L. H. C., JØRGENSEN, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – A Review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357-393, jan. 1998. Review.

[3] MACIÀ, A., BORRULL, F., AGUILLAR, C., CALLUL, M. Improving sensitivity by large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump to analyze some nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis in water samples. **Electrophoresis**, v. 24, n. 16, p. 2779-2787, aug. 2003.

[4] MACIÀ, A. BORRULL, F., CALLUL, M., AGUILLAR, C. Analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in water samples using microemulsion electrokinetic capillary chromatography under pH-suppressed electroosmotic flow with an on-column preconcentration technique. **Chromatographia**, v. 63, n. 3-4, p. 149-154, feb. 2006.

[5] TERNES, T. A. Occurrence of drugs in Germany sewage treatment plants and rivers. **Water Research**, v. 32, n. 11, p. 3245-3260, nov. 1998.

[6] TERNES T. A., STUMPF M., SCHUPPER B., HABERER K. **Vom Wasser**, v. 90, p. 295, 1998 *apud* DÍAZ-CRUZ, S.; BARCELÓ, D. Occurrence and analysis of selected pharmaceuticals and metabolites as contaminants present in waste waters, sludge and sediments. **The Handbook of Environmental Chemistry**, v. 5, part I, p. 6, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: USA, 2004.

[7] FARRÉ, M., FERRER, I., GINEBREDÀ, A., FIGUERAS, M., OLIVELLA, L., TIRAPU, M., VILANOVA, M., BARCELÓ, D. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1-2, p. 187-197, dec. 2001.

[8] HEBERER, Th., FHURMANN, B., SCHMIDT-BÄUMLER, K., TSIPI, D., KOUTSOUBA, V., HISKIA, A. Occurrence of pharmaceutical residues in sewage, river, ground and drinking water in Greece and German. In: DAUGHTON, C. G., JONES-LEPP, T. (eds) *Pharmaceutical and personal care products in the*

environment: Scientific and regulatory issues. Symposium Series 791, American Chemical Society, Washington DC, p. 70, 2001.

[9] AHRER, W., SCHERWENK, E., BUCHBERGER, W. Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 910, n. 1, p. 69-78, feb. 2001.

[10] AHRER, W., SCHERWENK, E., BUCHBERGER, W. Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 910, n. 1, p. 69-78, feb. 2001.

[11] TERNES, T., BONERZ, M., SCHMIDT, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1-2, p. 175-185, dec. 2001.

[12] MIAO, X., KOENIG, B., METCALFE, C. Anlysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 952, n.1-2, p.139-147, apr. 2002.

[13] BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Ed. Unicamp, Campinas, SP, 1995.

[14] CAMILLIERI, P. **Capillary electrophoresis: Theory and Practice**, Ed. New Directions and Biological Systems, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.

[15] SHLABACH, T. D., EXCOFFIER, J. L. Multi-variate ranking function for optimizing separations. **Journal of Chromatography A**, v. 439, n. 2, p. 173-184, sep. 1988.

[16] WATZIG, H., DEGENHARDT, M., KUNKEL, A. Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications. **Electrophoresis**, v. 19, n. 16-17, p. 2695-2752, apr. 2005.

[17] RIBANI, M., BOTOLLI, C. B. G., COLLING, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, set./out. 2004.

[18] BURGI, D. S. Large volume stacking of anions in capillary electrophoresis using an electroosmotic flow as a pump. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 24, p. 3726-3729, dec. 1993.

[19] SIMPSON JR., S. L., QUIRINO, J. P., TERABE, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 504-541, mar. 2008.

[20] FANG, H. F., ZENG, Z. R., LIU L., PANG, D. W. On-line back-extraction field-amplified sample injection method for directly analyzing cocaine and thebaine in the extractants by solvent microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 1257-1263, feb. 2006.

[21] KIM, J. B., QUIRINO, J. P., OTSUTA, K., TERABE, S. On-line sample concentration in micellar electrokinetic chromatography using cationic surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 916, n. 1-2, p. 123-130, may 2001.

Capítulo 3

Determinação de fármacos de caráter básico e neutro utilizando eletroforese capilar associada a estratégias de concentração “on line”

3.1. Introdução

A possibilidade de interação de substâncias com características distintas com micelas adicionadas ao eletrólito de corrida faz com que seja viável à análise de compostos tanto de caráter iônico quanto neutro na mesma corrida eletroforética.

Muitos estudos apresentados na literatura abordam este tipo de estratégia. Rodríguez-Flores e colaboradores [1] estudaram a separação de compostos carregados e neutros em uma mesma corrida utilizando MEKC; foram analisadas as substâncias letrozole e fluoxetina e seus principais metabólitos. O eletrólito de corrida foi constituído por 20 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio (TBS) contendo 20 mmol L⁻¹ de dodecilsulfato de sódio (SDS) e 12% (v/v) de 2-propanol (pH 9,5). Os analitos foram detectados em 8 minutos e a faixa de linearidade do método proposto esteve entre 125-1500 ng mL⁻¹, enquanto que os limites de detecção alcançados foram de 6 ng mL⁻¹ em amostras de água.

Nigović e colaboradores [2] desenvolveram um método baseado em MEKC para a quantificação simultânea de atorvastatina e substâncias relacionadas, com caráter neutro e iônico, a separação ocorreu com um eletrólito de corrida composto por 10 mmol L⁻¹ de TBS (pH 9,5), 50 mmol L⁻¹ de SDS e 20% de metanol. A escolha e adição do metanol ao eletrólito de corrida foi decisivo para que fosse alcançada a resolução entre as cinco substâncias analisadas juntamente com o padrão interno, que tiveram um tempo de análise de aproximadamente 15 minutos. A metodologia desenvolvida foi aplicada na determinação destas substâncias em formulações e os limites de detecção alcançados estiveram entre 0,26 e 18,35 µg mL⁻¹.

Drover e colaboradores investigaram a presença de ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, bezafibrato, gemfibrozil, ofloxacina, carbamazepina, primidona, sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfametazol em águas de abastecimento público.

Além destas substâncias pertencerem a diferentes classes farmacêuticas, possuem também características químicas distintas. Com isso foi possível a análise simultânea destes compostos com o uso de CE (MEKC)/UV, e o limite de detecção do método variou de 0,4 a 2,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ [3].

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um método baseado em MEKC com migração reversa de micelas para a separação de um grupo de fármacos de caráter básico e neutro. Serão estudadas também estratégias de pré-concentração on-line “stacking” desses analitos a fim de se alcançar valores de LOQ e LOD reduzidos.

Na Figura 3.1 são apresentadas as estruturas dos compostos básicos e neutros utilizados neste estudo.

Fluoxetina
(anti-depressivo)

Trimetoprima
(anti-microbiano)

Diazepam
(ansiolítico)

Carbamazepina
(anti-convulsivante)

Propranolol
(anti-hipertensivo)

Figura 3.1. Estrutura química dos compostos de estudo e classificação.

3.2. Procedimentos experimentais

3.2.1. Equipamento e parâmetros instrumentais

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos e “software” (HP ChemStation, rev A.06.01) para tratamento e aquisição de dados. O equipamento possui sistema de refrigeração do capilar por circulação de ar, e a temperatura foi mantida constante.

O capilar utilizado foi de sílica fundida (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, E.U.A.), revestido externamente com poli-imida, 50 μm de diâmetro interno, 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector. As lavagens de condicionamento inicial do capilar, com pressão de 940 mbars, foram realizadas diariamente com 15 minutos de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} , seguidos de 15 minutos de água desionizada e 30 minutos de eletrólito de corrida. No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com lavagens de 2 minutos de eletrólito e no término das análises 15 min de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} e 15 minutos de água desionizada para a limpeza do capilar.

3.2.2. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram grau analítico e a água desionizada (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Padrões dos fármacos clofibrato, fenofibrato, fluoxetina, propranolol, carbamazepina, trimetoprima, diazepam e os hormônios etinilestradiol e estrona foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, WI, E.U.A.). Soluções padrão estoque foram preparadas em metanol com concentração aproximada de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e armazenadas sob refrigeração (4 $^{\circ}\text{C}$). Foram preparadas semanalmente soluções estoque de ácido fosfórico, dodecilsulfato de sódio (SDS) (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na concentração de 100 mmol L^{-1} . Os eletrólitos utilizados nas análises foram preparados diariamente.

Eletrólito de corrida: o eletrólito de corrida utilizado para separação simultânea dos fármacos de caráter básico e neutro contém 30 mmol L^{-1} de tampão fosfato (pH 2,5), 40 mmol L^{-1} de SDS, 20 % de acetonitrila (v/v) e 0,1 % de TEA.

Preparo dos padrões: os padrões para injeção foram diluídos em solução aquosa contendo em 5 mmol L⁻¹ de tampão fosfato e 10 mmol L⁻¹ de SDS.

3.3. Resultados e discussão

Em MEKC com a presença de micelas aniônicas em pH abaixo de 4, estas apresentam mobilidade maior que a mobilidade do fluxo eletrosmótico. Nesse modo de operação, também chamado de migração reversa de micelas, a polaridade negativa é utilizada na extremidade da injeção, dessa forma, o fluxo migrará para um sentido e as micelas - com maior mobilidade que a mobilidade do fluxo - migrarão no mesmo sentido que o fluxo, levando consigo os analitos. Os analitos que possuem um grau de interação maior com as micelas migrarão mais rapidamente que os analitos que apresentam menor grau de interação. A faixa de pH normalmente utilizada nesse modo de operação é abaixo de 2,6, pH em que o fluxo eletrosmótico é negligenciável [4].

3.3.1. Otimização do eletrólito de separação

A otimização do eletrólito para análise dos compostos básicos e neutros foi realizada de maneira univariada, uma vez que, a partir de experimentos preliminares para melhor entendimento do sistema, foi alcançada uma condição satisfatória, não sendo interessante a utilização de métodos simultâneos de otimização.

3.3.1.1. Escolha do pH do eletrólito

Foi utilizado como eletrólito de corrida tampão fosfato, pH 2,5, na concentração de 30 mmol L⁻¹, esta concentração foi limitada pelos valores de corrente gerados durante as corridas exploratórias.

3.3.1.2. Concentração de SDS

A separação de solutos neutros quando em presença de micelas aniônicas é baseado na partição, modulada pela concentração de micelas (e monômeros), enquanto que para solutos carregados positivamente a interação ocorre através de pareamento iônico [6], entretanto, os mecanismos que governam essas interações ainda são pouco estudados. Variando-se a concentração de SDS, os experimentos mostraram uma forte redução do tempo de análise com aumento da concentração de SDS. A partir destes experimentos foi escolhida a concentração de 40 mmol L⁻¹ de SDS com base na resolução obtida e o formato dos picos.

3.3.1.3. Efeito da tensão aplicada

Os íons no meio eletroforético migram como resultado do campo elétrico aplicado ao longo do tubo capilar, quanto maior o campo menor o tempo de análise. Altos valores de campo aplicado podem levar a um desvio da Lei de Ohm [7], desvio causado por uma ineficiente dissipação do calor gerado dentro do capilar, causando efeitos indesejáveis à separação como, por exemplo, instabilidade e perda de resolução. Altas concentrações de eletrólito reduzem a faixa linear da Lei de Ohm.

A tensão de 30 kV, em um capilar de 50 μm de diâmetro interno, selecionada para a análise demonstrou uma alta eficiência acompanhada de um tempo relativamente curto de análise, sem o desvio da Lei de Ohm.

3.3.1.4. Escolha do contra-íon do eletrólito de corrida

Como contra-íon do eletrólito de corrida foi adicionado trietilamina na concentração de 0,1 % (m/m), também sendo responsável por minimizar a adsorção dos analitos catiônicos à superfície do tubo capilar

3.3.1.5. Adição de solventes orgânicos

A adição de solventes orgânicos à solução do eletrólito de corrida tem demonstrado em muitos estudos um aumento da solubilidade, sensibilidade, resolução e controle do fluxo eletrosmótico [5,6,8].

Quatro solventes orgânicos (acetonitrila, etanol, metanol e iso-propanol) foram testados isoladamente e combinados. Os resultados indicaram um aumento da resolução e sinal na presença de acetonitrila, na concentração de 20 %, enquanto que os outros solventes provocaram na maioria das vezes, um alargamento das bandas eletroforéticas, e conseqüentemente perdas na resolução entre picos adjacentes.

3.3.2. Composição do solvente utilizado para dissolução dos analitos

Quando os analitos foram dissolvidos em concentrações acima de 50 % de acetonitrila, os picos sofreram distorção, esse resultado é atribuído à impossibilidade da presença de micelas no plugue de amostra contendo concentrações altas de solvente orgânico. Desse modo quando as micelas migram para a região da amostra ocorre uma desmicelização, e agregados menores ou monômeros são os responsáveis por retirar os compostos do plugue da amostra. Como a interação monômero/analito num meio rico em acetonitrila é fraca, os analitos são retirados desse plugue lentamente, e quando os mesmos atingem a região do eletrólito, interagem mais fortemente com as micelas sendo rapidamente acelerados.

A piora do formato dos picos com o aumento da concentração de SDS no eletrólito de corrida ($>15 \text{ mmol L}^{-1}$) pode estar relacionada com o aumento da condutividade da zona de amostra. A melhora do formato dos picos quando os analitos são dissolvidos em SDS e fosfato possivelmente está relacionado à solubilização dos analitos nas micelas e na possibilidade de “stacking” com as micelas do eletrólito de corrida. Altria e colaboradores [9] observaram o mesmo efeito para compostos básicos insolúveis em água.

A concentração de SDS e fosfato em água escolhida para dissolver as amostras para posterior injeção no método otimizado foi 10 mmol L^{-1} e 5 mmol L^{-1} , respectivamente, esse valor foi alcançado levando-se em consideração a largura dos picos e o número de pratos calculados a partir dos mesmos, com isso não há uma diferença tão brusca entre o meio do eletrólito de corrida e o plugue de amostra.

3.3.3. Eletrólito de separação

O eletrólito de corrida otimizado foi constituído de 30 mmol L⁻¹ de fosfato (pH 2,5), 40 mmol L⁻¹ de SDS, 20 % de acetonitrila e 0,1 % de TEA. O eletroferograma da separação dos analitos é apresentado na Figura 3.2.

Figura 3.2. Separação dos analitos de caráter básico e neutro. Condições de análise: 30 mmol L⁻¹ de fosfato (pH 2,5), 40 mmol L⁻¹ de SDS, 20 % de ACN, 0,1 % de TEA; injeção hidrodinâmica com pressão de 50 mbar durante 3 segundos; tensão, -30 kV; comprimento do capilar 48,5 cm (efetivo 40 cm) e 50 µm de diâmetro interno; temperatura, 25°C. Analitos: 1, fluoxetina; 2, fenofibrato; 3, propranolol; 4, estrona; 5, diazepam; 6, clofibrato; 7, etinilestradiol; 8, trimetoprima; e 9, carbamazepina.

3.3.4. Avaliação do desempenho do método

3.3.4.1. Linearidade do método

Os padrões de fluoxetina, fenofibrato, propranolol, estrona, diazepam, clofibrato, etinilestradiol, trimetoprima e carbamazepina foram injetados no intervalo de concentração entre 2 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 3.1. Linearidade do método para fluoxetina, fenofibrato, propranolol, estrona, diazepam, clofibrato, etinilestradiol, trimetoprima e carbamazepina.

ANALITO	a	b	F	R ²	ERRO PADRÃO DA REGRESSÃO
Fluoxetina	0,290 $\pm$ 0,003	0,166 $\pm$ 0,095	10210	0,9997	0,1119
Clofibrato	0,551 $\pm$ 0,008	0,268 $\pm$ 0,176	4800	0,9994	0,2082
Fenofibrato	0,437 $\pm$ 0,169	0,471 $\pm$ 0,169	2670	0,9989	0,2053
Propranolol	0,306 $\pm$ 0,003	0,162 $\pm$ 0,101	9473	0,9997	0,1192
Carbamazepina	0,238 $\pm$ 0,004	0,093 $\pm$ 0,148	4333	0,9993	0,1739
Trimetoprima	0,398 $\pm$ 0,006	-0,428 $\pm$ 0,156	4242	0,9993	0,1746
Etinilestradiol	0,402 $\pm$ 0,006	-0,025 $\pm$ 0,147	4635	0,9994	0,1704
Estrona	0,160 $\pm$ 0,001	0,087 $\pm$ 0,059	28473	0,9999	0,0697
Diazepam	0,154 $\pm$ 0,001	0,322 $\pm$ 0,085	16478	0,9998	0,1017

a e b, coeficiente angular e linear da equação $A=aC+b$, onde A = área em unidade arbitrária e C = concentração em mg L^{-1} ; r, coeficiente de determinação, n=6.

As curvas de regressão apresentaram coeficientes de correlação satisfatórios ($r \geq 0,9989$), F (significância da regressão) elevados, erros de regressão relativamente baixos e os gráficos de resíduos não apresentaram tendências, ou seja os resíduos ficaram distribuídos aleatoriamente ao redor de zero (não mostrado).

3.3.4.2. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da relação sinal/ruído e de acordo com os parâmetros da curva de calibração, previamente descritos no Capítulo 2.

A Tabela 3.2 contém os valores dos limites de detecção e quantificação estimados pelos dois métodos citados para os analitos de estudo.

Tabela 3.2. Limites de detecção e quantificação obtidos pela relação sinal/ruído e pelos parâmetros da curva de calibração.

ANALITO	RELAÇÃO SINAL RUÍDO		CURVA ANALÍTICA	
	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Fluoxetina	0,13	0,20	1,27	3,86
Clofibrato	0,14	0,23	1,24	3,78
Fenofibrato	0,14	0,25	1,55	4,70
Propranolol	0,13	0,20	1,28	3,89
Carbamazepina	0,12	0,27	2,40	7,30
Trimetoprima	0,19	0,40	1,44	4,39
Etinilestradiol	0,13	0,19	1,40	4,24
Estrona	0,11	0,14	1,43	4,35
Diazepam	0,15	0,27	2,17	6,60

LOD, limite de detecção; LOQ, limite de quantificação; CV, coeficiente de variação (n=3)

Os limites de detecção e quantificação calculados pelos dois métodos não apresentam similaridade para nenhum dos compostos. Os valores calculados a partir da relação sinal/ruído são muito inferiores àqueles que utilizam os parâmetros da curva e não estão de acordo, isto pode estar relacionado aos coeficientes de correlação obtidos das curvas dos compostos.

3.3.5. Estratégias de pré-concentração “on line”

Os limites de detecção alcançados pela metodologia proposta ainda são altos para a determinação das substâncias estudadas em amostras ambientais. Com isso, foi necessário o uso de estratégias de pré-concentração “on line”.

Considerando a natureza dos analitos (que algumas moléculas estão ionizadas no pH de separação e outras encontram-se neutras), a presença de SDS no eletrólito de corrida, e a condição do fluxo eletrosmótico (negligenciável em pH 2,5) permitiram que fosse utilizada a estratégia de pré-concentração nomeada “stacking” com presença de micelas no eletrólito de corrida. O “stacking” com micelas foi introduzido em 1998 por Quirino e Terabe e se baseia na interação entre os analitos e um aditivo (fase pseudoestacionária ou agente complexante) presente no eletrólito de corrida, que promovem o acúmulo destas substâncias por particionamento, complexação ou qualquer outro tipo de interação, na fronteira entre a zona de amostra e do eletrólito de corrida. Ambos analitos, neutros ou carregados podem ser pré-concentrados. Neste estudo, a fase pseudoestacionária encontra-se carregada negativamente (SDS) e as micelas serão responsáveis por conduzir os analitos através de sua passagem pelo grande plugue de amostra injetado até o detector após concentrá-las no interior do capilar. Este fenômeno ocorre independentemente do fluxo eletrosmótico, apenas os analitos devem

possuir afinidade com a fase estacionária, independente da carga dos mesmos no meio de separação. Portanto o “stacking” com presença de micelas se dá pela injeção de um grande volume de amostra, cuja matriz apresente menor condutividade que o eletrólito de corrida, e a tensão com polaridade negativa é aplicada. A remoção da matriz é acompanhada pelo aumento da corrente elétrica. A Figura 3.3 ilustra o procedimento adotado.

Figura 3.3. Representação esquemática do modo de “stacking” com micelas e grande volume de injeção. (A/B) um grande volume de amostra é injetada hidrodinamicamente no capilar; (C) a tensão foi aplicada com polaridade negativa, a matriz da amostra é empurrada para fora do capilar e os analitos de caráter catiônico e neutro interagem com a fase pseudoestacionária constituída por SDS, que é o responsável por provocar a concentração dos compostos; (D) os analitos concentrados na fronteira entre a zona da amostra e o eletrólito de corrida migram em direção ao detector e (E) a separação ocorre.

Este modo de “stacking” emprega um eletrólito contendo micelas carregadas negativamente (no caso do SDS), sendo que a mobilidade das micelas é maior que a do fluxo eletrosmótico. As amostras são preparadas em água ou em uma matriz de baixa condutividade e são injetadas por um longo período de tempo comparado ao tempo de injeção normal, após o condicionamento com o eletrólito de corrida contendo meio micelar. A solução da amostra é injetada na extremidade catódica do capilar e então a tensão de separação é aplicada. Uma vez que a polaridade negativa é aplicada na extremidade da injeção, a matriz da amostra é empurrada lentamente para fora do capilar pela ação do fluxo eletrosmótico (fraco neste pH). Enquanto isso, os analitos interagem com as micelas presentes no eletrólito de corrida que fazem o papel de acumulá-los e então a separação acontece.

3.3.5.1. Escolha do solvente para solubilização dos padrões

Para que ocorra a concentração efetiva dos analitos no interior do capilar, a solução da amostra deve ser preparada em um meio de baixa condutividade comparada a condutividade do eletrólito de corrida, com ou sem micelas. Foi avaliada a dissolução dos analitos nos seguintes meios: i) apenas em água; ii) em ácido fosfórico, nas concentrações de 5, 10 e 15 mmol L⁻¹; e em uma solução contendo 10 mmol L⁻¹ de ácido fosfórico e 5 mmol L⁻¹ de SDS. Uma melhora na resposta dos picos foi observada com a adição de 10 mmol L⁻¹ de ácido fosfórico apenas. A presença de SDS no plugue de amostra promoveu uma distorção no formato dos picos, com perda da eficiência e resolução.

3.3.5.2. Efeito da injeção de plugue de água antecedendo a injeção da amostra

Mantendo a razão constante entre o tamanho do plugue injetado de água e de amostra, o efeito do aumento da zona de baixa condutividade (plugue de água + plugue da amostra) foi investigado. A razão igual a 1 foi mantida, e os experimentos mostraram um decaimento no formato dos picos, tanto após a adição de uma etapa de injeção de água quanto com o aumento do tamanho dos plugues (água + amostra). Foram investigados os efeitos do aumento do tamanho da zona de baixa condutividade, apenas com a injeção da amostra e com a injeção da amostra e plugue de água nas mesmas proporções. Os fatores de enriquecimento foram calculados utilizando a Equação 3.1, onde o numerador corresponde a altura do pico obtida com o “stacking” e o denominador é a altura do pico obtido com a injeção normal (3 segundos). Foi utilizada uma solução com os padrões na concentração de 1 mg L^{-1} . Os resultados demonstraram uma melhora a medida em que a injeção da amostra era aumentada, e uma piora a medida que a injeção do plugue de água antecedia a injeção do plugue de amostra. Os melhores resultados foram alcançados quando um volume de 220 segundos de amostra, preparada em 10 mmol L^{-1} de ácido fosfórico foi injetada no capilar, seguida da injeção de uma porção do eletrólito de corrida.

3.3.5.3. Avaliação do aumento da detectabilidade no modo de “stacking” com micelas com grande volume de injeção da amostra

De acordo com a Equação do fator de aumento da sensibilidade (FAZ) [11], o aumento da sensibilidade para os analitos estudados variou de 10 a 42 vezes, quando estes foram submetidos ao modo “stacking” com grande volume de amostra na concentração de $0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ e comparados com o procedimento de injeção convencional, em que os padrões na concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram injetados hidrodinamicamente durante 3 segundos com pressão de 50 mbar, ambos dissolvidos em 10 mmol L^{-1} de H_3PO_4 . A Tabela 3.3 mostra os resultados de enriquecimento alcançados no modo de “stacking” com micelas e injeção de grande volume de amostra para cada analito estudado.

Tabela 3.3. Valores de enriquecimento alcançados pelo “stacking” com micelas e grande volume de injeção da amostra para cada analito.

Analitos	Flu.	Fen.	Pro.	Est.	Dia.	Clo.	Eti.	Tri.	Car.
FAS	28	25	12	10	31	30	33	42	33

Flu., fluoxetina; Fen., fenofibrato; Pro., propranolol; Est., estrona; Dia., diazepam; Clo., clofibrato; Eti., etinilestradiol; Tri., trimetoprima; Car., carbamazepina.

A Figura 3.4 mostra o eletroferograma referente a injeção dos padrões injetados no modo convencional (50 mbar /3 segundos) e o eletroferograma dos analitos submetidos ao “stacking” com micelas e injeção de grande volume de amostra.

Figura 3.4. (A) Injeção dos padrões na concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ pelo modo convencional de injeção hidrodinâmica durante 3 segundos com pressão de 50 mbar; **(B)** Procedimento de “stacking” em presença de micelas, no modo LVSS, com os padrões na concentração de $0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ e injeção hidrodinâmica de 50 mbar durante 220 segundos. 1, fluoxetina; 2, fenofibrato; 3, propranolol; 4, estrona; 5, diazepam; 6, clofibrato; 7, etinilestradiol; 8, trimetoprima; 9, carbamazepina. Eletrólito de corrida e outras condições de análise, consultar Fig. 3.2.

3.3.5.4. Linearidade, precisão instrumental e limites de detecção e quantificação

Foram avaliados parâmetros de desempenho do método no modo de “stacking” em presença de micelas no modo LVSS, a precisão instrumental e linearidade foram avaliados e os limites de detecção e quantificação foram

determinados a partir de soluções contendo os oito padrões em concentrações apropriadas. A Tabela 3.4 resume os resultados obtidos.

Tabela 3.4. Reprodutibilidade, linearidade e limites de detecção e quantificação para o modo LVSS.

	Analitos								
	Flu	Fen	Pro	Est	Dia	Clo	Eti	Tri	Car
Reprodutibilidade (n = 6, padrões na concentração de 0,08 µg mL ⁻¹) ^a									
Tempo de migração ^a	1,12	2,33	4,38	4,94	2,03	1,21	0,91	1,55	2,01
Área do pico ^a	2,51	2,65	4,15	3,11	2,74	4,25	2,98	2,22	3,37
Altura do pico ^a	1,21	3,36	3,60	5,54	4,51	3,55	3,24	5,62	4,24
Linearidade									
<i>Área</i>									
R ²	0,9951	0,9917	0,9901	0,9935	0,9924	0,9900	0,9981	0,9976	0,9926
a (coeficiente angular)	4,637	4,1511	2,1434	1,2042	4,9488	3,9951	5,2351	12,031	8,0022
b (coeficiente linear)	0,0302	0,0212	-0,2076	-0,0251	0,0153	-0,0129	-0,0342	-0,0042	0,0189
F	527	611	425	617	512	921	559	628	316
Erro padrão da regressão	0,0014	0,0098	0,0219	0,0056	0,0145	0,0110	0,0245	0,0020	0,0210
<i>Altura</i>									
R ²	0,9982	0,9907	0,9899	0,9956	0,9927	0,9968	0,9954	0,9986	0,9934
a (coeficiente angular)	4,262	3,999	1,9480	2,0121	4,5402	5,1011	7,5214	12,1859	8,7725
b (coeficiente linear)	0,245	0,0311	-0,3001	0,0027	0,0029	-0,0097	-0,0154	0,0451	0,0542
F	520	333	294	291	415	721	362	257	325
Erro padrão da regressão	0,0025	0,0117	0,0301	0,0088	0,0210	0,0325	0,0096	0,0111	0,0203
Limites de detecção e quantificação ^b									
LOD ^b (relação sinal/ruído)	0,018	0,020	0,042	0,067	0,017	0,015	0,013	0,009	0,012
LOQ ^b (relação sinal/ruído)	0,085	0,091	0,120	0,215	0,082	0,074	0,069	0,031	0,066

Flu., fluoxetina; Fen., fenofibrato; Pro., propranolol; Est., estrona; Dia., diazepam; Clo., clofibrato; Eti., etinilestradiol; Tri., trimetoprima; Car., carbamazepina. Faixa de concentração 0,06 – 0,12 µg mL⁻¹; cinco níveis; A=aC+b, onde A = área em unidade arbitrária e C = concentração em µg mL⁻¹; R², coeficiente de determinação, n=3.

^a CV%; ^b µg mL⁻¹.

Os valores de precisão instrumental do método foram obtidos por meio de seis injeções de uma solução contendo os padrões na concentração aproximada de 0,08 µg mL⁻¹. Os valores alcançados foram referentes ao coeficiente de variação (%) entre as seis injeções para valores de tempo de migração, área e altura do pico. Os

resultados obtidos para o coeficiente de variação foram satisfatórios para todos os parâmetros estudados, considerando o volume de amostra injetada.

O estudo da linearidade do método foi estabelecido com cinco níveis de calibração na faixa de concentração que variou entre 0,06 e 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada composto e cada concentração foi injetada em triplicata. Os resultados obtidos foram avaliados com relação à área e altura obtidos. Os valores de coeficientes de determinação obtidos ($R^2 > 0,99$) foram satisfatórios, tanto quando utilizada altura ou a área dos picos. Os valores obtidos para o erro padrão da regressão de cada analito foram baixos e os valores de F mostram a significância da metodologia.

3.4. Considerações finais

O eletrólito otimizado alcançou a separação simultânea dos 9 fármacos de caráter básico e neutro com tempo de análise inferior a 8 minutos, com resolução em linha de base para todos os analitos. A melhora na sensibilidade foi estudada através de um método de pré-concentração “on line” dos analitos. Foi utilizada a estratégia de “stacking” em presença de micelas e injeção de grande volume de amostra. Limites de detecção e quantificação foram alcançados na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo portanto mais adequados para a análise das substâncias estudadas em amostras ambientais. Etapas de extração serão abordadas no próximo capítulo. O uso em análise de rotina do método proposto em amostras de água de abastecimento público mostrou-se promissor.

3.5. Referências bibliográficas

- [1] RODRÍGUEZ-FLORES, J., SALCEDO, A. M. C., FERNÁNDEZ, L. M. Rapid quantitative analysis of letrozole, fluoxetine and their metabolites in biological and environmental samples by MEKC. **Electrophoresis**, v. 30, n. 4, p. 624-632, jan. 2009.
- [2] NIGOVIĆ, B., DAMIĆ, M., INJAC, R., GLAVAČ N. K., ŠTRUKELJ, B. Analysis of atorvastatin and related substances by MEKC. **Chromatographia**, v. 69, n. 11-12, p. 1299-1305, mar. 2009.
- [3] DROVER, V. J., BOTTARO, C. S. Determination of pharmaceuticals in drinking water by CD-modified MEKC: Separation optimization using experimental design. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 21, p. 3740-3748, dec. 2008.
- [4] FOLEY, J. P. Critical compilation of solute-micelle binding constants and related parameters from micellar liquid chromatographic measurements. **Analytica Chimica Acta**, v. 231, p. 237-247, 1990.
- [5] LIU, Z., ZOU, H., YE, M., NI, J., ZHANG, Y. Effects of organic modifiers on solute retention and electrokinetic migrations in micellar electrokinetic capillary chromatography. **Electrophoresis**, v. 20, n. 1-2, p. 49-55, oct. 1999.
- [6] HUIE, C. W. Effects of organic solvents on sample pretreatment and separation performances in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, n. 10, p. 1508-1529, may 2003.
- [7] LANDERS, J. P. Introduction to capillary electrophoresis. In: J. P. LANDERS (Ed.). Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques, CRC Press, 2007.
- [8] BRETNALL, A. E., CLARKE, G. S. Investigation and optimization of the use of organic modifiers in micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 716, n. 1-2, p. 49-55, nov. 1995.
- [9] ALTRIA, K. D., CLARK, B. J., KELLY, M. A. Investigation into the effects of sample dissolving solvents and sample matrices on the separations obtained in capillary electrophoresis. Part II: MECC. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, n. 1, p. 55-58, jan. 1999.
- [10] QUIRINO, J. P., TERABE, S. Exceeding 5000-fold concentration of dilute analytes in micellar electrokinetic chromatography. **Science**, v. 282, p. 465-468, oct. 1998.
- [11] KIM, J. B., QUIRINO, J. P., OTSUTA, K., TERABE, S. On-line sample concentration in micellar electrokinetic chromatography using cationic surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 916, n. 1-2, p. 123-130, may 2001.

Capítulo 4

**Estudos de extração em fase
sólida aplicados a substâncias de
caráter ácido, básico e neutro**

4.1. Introdução

Nos Capítulos 2 e 3 foram apresentados os resultados obtidos para a determinação de compostos ácidos e compostos básicos e neutros, respectivamente. Os valores obtidos de LOD e LOQ utilizando-se os procedimentos de “stacking” não foram suficientes para a determinação das substâncias determinadas em amostras de águas superficiais, de acordo com os níveis reportados na literatura. Dessa forma um procedimento de pré-concentração “off-line” se faz necessário.

A técnica de extração em fase sólida foi escolhida como procedimento de extração “off-line”. Com base na estrutura dos analitos duas fases estacionárias foram selecionadas para o estudo de SPE: poliestireno divinilbenzeno (PS-DVB) e C18.

Conforme mostrado no Apêndice I um parâmetro muito importante a ser conhecido a fim de se obter bons níveis de recuperação é o volume de capacidade, esse parâmetro pode ser determinado por experimentos de eluição ou pela constante de distribuição sólido-líquido.

Este estudo tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia de preparo de amostra por meio da extração em fase sólida para concentração e “clean up” dos analitos estudados nos Capítulos 2 e 3 e aplicação desta metodologia associada aos métodos de separação em amostras de água coletadas da Represa Billings (região metropolitana de São Paulo).

4.2. Procedimentos Experimentais

4.2.1. Equipamentos e parâmetros instrumentais

A fim de se determinar o volume de capacidade por experimentos de eluição, foi montada a instrumentação representada pela Figura 4.1.

Figura 4.1. Instrumentação utilizada para determinação do volume de capacidade.

Os experimentos relacionados a determinação do volume de capacidade foram realizados em um espectrofotômetro modelo 800 XI (Femto, São Paulo, SP, Brasil) com varredura espectral, duplo feixe, 2 fotodiodos de silício, e faixa espectral de 190 a 1100 nm. O comprimento de onda utilizado foi de 205 nm.

Os experimentos para determinação das substâncias foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos e “software” (HP ChemStation, rev A.06.01) para tratamento e aquisição de dados. O aparelho possui sistema de refrigeração do capilar por circulação de ar, e a temperatura foi mantida constante. Os capilares utilizados foram de sílica fundida (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, E.U.A.), revestidos externamente com poli-imida. Outros parâmetros instrumentais estão descritos nos Capítulos 1 e 2. Para a propulsão das soluções submetidas ao estudo de extração em fase sólida utilizou-se uma bomba peristáltica Ismateck (Zurich, Switzerland, modelo 7618-40) e tubos de bombeamento de Tygon de diâmetro conhecido.

4.2.2. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram grau analítico e a água desionizada (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Padrões dos fármacos diclofenaco, bezafibrato, fenoprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno, fluoxetina, fenofibrato, propranolol, estrona, diazepam, clofibrato, etinilestradiol, trimetoprima, carbamazepina, e os metabólitos ácido gentísico e ácido salicílico foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, WI, E.U.A.), e ácido difenilacético, adquirido da Acros (Morris Plains, NJ, E.U.A.). Soluções padrão estoque foram preparadas em metanol com concentração aproximada de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e armazenadas sob refrigeração (4 °C).

4.2.3. Amostras

Para a otimização do método de SPE foram utilizadas alíquotas de 100 mL de amostras de água de torneira, fortificada com os padrões em concentrações apropriadas. O método de extração otimizado foi aplicado em alíquotas de 100 mL de amostras de água coletadas na Represa Billings, localizada na região metropolitana de São Paulo. As amostras foram coletadas com profundidade de 50 cm da superfície, no período da manhã, em recipientes de vidro âmbar, e levadas imediatamente ao laboratório, filtradas e armazenadas sob refrigeração (4 °C) ao abrigo da luz. As amostras coletadas apresentavam pH que variou de 6,8 a 7,2, e estas foram analisadas no prazo máximo de 72 horas após a coleta.

4.2.4. Extração em fase sólida

Foram utilizados cartuchos de 500 mg de sorvente para ambas as fases estudadas: fase estacionária C18 (fase reversa contendo o grupo octadecil quimicamente ligado à sílica) e o outro, fase poli-estireno-divinilbenzeno (PS-

DVB) (500 mg). Os cartuchos foram pré-condicionados (para ativação da fase) com 5 mL de metanol, seguidos de 5 mL de água:metanol (50:50 v/v) e água.

Extração das substâncias de caráter ácido: alíquotas de 100 mL de água da torneira (uma alíquota para cada estudo) foram utilizadas para os estudos de extração através da adição de concentrações conhecidas dos padrões de diclofenaco, bezafibrato, naproxeno, ibuprofeno, cetoprofeno, fenoprofeno, ácido salicílico e ácido gentísico. Após a adição dos compostos, o pH da água foi ajustado em aproximadamente 2,5 (com HCl 37 %), e filtrada em membrana 0,45 μ m (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) com o auxílio de um sistema à vácuo. As soluções contendo os padrões foram submetidas à extração em dois cartuchos, um contendo 500 mg da fase estacionária C18 (fase reversa contendo o grupo octadecil quimicamente ligado à sílica) e o outro, fase poli-estireno-divinilbenzeno (PS-DVB) (500 mg). As amostras foram submetidas às colunas de extração em fase sólida com um fluxo aproximado de 3 mL min⁻¹. A eluição dos analitos de estudo foi realizada com 5 mL de metanol, e o eluato foi evaporado até completa secura sob fluxo de N₂ constante e banho de água (45 °C). Finalmente os resíduos foram ressuspensos em 1 mL de uma solução contendo 5 mmol L⁻¹ TBS em metanol:água (10:80 v/v) e injetados no equipamento de eletroforese capilar.

Extração das substâncias de caráter básico e neutro: alíquotas de 100 mL de água da torneira foram fortificadas concentrações conhecidas dos padrões de fluoxetina, clofibrato, fenofibrato, propranolol, carbamazepina, trimetoprima, etinilestradiol, estrona e diazepam. Após a adição dos compostos, o pH da água foi ajustado em aproximadamente 11 (com NaOH 1 mol L⁻¹), e filtrada em membrana 0,45 μ m (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) com o auxílio de um sistema à vácuo. As amostras foram então submetidas aos cartuchos de extração em fase sólida constituídos 500 mg (cada) da fase estacionária C18 e poli-estireno-divinilbenzeno. As amostras foram submetidas à coluna de extração em fase sólida com um fluxo aproximado de 3 mL min⁻¹. Após a extração, a fase foi

lavada com 10 mL de água desionizada (pH 11) e em seguida seca sob fluxo de nitrogênio durante 30 minutos. A eluição dos analitos de estudo foi realizada com 5 mL de metanol, e o eluato foi evaporado até completa secura sob fluxo de N₂ constante e banho de água (45 °C). Finalmente os resíduos foram ressuspensos em 1 mL de uma solução contendo 5 mmol L⁻¹ de ácido fosfórico e 10 mmol L⁻¹ de SDS e injetado no equipamento de eletroforese capilar. Os mesmos experimentos descritos anteriormente também foram realizados em amostras de água sem o ajuste do pH da solução.

Determinação do volume de capacidade: os experimentos relacionados ao volume de capacidade foram realizados com uma solução contendo todos os analitos de interesse, de caráter aniônico, catiônico e neutro na concentração de 4 mg L⁻¹ cada, suficiente para que cada componente apresentasse sinal no detector. Esta solução foi percolada em um cartucho contendo o sorvente de estudo, com o auxílio de um sistema de fluxo em linha, o sinal era registrado no espectrofotômetro no comprimento de onda de 205 nm.

Estudo de recuperação: a recuperação do método foi determinada pela adição de volumes conhecidos de soluções padrão das substâncias analisadas em um volume de 100 mL da amostra. A recuperação foi avaliada através da injeção dos analitos submetidos a extração no equipamento de eletroforese capilar. As metodologias de análise são as mesmas utilizadas nos Capítulos 2 e 3. Os cálculos foram realizados através da comparação entre as áreas resultantes no eletroferograma da solução padrão na concentração apropriada, e da amostra de água adicionada desses padrões e submetidas ao procedimento de extração em fase sólida.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Experimentos preliminares

Para se determinar qual das fases selecionadas seria mais adequada para pré-concentração de cada classe de fármacos em estudo foram realizados experimentos preliminares de extração. Foi determinada a recuperação como medida de eficiência de extração. Os dois grupos de analitos (ácidos e básicos + neutros) foram aplicados em ambas as fases sólidas em estudo. Nos métodos de determinação para o estudo de recuperação não foram utilizados procedimentos de “stacking” que produzem resultados com valores altos de CV% de área. Este procedimento foi adotado a fim de se avaliar com maior confiança os desvios relacionados à extração. Foram preparadas soluções de 0.05 mg L⁻¹ para os analitos ácidos (solução A) e para os analitos básicos e neutros (solução B), ambas em água desionizada. Estas soluções foram utilizadas para os estudos preliminares de extração.

4.3.1.1. Compostos de caráter ácido

Na Figura 4.2 são apresentados os resultados dos estudos de recuperação aplicando-se 100 mL da solução A, utilizando as fases sólidas C18 e PS-DVB em pH 2,5.

Figura 4.2. Gráfico com os resultados de recuperação obtidos com a avaliação dos cartuchos de extração C18 e PS-DVB para compostos de caráter ácido, pH de extração 2,5.

Foram utilizados valores de pH baixos a fim de tornar os analitos – de caráter ácido – neutros e portanto aumentar o coeficiente de distribuição com a fase sólida, quando o mecanismo de partição é predominante, como é o caso da fase C18. Pode-se observar que a fase PS-DVB apresenta valores de recuperação maiores para todos os analitos estudados, assim foi escolhida para experimentos posteriores. Os ácidos salicílico e gentísico não foram detectados no eletroferograma gerado pelo método para análise de ânions, isto ocorreu provavelmente, devido ao volume de capacidade para estes analitos ser muito baixo, sendo os mesmos removidos do cartucho pelo fluxo da amostra e pela lavagem com água, ou ainda devido a característica hidrofílica destes analitos, não havendo retenção pela fase de extração.

Na Figura 4.3 são apresentados os resultados para a recuperação de duas alíquotas fortificadas com os analitos de caráter aniônico, utilizando-se a fase

escolhida PS-DVB. O pH de cada alíquota foi ajustado em 2,5 e pH 7, respectivamente.

Figura 4.3. Gráfico com os resultados de recuperação obtidos com a avaliação do pH de extração – 2,5 e 7,0 – da amostra utilizando a fase PS-DVB para compostos de caráter ácido.

Levando-se em consideração os desvios padrão obtidos, pode-se concluir que os valores de recuperação não são muito afetados pelo pH da amostra. Este resultado condiz com o tipo de interação prevalente na fase, ou seja, uma interação anel-anel (π - π) entre os analitos e a fase. Novamente, os ácidos salicílico e gentísico não foram detectados.

4.3.1.2. Compostos de caráter básico e neutro

Na Figura 4.4 são apresentados os resultados obtidos utilizando-se as fases sólidas C18 e PS-DVB, e amostras ajustadas em pH 11 para análise dos compostos básico e neutros, aplicando-se 100 mL da solução B. Em valor de pH 11, os

compostos de caráter básicos apresentam-se na forma neutra. Pode-se observar que os valores de recuperação com o emprego da fase PS-DVB foram superiores aos obtidos utilizando-se o sorvente C18 (exceto estrona), sendo a fase PS-DVB escolhida para estudos posteriores.

Figura 4.4. Gráfico com os resultados de recuperação obtidos com a avaliação dos cartuchos de extração C18 e PS-DVB para compostos de caráter básico e neutro, pH de extração 11.

A Figura 4.5 apresenta os dados de recuperação para os analitos básicos e neutros com o emprego da fase PS-DVB como fase sólida, com extração da amostra em valores de pH 7 e 11; novamente os valores obtidos indicam que o fenômeno de interação predominante é do tipo π - π , e os resultados são semelhantes para a maioria dos compostos, (quando levado em consideração os coeficientes de variação).

Figura 4.5. Gráfico com os resultados de recuperação obtidos com a avaliação do pH de extração – 2,5 e 7,0 – da utilizando a fase PS-DVB para compostos de caráter neutro e básico.

Tendo em vista os resultados preliminares obtidos é possível concluir que a fase sólida a ser utilizada deve ser PS-DVB e, pH 7 parece ser adequado. Espera-se com isso extrair os compostos aniônicos, catiônicos e neutros simultaneamente, reduzindo além dos custos operacionais, a geração de resíduos, pois toda a extração é realizada em uma única etapa, levando a um aumento da frequência analítica. Estudos confirmam que em pH 7, é menor a influência de substâncias húmicas e fúlvicas provenientes da matriz da amostra [1], o que leva a um aumento da eficiência da extração e menos interferentes durante a análise.

4.3.2. Determinação do volume de capacidade

Os experimentos relacionados ao volume de capacidade foram realizados com uma mistura de todos os analitos de interesse, aniônicos, catiônicos e neutros, conforme procedimento experimental.

Na Figura 4.6 é apresentado o perfil de eluição com o cartucho contendo PS-DVB como fase extratora, de uma mistura dos 16 analitos de interesse, preparados em água de torneira, sem ajuste de pH (o pH da amostra medido foi 6,2).

Figura 4.6. Perfil de eluição dos analitos estudados em água de torneira, sem ajuste do pH, e submetidos a fase polimérica PS-DVB. Cartucho contendo 500 mg de fase, condicionamento com 5 mL de metanol, seguidos de 5 mL de água:metanol (50:50 v/v) e 5 mL de água. Fluxo aproximado de 3 mL min⁻¹.

Pode-se observar que após a passagem de 10 mL da solução contendo os padrões, houve um aumento do sinal, o que indica que um ou mais analitos atingiu o volume de capacidade. Cabe destacar que o volume morto é da ordem de 10 mL, o que implica em nenhuma retenção deste analito. Pode-se observar

também que por volta de 70 mL, há um novo aumento indicando, que outro analito (ou grupo de analitos) atingiu o volume de capacidade.

Na Figura 4.7 são apresentados espectros de UV: (A) do ácido salicílico; (B) após a passagem de uma alíquota de 280 mL da amostra de torneira fortificada com os analitos de caráter ácido, básico e neutro, pelo cartucho de extração; e (B) do ácido gentísico.

Figura 4.7. Espectro de UV do ácido salicílico (A), após submetido um volume de 280 mL de uma amostra de água de torneira contendo os 16 compostos em estudo (B) e do ácido gentísico (C).

Ao espectro de UV da amostra (B) estão sobrepostos aos espectros de UV dos ácido salicílico (A) e gentísico (C). O espectro obtido em B parece ser uma sobreposição de A e C.

A fim de identificar os compostos que possuem valores de volume de capacidade reduzidos foram coletadas frações ao longo do experimento (35, 70, 105, 140 e 280 mL). As frações foram analisadas por ambos os métodos desenvolvidos nos Capítulos 2 e 3, entretanto a injeção, foi realizada no lado mais próximo ao detector (Figura 4.8).

Figura 4.8. Perfil de eluição dos ácidos gentísico e salicílico. (A) 35 mL, (B) 70 mL, (C) 105 mL, (D) 140 mL, (E) 280 mL. 1) Ácido Gentísico, 2) Ácido Salicílico. Condições analíticas, (ver procedimento experimental no Capítulo 2, injeção pela extremidade mais próxima ao detector).

Por meio das análises realizadas, pode-se observar que o ácido gentísico apresentou o menor volume de capacidade seguido do ácido salicílico, e estes são os compostos responsáveis pelo perfil de eluição apresentado na Figura 4.8. Observou-se também que nas primeiras frações foi possível obter o ácido gentísico puro, separado por cromatografia frontal. Estes resultados estão em acordo com os dados obtidos nos estudos preliminares onde a recuperação destes compostos foi muito baixa. Aplicando-se o método eletroforético para os compostos básicos e neutros nas frações obtidas não foram detectados nenhum dos analitos.

4.3.3. Estudo da retenção dos ácidos salicílico e gentísico

4.3.3.1. Efeito da vazão

Para avaliar o efeito da vazão sobre o volume de capacidade foi realizado um experimento utilizando-se a metade da vazão (reduziu-se de 4,2 para 2,1 mL min⁻¹). Na Figura 4.9 é apresentado o perfil de eluição obtido através deste experimento.

Figura 4.9. Perfil de eluição obtido com valores de vazão de 4,2 mL min⁻¹ e 2,1 mL min⁻¹ para os ácidos gentísico e salicílico.

Pode-se observar que o perfil obtido é muito semelhante aos anteriores (Fig. 4.6) não resultando num aumento de volume de capacidade em ambos os valores de vazão, sendo os valores de volume de capacidade bastante semelhantes.

4.3.3.2. Efeito do pH

Com o intuito de se aumentar o volume de capacidade para os ácidos salicílico e gentísico foi realizado um estudo de pH. A redução do pH pode aumentar a retenção pela diminuição da carga dos analitos devido a uma redução de polaridade.

O perfil de retenção reduzindo-se o pH para 2,2 apenas para os ácidos salicílico e gentísico, foi semelhante ao apresentado na Figura 4.8, não resultando no aumento das concentrações eluídas, o que novamente concorda com o obtido anteriormente.

Os valores de pK_a para estes analitos são 3,1 (ácido salicílico) e 2,97 (ácido gentísico) (Fig. 2.1). A construção de curvas de carga em função do pH pode auxiliar na determinação do pH de extração.

Na Figura 4.10 são apresentadas curvas de carga *versus* pH para ambos os analitos.

Figura 4.10. Curvas de carga *versus* pH para os ácidos salicílico e gentísico.

Pode-se observar que em pH 2,2, usado no experimento anterior, os analitos apresentam valor de carga efetiva entre 0,2 e 0,25.

Outro dado interessante de se avaliar é o $\log D$, que representa o coeficiente de partição octanol/água em função do pH. A Figura 4.11 apresenta os valores de $\log D$ calculados utilizando-se o software Pallas 3.1.1 (“demo version”).

Figura 4.11. Valores de $\log D$ em função do pH para os ácidos salicílico e gentísico.

Pode-se observar a partir da Figura 4.11 que a medida em que os valores de pH diminuem ocorre um aumento dos valores de $\log D$, reduzindo portanto a polaridade dos analitos.

Foi realizado outro experimento de eluição em que o valor de pH foi ajustado em 1,3. Os experimentos de eluição neste novo valor de pH mostraram que o volume de capacidade para ambos os ácidos utilizados foi maior que 300 mL. A utilização do cartucho contendo PV-DVB se justifica também, pois a fase C18 não é estável em pH menor que 3 [2].

De posse dos dados poderia ser elaborada a seguinte estratégia seqüencial: inicialmente a amostra é aplicada no cartucho PS-DVB sem ajuste do pH, o eluato (1) é recolhido e o pH do mesmo é ajustado em 1,3 utilizando-se HCl 37%. O cartucho então é eluído com solvente obtendo-se o *extrato 1*, lavado e recondicionado. O *eluato 1* com pH ajustado é reaplicado no cartucho sendo obtido o *eluato 2*. O cartucho é então novamente eluído obtendo-se o extrato (2); os dois extratos podem ser reunidos ou analisados independentemente. Esta estratégia implicaria num grande aumento de tempo no preparo da amostra. Os ácidos salicílico e gentísico são compostos presentes em diversos tipos de plantas, assim sendo, podem estar presentes em água superficial devido ao aporte de matéria de origem vegetal e não somente devido à metabolização do ácido acetil salicílico. Por conta destes fatos os estudos posteriores foram realizados com os 14 compostos restantes. Entretanto, como o volume de capacidade do ácido salicílico é aproximadamente 70 mL, em pH 7, espera-se que o mesmo seja detectado, porém deverá apresentar um valor reduzido de recuperação.

A necessidade do ajuste do pH em 1,3 apenas em uma etapa do procedimento de extração, (para extração dos ácidos salicílico e gentísico) se deve ao fato de que em valores baixos de pH ocorre a precipitação dos ácidos orgânicos comumente presentes em matrizes ambientais (ácidos húmicos e fúlvicos), e a presença destas substâncias durante a extração possivelmente provoca uma diminuição da eficiência da extração. Portanto, todos os outros analitos estudados (exceto os ácidos salicílico e gentísico) serão extraídos em valores de pH próximos a 7 (com menor influência de substâncias que possam interferir durante o processo de extração).

4.3.4. Determinação dos volumes de lavagem

Outra etapa igualmente importante em um procedimento de SPE é a determinação do solvente e volume de lavagem da fase de extração. Para se determinar qual o volume e qual a composição do solvente de lavagem alguns

critérios foram adotados: primeiramente, espera-se que um solvente de maior força eluotrópica possa remover um maior número de interferentes, com o menor volume possível. Assim sendo, passando-se por um cartucho de SPE uma mistura dos analitos, numa dada concentração, preparada em um solvente com uma determinada força, o volume máximo de lavagem será dado pelo máximo volume de solvente que pode ser eluído pelo cartucho, sem que os analitos possam ser detectados, ou seja, o volume máximo possível onde os analitos ainda fiquem retidos na fase de extração contida no cartucho.

Para isso foram realizados experimentos com todos os analitos de caráter ácido, básico e neutro no volume de 100 mL de água de torneira, na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os analitos foram percolados pela coluna de PS-DVB, previamente condicionada (consultar Procedimentos Experimentais) com auxílio de uma bomba de vácuo. Antecedendo a etapa de eluição, o cartucho foi submetido a uma solução de 10 mL contendo concentrações de 10, 20 e 30% de metanol, considerado um solvente polar, espera-se com isso que alguma destas concentrações seja suficiente para arrastar substâncias interferentes provenientes da matriz, sem remover os analitos da coluna. Os resultados obtidos nas três concentrações não indicaram a perda dos analitos do sorvente durante o processo de lavagem, ficando estabelecido que após a passagem da amostra pelo cartucho de extração, uma solução aquosa no volume de 10 mL contendo 30% de metanol será utilizada para remoção de impurezas que potencialmente estejam presentes na amostra.

4.3.5. Determinação do solvente de eluição

A escolha do solvente de eluição leva em consideração a toxicidade do solvente utilizado e sua volatilidade; logo, se busca utilizar um pequeno volume de solvente com baixa toxicidade e alta volatilidade, com o intuito de reduzir o tempo de secagem do eluato. Dentre os solventes comumente utilizados pode-se destacar o metanol, acetonitrila, acetona e diclorometano, os quais foram

avaliados neste experimento em diferentes volumes (3, 5, 7 e 9 mL). Dentre os solventes utilizados para o estudo, o que mostrou valores superiores de recuperação dos analitos foi o metanol, no volume de 5 mL.

4.3.6. Etapa de secagem da amostra

A etapa de secagem da amostra eluída pode ser a limitante do tempo de análise, pois comumente se utiliza um tubo de ensaio mantendo-se um fluxo de N_2 sobre a amostra que é aquecida, Figura 4.12.

Figura 4.12. Instrumentação para secagem de amostra.

Normalmente é utilizado um tubo com fundo cônico de modo que o resíduo seco se concentre numa pequena porção do tubo facilitando assim a redissolução em um volume reduzido de solvente. Esta etapa pode levar mais de uma hora até a secura total da amostra.

O seguinte procedimento alternativo foi desenvolvido: após a eluição dos analitos com um dado volume de solvente é adicionado sobre o mesmo, 500 μ L de uma solução aquosa contendo o padrão interno, o eluato assim preparado é transferido para um béquer e submetido a aquecimento sob um fluxo de N_2 constante. Devido à grande área superficial para evaporação, a amostra tem seu volume rapidamente reduzido. A presença da água permite que se retire a amostra antes da remoção de todo o solvente, pois nesse caso o volume não

precisa ser conhecido devido à presença do padrão interno nesta mistura. Utilizando-se este procedimento a amostra pode ser seca em cerca de 7 minutos.

4.3.7. Combinação das técnicas de concentração “on-line” e “off-line” para os compostos de caráter ácido, básico e neutro

Na Figura 4.13A é apresentado um eletroferograma de uma amostra preparada em uma amostra de água coletada na Represa Billings contendo 500 ng L⁻¹ das substâncias de caráter ácido, foram aplicados 100 mL da amostra em um cartucho de extração em fase sólida utilizando os parâmetros otimizados de extração. Na Figura 4.13B é apresentado um eletroferograma do branco de extração. Pode-se observar que foi possível identificar 7 dos oito analitos ácidos estudados. Conforme esperado o ácido gentísico não foi detectado devido à baixa retenção nas fases estudadas. O ácido salicílico foi detectado, pois foram aplicados 100 mL da amostra e conforme determinado seu volume de capacidade é da ordem de 70 mL. Foi detectado também um pico interferente, tanto na amostra quanto no branco. Este pico não foi identificado.

Figura 4.13. (A) Amostra de 100 mL de água enriquecida pela adição de 500 ng L⁻¹ das substâncias de caráter ácido: 1, diclofenaco; 2, bezafibrato; 3, ibuprofeno; 4, cetoprofeno; 5, fenoprofeno; 7, ácido salicílico; Procedimento de “stacking” no modo LVSS. **(B)** Amostra de 100 mL de água sem adição de padrões. A e B submetida à extração em fase sólida. Condições: eletrólito de corrida, 30 mmol L⁻¹ TBS, 5 mmol L⁻¹ Brij 35 (pH 9,3); injeção hidrodinâmica de 50 mbar durante 120 segundos, tensão de stacking -15 kV até corrente aproximada de 62 μ A, então foi aplicada inversão da polaridade e tensão de separação de 15 kV; comprimento do capilar 48,5 cm (efetivo 40 cm) e 75 μ m de diâmetro interno; temperatura 25 °C; comprimento de onda de detecção 200 nm.

Na Figura 4.14A é apresentado um eletroferograma em 230 nm, comprimento de onda máximo para o fármaco naproxeno. Pode-se observar que a relação sinal ruído é maior para este analito neste comprimento de onda, pois há uma redução do ruído concomitantemente a um aumento do sinal. O resultado é uma maior seletividade e detectabilidade.

Figura 4.14. (A) Amostra de 100 mL de água enriquecida pela adição de 500 ng L⁻¹ das substâncias de caráter ácido. **(B)** Amostra de 100 mL de água sem adição de padrões, ambas submetidas à extração em fase sólida. Condições de análises e parâmetros instrumentais consultar Figura 4.13. Comprimento de onda de detecção 230 nm.

Na Figura 4.15A é mostrado um eletroferograma para a determinação dos compostos de caráter básico e neutro (incluindo fármacos e hormônios) e na Figura 4.15B o eletroferograma de uma amostra considerada branco, ou seja, sem a adição dos analitos e submetida à etapa de extração em fase sólida.

Figura 4.15. (A) Amostra de 100 mL de água enriquecida pela adição de 500 ng L⁻¹ das substâncias de caráter básico e neutro: 1, fluoxetina; 2, fenofibrato; 3, propranolol; 4, estrona; 5, diazepam; 6, clofibrato; 7, etinilestradiol; 8, trimetoprima; 9, carbamazepina. **(B)** Amostra de 100 mL de água coletada na Represa Billings, sem adição de padrões submetida a extração em fase sólida. Condição: procedimento de “sweeping” no modo LVSS, e injeção hidrodinâmica de 50 mbar durante 220 segundos. Eletrólito de corrida 30 mmol L⁻¹ tampão fosfato, 40 mmol L⁻¹ de SDS, 0,1% TEA, 20% de acetonitrila; comprimento do capilar 48,5 cm (efetivo 40 cm) e 50 µm de diâmetro interno; temperatura 25 °C; comprimento de onda de detecção 200 nm.

4.3.8. Estudos de recuperação

4.3.8.1. Analitos de caráter ácido

A seguir a Tabela 4.1 mostra os resultados obtidos para os cálculos de recuperação dos analitos de caráter ácido. Os valores foram calculados pela comparação entre a área da amostra fortificada com os padrões diclofenaco, bezafibrato, ibuprofeno, cetoprofeno, fenoprofeno, ácido salicílico e ácido gentísico na concentração de 500 ng L⁻¹ submetida à extração (100 mL) e os valores de área obtidos de uma solução padrão na concentração de 0,1 µg mL⁻¹. Esta concentração corresponde ao produto do fator de enriquecimento (200) e a concentração adicionada (500 ng L⁻¹). O procedimento foi repetido três vezes.

Tabela 4.1. Valores das concentrações adicionadas e valores recuperados durante os experimentos de extração.

Analitos	Concentração adicionada (µg L ⁻¹)	Recuperação* (%)
Diclofenaco	500	69±7
Bezafibrato	500	73±7
Fenoprofeno	500	74±8
Ibuprofeno	500	78±5
Cetoprofeno	500	76±6
Naproxeno	500	88±6
Ác. gentísico	500	0
Ác. salicílico	500	58±6

*(n=3)

Os valores de recuperação para os analitos ácidos variou de 58 a 88 %, a menor recuperação, como já mencionado, é causada pelo baixo volume de capacidade para este analito, o ácido salicílico. A maior recuperação pode ser

explicada pela maior relação sinal /ruído para este analito. Estes valores são considerados aceitáveis para amostras ambientais.

4.3.8.2. Analitos de caráter básico e neutro

A recuperação para os analitos de caráter básico e neutro foi realizada de acordo com o procedimento anterior, entretanto foi adicionada à amostra de 100 mL de água da Represa Billings contendo os padrões fluoxetina, clofibrato, fenofibrato, propranolol, carbamazepina, trimetoprima, etinilestradiol, estrona e diazepam.

Os valores de recuperação as concentrações adicionadas à amostra estão na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Valores das concentrações adicionadas e valores recuperados durante os experimentos de extração

Analitos	Concentração adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação* (%)
Fluoxetina	500	68 ± 10
Clofibrato	500	78 ± 8
Fenofibrato	500	71 ± 9
Propranolol	500	73 ± 11
Carbamazepina	500	81 ± 4
Trimetoprima	500	78 ± 6
Etinilestradiol	500	74 ± 7
Estrona	500	80 ± 6
Diazepam	500	84 ± 4

*(n=3)

A faixa de recuperação para os compostos básicos variou de 68 a 84%. Os menores valores de recuperação para fluoxetina, fenofibrato e propranolol e maiores valores de CV(%) ocorreram devido a instabilidade da linha de base na região onde migram estes analitos, o que causa dificuldade de integração dos picos.

4.4. Considerações finais

Este capítulo abordou o estudo de desenvolvimento de um método de preparo de amostra envolvendo a técnica de extração em fase sólida, e com isso foi possível avaliar parâmetros físico-químicos do processo de extração aplicados a pré-concentração de analitos de caráter ácido, básico e neutro em amostras de água. Foi possível a detecção de uma concentração aproximada de 500 ng L⁻¹ destas substâncias em amostras de água, associando as técnicas extração em fase sólida e enriquecimento em linha utilizando eletroforese capilar. Os valores de recuperação foram favoráveis considerando a natureza da amostra e a presença de substâncias oriundas do aporte de matéria orgânica proveniente da região da coleta.

4.5. Referências bibliográficas

[1] POMPE, S. HEISE, K. H., NITSCHKE, H. Capillary electrophoresis for a “fingerprint” characterization of fulvic and humic acids. **Journal of Chromatography A**, v. 723, n. 1, p. 215-218, feb. 1996.

[2] **Polymeric sorbents for sample preparation.** Disponível em: <www.phenomenex.com>. Acesso em outubro de 2007.

5.1. Introdução

Os p-hidroxibenzoatos de alquila (Figura 5.1), comumente nomeados parabenos, são ésteres derivados do ácido p-hidroxibenzóico, amplamente utilizados como conservantes antimicrobianos, por demonstrarem atividade inibitória frente a fungos e leveduras, sendo empregados em produtos com finalidade cosmética, farmacêutica e alimentícia [1].

Figura 5.1. Estrutura da série homóloga dos p-hidroxibenzoato de alquila.

Os parabenos são utilizados há mais de 50 anos, atualmente estima-se que estão presentes em mais de 13200 formulações, individualmente ou em associações. Os parabenos são empregados em diversos produtos utilizados rotineiramente, como hidratantes, cremes dentais, sabonetes, desodorantes e xampus [2,3] na concentração de até 0,4%, conforme estabelecido pela Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000 da ANVISA [4].

Estudos “in vitro” sugerem que os parabenos exibem atividade estrogênica [5], sendo esta dependente da sua estrutura [6], resultando em um provável desenvolvimento de linhagens celulares de adenocarcinoma de mama; outros estudos evidenciam que os parabenos influenciam na expressão de genes estrogênio-dependente [7,8]. Estudos “in vivo”, utilizando roedores, sugerem o aumento do peso do útero após exposição aos parabenos do tipo butílico, isobutílico e benzílico [8]. Roedores masculinos demonstraram diminuição do

nível de excreção da testosterona e, alguns, redução do aparelho reprodutor após exposição ao butil e propilparabenos [9], não sendo observados os mesmos efeitos para exposição ao metil e etil parabenos [10].

A determinação dos parabenos no ambiente aquático tem sido alvo de alguns estudos apresentados na literatura, e o monitoramento destas substâncias desperta um crescente interesse devido aos seus efeitos ainda pouco conhecidos [11-13].

Considerando a necessidade de estudos para comprovação da segurança dos parabenos e sua ampla aplicabilidade, é imprescindível o desenvolvimento de técnicas analíticas rápidas e robustas visando a quantificação dos parabenos em amostras de origem ambiental.

A eletroforese capilar mostra-se uma ferramenta analítica apropriada à análise dos parabenos em diferentes matrizes, pois associa alta eficiência, baixo custo por análise e consumo mínimo de amostras, reagentes e solventes. Este estudo tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de parabenos que seja rápida, sensível e eficiente, associando estratégias de enriquecimento “off line” e “on line” para o aumento da detectabilidade do método.

5.2. Procedimentos experimentais

5.2.1 Equipamentos e parâmetros instrumentais

Desenvolvimento do método de análise e “stacking”: os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos e “software” (HP ChemStation, rev A.06.01) para tratamento e aquisição de dados. O aparelho possui sistema de refrigeração do capilar por circulação de ar, e a temperatura foi mantida constante. Foram utilizados capilares de sílica fundida (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, E.U.A.),

revestidos externamente com poli-imida, de 50 e 75 μm de diâmetro interno, com 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector ou 32 cm e 23,5 cm até o detector.

Determinação da mobilidade efetiva: os experimentos para determinação da mobilidade efetiva dos p-hidróxibenzoatos de alquila foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar modelo P/ACE MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA, E.U.A.). O capilar utilizado foi de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) com 60,2 cm de comprimento total, 50 cm até o detector e 50 μm de diâmetro interno.

Condicionamento dos capilares: as lavagens de condicionamento inicial do capilar, foram realizadas diariamente com 15 minutos de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹, seguidos de 15 minutos de água desionizada e 30 minutos de eletrólito de corrida. No intervalo entre as corridas o capilar foi reconicionado com lavagens de 2 minutos de eletrólito e no término das análises 15 min de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ e 15 minutos de água desionizada para a limpeza do capilar.

5.2.2. Reagentes e soluções

Água desionizada (Milli-Q, Millipore, Milford, MA, E.U.A.) foi utilizada para o preparo de todas as soluções utilizadas. Solventes metanol, acetona, diclorometano, acetato de etila e acetonitrila foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Todos os reagentes utilizados foram grau analítico. Padrões de butil, propil, etil e metilparabeno e ácido cinâmico foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, WI, E.U.A.). Soluções padrão estoque foram preparadas em metanol com concentração aproximada de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e armazenadas sob refrigeração (4 °C). Foram preparadas semanalmente soluções estoque de tampão glicina (Fluka, São Paulo, SP, Brasil), trietilamina (TEA) (Tédia, Rio de

Janeiro, RJ, Brasil) e ácido 2-hidroxi-isobutírico (HIBA) nas concentrações de 100 mmol L⁻¹. Os eletrólitos utilizados nas análises foram preparados diariamente.

5.2.3. Amostras

Para a otimização do método de SPE foram utilizadas alíquotas de 100 mL de amostras de água de torneira, fortificada com os padrões em concentrações apropriadas. O método de extração otimizado foi aplicado em alíquotas de 100 mL de amostras de água coletadas na Represa Billings, localizada na região metropolitana de São Paulo. As amostras foram coletadas com profundidade de 50 cm da superfície, no período da manhã, em recipientes de vidro âmbar, e levadas imediatamente ao laboratório, filtradas e armazenadas sob refrigeração (4 °C) ao abrigo da luz. As amostras coletadas apresentavam pH que variou de 6,8 a 7,2, e estas foram analisadas no prazo máximo de 72 horas após a coleta.

5.2.4. Metodologias

Determinação da mobilidade efetiva: o eletrólito de corrida utilizado para determinação das mobilidades foi constituído por 15 mmol L⁻¹ de TEA e 9,6 mmol L⁻¹ de HIBA, pH 10,59, com força iônica de 10,04. Entre as corridas o capilar foi recondicionado com o eletrólito de corrida durante 2 minutos. O potencial aplicado, V_{prog} , foi 10 kV, polaridade positiva e o tempo de separação, t_{migr} , foi de 4 minutos. A rampa de voltagem aplicada no início e no final das corridas foi de 0,2 minuto. O seguimento termostatizado do capilar foi mantido a 25 °C e o tempo de injeção, t_{inj} , foi de 5 segundos.

Injeção convencional: o eletrólito de corrida utilizado para separação simultânea dos parabenos foi constituído por 40 mmol L⁻¹ de glicina e 40 mmol L⁻¹ de TEA; tensão de separação aplicada de 30 kV, com polaridade positiva. Amostras e padrões foram injetados hidrodinamicamente com pressão de 50 mbar durante 3 segundos e a detecção monitorada em 297 nm.

“Stacking”: o eletrólito de corrida utilizado para o “stacking” dos parabenos foi constituído por 40 mmol L⁻¹ de glicina e 40 mmol L⁻¹ de TEA; injeção hidrodinâmica com pressão de 50 mbar durante 200 segundos e tensão de separação aplicada de 30 kV; a polaridade foi mantida no modo positivo até o alcance de aproximadamente 95% da corrente normal com eletrólito de corrida e logo a polaridade foi invertida para o modo negativo; a aquisição dos dados foi monitorada em 297 nm.

Procedimento de extração em fase sólida: foram utilizados cartuchos de SPE de 6 mL tipo seringa contendo 500 mg de fase polimérica poliestireno-divinilbenzeno (Phenomenex, Torrance, CA, E.U.A.), as etapas do procedimento de extração serão detalhadas a seguir.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Desenvolvimento do método com injeção convencional

Um método desenvolvido por eletroforese capilar em solução livre deve satisfazer as seguintes condições: i) o co-íon do eletrólito de corrida (componente do eletrólito de corrida com a mesma carga do analito) deve ser escolhido de modo a minimizar os efeitos de dispersão por eletromigração (EMD); ii) o eletrólito otimizado deve apresentar boa capacidade tamponante; iii) as diferenças de mobilidade efetiva devem ser suficientes para uma boa resolução entre os analitos; iv) para a obtenção de um método rápido deve-se aplicar um alto campo elétrico [14,15].

A partir dos valores de pK_a e μ_i (mobilidade iônica) pode-se construir curvas de mobilidade efetiva para os analitos e para os componentes do eletrólito de corrida. A utilização das curvas de mobilidade efetiva *versus* pH auxilia na escolha do co-íon do eletrólito de corrida, escolha do padrão interno, inspeção dos possíveis interferentes e determinação do modo de operação (contra ou co-eletrosmótico).

Os fenômenos de EMD para eletrólitos fortes podem ser descritos por modelos que se baseiam principalmente na diferença de mobilidade efetiva entre o analito e seu co-íon no eletrólito de corrida [16]. Outro fenômeno que também deve ser evitado em eletroforese capilar é a formação de “system zones” (também chamados picos de sistema) [16] próximos ou coincidentes com a zona da amostra, fenômeno esse que pode ser prejudicial à separação [17]. Via de regra, um eletrólito formado por múltiplos co-íons apresenta $n-1$ picos de sistema sendo n o número de co-íons que constituem o eletrólito. Os picos de sistema existem tanto no modo de detecção direta quanto indireta. A diferença é que quando um cromóforo é utilizado esses picos podem ser visualizados, enquanto que em detecção direta a visualização destes picos não é possível, mas quando um destes picos migra próximo a um analito de interesse, a zona desse analito é comprometida. Esse fenômeno explica porque várias vezes um analito apresenta um perfil muito discrepante com o esperado (desconsiderando efeitos de adsorção e complexação que podem ocorrer) [18-20].

5.3.1.1. Aumento da velocidade de separação

Para a obtenção de métodos rápidos em eletroforese capilar é necessário que se utilize um valor elevado de campo elétrico através da aplicação de um valor elevado de tensão em um capilar de comprimento pequeno. Para que se possam utilizar valores altos de campo elétrico, os valores de corrente elétrica obtidos não podem ser muito elevados de modo a minimizar o efeito Joule.

5.3.1.2. Determinação da mobilidade iônica dos parabenos

Para a construção das curvas de mobilidade efetiva *versus* pH para os parabenos, é necessário conhecer os valores de pK_a e mobilidade iônica, μ_{0,A^-} . Os valores de pK_a estão disponíveis na literatura, entretanto os valores de mobilidade iônica não. Sendo assim, foi realizado um procedimento para a

determinação dos valores de mobilidade iônica dos compostos butil, propil, etil e metilparabeno.

A expressão que relaciona a mobilidade real μ_{act,A^-} com a mobilidade efetiva (μ_{eff}) é representada na Equação 5.1. A mobilidade real é a mobilidade da espécie iônica totalmente dissociada numa dada temperatura e força iônica [21].

$$\mu_{eff,A^-} = \frac{\mu_{act,A^-}}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

(5.1)

Se o valor de $pH \gg pK_a$, Equação 4.2.

$$\mu_{eff,A^-} \cong \mu_{act,A^-}$$

(5.2)

A partir da Equação 5.2 é possível observar que em valores de pH muito acima do valor de pK_a ($\cong 2$ unidades maior), o valor da mobilidade efetiva se aproxima do valor da mobilidade real.

A partir do valor da mobilidade real pode-se obter o valor da mobilidade iônica numa dada temperatura a partir da Equação 5.3 [22].

$$\mu_{act,A^-} = \mu_{0,A^-} - \left[\frac{159,36}{\epsilon_r^{3/2}} \mu_{0,A^-} + \frac{0,2476 \times 10^{-5}}{\eta \epsilon_r^{1/2}} \right] \sqrt{I}$$

(5.3)

Onde μ_{0,A^-} é a mobilidade iônica de A^- . Em água a uma temperatura de 25 °C: $\varepsilon_r = 78,54$; $\eta = 0,890 \times 10^{-3} \text{ Pa s}$ [23]; I é a força iônica do eletrólito de corrida.

Para a determinação do valor da mobilidade efetiva dos parabenos, num valor de $\text{pH} \gg \text{pK}_a$, para um eletrólito univalente de força iônica igual a 10 mmol L⁻¹, foi utilizado o procedimento desenvolvido por Willians e Vigh [24].

5.3.1.3. Determinação da mobilidade efetiva dos parabenos

Existem inúmeros fatores que influenciam na precisão das medidas de mobilidade efetiva em eletroforese capilar. Enquanto μ_{eff} é constante em um dado eletrólito de corrida, μ_{eo} (e conseqüentemente μ_{obs}) pode variar a cada corrida eletroforética. Quando o marcador neutro – substância com carga zero, que migra na mesma velocidade do fluxo eletrosmótico – migra mais rapidamente que os analitos de interesse, qualquer mudança que ocorra no fluxo eletrosmótico após a passagem do marcador neutro pela janela de detecção não será registrada. Assim como, quando o analito migra e passa pelo detector antes do marcador neutro, o mesmo não sofrerá os mesmos efeitos que o fluxo eletrosmótico poderá passar. Portanto, haverá desvios nos valores calculados de μ_{eff} . Outros fatores que influenciam na determinação da mobilidade é o tipo de cartucho – acessório utilizado para o armazenamento do capilar nos diferentes equipamentos de eletroforese capilar – alguns possuem controle de temperatura através da passagem de um líquido refrigerante, outros por ar forçado e ainda existem equipamentos construídos em laboratórios, que não possuem qualquer sistema de controle de temperatura. Portanto, a velocidade eletroforética de um determinado analito em uma região não termostatizada será diferente de uma região termostatizada. Estes fatores resultam em duas situações: i) a μ_{eff} vai variar quando a temperatura ambiente sofrer alterações entre as corridas; ii) quando o tamanho do capilar for alterado, a μ_{eff} será diferente, pois a porcentagem da região não termostatizada passará a ser outra.

Williams e Vigh [24] desenvolveram uma metodologia rápida e precisa capaz de determinar a mobilidade efetiva de analitos tanto de caráter aniônico quanto catiônico em uma única corrida eletroforética, independente da magnitude ou direção do fluxo eletrosmótico, eliminando as dificuldades citadas anteriormente que envolvem esse processo.

5.3.1.3.1. Determinação rápida de μ_{eff} para analitos aniônicos

A Figura 5.2 mostra a seqüência de etapas envolvidas na determinação de μ_{eff} para um dado analito aniônico. Primeiramente (etapa A) a amostra, que contém um marcador neutro e o ânion ($\text{N1} + \text{A}$) dissolvido no eletrólito de corrida, é injetada no capilar, previamente preenchido somente com o eletrólito de corrida. Na etapa B, a banda da amostra é transferida para o seguimento termostaticado do capilar através da aplicação de pressão por um determinado espaço de tempo, t_{tr} , sobre o recipiente contendo apenas o eletrólito de corrida. Na próxima etapa, C, a tensão de separação é aplicada, V_{prog} , durante o tempo t_{migr} , neste momento, o fluxo eletrosmótico (através da presença de um marcador neutro) se move em direção ao catodo com uma mobilidade μ_{eo} , enquanto que o ânion é levado pelo fluxo também em direção ao pólo de carga negativa. Após esta etapa, o potencial, V_{prog} , retorna a zero (etapa D) e uma solução contendo apenas um marcador neutro (N2) é injetada durante um determinado tempo, t_{inj} , para o interior do capilar. Finalmente, na etapa E, a injeção por pressão é aplicada novamente no recipiente contendo apenas o eletrólito de corrida e a aquisição dos dados inicia simultaneamente, sendo que a passagem das três bandas é registrada pelo detector. Esquemáticamente o registro das três bandas é ilustrado na Figura 5.2.

Figura 5.2. Etapas envolvidas na determinação de μ_{eff} .

A seguir, na Fig. 5.3, é demonstrado por meio de uma representação esquemática o sinal gerado após a realização de todas as etapas envolvidas na Figura 5.2.

Figura 5.3. Representação esquemática do registro de um eletroferograma resultante do método para determinação de μ_{eff} de um ânion.

Para analitos de caráter aniônico, a Equação utilizada para o cálculo de μ_{eff} é apresentada a seguir, Equação 5.4:

$$\mu_{\text{eff}}^{\text{A}} = \frac{L_{\text{A}} L_{\text{t}}}{V_{\text{prog}} (t_{\text{migr}} - t_{\text{ramp-up}}/2 - t_{\text{ramp-down}}/2)} \quad (5.4)$$

onde, L_{A} é a distância entre as bandas (calculada através da Equação 5.5); L_{t} é o comprimento total do capilar; V_{prog} a tensão de separação aplicada; t_{migr} o tempo em que a tensão foi aplicada; $t_{\text{ramp-up}}$ e $t_{\text{ramp-down}}$, é o tempo em que a tensão (V_{prog}) aplicada leva para alcançar linearmente o valor estabelecido para a corrida, e o tempo em que a mesma retorna a zero, respectivamente.

$$L_{\text{A}} = (t_{\text{A}} - t_{\text{N}_1}) v_{\text{m}} \quad (5.5)$$

Onde t_A é o tempo de migração do ânion A; t_{N1} é o tempo de migração do marcador neutro injetado a partir de uma solução contendo analito e marcador neutro, e v_m é a velocidade de mobilização por pressão, calculada a partir da equação 5.6:

$$v_m = \frac{L_d}{t_{N_2} + t_{inj}/2 - t_d} \quad (5.6)$$

onde L_d é a distância percorrida pelo ânion até o detector; t_{N2} é o tempo utilizado para empurrar N2 até sua passagem pelo detector; o termo t_{inj} é o tempo de injeção da solução contendo o ânion e o marcador neutro; e t_d é o tempo de resposta do equipamento para o início da operação.

5.3.1.3.2. Parâmetros para determinação de μ_{eff}

Na Figura 5.4 é apresentado um eletroferograma obtido exemplificando a resposta do equipamento ao procedimento de Williams e Vigh [24], para determinação da mobilidade efetiva do butilparabeno. A seguir, a Tabela 5.1 compila os dados utilizados para a determinação da mobilidade efetiva dos parabenos.

Figura 5.4. Exemplo de um eletroferograma do conservante butilparabeno durante a determinação de mobilidade efetiva.

Tabela 5.1. Parâmetros utilizados para determinação da mobilidade efetiva dos parabenos.

	MP	EP	PP	BP
t_{N1} (min)	3,092	2,933	2,921	2,947
t_{N2} (min)	7,79	7,683	7,579	7,629
t_A (min)	4,56	4,279	4,162	4,142
L_d (cm)	50	50	50	50
t_{inj} (s)	5	5	5	5
t_d (s)	3	3	3	3
L_a (cm)	9,43	8,77	8,2	7,84
V_m (cm s ⁻¹)	0,11	0,11	0,11	0,11
L_t (cm)	60,2	60,2	60,2	60,2
V_{prog} (kV)	10	10	10	10
t_{migr} (min)	4	4	4	4
$t_{ramp-up}$ (min)	0,2	0,2	0,2	0,2
$t_{ramp-down}$ (min)	0	0	0	0
μ_{eff} (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	$2,34 \times 10^{-4}$	$2,26 \times 10^{-4}$	$2,11 \times 10^{-4}$	$2,02 \times 10^{-4}$

Segundo a Equação 5.1, os dados de mobilidade efetiva no pH 10,59 convergem para valores de mobilidade real. Utilizando-se, portanto, os valores de mobilidade real na Equação 5.2 foi possível obter os valores de mobilidade iônica. Os valores de pKa, obtidos na literatura [25] e μ_{0,A^-} calculados são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Dados de mobilidade iônica e pKa para os parabenos

Analito	pKa	Mobilidade iônica (x 10 ⁻⁵ cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)
Metilparabeno	8,27	-28,05
Etilparabeno	8,29	-26,3
Propilparabeno	8,3	-24,8
Butilparabeno	8,32	-23,8

A partir dos dados da Tabela 5.2 é possível a construção de curvas de mobilidade efetiva *versus* pH para os analitos estudados. O gráfico com estes resultados foi construído e é apresentado na Figura 5.5, contendo o tampão glicina juntamente com os parabenos.

Figura 5.5. Curva de mobilidade *versus* pH para os parabenos e glicina.

Observa-se que, em pH maior que 8,5 ocorrerá a separação dos parabenos, entretanto é interessante utilizar um pH maior que 10, pois os mesmos estarão próximos de sua completa dissociação, o que aumenta a robustez do método, uma vez que, pequenas variações de pH não acarretam em grandes variações de mobilidade. Foi escolhida a glicina como co-íon do eletrólito de corrida por apresentar mobilidade efetiva próxima à mobilidade efetiva dos analitos, reduzindo com isso os valores de dispersão por eletromigração (EMD, “electromigration dispersion”).

É possível observar a partir das curvas de mobilidade, que a glicina atuará também como tampão em valores de pH próximos ao seu pK_a (9,78). E, o contra-íon escolhido para o eletrólito de corrida foi o TEA, pois esse composto apresenta pK_a 10,86. Com isso, é esperado um aumento da capacidade tamponante na faixa de pH determinada.

Depois de escolhidos os componentes do eletrólito de corrida foi utilizado o “software” Peakmaster, um simulador em eletroforese capilar no modo solução livre. Esta ferramenta muito útil na simulação de separações foi desenvolvida por Bob Bohuslav Gas (Charles University, Prague, Czech Republic) [26-28]. A partir dos dados obtidos no “software” Peakmaster foi possível determinar as concentrações do eletrólito de corrida a serem utilizadas.

Utilizando-se um valor fixo de 40 mmol L⁻¹ de glicina, e através da variação da concentração de TEA (3 - 60 mmol L⁻¹) construiu-se o gráfico apresentado na Figura 5.6.

Figura 5.6. Curvas construídas utilizando o “software” Peakmaster para otimização da composição do eletrólito de corrida. Os valores foram simulados para cada analito em relação aos seguintes parâmetros: mobilidade efetiva; capacidade tamponante; condutividade; pH; e EMD. As legendas estão na Figura.

O gráfico da Figura 5.6 apresenta os valores atribuídos para mobilidade efetiva, EMD, condutividade, capacidade tamponante e pH para cada concentração simulada. O “software” Peakmaster corrige efeitos de força iônica, resultando em simulações muito semelhantes aos resultados obtidos experimentalmente.

Foi estabelecido, através dos experimentos simulados, como condição favorável à separação, um eletrólito constituído de 40 mmol L⁻¹ de glicina e 40 mmol L⁻¹ de TEA. Nessa condição, as diferenças de mobilidade efetiva permitem a separação dos analitos, os valores de EMD são reduzidos, a capacidade tamponante é alta e o valor da condutividade permite a aplicação de um campo

elétrico elevado, para a obtenção de um método rápido. O eletrólito de corrida e as demais condições de análise foram avaliadas através da simulação dos experimentos com o objetivo de alcançar a melhor separação e resolução entre os analitos estudados, em um curto espaço de tempo, levando em consideração a capacidade tamponante e valores baixos de EMD.

5.3.1.4. Escolha do padrão interno

A utilização de um padrão interno melhora substancialmente a precisão dos resultados, minimizando possíveis erros de injeção do equipamento [29].

Para a separação dos conservantes butil, propil, etil e metilparabeno, o ideal é que o padrão interno possua uma mobilidade intermediária ou muito próxima as mobilidades dos analitos, sendo assim, foi possível verificar que o ácido cinâmico satisfaz a segunda condição. O ácido cinâmico foi escolhido como padrão interno, pois além de apresentar mobilidade próxima à dos analitos, também possui características semelhantes aos mesmos.

Na Figura 5.7(A) é apresentado um eletroferograma experimental, obtido utilizando-se um capilar de 48,5 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento até o detector, tensão de 30 kV, injeção de 50 mbar durante 3 s, temperatura de 25 °C, e detecção em 297 nm. Na Figura 5.7(B) é apresentado um eletroferograma simulado utilizando-se o “software” Peakmaster, nas mesmas condições do procedimento experimental realizado.

Figura 5.7. (A) Eletroferograma obtido experimentalmente a partir de uma mistura de padrões de butilparabeno (BP), propilparabeno (PB), etilparabeno (EP) e metilparabeno (MP) e ácido cinâmico (PI), na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ dissolvidos em água; injeção hidrodinâmica, 50 mbar durante 3 segundos; com tensão aplicada de 30 kV, polaridade positiva; capilar 48,5 cm comprimento total, 40 cm comprimento efetivo; detecção em 297 nm. **(B)** Eletroferograma simulado e obtido através do “software” Peakmaster. Eletrólito de corrida para ambas as condições A e B constituído de 40 mmol L^{-1} de glicina e 40 mmol L^{-1} de TEA.

Os resultados demonstraram uma boa correlação entre os dados simulados e os dados obtidos experimentalmente. A maior eficiência dos picos do eletroferograma experimental provavelmente se deve a um fenômeno de “stacking”, esse fenômeno não levado em consideração para a obtenção do eletroferograma simulado.

5.3.2. Avaliação do método desenvolvido

A fim de avaliar a metodologia proposta para a análise dos parabenos foram determinados alguns parâmetros importantes: número de pratos; simetria; resolução; precisão instrumental; precisão intra e inter-ensaio; linearidade; limite de detecção e quantificação. Os resultados estão apresentados nas Tabela 5.3 a 5.6.

Tabela 5.3. Parâmetros de desempenho do método avaliados para a substância butilparabeno

Parâmetro		Valor
Número de pratos (N/m)		93057
Simetria do pico		1,99
Resolução (butilparabeno, propilparabeno)		1,12
Precisão instrumental (CV%); área corrigida	n = 6	0,99
Precisão instrumental (CV%); tempo de migração	n = 6	0,64
Precisão intra-ensaio (CV%); tempo de migração	n = 6	2,44
Precisão intra-ensaio (CV%); área corrigida	n = 6	3,21
Precisão inter-ensaio (CV%); tempo de migração	n = 6	5,67
Precisão inter-ensaio (CV%); área corrigida	n = 6	4,55
Linearidade - inclinação		0,1453
Desvio padrão da inclinação		0,0081
Linearidade - intercepto		-0,0065
Desvio padrão do intercepto		0,0345
Linearidade - coeficiente de correlação		0,9999
F		1314
LOQ (mg L ⁻¹)*		2,12
LOD (mg L ⁻¹)*		0,64

Faixa de concentração 1 – 12 µg mL⁻¹, seis níveis, n=3; *limite de quantificação e detecção (cálculo baseado na curva analítica).

Tabela 5.4. Parâmetros de desempenho do método avaliados para a substância propilparabeno

Parâmetro		Valor
Número de pratos (N/m)		34507
Simetria do pico		1,99
Resolução (propilparabeno, etilparabeno)		1,12
Precisão instrumental (CV%); área corrigida	n = 6	0,99
Precisão instrumental (CV%); tempo de migração	n = 6	0,33
Precisão intra-ensaio (CV%); tempo de migração	n = 6	1,98
Precisão intra-ensaio (CV%); área corrigida	n = 6	2,51
Precisão inter-ensaio (CV%); tempo de migração	n = 6	4,88
Precisão inter-ensaio (CV%); área corrigida	n = 6	4,12
Linearidade - inclinação		0,1651
Desvio padrão da inclinação		0,0012
Linearidade - intercepto		-0,0648
Desvio padrão do intercepto		0,0333
Linearidade - coeficiente de correlação		0,9999
F		1282
LOQ (mg L ⁻¹)*		2,23
LOD (mg L ⁻¹)*		0,67

Faixa de concentração 1 – 12 µg mL⁻¹, seis níveis, n=3; *limite de quantificação e detecção (cálculo baseado na curva analítica).

Tabela 5.5. Parâmetros de desempenho do método avaliados para a substância etilparabeno

Parâmetro		Valor
Número de pratos (N/m)		70858
Simetria do pico		1,88
Resolução (etilparabeno, metilparabeno)		2,59
Precisão instrumental (CV%); área corrigida	n = 6	0,79
Precisão instrumental (CV%); tempo de migração	n = 6	0,98
Precisão intra-ensaio (CV%); tempo de migração	n = 6	3,39
Precisão intra-ensaio (CV%); área corrigida	n = 6	6,11
Precisão inter-ensaio (CV%); tempo de migração	n = 6	2,45
Precisão inter-ensaio (CV%); área corrigida	n = 6	2,9
Linearidade - inclinação		0,1845
Desvio padrão da inclinação		0,0026
Linearidade - intercepto		-0,0766
Desvio padrão do intercepto		0,0391
Linearidade - coeficiente de correlação		0,9999
F		1291
LOQ (mg L ⁻¹)*		2,06
LOD (mg L ⁻¹)*		0,62

Faixa de concentração 1 – 12 µg mL⁻¹, seis níveis, n=3; *limite de quantificação e detecção (cálculo baseado na curva analítica).

Tabela 5.6. Parâmetros de desempenho do método avaliados para a substância metilparabeno

Parâmetro		Valor
Número de pratos (N/m)		73692
Simetria do pico		1,8
Resolução (metilparabeno, PI)		2,78
Precisão instrumental (CV%); área corrigida	n = 6	1,78
Precisão instrumental (CV%); tempo de migração	n = 6	1,21
Precisão intra-ensaio (CV%); tempo de migração	n = 6	3,12
Precisão intra-ensaio (CV%); área corrigida	n = 6	2,91
Precisão inter-ensaio (CV%); tempo de migração	n = 6	5,22
Precisão inter-ensaio (CV%); área corrigida	n = 6	7,87
Linearidade - inclinação		0,2012
Desvio padrão da inclinação		0,0111
Linearidade - intercepto		-0,0934
Desvio padrão do intercepto		0,0434
Linearidade - coeficiente de correlação		0,9999
F		1126
LOQ (mg L ⁻¹)*		2,2
LOD (mg L ⁻¹)*		0,66

Faixa de concentração 1 – 12 µg mL⁻¹, seis níveis, n=3; *limite de quantificação e detecção (cálculo baseado na curva analítica).

As curvas de calibração foram construídas nas faixas de concentração que variou de 1 a 12 µg mL⁻¹ para cada substância, com o padrão interno ácido cinâmico na concentração de 20 µg mL⁻¹. Foi considerada a razão entre o analito e o padrão interno. Os valores de LOQ e LOD do método foram estimados pelo procedimento baseado em parâmetros da curva analítica [30]:

As curvas de regressão apresentaram bons coeficientes de correlação para todos os analitos, F (significância da regressão) elevados e valores de erros de regressão baixos, os gráficos de resíduos não apresentaram tendências, ou seja, os resíduos estão distribuídos aleatoriamente ao redor de zero (não mostrado).

5.3.3. Estratégias empregadas para o aumento da detectabilidade do método

As baixas concentrações dos parabenos ($\mu\text{g L}^{-1}$, ng L^{-1} e pg L^{-1}) encontradas no ambiente aquático, associados a matrizes complexas (efluentes e afluentes de ETEs, águas superficiais e sedimentos) exigem uma especial atenção ao procedimento analítico a ser empregado. Com isso, o grande desafio analítico é o desenvolvimento de metodologias capazes de determinar concentrações traços, em matrizes ambientais de alta complexidade. A seguir serão avaliados dois tipos de estratégias de enriquecimento, estudos de pré-concentração “off-line” – utilizando extração em fase sólida – e “on line”, com o desenvolvimento de um método de “stacking” baseado em eletroforese capilar.

5.3.3.1. Extração em fase sólida

5.3.3.1.1. Escolha da fase de extração

Os experimentos realizados para a escolha da fase de extração foram conduzidos da seguinte forma: o volume de 1 mL de uma solução aquosa contendo butil, propil, etil e metilparabeno na concentração aproximada de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados em dois recipientes, um contendo 20,3 mg da fase C18 e outro contendo 21,2 mg da fase poliestireno divinilbenzeno (PS-DVB) e submetidos à agitação durante 24 horas. Após esse período, a mistura foi centrifugada durante 15 minutos (3000 rpm) e o sobrenadante injetado no equipamento de eletroforese capilar.

A Figura 5.8 apresenta o eletroferograma da solução antes de ser adicionada às fases sob avaliação. A Figura 5.9 mostra o eletroferograma obtido a partir da solução adicionada à fase PS-DVB. Enquanto que, a Figura 5.10, o resultado obtido a partir da solução adicionada à fase C18.

Figura 5.8. Eletroferograma de uma mistura de padrões de BP (butilparabeno), PB (propilparabeno), EP (etilparabeno), MP (metilparabeno). À solução foi adicionado ácido cinâmico (PI), na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições analíticas: eletrólito contendo 40 mmol L^{-1} de glicina e 40 mmol L^{-1} de TEA; injeção hidrodinâmica, 50 mbar durante 3 segundos; tensão aplicada de 30 kV, polaridade positiva; capilar de 32 cm de comprimento total, 23,5 cm comprimento efetivo; detecção em 297 nm.

Figura 5.9. Eletroferograma de uma mistura de padrões de BP, PB, EP, MP na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ adicionados à fase PS-DVB. À solução foi adicionado

ácido cinâmico (PI), na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições analíticas: eletrólito contendo 40 mmol L^{-1} de glicina e 40 mmol L^{-1} de TEA; injeção hidrodinâmica, 50 mbar durante 3 segundos; tensão aplicada de 30 kV, polaridade positiva; capilar de 32 cm de comprimento total, 23,5 cm comprimento efetivo; detecção em 297 nm.

Figura 5.10. Eletroferograma de uma mistura de padrões de BP, PB, EP, MP na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ adicionados à fase C18. À solução foi adicionado ácido cinâmico (PI), na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições analíticas: eletrólito contendo 40 mmol L^{-1} de glicina e 40 mmol L^{-1} de TEA; injeção hidrodinâmica, 50 mbar durante 3 segundos; tensão aplicada de 30 kV, polaridade positiva; capilar de 32 cm de comprimento total, 23,5 cm comprimento efetivo; detecção em 297 nm.

É possível observar a presença dos analitos no sobrenadante resultante do experimento utilizando a fase C18, o que sugere que a fase de extração mais apropriada para a extração destes compostos é PS-DVB, capaz de reter completamente os analitos na concentração utilizada.

5.3.3.1.2. Determinação do coeficiente de distribuição sólido /líquido

Os valores de coeficiente de distribuição sólido/líquido (K_s) entre as fases aquosa e estacionária foram determinados para as duas fases de extração, C18 e

PS-DVB. A partir da razão da área do analito e do padrão interno, antes e depois de transcorridas as 24 horas, foi possível determinar o valor da constante K_s a partir da Equação 5.7:

$$K_s = \frac{[FE_s]}{[FM_s]}$$

(5.7)

onde $[FM_s]$ é a concentração de analito massa/massa (m/m) presente na fase móvel e $[FE_s]$ é a concentração de analito m/m contida na fase estacionária. Quanto maior o valor de K_s , maior o tempo de permanência do soluto na fase estacionária. A Tabela 5.7 apresenta os valores de K_s obtidos para os parabenos em cada fase estudada.

Tabela 5.7. Valores de K_s para os parabenos utilizando a fase de extração PS-DVB e C18.

Analito	K_s (PS-DVB)	K_s (C18)
MP	>2450	820
EP	>2450	1560
PP	>2450	2150
BP	>2450	2425

Os padrões contidos na solução adicionada à fase estacionária PS-DVB não foram detectados após 24 horas. Levando em consideração os valores obtidos para o LOD de 0,2 mg L⁻¹ para as substâncias estudadas, é possível afirmar que um valor menor que o LOD permaneceu na solução, resultando um valor de $K_s > 2450$. Os valores de K_s para a fase C18 foram menores, o que indica retenção menor dos analitos nesta fase de extração. É possível concluir inicialmente que, devido aos maiores valores de coeficiente de partição obtidos, a fase escolhida para a extração dos parabenos foi PS-DVB.

5.3.3.1.3. Determinação do volume morto da coluna e razão entre as fases sólida e líquida

O volume morto (V_M) da coluna é o espaço não preenchido pela fase estacionária na coluna, e pode ser obtido diretamente pela massa da fase de extração antes (m_0) e depois da adição de uma quantidade de água (m_1) necessária para preencher a fase e após a expulsão desta água (m_2) (líquido intersticial), por meio de um fluxo de ar. Então, o volume da fase móvel nos poros (m_1) é igual a $m_2 - m_0$; o volume da fase móvel intersticial (volume morto) se refere a $m_1 - m_2$, enquanto a razão entre as fases sólida e líquida (Φ) no interior do cartucho de SPE pode ser calculada através da Equação 5.8.

$$\Phi = m_0 / (V_M + V_p) \quad (5.8)$$

Onde V_p é o volume da fase móvel nos poros, e pode ser obtido pela diferença entre m_2 e m_0 .

O fator de retenção (k_s) do analito no solvente de eluição, pode ser obtido a partir da constante de distribuição do analito S entre a fase móvel e a fase sólida, de acordo com a Equação 5.9.

$$k_s = K_s \phi \quad (5.9)$$

Enquanto o volume de capacidade (V_B), pode ser determinado a partir da constante de distribuição K e dos valores de V_M e Φ .

Os valores de V_p , V_M e Φ obtidos para a fase PS-DVB foram determinados a partir das Equações citadas, e os resultados estão na Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Valores obtidos de V_p , V_m e Φ .

Parâmetro	Valor
V_p	0.356
V_m	0.604
Φ	0.521

5.3.3.1.4. Determinação do volume de capacidade para a fase PS-DVB

O volume de capacidade, V_B , pode ser definido como o volume máximo de amostra que pode ser percolado por um tubo de extração sem que ocorram perdas do analito de interesse, e, conseqüentemente diminuição de sua recuperação. Este é dependente das interações entre o analito, o solvente da amostra e o tipo de fase de extração empregado. Para fase reversa, o V_B depende da hidrofobicidade do analito e da massa da fase a ser utilizada.

Um método interessante para determinação do volume de capacidade foi apresentado por Ferreira, e colaboradores [31], sendo o volume de capacidade dado por:

$$V_B = \frac{1}{\sqrt{a_0 + a_1 / N + a_2 / N^2}} (1 + k_s) V_M$$

(5.10)

onde N é o número de pratos, V_M é o volume morto, e k_s , o fator de retenção do analito no meio em que está diluído quando submetido à fase de extração. Os valores de a_0 , a_1 e a_2 podem ser encontrados em estudo de Lovkvist e Jonsson [32].

Purnell [33] demonstrou em estudo que N pode ser calculado a partir da curva para o volume de capacidade através da seguinte relação, expressa na Equação 5.11:

$$N = V_R (V_R - \sigma_v) / \sigma_v^2 \quad (5.11)$$

o que é válido para $N > 3$. Em outras palavras, N é determinado a partir da curva de "breakthrough" (Apêndice 1) para um composto padrão. Neste estudo, o ácido gentísico foi escolhido como composto padrão, e este valor é utilizado para todos os compostos em questão. Os valores de V_R (volume de retenção) e σ_v (alargamento da banda) podem ser lidos na Figura 5.11.

Figura 5.11. Curva de "breakthrough" característica para o composto padrão ácido gentísico, medido através da utilização da fase PS-DVB. A solução foi percolada na vazão de 3 mL min⁻¹. Para abreviações, consultar o texto.

Os valores de V_B calculados para os compostos metil, etil, propil e butilparabeno estão apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Valores de k e V_B para a fase de extração PS-DVB

Analito	k	V_B (ml)
MP	>1260	>360
EP	>1260	>360
PP	>1260	>360
BP	>1260	>360

$N = 8,2, a_1 13,59 a_2 17,6$ [ref 32]

A partir dos resultados obtidos, foi possível verificar, que é possível a utilização de um volume maior que 360 mL para que o eluato apresente menos de 1% da concentração inicial aplicada ao cartucho de extração contendo a fase PS-DVB.

5.3.3.1.5. Seleção do volume e composição do solvente de limpeza da fase a partir de experimentos de eluição

Para este experimento, um cartucho de extração em fase sólida contendo a fase polimérica PS-DVB foi percolado com uma solução aquosa contendo butil, propil, etil e metilparabeno, na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após este procedimento, alíquotas de 2 mL de uma solução metanol:água (20:80, v/v) foi submetida ao cartucho de extração e coletadas na saída deste (também em alíquotas de 2 mL), e posteriormente analisadas por eletroforese capilar. Considera-se que, o volume máximo de limpeza da fase de extração seja dado pelo máximo volume de solvente que possa ser eluído pelo cartucho sem que os analitos sejam detectados, ou seja, um volume capaz de remover interferentes

provenientes da matriz das amostras mantendo ainda assim os analitos retidos na fase. Neste experimento foi estabelecido um volume de 10 mL de uma solução metanol:água (20:80, v/v). A Figura 5.12 mostra o eletroferograma a partir deste experimento.

Figura 5.12. Eletroferograma obtido a partir da solução de limpeza da fase de extração (metanol:água, 20:80, v/v) sem que houvesse a perda dos analitos BP, PP, MP e EP; Condições analíticas: eletrólito contendo 40 mmol L⁻¹ de glicina e 40 mmol L⁻¹ de TEA; injeção hidrodinâmica, 50 mbar durante 3 segundos; tensão aplicada de 30 kV, polaridade positiva; capilar de 32 cm de comprimento total, 23,5 cm comprimento efetivo; detecção em 297 nm.

5.3.3.1.6. Avaliação do volume de capacidade

A determinação do volume de capacidade para o BP, PP, EP e MP foi realizada através de um único experimento de eluição, cujo principal objetivo foi o de confirmar os resultados obtidos a partir das Equações. Primeiramente uma solução aquosa contendo 20 µg mL⁻¹ dos parabenos foi submetida ao cartucho de extração, e alíquotas de 10 mL, a partir de 80 mL foram coletadas na saída do cartucho e analisadas por eletroforese capilar.

Devido à complexidade da matriz estudada, estabeleceu-se um volume de amostra de 100 mL, apesar de o experimento ter sido conduzido até 360 mL. Isto é explicado pelo fato de que juntamente com a concentração dos analitos estudados, haveria a concentração de substâncias potencialmente interferentes (principalmente matéria orgânica originada da presença de ácidos húmicos e fúlvicos) comumente presentes concentrações elevadas em amostras de origem ambiental.

A Figura 5.13 apresenta o eletroferograma da última alíquota de 10 mL coletada, de um volume total de 100 mL de solução percolada, contendo todos os parabenos.

Figura 5.13. Eletroferograma obtido a partir de uma alíquota final de 10 mL, de um total de 100 mL, provenientes de uma solução contendo parabenos na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, submetidos ao cartucho de extração, com adição posterior do padrão interno ácido cinâmico; Para as condições analíticas consultar Fig. 5.12.

Os resultados deste experimento corroboram com os obtidos a partir da constante de distribuição, ou seja, seria possível a aplicação de um volume de 360 mL sem a perda da retenção dos analitos.

5.3.3.1.7. Determinação do volume de eluição

Para estudos de determinação do volume de eluição, necessário para a remoção completa dos analitos do cartucho de extração, foram avaliados solventes com diferentes propriedades, Tabela 5.12.

Tabela 5.12. Propriedades físico-químicas dos solventes utilizados para a determinação do volume de eluição.

Solvente	UV “cut off”	Viscosidade a 20° C	Índice de polaridade (<i>Snyder</i>)	Ponto de ebulição (°C)
Acetona	330	0,32	5,4	56,3
Acetonitrila	190	0,37	6,2	81,6
Acetato de etila	256	0,46-0,47	4,3	77,1
Diclorometano	232	0,44	3,4	40
Metanol	205	0,60	6,6	64,7

Para cada solvente foi realizado o seguinte experimento: 100 mL de uma solução aquosa contendo aproximadamente 20 µg mL⁻¹ de cada parabeno foi submetida ao cartucho de SPE, previamente condicionado, logo 10 mL de uma solução contendo metanol:água (20:80, v/v) foi passada pelo cartucho, para limpeza da fase de extração. E, por fim, 10 mL de solvente (citados na Tabela 5.12) foi submetido ao cartucho, e recolhido em alíquotas de 2 mL (até o volume máximo de 12 mL). Todas as alíquotas foram analisadas por eletroforese capilar. Os resultados obtidos foram avaliados através da comparação da soma das áreas corrigidas dos parabenos, em relação ao padrão interno, obtida para cada solvente utilizado, em cada alíquota de 2 mL. A Figura 5.14 mostra os eletroferogramas das alíquotas de 4, 8 e 12 mL para o solvente acetona.

Figura 5.14. Eletroferogramas de 3 alíquotas de eluatos do cartucho de extração em fase sólida utilizando acetona como solvente. Para condições analíticas consultar Fig. 5.12.

Os experimentos realizados forneceram dados suficientes para a escolha de um volume de eluição de 8 mL de acetona, os quais foram suficientes para a remoção dos analitos do cartucho de extração (considerando os valores de LOD do método).

5.3.3.1.8. Etapas do procedimento de extração

Todas as etapas compreendidas no procedimento de extração, para a pré-concentração dos parabenos – utilizando a técnica de SPE – compreendeu os seguintes procedimentos (Figura 5.15):

Figura 5.15. Etapas envolvidas durante o procedimento de extração em fase sólida.

5.3.4. Estratégia de pré-concentração “on-line”

5.3.4.1. Determinação do limite de detecção utilizando injeção normal

Neste estudo utilizaremos o termo *injeção normal* para designar a injeção propriamente dita, sem nenhuma estratégia de “stacking” ou inversão de polaridade.

Antecedendo os estudos de pré-concentração “on-line”, foi estimado o limite de detecção do método, a partir do tempo máximo de injeção sem o comprometimento do desempenho do método em termos de número de pratos, resolução e tempo de análise. Na Figura 5.16 são apresentados os eletroferogramas obtidos a partir da injeção dos analitos, durante 3 segundos com pressão de 50 mbar nas concentrações de 2 e 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Figura 5.16. Eletroferograma de uma mistura de parabenos na concentração de (A) 2 mg L⁻¹ e (B) 0,2 mg L⁻¹ utilizando o modo de injeção normal. Outras condições experimentais consultar Fig. 5.12.

Na Figura 4.16(A) foi utilizada uma concentração de 2 mg L^{-1} de cada um dos parabenos e 5 mg L^{-1} do padrão interno, ácido cinâmico. É possível observar a partir da Figura 4.16(B), que com uma redução de 10 vezes na concentração dos analitos, um valor bem próximo ao limite de detecção é alcançado.

Na Figura 5.17 são apresentados os eletroferogramas obtidos a partir do aumento do tempo de injeção para 6 e 10 segundos, respectivamente, com o objetivo de aumentar o sinal analítico.

Figura 5.17. Eletroferograma de uma mistura de parabenos na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ utilizando tempos de injeção de 6 e 10 segundos / 50mbar. Outras condições experimentais consultar Fig. 5.12.

A Fig. 5.17 indica que, o aumento de 3 para 6 segundos de injeção, acontece o aumento do sinal analítico, entretanto, com o aumento de 6 para 10 segundos, observa-se uma diminuição da eficiência dos picos, reduzindo, portanto, a resolução. Não é observado um aumento da detectabilidade. A partir dos resultados obtidos, estabeleceu-se uma injeção de 6 segundos para o

método convencional. Na Figura 5.18 são apresentados os eletroferogramas obtidos utilizando 6 segundos de injeção. Houve uma redução na concentração dos analitos com o intuito de obter o valor para o limite de detecção do método com *injeção normal*.

Figura 5.18. Eletroferograma de uma mistura de parabenos na concentração de 0,1 mg L⁻¹ e 0,06 mg L⁻¹ utilizando o modo de injeção normal. Para condições analíticas consultar Fig. 5.12.

O limite de detecção do método foi determinado a partir da Figura 5.17, utilizando-se como critério a determinação da concentração, que apresentou um sinal 3 vezes maior que o ruído. Este limite foi estabelecido em 0,06 µg mL⁻¹. Para o estudo da otimização do procedimento de “stacking” foi utilizada a concentração de 0,06 µg mL⁻¹.

5.3.4.2. Pré-concentração utilizando grande volume de injeção com remoção da matriz da amostra com inversão da polaridade

5.3.4.2.1. Otimização do procedimento de “stacking”

Para o estudo do volume de injeção, foi avaliada uma mistura de analitos na concentração de 60 ng mL^{-1} . Inicialmente foi determinado o tempo necessário para a remoção da matriz da amostra utilizando-se valores de tensão constante e tempo de injeção variável.

A Figura 5.19 apresenta as curvas de corrente *versus* tempo, obtidas para os diferentes tempos de injeção.

Figura 5.19. Curvas de tempo de injeção (pressão de 50 mbar) *versus* corrente. A) 10 s; B) 20 s; C) 40 s; D) 80 s; E) 120 s; F) 160 s; G) 180s; H) 200; I) 240s. Condições analíticas, consultar Fig. 5.12.

De acordo com a Fig. 4.18, é possível observar que, na medida em que o tempo de injeção aumenta, há um aumento do tempo necessário para a remoção da matriz da amostra. Para cada tempo de injeção hidrodinâmica, é necessário aplicar um dado tempo de tensão com polaridade negativa até que seja atingido um valor de corrente entre 90 e 99% do valor normal, sem a presença do plugue de amostra, logo a polaridade é invertida para que o “stacking” aconteça e a separação ocorra.

Na Figura 5.19 são mostrados os eletroferogramas obtidos com o aumento do tempo de injeção de 10 a 240 segundos, utilizando a estratégia de “stacking” com grande volume de injeção seguido da inversão da polaridade (do inglês LVSS, “large volume sample stacking”).

Figura 5.19. Eletroferograma de uma mistura de parabenos na concentração de 60 ng mL^{-1} com tempo de injeção de 10 a 240 segundos utilizando-se a estratégia de “stacking” no modo LVSS. Para outras condições analíticas consultar Fig. 5.12.

A Figura 5.19 indica que há um aumento significativo do sinal na medida em que o tempo de injeção é aumentado, entretanto com 240 segundos ocorre uma perda da eficiência e diminuição da resolução entre as bandas dos analitos. Portanto o tempo de 200 segundos foi estabelecido como apropriado para injeção, associada a uma sensibilidade satisfatória (boa detectabilidade). A Figura 5.20 apresenta eletroferogramas comparativos, em que é possível observar o aumento do sinal alcançado utilizando-se a estratégia de injeção normal, descrita anteriormente e “stacking” no modo LVSS, em que os limites de detecção calculados a partir da relação sinal ruído ficam na faixa de 4 a 6 ng mL^{-1} .

Figura 5.20. Eletroferogramas comparativos com o modo de injeção utilizando-se a estratégia de “stacking” com grande volume de injeção seguido da inversão

da polaridade, 200 segundos/50 mbar (A) e o modo de *injeção normal*, 6 segundos/50 mbar (B). Para outras condições analíticas consultar Fig. 5.12.

5.3.4.2.2. Estudo do fenômeno de “stacking” no modo LVSS com inversão da polaridade

Segundo a Figura 5.21, mostra uma representação esquemática do “stacking” no modo LVSS, em que os analitos sofrem um “empilhamento” na zona frontal da amostra, fato que corrobora com o que está descrito na literatura [34]; entretanto, dependendo do pH da matriz da amostra e do pK_a dos analitos, estes podem estar na sua forma não dissociados. Portanto, a descrição anterior não concordaria com o esquema apresentado.

Figura 5.21. Representação esquemática do modo de “stacking” LVSS com inversão da polaridade. (A) um grande volume de amostra é injetada hidrodinamicamente no capilar juntamente com um pequeno plugue do eletrólito de corrida, (B) a tensão é aplicada com polaridade invertida (fluxo eletrosmótico migra na direção inversa), com isso a matriz da amostra é empurrada para fora do capilar pela ação do fluxo eletrosmótico, (C) os analitos

de caráter aniônico são concentrados na fronteira entre a zona da amostra e do eletrólito de corrida, na porção final do capilar, (D) a polaridade é invertida novamente para o modo normal de separação e a tensão correta de separação aplicada para que, (E) os analitos migrem em direção ao detector e a separação ocorra de fato.

Para um estudo mais detalhado do fenômeno que ocorre no interior do capilar utilizando este modo de injeção, foi realizado o seguinte experimento, ilustrado na Figura 5.22. Primeiramente o capilar foi preenchido com o eletrólito de corrida, a seguir é efetuada a injeção de um grande volume da amostra, com pressão constante de 50 mbar durante 150 segundos. Posteriormente, é aplicada tensão com polaridade negativa a fim de remover a matriz do plugue de amostra, e com isso, efetuar o acúmulo dos analitos por um tempo determinado, denominado t_{stacking} . Finalmente, o plugue da amostra move-se em direção ao detector apenas pela ação da pressão aplicada pelo equipamento. Este experimento tem como objetivo a determinação do perfil de migração dos analitos à medida que o fenômeno de “stacking” ocorre.

Figura 5.22. Esquema que ilustra o procedimento utilizado para o estudo do fenômeno de “stacking” no interior do capilar. Para outras condições analíticas consultar Fig. 5.12.

Na Figura 5.23 são apresentados os espectros de absorção no UV dos parabenos na sua forma ácida (HA) e dissociada (A^-).

Figura 5.23. Espectros de UV dos parabenos na sua forma ácida (HA) e dissociada (A^-).

A mistura de padrões utilizada neste experimento apresentou pH 6,8, e, sendo o pK_a dos parabenos maior que 8, espera-se que os mesmos estejam em sua forma ácida no plugue de amostra.

A Figura 5.24 apresenta o resultado do experimento descrito na Figura 5.22 aplicando-se $t_{\text{stacking}} = 0$, ou seja, a situação inicial (desconsiderando-se efeitos de alargamento causados pela pressão aplicada pelo movimento do plugue em direção ao detector).

Figura 5.24. Eletroferogramas resultantes do estudo do fenômeno de “stacking” descrito na Figura 4.22. Para outras condições de análise, consultar Fig. 5.12.

Foram monitorados três comprimentos de onda distintos durante este experimento: 297 nm, máximo de absorção da espécie A^- ; 255 nm, máximo de absorção da espécie HA; e 360 nm, região onde os parabenos não apresentam absorção. A Figura 5.25 (A), monitorada no comprimento de onda de 297 nm, indica que os parabenos na região frontal e caudal do plugue de amostra estão predominantemente na sua forma dissociada, e a seguir ocorre a “mistura” entre o eletrólito de corrida e o plugue da amostra no sentido da região frontal para a região caudal, uma vez que é gerado um perfil parabólico, que diminui ao longo

do plugue. Este fenômeno sugere um “escoamento turbulento” do plugue de amostra.

Na Figura 5.25, são apresentados os eletroferogramas com a variação de t_{stacking} de 0 a 110 segundos.

Figura 5.25. Variação do t_{stacking} de 10 a 110 segundos (com incrementos de 10 s) monitorados em diferentes comprimentos de onda (indicados na Figura). Para outras condições analíticas, consultar Fig. 5.12.

É possível observar a partir da Figura 5.25 que, nos comprimentos de onda de 297 e 255 nm, respectivamente, o resultado corrobora com o apresentado na Figura 5.22, em que, o fenômeno de “stacking” aconteceria na interface “frontal” do plugue, ou seja, a zona localizada entre a amostra e o eletrólito de corrida (ao lado direito do plugue da amostra – na primeira porção a atingir o detector), formando em “L” uma banda estreita de alta concentração

em relação ao resultado “A”. Em 360 nm pode-se observar que o tamanho original do plugue diminui, até ser completamente removido, restando apenas os analitos no interior do capilar. Este resultado final pode ser melhor visualizado na Figura 5.26.

Figura 5.26. Eletroferogramas “K” e “L”, extraídos da Figura 5.25.

Observa-se que, no eletroferograma da Figura 5.26 (K), a zona de amostra (λ , 297 nm) apresenta um pequeno deslocamento do plugue (λ , 360 nm), o que colabora com o fato de haver a remoção da matriz da amostra simultânea à migração dos analitos. Em “L” observa-se a total remoção da matriz da amostra (λ , 360 nm) e a permanência dos analitos no interior do capilar. Neste momento, a polaridade deve ser invertida para que ocorra a separação dos analitos, ocasionada pela composição dos vetores de velocidade eletrosmótica e eletroforética.

O estudo descrito foi realizado sem adição de nenhum componente que alterasse o pH da amostra. A seguir, foi estudada a influência da adição de ácido

acético, na concentração de 4 mmol L⁻¹ à amostra, para a verificação do mesmo fenômeno descrito anteriormente, uma vez que as matrizes de amostras reais possuem maior complexidade em sua composição, quando comparados à mistura de padrões, utilizada no estudo anterior.

Na Figura 5.27 são apresentados os eletroferogramas obtidos utilizando-se o mesmo procedimento para a amostra, agora com adição de ácido acético.

Figura 5.27. Eletroferogramas obtidos utilizando-se o mesmo procedimento para a amostra com adição de ácido acético 4 mmol L⁻¹ à solução dos padrões.

Um perfil parabólico resultante da concentração de A^- ao longo do plugue da amostra é observado na Figura 4.27, devido a uma quantidade maior de espécies ácidas no centro do plugue da solução. Nas extremidades, acontece um contato “efetivo” entre o seguimento da amostra e o eletrólito de corrida, em pH maior que 10, o que é evidenciado pelo perfil gerado, onde, devido a difusão, os analitos entram em contato com a região de maior pH e se ionizam. À medida que t_{stacking} aumenta, o fenômeno de “empilhamento” ocorre na extremidade da porção direita do plugue de amostra, Figura 4.27(2), comportamento contrário ao observado no estudo anterior. Uma possível explicação encontrada para este fenômeno é, que quando o plugue de amostra migra em direção ao pólo positivo, as substâncias se ionizam por entrarem em contato com o alto valor de pH do eletrólito, e, estas migram no sentido contrário, como apresentado no primeiro estudo. Entretanto, quando os analitos atingem a região central do plugue da solução contendo os compostos, os mesmos são protonados novamente, “zerando” sua mobilidade eletroforética. Este fenômeno ocorre até que, toda a região ácida tenha sido removida do interior do capilar, o que pode ser observado nos casos apresentados na Figura 4.27(B-K). Este tipo de “stacking” sugere que o fenômeno que ocorre no interior do capilar é “sweeping”.

5.3.5. Aplicação dos procedimentos de pré concentração “off-line” e “on-line” em amostra de água do reservatório Billings

A Figura 4.28 apresenta um eletroferograma de uma amostra de água coletada no reservatório Billings, a amostra foi submetida aos procedimentos de pré-concentração “off-line” e “on-line” apresentados neste estudo. A mesma amostra foi fortificada por meio da adição de 500 ng L⁻¹ dos padrões butil, propil, etil e metilparabeno.

Figura 4.28. Amostra do reservatório Billings fortificada com 500 ng L⁻¹ dos padrões de parabenos. Foi utilizado o procedimento de SPE e “stacking” descritos anteriormente.

5.3.5.1. Recuperação

A recuperação do método foi determinada pela comparação entre a área da amostra fortificada com os padrões butil, propil, etil e metilparabeno na concentração de 1 µg L⁻¹, submetida à extração (100 mL de amostra) e os valores de área obtidos de uma amostra não fortificada.

Os valores de recuperação e as concentrações adicionadas à amostra estão na Tabela 5.13.

Tabela 5.13. Valores das concentrações adicionadas e valores recuperados durante os experimentos de extração.

Analitos	Concentração adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação* (%)
Butilparabeno	1,0	$89,5 \pm 3,2$
Propilparabeno	1,0	$82,3 \pm 4,5$
Etilparabeno	1,0	$77,4 \pm 4,2$
Metilparabeno	1,0	$79,1 \pm 3,3$

*(n=3)

O menor valor de recuperação alcançado foi para composto etilparabeno, enquanto a maior recuperação se deu para o butilparabeno. Valores reduzidos de recuperação estão possivelmente relacionados a composição da matriz da amostra, a qual possui substâncias provenientes de material orgânico que prejudica a extração das substâncias da amostra.

5.4. Considerações finais

Os resultados apresentados demonstraram claramente o potencial da técnica de eletroforese capilar na separação, caracterização e quantificação de parabenos em amostras de água superficial, utilizando a técnica de extração em fase sólida associado a estratégias de pré-concentração “on line” (“stacking”/“sweeping”). O método demonstrou ser eficiente e foi possível a quantificação de aproximadamente 500 ng L^{-1} em amostras de água fortificadas provenientes do Reservatório Billings.

5.5. Referências bibliográficas

- [1] YE, X., KUKLENYIK, Z., BISHOP, A. M., NEEDHAM, L. L., CALAFAT, A. M. Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 844, n. 1, p. 53-59, nov. 2006.
- [2] CANOSA, P., RODRÍGUEZ, I., RUBÍ, E., BOLLAÍN, M. H., CELA, R. Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabéns in water samples at the low ng per litre level. **Journal of Chromatography A**, v. 1124, n. 1-2, p. 3-10, aug. 2006.
- [3] ELDER, R. L. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 3, n. 5, p. 147-209, 1984.
- [4] ANVISA. Resolução nº 79, de 28 de agosto de 2000. Diário Oficial da União.
- [5] ROUTLEDGE, E. J., PARKER, J., ODUM, J., ASHBY, J., SUMPTER, J. P. Some alkyl hydroxyl benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 12-19, nov. 1998.
- [6] GOLDEN, R., GANDY, J., VOLLMER, G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 435-458, jun. 2005.
- [7] BYFORD, J. R., SHAW, L. E., DREW, M. G. B., POPE, G. S., SAUER, M. J., DARBRE, P. D. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 80, n. 5, p. 49-60, jan 2002.
- [8] DARBRE, J. R., SHAW, L. E., HORTON, R. A., POPE, G. S., SAUER, M. J. Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo. **Journal of Applied Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 219-226, jul-aug. 2002.
- [9] OISHI, S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 17, n. 1, p. 31-39, feb. 2001.
- [10] OISHI, S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 12, p. 1807-1813, dec. 2002.
- [11] PIETROGRANDE, M. C., BASAGLIA, G. GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1086-1094, dec. 2007.
- [12] LEE, H. B., PEART, T. E., SVOBODA, M. L. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, n. 1-2, p. 122-129, nov. 2005.
- [13] CANOSA, P., RODRIGUEZ, I., RUBI, E., BOLLAIN, M. H., CELA, R. Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of

parabéns in water samples at the low ng per litre level. **Journal of Chromatography A**, v. 1124, n. 1-2, p. 3-10, aug. 2006.

[14] COSTA, A. C. O., DA COSTA, J. L., TONIN, F. G., TAVARES, M. F. M., MICKE, G. A. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1171, p. 140-143, 2007.

[15] BAKER, D. R., *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995.

[16] BECKERS, J. L. System peaks and disturbances to the base-line UV signal in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 662, n. 1, p. 153-166, feb. 1994.

[17] BECKERS, J. L. UV detection in capillary zone electrophoresis peaks or dips – that is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 679, n. 1, p. 153-165, sep. 1994.

[18] BOCEK, P., GEBAUER, P. System peaks in capillary zone electrophoresis. 1. Simple model of vacancy electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 772, n. 1-2, p. 73-79, jun. 1997.

[19] BECKERS, J., BOCEK, P. Peaks in capillary zone electrophoresis: Fact or fiction. **Electrophoresis**, v. 20, n. 3, p. 518-524, mar 1999.

[20] STEDRY, M., JAROS, M., GAS, B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis – I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes. **Journal of Chromatography A**, v. 960, n. 1-2, p. 187-198, jun 2002.

[21] BOČEK, P., DEML, M., GEBAUER P., DOLNÍK, V., RADOLA, B. J. (Ed.) **Analytical Isotachophoresis**. VCH: New York, 1988, first edition.

[22] MARCUS, Y. **Ion Solvation**; John Wiley: Chichester, 1985.

[23] WILLIAMS, B. A., VIGH, G. Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 7, p. 1174-1180, apr. 1996.

[24] MARCUS, Y. **Ion Solvation**; John Wiley: Chichester, 1985.

[25] MUIJSELAAR, P. G., CLAESSENS, H. A., CRAMERS, C. A. Migration behaviour of monovalent weak acids in micellar electrokinetic chromatography mobility model versus retention model. **Journal of Chromatography A**, v. 765, n. 2, p. 295-306, mar. 1997.

[26] GAS, B., COUFAL, P., JAROS, M., MUZIKAR, J., JELINEK, I. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis I. Mathematical and computational model. **Journal of Chromatography A**, v. 905, n. 1-2, p. 269-279, jan. 2001.

- [27] STEDRY, M., JAROS, M., GAS, B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis – I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes. **Journal of Chromatography A**, v. 960, n. 1-2, p. 187-198, jun 2002.
- [28] STEDRY, M., JAROS, M., VCELAKOVA, K., GAS, B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes. **Electrophoresis**, v. 24, n. 3, p. 536-547, feb. 2003.
- [29] WATZIG, H., DEGENHARDT, M., KUNKEL, A. Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications. **Electrophoresis**, n. 19, n. 16-17, p. 2695-2752, nov. 1998.
- [30] RIBANI, M., BOTOLLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, sep. 2004.
- [31] FERREIRA, V., JARAUTA, I., ORTEGA, L., CACHO, J. Simple strategy for the optimization of solid-phase extraction procedures through the use of solid-liquid distribution coefficients Application to the determination of aliphatic lactones in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 2, p. 147-156, 2004.
- [32] LOVKVIST, P., JONSSON, J. A. Capacity of sampling and preconcentration columns with a low number of theoretical plates. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 818-821, mar. 1987.
- [33] PURNELL, H. **Gas Chromatography**, Wiley, New York, 1962.
- [34] SIMPSON, S. L., QUIRINO, J. P., TERABE, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. Fundamentals and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 504-541, mar. 2008.

Capítulo 5

**Determinação de p-
hidroxibenzoatos de alquila
utilizando eletroforese capilar
associada a estratégias de pré-
concentração “on line” e “off line”**

Capítulo 6

**Determinação de alquilbenzeno
sulfonato linear total e homólogos
por eletroforese capilar aplicados a
amostras de efluente
e detergentes comerciais**

6.1. Introdução

Alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) é um tensoativo aniônico sintético, constituído por uma mistura de homólogos e isômeros posicionais de cadeias alquiladas lineares, variando de C_{10} a C_{16} com predominância de C_{10} a C_{13} . O benzeno sulfonato pode estar localizado em várias posições de alquil carbonos, a partir do segundo centro (Figura 6.1) [1].

Onde: $n+n' = 7 - 11$

Figura 6.1. Estrutura molecular do alquilbenzeno sulfonato linear.

Este tensoativo é encontrado em produtos de limpeza doméstica (detergente para roupas e superfícies) e, é amplamente empregado na indústria têxtil, de cosméticos, alimentos, couro e, ainda, na flotação de minério. A detergência está ligada principalmente à estrutura, à posição do grupamento benzeno sulfonato e ao comprimento da cadeia alquil da parte hidrofóbica.

Após a utilização deste tensoativo, seus resíduos são descartados e alcançam as estações de tratamento de esgoto, local onde são efetivamente removidos, como resultado de sua degradação biológica e adsorção no sedimento. Uma pequena quantidade de LAS atinge águas naturais através de efluentes tratados e, também pela aplicação do lodo resultante do tratamento comumente utilizado em agricultura. Devido as suas propriedades este tensoativo interage com membranas celulares, proteínas e enzimas de organismos aquáticos, promovendo distúrbios de suas funções biológicas [2].

Alguns estudos disponíveis na literatura relatam a presença de LAS em efluentes de estações de tratamento de esgoto e águas superficiais utilizando principalmente a cromatografia líquida de alta eficiência [3-6] cromatografia à gás [7-9] e eletroforese capilar [3,10-12].

Holt e colaboradores [13] avaliaram a presença de LAS em diversas amostras de efluentes provenientes de estações de tratamento de esgoto (ETEs), e em água de rios localizados em países integrantes da União Européia, a técnica empregada foi HPLC, e a extração em fase sólida foi utilizada na pré-concentração e “clean up” das amostras. Os resultados indicaram a presença do tensoativo aniônico em concentrações que variaram de 0,003 a 0,601 mg L⁻¹. LAS e seus homólogos foram determinados em amostras de afluentes e efluentes de ETEs e águas de rio, todas as amostras foram analisadas utilizando HPLC-ESI-MS [3], e os resultados comparados com CE/UV. Os níveis de concentração encontrados em todas as amostras variaram entre 136 e 1309 mg L⁻¹.

Lunar e colaboradores [4] determinaram o tensoativo LAS e seus homólogos em amostras de água superficial utilizando LC-MS combinado a SPE com limite de detecção de 4 ng L⁻¹. As concentrações encontradas variaram de 9 a 503 mg L⁻¹.

Outro estudo realizado por Ding & Liu [10] utilizando eletroforese capilar com injeção de grande volume de amostra foi aplicado à análise de detergentes de uso doméstico. O fator de enriquecimento alcançado foi de 100 vezes e as amostras foram quantificadas na faixa de 0,002 a 0,01 mg L⁻¹.

A separação dos homólogos de LAS e isômeros é de grande importância devido à degradação biológica, detergentência e toxicidade aquática estar relacionada ao comprimento da cadeia alquil e da posição do anel fenil. A distribuição dos isômeros fornece informações sobre o processo industrial e, portanto, pode ser utilizado para identificar a origem do produto [2,3].

Eletroforese capilar é uma técnica apropriada para a análise de diferentes substâncias incluindo as de caráter aniônico, destacando-se pela alta eficiência de separação, reduzido consumo de solventes e pequenos volumes de amostra. Esta

eficiência demonstrada pela técnica aliada a um preparo simples de amostra, torna possível a construção de métodos sensíveis, seletivos e de baixo custo operacional.

Neste estudo, um método simples e rápido utilizando eletroforese capilar proposto para a determinação de LAS total e seus homólogos. A metodologia foi aplicada na determinação deste tensoativo em amostras de efluentes e amostras de detergentes comerciais líquidos e em pó.

6.2. Procedimento Experimental

6.2.1. Equipamento e parâmetros instrumentais

Todos os experimentos foram conduzido em um equipamento de eletroforese capilar (modelo HP ^{3D}CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.) com detector de arranjo de diodos e “software” (HP ChemStation, rev A.06.01) para tratamento e aquisição de dados. O aparelho possui sistema de refrigeração do capilar por circulação de ar, e a temperatura foi mantida constante. Foi utilizado um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) com dimensões de 76 µm de diâmetro interno e 48,5 cm de comprimento total, sendo 40 cm até a janela de detecção.

6.2.2. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram grau analítico e a água desionizada (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Padrão de dodecilbenzenosulfonato de sódio 80% foi adquirido da Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Solução padrão estoque de SDBS foi preparado em água com concentração aproximada de 1000 µg mL⁻¹ e armazenada sob refrigeração (4 °C). Foram preparadas semanalmente soluções estoque de tris-hidroximetilaminometano (Tris) (Fluka, São Paulo, SP, Brasil), ácido 2-hidroxibutírico (HIBA) e poli-etilenoglicol docecil-éter (Brij 35) (Aldrich, Milwaukee, WI, E.U.A.) na concentração de 100 mmol L⁻¹. Também foi utilizada acetonitrila (ACN) (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e solução de hidróxido de

sódio 1 mol L⁻¹ utilizada no condicionamento do capilar. Os eletrólitos utilizados nas análises foram preparados diariamente.

6.2.3. Amostras

Amostras de detergentes comerciais de uso doméstico (em pó e líquido) foram adquiridos no comércio local. Amostras de efluentes de uma região predominantemente industrializada de São Paulo, localizada na cidade de Cotia e ainda amostra de efluente de uma região predominantemente doméstica localizada na cidade de São Paulo, na serra da Cantareira. As amostras foram coletadas com profundidade de 1 m da superfície, no período da manhã, em recipientes de vidro âmbar, e levadas imediatamente ao laboratório, filtradas e armazenadas sob refrigeração (4 °C) ao abrigo da luz. As amostras coletadas apresentavam pH que variou de 5,5 a 7,2, e estas foram analisadas no prazo máximo de 48 horas após a coleta.

6.2.4. Condições de análise

As lavagens de condicionamento inicial do capilar, com pressão de 940 mbar, foram realizadas diariamente com 15 minutos de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹, seguidos de 15 minutos de água desionizada e 30 minutos de eletrólito de corrida. No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com lavagens de 2 minutos de eletrólito e no término das análises, 15 min de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ e 15 minutos de água desionizada para a limpeza do capilar. O eletrólito de corrida foi constituído de 60 mmol L⁻¹ de Tris, 30 mmol L⁻¹ de HIBA, 15 mmol L⁻¹ de Brij e 40 % de ACN. As amostras e soluções padrão foram injetadas hidrodinamicamente (50 mbar, 3 s) e o sistema de eletroforese foi operado com polaridade normal e tensão constante de 30 kV, a temperatura do capilar foi mantida a 25 °C. O comprimento de onda utilizado foi 224 nm com detecção direta.

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Desenvolvimento do método

Espera-se que os LAS possuam mobilidade baixa, tendo em vista a massa molecular desses compostos. A análise de ânions de baixa e média mobilidades (entre 3 e $35 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V.s}$), normalmente é realizada no modo contra-eletrosmótico. Uma peculiaridade na análise destes compostos é a baixa solubilidade dos mesmos em água, e a possibilidade de micelização em concentrações baixas de solvente. Com isso é interessante a utilização de solvente orgânico tanto na amostra quanto no eletrólito de corrida. A adição de modificadores orgânicos ao eletrólito de separação pode afetar o fluxo eletrosmótico e as mobilidades eletroforéticas. Heining e colaboradores [2] afirmaram que acetonitrila é o modificador orgânico mais eficiente na separação de LAS e homólogos.

Para análise de LAS, o eletrólito de corrida deve conter um co-íon de baixa mobilidade, juntamente com um dos componentes que apresente capacidade tamponante. A detecção de LAS pode ser realizada no comprimento de onda de 224 nm, tendo em vista o espectro de UV para estes compostos.

Além de solventes orgânicos, a adição de tensoativos pode auxiliar na separação de homólogos e isômeros devido a interações do tipo cauda/cauda tensoativo : LAS. Dentre os tensoativos normalmente utilizados em eletroforese capilar existem os neutros, aniônicos e catiônicos. No caso dos tensoativos catiônicos, esses poderiam formar pares iônicos ao interagir com o LAS (característica aniônica), podendo levar a precipitação dos mesmos. Quanto aos tensoativos aniônicos, os mesmos tenderiam a aumentar o tempo de análise, já que migram no modo contra-eletrosmótico. Acredita-se, portanto, que os tensoativos neutros são os mais adequados para essa separação, podendo, além de promover o aumento de seletividade, um redução no tempo de análise.

Um tensoativo neutro muito utilizado em eletroforese capilar é o Brij 35. A otimização da separação foi realizada estudando-se o comportamento dos

analitos em função da adição de diferentes concentrações de Brij 35 e ACN ao eletrólito de corrida.

Conforme mencionado anteriormente, um método desenvolvido por eletroforese capilar em solução livre deve satisfazer as seguintes condições: i) o co-íon do eletrólito de corrida (componente do eletrólito de corrida com a mesma carga do analito) deve ser escolhido de modo a minimizar os efeitos de dispersão por eletromigração (EMD); ii) o eletrólito otimizado deve apresentar boa capacidade tamponante; iii) e as diferenças de mobilidade efetiva devem ser suficientes para uma boa resolução entre os analitos.

Para análise de LAS, o co-íon escolhido foi o HIBA, pois este composto apresenta baixa mobilidade eletroforética e baixa absorvidade molar, quando comparado aos analitos em estudo. Espera-se com isso uma redução dos valores de EMD. O contra-íon utilizado foi o Tris, pKa 8,15. Uma mistura na proporção de 2:1 Tris:Hiba apresenta pH 8,15; portanto, o eletrólito selecionado apresenta boa capacidade tamponante, baixa condutividade – contribuindo para redução do efeito Joule – e baixa absorvidade molar, aumentando a relação sinal/ruído.

A Figura 6.1 apresenta o eletroferograma de uma solução contendo o padrão de SDBS na concentração de 0,4 mmol L⁻¹ em água.

Figura 6.1. Eletroferograma de SDBS na concentração de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ em água. Condições de análise: 30 mmol L^{-1} de Tris, 15 mmol L^{-1} de HIBA; tensão aplicada: 30 kV ; injeção: 3 s , 50 mbar ; temperatura do capilar: $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

É possível observar na Figura 6.1 que não houve a separação dos homólogos, provavelmente devido à formação de uma micela mista entre o Brij 35 e o LAS.

Adição de acetonitrila ao eletrólito de corrida: a fim de se obter a separação dos homólogos e isômeros, foi avaliada a adição do solvente acetonitrila ao eletrólito de corrida. A Figura 6.2 apresenta os eletroferogramas obtidos variando-se a concentração de acetonitrila ($10 - 60\%$) adicionada ao eletrólito de corrida constituído por 30 mmol L^{-1} de Tris, 15 mmol L^{-1} de HIBA.

Figura 6.2. Eletroferograma de SDBS na concentração de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ em água. Concentração de acetonitrila adicionada ao eletrólito: (A) 10%; (B) 20%; (C) 30%; (D) 40%; (E) 50%; (F) 60%. Mesmas condições de análise da Figura 5.1.

É possível observar que o aumento da concentração de acetonitrila no eletrólito de corrida causa um aumento de resolução entre as bandas eletroforéticas. Concentrações de acetonitrila menores que 30%, possibilitam a formação de micelas, o que reduz a resolução dos analitos. Valores de acetonitrila maiores que 40% causam uma redução na eficiência das bandas.

Efeito da adição de tensoativo não iônico: a porcentagem de 40% de acetonitrila foi escolhida como apropriada para a separação do tensoativo SDBS. O efeito da adição de Brij 35, um tensoativo não iônico, ao eletrólito de corrida, foi avaliado e pode ser observado na Figura 6.3.

Figura 6.3. Separação dos homólogos de SDBS e isômeros na concentração de 0,4 mmol L⁻¹ variando a concentração de Brij 35 no eletrólito: (A) 10 mmol L⁻¹; (B) 15 mmol L⁻¹; (C) 20 mmol L⁻¹; (D) 25 mmol L⁻¹. Eletrólito de corrida: 30

mmol L⁻¹ de Tris, 15 mmol L⁻¹ de HIBA, 40% de acetonitrila. Parâmetros instrumentais consultar Figura 6.1.

Pode-se observar que há um aumento da resolução entre as bandas, quando a concentração de é 15 mmol L⁻¹ Brij 35 é utilizada. Possivelmente o aumento de seletividade está associado à interação do tipo forças de Van der Waals entre o tensoativo LAS e o Brij 35.

6.3.2. Avaliação do desempenho do método

Um obstáculo encontrado na determinação dos LAS é a ausência de um padrão comercial dos homólogos individuais. A empresa Sigma comercializa o padrão de SDBS (dodecilbenzenosulfonato de sódio linear) com 80% de pureza. Neste estudo foi utilizado este padrão para fins quantitativos. A identificação qualitativa dos homólogos foi realizada com base no espectro de UV de cada pico, utilizando-se o detector de arranjo de diodos, além disso, sabendo-se que, compostos com menor mobilidade migram mais rapidamente no modo contra eletrosmótico, e também a partir de dados da literatura foi possível prever a posição de cada homólogo no eletroferograma [2].

Foram construídas curvas de calibração utilizando-se o padrão de SDBS no intervalo de 3 a 20 mg L⁻¹, o valor de R² obtido foi melhor que 0,99 mostrando a linearidade do método.

Os valores de LOD e LOQ foram obtidos a partir das curvas de calibração. Os resultados de linearidade do método proposto estão resumidos na Tabela 6.1. A precisão intra-ensaio foi determinada analisando-se 6 diferentes preparações, os valores de CV% para área e tempo de migração foram melhores que 4,2 e 2,7% respectivamente.

Tabela 6.1. Parâmetros da curva analítica para LAS

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular	5,19
Desvio padrão da inclinação	0,15
Coeficiente linear	3,49
Desvio padrão da interceção	1,48
Coeficiente de determinação	0,9967
F	1194
LOD (mg L-1)	0,92
LOQ (mg L-1)	2,95

A curva de regressão apresentou bom coeficiente de determinação ($>0,99$), F (significância da regressão) elevado, erros de regressão baixos, e os gráficos de resíduos não apresentaram tendências, ou seja, os resíduos estão distribuídos aleatoriamente ao redor de zero (não mostrado).

6.3.3. Aplicação do método desenvolvido

6.3.3.1. Amostras de detergentes comerciais

O eletrólito otimizado, foi utilizado inicialmente a análise de amostras de detergentes sólidos e líquidos, de uso doméstico. O objetivo destas análises foi o de verificar se o perfil dos tensoativos variava de acordo com a procedência, ou ainda, de acordo com a forma de apresentação (líquido ou em pó). Para este estudo foram avaliadas nove marcas diferentes de detergentes, sendo 5 na forma líquida e 4 com apresentação em pó. Neste estudo os produtos foram classificados por faixa de preço, a fim de também verificar se o custo do detergente está relacionado à concentração de LAS. Foi utilizada uma classificação para o custo dos detergentes, a fim de facilitar sua identificação: a) detergentes líquidos (500 mL) – ai) A, acima de R\$ 2,00; aii) B, entre R\$ 1,00 e R\$ 2,00; (C) C, abaixo de R\$ 1,00; b) detergentes em pó (1 kg) – bi) A, acima de R\$ 8,00; bii) B, entre R\$ 5,00 e R\$ 7,00; biii) C, entre R\$ 3,50 e R\$ 5,00.

Na Figura 6.4 são apresentados os eletroferogramas obtidos experimentalmente para as amostras de detergentes líquidos.

Figura 6.4. Separação de homólogos de LAS e isômeros de diversas amostras de detergentes líquidos comerciais de uso doméstico. Condições de análise: eletrólito de corrida, 30 mmol L⁻¹ de Tris, 15 mmol L⁻¹ de HIBA, 40% de ACN, 15 mmol L⁻¹ de Brij 35; tensão aplicada, 30 kV; injeção, 3 s, 50 mbar; temperatura do capilar, 25 °C. Todas as amostras foram diluídas em proporções equivalentes. As amostras estão classificadas de acordo com a faixa de preço.

A Figura 6.5 mostra os resultados obtidos experimentalmente para a análise de detergentes em pó comerciais de uso doméstico.

Figura 6.5. Separação de homólogos de LAS e isômeros de diversas amostras de detergentes em pó comerciais de uso doméstico. Condições de análise: eletrólito de corrida, 30 mmol L⁻¹ de Tris, 15 mmol L⁻¹ de HIBA, 40% de ACN, 15 mmol L⁻¹ de Brij 35; tensão aplicada, 30 kV; injeção, 3 s, 50 mbar; temperatura do capilar, 25 °C. Todas as amostras foram diluídas em proporções equivalentes. As amostras estão classificadas de acordo com a faixa de preço.

Foi possível observar que quanto maior o preço do produto, maior a concentração de LAS no mesmo. Ainda assim, é possível identificar um perfil das bandas similar para todos os produtos analisados, desta forma, espera-se que no ambiente aquático a identificação seja guiada pelo aspecto destas bandas obtidas e pela comparação dos espectros de absorção no UV.

6.3.4. Procedimento de extração em fase sólida

Escolha da fase estacionária e do pH de extração: as moléculas da LAS, Figura 6.1, apresentam em sua cadeia uma cauda hidrofóbica com mais de 10 carbonos. Com isso, foi utilizado um cartucho de extração com fase C18 devido a grande interação esperada entre o analito e esta fase. O grupamento sulfônico tem um

valor de pK_a muito baixo, impossibilitando sua protonação em valores de pH comumente utilizados em extração em fase sólida, desta forma, o pH da água não precisou ser ajustado.

Determinação do volume de capacidade: o sistema FIA descrito no capítulo 4, foi aplicado para determinação do volume de capacidade do SDBS. Utilizando um cartucho de 6 mL, contendo 500 mg da fase de extração C18, com vazão de 4 mL por minuto, foi possível observar que o volume de 300 mL de uma solução contendo o padrão de LAS, quando aplicado ao cartucho de extração não existe a passagem dos analitos pela fase de extração em concentrações detectáveis. O que sugere que o volume de capacidade é maior que 300 mL (dados não mostrados).

6.3.5. Análise de efluentes de ETEs

Para o estudo da determinação dos LAS em amostras de água foram utilizadas duas amostras de efluentes de ETEs, sendo a primeira localizada uma região de Cotia/SP, com alta densidade demográfica e predominantemente industrializada. A segunda amostra foi coletada em uma região de águas bem menos poluídas, localizada na Serra da Cantareira, na cidade de São Paulo/SP. O volume de 10 mL das amostras foi aplicado diretamente nos cartuchos C18, apenas passando por uma etapa de filtração antes. O cartucho foi eluído com 5 mL de metanol, após o mesmo ter sido seco sob fluxo constante de N_2 . O eluato foi seco sob fluxo de N_2 e ressuspendido em 1,25 mL de metanol:água (1:1, v/v). A Figura 6.6 apresenta os resultados obtidos para ambas as amostras.

Figura 6.6: Separação de LAS e isômeros de duas amostras de efluentes. (A) efluente de uma região predominante doméstica; (B) efluente de uma região predominantemente industrializada. Mesmas condições de análise da Figura 6.5.

Pode-se observar a presença de LAS na amostra de efluente de uma região predominantemente industrializada. Ainda é interessante observar, que o perfil obtido é muito semelhante ao obtido para os detergentes de uso doméstico. A quantificação desta amostra foi possível através da soma das áreas de todas as bandas eletroforéticas. A soma resultante foi interpolada na curva de calibração construída utilizando-se o LAS padrão (Sigma). O valor obtido foi de $8,76 \pm 0,37$ mg L⁻¹ como concentração injetada no equipamento, o que implica numa concentração de 1,09 mg L⁻¹ na amostra de água analisada. Enquanto que a amostra de efluente coletada na região da Cantareira, apresentou um valor inferior a 0,1 mg L⁻¹, baseado no limite de detecção do método desenvolvido, associado ao fator de enriquecimento resultante do procedimento de SPE.

6.4. Considerações finais

O método desenvolvido mostrou-se rápido e seletivo para análise de LAS. Os valores de R² e precisão indicaram que o método pode ser usado para quantificação dos analitos em amostras de efluentes. Cabe ressaltar que este

método foi desenvolvido em virtude da necessidade de se determinar estes compostos em amostras de efluentes de origem urbana.

6.5. Referências bibliográficas

- [1] VOGT, C., HEINIG, K., LANGER, B., MATTUSCH, J., WERNER, G. Determination of linear alkylbenzenesulfonates by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Frenesius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, n. 5, p. 508-514, jan. 1995.
- [2] HEINIG, K., VOGT, C., WERNER, G. Determination of linear alkylbenzenesulfonates in industrial and environment samples by capillary electrophoresis. **Analyst**, v. 123, n. 1, p. 349-353, feb. 1998.
- [3] RIU, J., EICHHORN, P., GUERRERO, J. A., KNEPPER, Th. P., BARCELÓ, D. Determination of linear alkylbenzenesulfonates in wastewater treatment plants and coastal waters by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis – UV detection and confirmation by capillary electrophoresis – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 889, n. 1-2, p. 221-229, aug. 2000.
- [4] LUNAR, L., RUBIO, S., PÉREZ-BENDITO, D. Analysis of linear alkylbenzene sulfonate homologues in environmental waters samples by mixed admicelle-based extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Analyst**, v. 131, p. 835-841, may 2006.
- [5] RIU, J., MARTÍNEZ, E., BARCELO, D., GINEBREDÀ, A., TIRAPU, L. LC-MS determination of linear alkylbenzene sulfonates and their carboxylic degradation products in influent and effluent water samples and sludges from sewage-treatment plants: Waste water characterization. **Frenesius Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, n. 4, p. 448-455, oct 2001.
- [6] NISHIGAKI, A., KUROIWA, C., SHIBUKAWA, M. Characterization and determination of linear alkylbenzenesulfonates in environmental water samples by high-performance liquid chromatography with a hydrophilic polymer column and electrospray ionization mass spectrometric detection. **Analytical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 143-147, jan. 2004.
- [7] DING, W-H., LO, J-H., TZING, S-H. Determination of linear alkylbenzenesulfonates and their degradation products in water samples by gas chromatography with ion-trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 818, n. 2, p. 270-279, sep. 1998.
- [8] DING, W-H., CHEN, C-T. Analysis of linear alkylbenzenesulfonates in water samples by large-volume injection-port derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 857, v. 1-2, p. 359-364, oct. 1999.
- [9] DING, W-H., FAN, J. C. H. Determination of linear alkylbenzenesulfonates in sediments using pressurized liquid extraction and ion-pair derivatization gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 408, n. 1-2, p. 291-297, mar. 2000.
- [10] DING, W-H., LIU, C-H. Analysis of linear alkylbenzenesulfonates by capillary zone electrophoresis with large-volume sample stacking. **Journal of Chromatography**, v. 929, n. 1-2, p. 143-150, sep 2001.

- [11] HERRERO-MARTÍNEZ, J. M., SIMÓ-ALFONSO, E. F., RAMIS-RAMOS, G. Separation of homologues and isomers of linear alkylbenzenesulfonates by capillary electrophoresis with sodium dodecyl sulfate, carboxylic acids and bile salts. **Electrophoresis**, v. 24, n. 4, p. 681-686, feb. 2003.
- [12] HEINIG, K., VOGT, C., WERNER, G. Determination of linear alkylbenzenesulfonates in industrial and environment samples by capillary electrophoresis. **Analyst**, v. 123, n. 1, p. 349-353, feb. 1998.
- [13] HOLT, M. S., FOX, K. K., DANIEL, M., BUCKLAND, H. Linear alkylbenzene sulfonate and boron monitoring in four catchments in the UK contribution to GREAT-ER # 11. **The Science of the Total Environment**, v. 314-316, p. 271-288, out. 2003.

Capítulo 7

Análise de fármacos em águas superficiais utilizando CE-MS/MS

7.1. Introdução

Nos últimos 25 anos a eletroforese capilar conquistou sólida posição na comunidade científica, suportada por uma vasta literatura contendo aspectos teóricos e inúmeras aplicações. Ainda assim, é restrito o número de trabalhos abordando a utilização desta técnica analítica hifenada a espectrometria de massas na análise de resíduos farmacêuticos em amostras ambientais, principalmente em águas superficiais.

Buchberger e colaboradores [1] desenvolveram um método por CE-MS para a análise dos fármacos ácido clofibrato, naproxeno, bezafibrato, diclofenaco, ibuprofeno e ácido mefenâmico em amostras de água de rio. O eletrólito de corrida foi constituído por 20 mmol L⁻¹ de acetato de amônio, pH 5,1 e o pré-tratamento da amostra foi realizado através da combinação de extração líquido-líquido e em fase sólida. Os limites de detecção alcançados com a injeção de padrões variaram de 27 a 93 µg L⁻¹, sem a etapa de pré-tratamento, necessária para análise de amostras reais. Macià e colaboradores [2] estudaram a ocorrência de três fármacos ácidos (naproxen, ácido clofibrato e bezafibrato) em amostras de água de abastecimento através da técnica de eletroforese capilar acoplada a um espectrômetro de massas, este estudo incluiu o desenvolvimento de um método de extração em fase sólida associada à extração líquido-líquido, e os limites de detecção alcançados foram de 100 ng L⁻¹ para todos os analitos, e todos os compostos estudados foram detectados nas amostras de água. Um método para a determinação de sete antidepressivos em amostras de água superficial e ETEs utilizando CE-MS com ionização por ESI foi desenvolvido por Himmelsbach e colaboradores [3]. Os limites de detecção alcançaram valores de 6 e 13 µg L⁻¹ para o antidepressivo trazodona e 39 e 53 µg L⁻¹ para sertralina em água desionizada e em água de rio, respectivamente. Para a pré-concentração da amostra foi utilizada SPE através da fase de extração poliestireno divinilbenzeno. Das oito amostras analisadas, seis apresentaram resultados positivos para antidepressivos, em particular venlafaxina, citalopram e trazodona em concentrações compreendendo o intervalo de 36 a 322 ng L⁻¹.

Este estudo teve como objetivo desenvolver uma metodologia de análise utilizando CE-MS/MS aplicada a análise dos fármacos salbutamol, cimetidina, propranolol, trimetoprima e metoclopramida em amostras de água superficial. Foi realizada uma etapa de extração em fase sólida utilizando a fase PS-DVB antecedendo no preparo das amostras.

7.2. Procedimentos experimentais

7.2.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico e as soluções foram preparadas com água desionizada (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). As soluções padrão estoque dos fármacos salbutamol, cimetidina, propranolol, trimetoprima e metoclopramida de procedência Sigma (Milwaukee, WI, E.U.A.) foram preparadas em metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) na concentração aproximada de 2000 µg/mL e mantidas sob refrigeração a 4 °C. A solução estoque de ácido fórmico (Sigma) 1,0 mol L⁻¹ utilizada no eletrólito foi preparada semanalmente e os eletrólitos utilizados nas análises preparados diariamente. Hidróxido de amônio (Merck) foi utilizado para ajuste do pH do eletrólito de corrida.

7.2.2. Equipamentos

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar P/ACE™ MDQ (Beckman Coulter) e a detecção por espectrometria de massas foi realizada em um sistema Finnigan LCQ “ion trap” (Finnigan, San Jose, CA, E.U.A.) equipado com uma fonte “electrospray” (Finnigan).

7.2.3. Condições de análise e parâmetros instrumentais

Foi utilizado um capilar de sílica fundida revestido externamente com poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) de 50 μm D.I. (375 μm D.E.) e 75 cm (10 cm até o detector) de comprimento total. O equipamento de eletroforese capilar possui controle de temperatura através da circulação de líquido refrigerante, e a temperatura do cartucho foi mantida constante a 20 °C. O “software” 32 Karat, versão 4.01 (Beckman Coulter) foi empregado para o registro e avaliação dos dados obtidos. As lavagens de condicionamento inicial do capilar, com pressão de 20 psi, foram realizadas diariamente com 20 min hidróxido de amônio 1 mol L⁻¹, 20 min água desionizada, 30 min com o eletrólito de corrida. No intervalo entre corridas o capilar foi reconicionado com lavagens de 3 min de eletrólito e no término das análises 20 min de água e 10 min de ar foram suficientes para a limpeza do capilar.

O eletrólito foi constituído por 300 mmol L⁻¹ de ácido fórmico, pH 3,1, ajustado com hidróxido de amônio. A tensão aplicada foi de 25 kV com polaridade (rampa de 0,17 min) positiva e a detecção por UV foi efetuada com filtro selecionado em 200 nm. As amostras foram introduzidas hidrodinamicamente pela extremidade mais próxima ao detector com pressão reversa de 20 psi durante 10 s. O sistema CE-MS foi operado no modo de ionização positivo com tensão de 4 kV e a temperatura do capilar do ESI foi mantida a 300 °C. Uma solução de metanol:água (50:50, v/v) contendo 50 mmol L⁻¹ de ácido fórmico foi utilizada como líquido auxiliar (“sheath liquid”) com fluxo de 3 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Os espectros de massas no modo “full scan” foram monitorados no intervalo de m/z de 100 a 400. Os resultados obtidos para os íons moleculares de cada composto protonado $[\text{M-H}]^+$ corresponderam a 240, 253, 260, 291, 300 para os fármacos salbutamol, cimetidina, propranolol, trimetoprima e metoclopramida respectivamente.

7.2.4. Procedimento de extração em fase sólida

Alíquotas de 100 mL de água coletadas no reservatório Billings (São Paulo) foram filtradas em membrana 0,45 μm (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.) com o auxílio de um sistema à vácuo e posteriormente utilizadas para na etapa extração em fase sólida. Foram adicionadas concentrações conhecidas dos padrões salbutamol, cimetidina, propranolol, trimetoprima e metoclopramida. As amostras foram submetidas aos cartuchos de extração em fase sólida constituídos 500 mg (cada) da fase estacionária poli-estireno-divinilbenzeno (PS-DVB). Os cartuchos foram pré-condicionados (para ativação da fase) com 5 mL de metanol, seguidos de 5 mL de água:metanol (50:50 v/v) e água.

As amostras foram submetidas à coluna de extração em fase sólida com um fluxo aproximado de 10 mL min⁻¹. Após a extração, a fase foi lavada com 10 mL de água desionizada e em seguida seca sob fluxo de N₂ constante durante aproximadamente 30 minutos. A eluição dos analitos foi realizada com 5 mL de metanol, e o eluato foi evaporado até completa secura sob fluxo de N₂ constante e banho de água (45 °C). Finalmente os resíduos foram ressuspensos em 1 mL do eletrólito de corrida e injetados no equipamento CE-MS/MS.

7.3. Resultados e discussão

De acordo com a Figura 7.1, a presença de no mínimo um grupamento amino, característica comum entre os fármacos em estudo, o que permite que os mesmos sejam protonados na presença de eletrólitos de caráter ácido, o qual será responsável pela condução destes analitos até a fonte de ionização e posterior detecção no sistema CE-MS. Estes fármacos são amplamente utilizados em países industrializados e o encontro destas substâncias no ambiente aquático foi previamente relatado na literatura.

Figura 7.1. Estrutura química das substâncias farmacêuticas selecionadas.

7.3.1. Composição do eletrólito de corrida

A técnica de eletroforese capilar quando acoplada a espectrometria de massas com ionização ESI leva a uma série de vantagens, tais como a possibilidade de quantificar dois ou mais compostos não resolvidos eletroforeticamente, pela extração do eletroferograma a partir da massa do íon molecular – específica para cada composto (protonado ou desprotonado), através do modo “total ion current”. Em algumas situações isso não é possível, já que determinados compostos poderão apresentar mesma massa de seu íon molecular e, portanto o processo de otimização da resolução de tais pares críticos se torna fundamental durante o desenvolvimento do método. Assim como é de suma importância levar em consideração possíveis interferentes contidos na matriz em estudo. É necessária a utilização de eletrólitos de baixa condutividade e alta volatilidade para utilização no acoplamento de técnicas de separação em meio líquido com espectrometria de massas. Sistemas com

eletrólitos contendo ácido acético, ácido fórmico juntamente com hidróxido de amônio e também em combinação com quantidades variadas do solvente orgânico metanol foram estudados.

A acidificação do meio eletroforético é de grande relevância, já que determina a extensão da ionização de cada analito individualmente. A influência da concentração de ácido fórmico foi estudada na faixa de 50 a 350 mmol L⁻¹ e os efeitos mais pronunciados foram observados em concentrações maiores que 200 mmol L⁻¹, ficando estabelecido um valor de 300 mmol L⁻¹ de ácido fórmico no eletrólito de corrida. O aumento da concentração demonstrou claramente um aumento no tempo de análise, interferindo diretamente na separação dos fármacos estudados. Hidróxido de amônio foi utilizado para o ajuste de pH do eletrólito, sendo avaliado na faixa de 2 a 4 com incrementos de 0,5, no intervalo entre 3 e 3,5 foram identificadas variações na migração dos analitos, portanto foram estudados incrementos de 0,1 nesta faixa, e finalmente o pH escolhido foi 3,1. Posteriormente avaliou-se a adição de solventes orgânicos, particularmente por proporcionar um aumento da solubilidade do eletrólito e para um provável ajuste da seletividade do sistema, portanto percentagens de metanol variando de 5 a 30 % foram adicionados, optou-se inicialmente pela não utilização de outros tipos de solventes orgânicos pelo risco do rompimento da poliimida que reveste o capilar de separação, a qual se torna frágil principalmente quando adicionado acetonitrila no eletrólito de corrida. Com a utilização de metanol observou-se que a separação dos fármacos não sofreu influência significativa, enquanto que apenas o tempo de análise aumentou com a elevação da quantidade de metanol adicionada ao eletrólito. Além disso, a resolução de todos os compostos foi prejudicada na presença de metanol. Portanto, foram obtidos resultados satisfatórios sem a presença de aditivos ao eletrólito de corrida.

7.3.2. Parâmetros instrumentais – MS

Alguns parâmetros influenciam significativamente a intensidade do sinal obtido no espectrômetro de massas, dentre eles estão a composição do líquido auxiliar (“sheath liquid”), assim como seu fluxo; a pressão do gás de nebulização; fluxo; e temperatura do gás secante.

Os parâmetros da fonte ESI foram otimizados no modo “full scan” (monitorado no intervalo m/z 100 – 400) pela infusão de 5 mg L⁻¹ de uma mistura dos padrões, dissolvidos em 200 mmol L⁻¹ de ácido fórmico, no modo positivo através do equipamento de CE com pressão constante de 20 psi durante o tempo necessário para a realização do “tuning” pelo CE-MS. A voltagem do capilar, previamente estudada, foi mantida em 4 kV enquanto a composição e fluxo do líquido auxiliar, fluxo do gás nebulizador, temperatura do capilar do ESI foram otimizados.

O líquido auxiliar é necessário para assegurar a conexão elétrica da extremidade de saída do equipamento de eletroforese capilar e o espectrômetro de massas, permitindo com isso um bom desempenho no acoplamento. O líquido auxiliar também é um dos responsáveis pela obtenção de uma corrente estável na fonte de ESI. A presença de uma alta concentração de solvente orgânico na composição do líquido auxiliar assegura uma melhor eficiência da evaporação durante o processo de ionização [4,5]. Os melhores resultados para a composição do líquido auxiliar foram obtidos com misturas de água e metanol. Pela variação da percentagem de água (20 - 80%) na mistura, uma maior intensidade e estabilidade do sinal foram observadas quando o líquido auxiliar foi composto por metanol:água (50:50, v/v). A adição de ácidos a essa mistura aumentou a condutividade do meio e a performance, resultando numa melhor estabilidade do “spray” da fonte. Após a avaliação da adição de ácido fórmico ou ácido acético ao líquido auxiliar, encontrou-se um melhor resultado com o uso de ácido fórmico na concentração de 50 mmol L⁻¹. A influência do fluxo do líquido auxiliar também foi investigada e como era esperado, maiores fluxos resultaram em uma relação sinal/ruído menor, devido a diluição dos compostos investigados, enquanto que um fluxo reduzido afetaria negativamente a

estabilidade do “electrospray”. Um bom resultado foi alcançado com fluxo de 3 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Em sistemas com ionização por ESI, a evaporação do solvente é um processo auxiliado pela alta voltagem aplicada em combinação com o gás de nebulização, aqui chamado de gás auxiliar. O gás de nebulização influencia na qualidade da separação dos analitos devido a um fluxo por pressão induzida gerado pelo gás [4-6]. Este parâmetro foi avaliado no intervalo entre 10 e 20 U.A. (unidades arbitrárias) e o aumento da pressão do gás de nebulização auxiliou positivamente no processo de evaporação iônica, bem como no aumento da sensibilidade do método. Então a pressão de nebulização escolhida para o método desenvolvido foi de 17 U.A..

7.3.3. Resultados qualitativos

A Figura 7.2 mostra um eletroferograma no modo de aquisição “base peak” com os íons moleculares selecionados dos fármacos em estudo sob condições otimizadas – indicadas na Figura. A separação foi alcançada em um tempo total de aproximadamente 20 minutos. Apesar das bandas dos fármacos propranolol, trimetoprima e metoclopramida apresentarem tempos de migração muito semelhantes, a determinação qualitativa foi possível devido às diferenças de massa molecular de cada analito.

Figura 7.2. Eletroferograma no modo “full scan”. Analitos na concentração aproximada de 1 mg L^{-1} dissolvidos em 200 mmol L^{-1} de ácido fórmico; eletrólito de corrida constituído por 300 mmol L^{-1} de ácido fórmico, pH 3,1, ajustado com hidróxido de amônio; injeção hidrodinâmica 20 psi durante 10 s; potencial de 25 kV, polaridade positiva; capilar $50 \text{ }\mu\text{m}$ D.I. x 70 cm de comprimento efetivo; ESI no modo positivo com potencial de 4 kV; líquido auxiliar constituído por 50 mmol L^{-1} de ácido fórmico em água:metanol (50:50, v/v) com fluxo de $3 \text{ }\mu\text{Lmin}^{-1}$ m/z 239,93, salbutamol; m/z 253,09, cimetidina; m/z 260,06, propranolol; m/z 291,15, trimetoprima; m/z 300,80, metoclopramida.

A Figura 7.3 apresenta os espectros de massa dos fármacos no modo MS^2 com diferentes energias de colisão (indicadas na Figura) e padrões de fragmentação distintos para cada analito.

Figura 7.3. Espectros de massa no modo MS^2 . Condições experimentais ver Fig. 7.2. Energias de colisão: m/z 239,93 (20%), salbutamol; m/z 253,09 (26%), cimetidina; m/z 260,06 (29%), propranolol; m/z 291,15 (35%), trimetoprima; m/z 300,80 (26%), metoclopramida.

As energias foram escolhidas de forma que fosse mantido o íon molecular pai de cada analito, e nos resultados apresentados o fármaco salbutamol apresentou um fragmento predominante com m/z 221,97 caracterizando uma diferença de 17,96 U, provavelmente referente à perda de uma molécula de água. O espectro do composto farmacêutico cimetidina indicou diversos fragmentos depois de submetido a uma energia de colisão de 26%, e dentre os fragmentos, o mais abundante com m/z 159,02 se deve possivelmente a uma clivagem próxima ao anel. Enquanto o fármaco propranolol apresenta os fragmentos mais abundantes com m/z 183,14 correspondente ao resíduo [(N-isopropil-N-2-hidroxi-propilamina)+H]⁺ e 116,12 correspondente ao fragmento [M-H₂O-C₃H₇NH]⁺ da molécula. O fármaco trimetoprima mostrou os fragmentos mais abundantes com m/z 230,17, 258,02 e 276, enquanto a metoclopramida obteve um fragmento mais abundante na energia utilizada durante a corrida no modo MS^2 com m/z 228,17.

7.3.4. Avaliação do desempenho do método

7.3.4.1. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através de uma mistura dos analitos diluídos em uma solução aquosa de ácido fórmico 200 mmol L⁻¹ e no intervalo de concentração de aproximadamente 5 a 35 mg L⁻¹ para cada fármaco com duas injeções para cada concentração. As áreas foram extraídas dos eletroferogramas monitorados no modo “full scan”. Os coeficientes de correlação apresentaram valores superiores a 0,98 para todos os analitos. A Tabela 7.1 apresenta os resultados para o estudo da linearidade do método.

Tabela 7.1. Parâmetros de linearidade do método.

Analito	Equação	r	Faixa linear (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Erro padrão da regressão
Salbutamol	A= 79428C - 2E+06	0,9868	6,8 – 34,1	0,8	1,6	1,75
Cimetidina	A= 45995C - 69597	0,9871	5,7 – 28,6	0,7	1,5	1,36
Propranolol	A= 59473C + 57916	0,9982	6,6 – 33,2	0,8	1,7	0,51
Trimetoprima	A= 3E+06C - 56079	0,9980	6,6 – 33,2	0,4	1,1	0,54
Metoclopramida	A= 35281C + 1E+06	0,9904	5,4 – 21,7	0,7	1,4	0,84

A=aC+b (a e b, coeficiente angular e linear da equação), onde A = área em unidade arbitrária e C = concentração em mg L⁻¹; r, coeficiente de correlação (n=2)

As curvas de regressão apresentaram coeficientes de correlação satisfatórios ($r \geq 0,9868$) e valores baixos de erros de regressão. Os valores de LOD e LOQ calculados a partir da relação sinal/ruído não são suficientes para a análise destas substâncias em amostras ambientais, mas a associação do método desenvolvido por CE-MS/MS com a técnica de extração em fase sólida tornará possível a visualização dos fármacos em concentrações menores nas amostras de água.

7.3.4.2. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida foi realizada em 100 mL de uma amostra coletada no reservatório Billings (São Paulo), enriquecida com aproximadamente 40 µg L⁻¹ de cada fármaco e submetida ao cartucho de extração em fase sólida contendo 500 mg da fase PS-DVB. O procedimento de condicionamento do cartucho foi explicado no item 7.2.4 (Procedimento Experimental). O resíduo

A Figura 7.4 apresenta o eletroferograma no modo “full scan” para os cinco fármacos adicionados a amostra de água superficial de uma amostra coletada no reservatório Billings submetida ao procedimento de extração em fase sólida.

Figura 7.4. Eletroferogramas no modo “full scan” de uma mistura dos cinco fármacos em estudo submetidas a extração em fase sólida. Condições analíticas consultar Figura 7.2. Procedimento de extração em fase sólida consultar item 7.2.4 em “Procedimento experimental”.

7.3.4.3. Recuperação

A recuperação do método foi determinada pela comparação das áreas entre uma análise realizada a partir da solução dos padrões antes de ser adicionada na amostra de água do reservatório Billings e a análise da amostra após passar pelo processo de extração em fase sólida. A diferença entre as áreas das duas análises resultou nos valores de recuperação. Os valores de recuperação estão na Tabela 7.2.

Tabela 7.2. Valores de recuperação obtidos após os experimentos de extração.

Analitos	Recuperação* (%)
Salbutamol	66,4 ± 4,8
Cimetidina	73,1 ± 4,4
Propranolol	65,1 ± 2,6
Trimetoprima	80,5 ± 7,2
Metoclopramida	78,9 ± 3,8

*(n=3)

O menor valor de recuperação alcançado foi para composto propranolol, o qual atingiu $65,1 \pm 2,6\%$ de recuperação, enquanto o maior valor se deu para a trimetoprima, com valor de recuperação de $80,5 \pm 7,2\%$. Os valores de recuperação não foram altos e provavelmente estão relacionados a constituição da matriz da amostra, que contem substâncias capazes de interferir no processo de ionização dos analitos estudados, causando uma diminuição da entrada dos mesmos no analisador “ion trap”. Estas substâncias provem de matéria orgânica que dependendo da época do ano e do local da coleta, encontra-se em maior ou menor quantidade.

7.4. Considerações Finais

Os resultados apresentados demonstraram o potencial da técnica CE-ESI-MS/MS na separação, caracterização e quantificação de substâncias farmacêuticas. A detecção por espectrometria de massas permite normalmente uma confirmação inequívoca e uma caracterização estrutural dessas substâncias, o que é um fator importante quando se trata da análise de matrizes complexas como efluentes de estações de tratamento e águas destinadas ao abastecimento público, apesar dos valores de recuperação obtidos com a metodologia proposta. Estudos mais aprofundados no que se refere às etapas que antecedem

a análise e aos fatores que interferem na ionização da amostra se faz necessário. Os resultados obtidos até o momento indicaram a seletividade e alta eficiência proporcionada por esta técnica hifenada, aliando a versatilidade da eletroforese capilar e a sensibilidade da espectrometria de massas.

7.5. Referências bibliográficas

- [1] Ahler, W., Scherwenk, E., Buchberger, W. Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 910, n. 1, p. 69-78, feb. 2001.
- [2] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguillar, C. Determination of some acidic drugs in surface and sewage treatment plant waters by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 25, n. 20, p. 3441-3449, oct. 2004.
- [3] Himmelsbach, M., Buchberger, W., Klampfl, C.W. Determination of antidepressants in surface and waste water samples by capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection after preconcentration using off-line solid-phase extraction. **Electrophoresis**, v. 27, n. 5-6, p. 1220-1226, mar. 2006.
- [4] Sheppard, R. L., Tong, X., Cai, J., Henion, J. D. Chiral separation and detection of terbutaline and ephedrine by capillary electrophoresis coupled with ion spray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 13, p. 2054, jul. 1995.
- [5] Geiser, L., Cherkaoui, S., Veuthey, J. L. Simultaneous analysis of some amphetamine derivatives in urine by nonaqueous capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 895 n. 1-2, p. 111-121, feb. 2000.
- [6] Cole, R.B.; In: *Electrospray Mass Spectrometry*; John Wiley & Sons, New York, Inc Chinchester, (1997)

Capítulo 8

Determinação de fármacos em águas superficiais utilizando LC- MS/MS

8.1. Introdução

Os fármacos compreendem um grande grupo de substâncias e moléculas quimicamente complexas. A ampla gama de classes quimicamente distintas que representam este grupo não permite uma generalização de seu comportamento químico. Muitos impactos ambientais podem ocorrer, incluindo toxicidade aguda e crônica, desequilíbrio do sistema endócrino, danos aos sistemas reprodutivos de seres aquáticos, entre outros. Sua mobilidade no solo, na água e em sedimentos pode variar de acordo com as interferências do local, mudanças climáticas, e principalmente o tipo de ação que é praticada naquele meio [1-4].

Substâncias farmacêuticas ainda não são consideradas poluentes ambientais e tampouco fazem parte de qualquer tipo de legislação no Brasil, entretanto, a presença destas substâncias tem sido alvo de estudo no meio científico, devido a possível persistência destas substâncias principalmente em ambientes aquáticos, mas também no sedimento e no solo. O tratamento a que são submetidos os efluentes em ETEs não são capazes de eliminar estes poluentes da água que será posteriormente reutilizada pela população, podendo causar problemas ainda pouco conhecidos, mas muito estudados.

Muitas destas substâncias são frequentemente detectadas em águas superficiais, destinadas ao abastecimento público, no mundo inteiro, e a técnica mais utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massas. Buseti e colaboradores [5] desenvolveram uma metodologia utilizando SPE-LC-MS/MS para determinação de 18 fármacos comerciais em efluentes e água “reciclada” na Austrália. Fizeram parte das substâncias estudadas analgésicos, antihiperlipêmicos, tranquilizantes, antitérmicos, antidepressivos, entre outros. Os limites de quantificação atingidos com o método variaram de 15 a 250 ng mL⁻¹. Pailler e colaboradores [6] investigaram a presença de analgésicos, antimicrobianos e hormônios em águas superficiais e efluentes localizados em Luxemburgo, a metodologia desenvolvida utilizando LC/MS-MS alcançou limites de quantificação de 1 ng L⁻¹ quando associado a uma etapa de SPE, exceto para os hormônios que ficaram na faixa de 6 ng L⁻¹. As amostras analisadas apresentaram “altos” níveis de ibuprofeno (10-

4000 ng L⁻¹), estrogênios (1-240 ng L⁻¹) e sulfonamidas (1-20 ng L⁻¹). Em estudo realizado por Grujić e colaboradores [7] diversas classes de substâncias foram determinadas por meio da técnica de LC acoplada a espectrometria de massas, A metodologia atingiu limites de detecção da ordem de ng L⁻¹ e uma etapa de pré-concentração da amostra antecedeu as análises. O método foi aplicado a 26 amostras de água para o monitoramento dos resíduos dos fármacos estudados. Os resultados revelaram a presença de carbamazepina, azitromicina, bem como trimetoprima e paracetamol.

Este estudo teve como objetivo a determinação de fármacos em águas coletadas do reservatório Billings através da utilização de um sistema LC-MS/MS com ionização por “electrospray” e analisador triplo quadrupolar.

8.2. Procedimentos experimentais

8.2.1. Equipamentos e parâmetros instrumentais

Os experimentos foram conduzidos em dois espectrômetros de massas descritos a seguir:

QTrap 2000: (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canadá) acoplado a um HPLC Agilent (modelo 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.) com injetor automático e forno para controle de temperatura da coluna.

API 5000: (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canadá) acoplado a um HPLC Agilent (modelo 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.) com injetor automático e forno. A temperatura do forno em ambos os sistemas foi mantida em 40 °C.

A otimização das condições de operação dos espectrômetros de massa foi por infusão direta no espectrômetro mediante o uso de uma bomba de seringa. Foram preparadas soluções individuais de cada composto a ser otimizado na concentração de 1 mg L⁻¹ para o sistema *QTrap* e 10 ng L⁻¹ para o sistema API 5000, preparados em água:acetonitrila (50:50 v/v) contendo 0,1 % de ácido fórmico e 1 mmol L⁻¹ de formiato de amônio, os mesmos foram infundidos num fluxo de 10 µL min⁻¹. O modo de operação utilizado foi o de MRM (*multiple*

reaction monitoring) devido a necessidade de uma alta especificidade e sensibilidade para a determinação dos fármacos em amostras de água. Foram otimizados os parâmetros DP (*declustering potential*), EP (*entrance potential*), CEP (*collision cell entrance potential*) CE (*collision energy*) e CXP (*collision cell exit potential*). Após, foram otimizados os parâmetros de interfaciamento, como voltagem do capilar, gases de nebulização e secagem e temperatura de secagem.

No sistema de HPLC foram utilizadas as seguintes condições:

No acoplamento ao sistema *QTrap* foi utilizada uma coluna Synergi Polar RP (Phenomenex, Torrance, CA, E.U.A.), 150 x 2 mm (comprimento x diâmetro interno) com partículas de 4 µm. As fases utilizadas foram:

Fase A: água desionizada contendo 0,1 % de ácido fórmico e 1 mmol L⁻¹ de formiato de amônio.

Fase B: acetonitrila com 5 % de água desionizada contendo 0,1 % de ácido fórmico e 1 mmol L⁻¹ de formiato de amônio.

O gradiente utilizado foi:

Fluxo: 5 µL min⁻¹.

12 minutos: 98% A, 2% B.

20 minutos: 5% A, 95% B.

30 minutos: 5% A, 95% B.

30,1 minutos: 98% A, 2%B.

No acoplamento ao sistema API 5000 foi utilizada uma coluna Symmetry (Waters, Milford, MA, E.U.A.) C8, 150 x 2 mm com partículas de 4 µm. As fases utilizadas foram:

Fase A: água desionizada contendo 0,1 % de ácido fórmico.

Fase B: acetonitrila contendo 0,1 % de ácido fórmico.

O gradiente utilizado foi:

Fluxo: 300 µL min⁻¹.

0,5 minuto: 95% A, 5% B.

2 minutos: 5% A, 95% B.

12 minutos: 5% A, 95% B.

12,1 minutos: 95% A, 5% B.

8.2.2. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico, a água desionizada (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.), solventes acetonitrila e metanol da Tédia (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), ácido fórmico Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Padrões dos fármacos paracetamol, naproxeno, carbamazepina, salbutamol, clofibrato, cimetidina, sulfametoxazol, propranolol, diazepam, trimetoprima, fluoxetina, bromazepam, norfloxacin, bezafibrato e enalapril foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, WI, E.U.A.). Soluções padrão estoque foram preparadas em metanol com concentração aproximada de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e armazenadas sob refrigeração (4°C). Foi preparada solução estoque de formiato de amônio (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em metanol, semanalmente, na concentração de 100 mmol L^{-1} .

8.2.3. Amostras

Amostras de água foram coletadas no reservatório Billings e antes da análise foram filtradas em membrana ($0,45 \mu\text{m}$). As amostras foram coletadas com profundidade de 50 cm da superfície, no período da manhã, em recipientes de vidro âmbar, e levadas imediatamente ao laboratório, filtradas e armazenadas sob refrigeração (4°C) ao abrigo da luz. As amostras coletadas apresentavam pH que variou de 6,8 a 7,2, e estas foram analisadas no prazo máximo de 48 horas após a coleta.

8.3. Resultados e discussão

8.3.1. LC-QTrap/API5000

Neste tópico serão descritos os experimentos realizados para otimização dos parâmetros experimentais utilizados para a determinação dos compostos. É importante ressaltar que essa otimização é comum para ambos os sistemas, LC-QTrap e HPLC-API 5000.

A primeira observação a ser feita é a verificação do sinal mais intenso dos compostos - modo positivo ou negativo de operação. A decisão da polaridade de operação foi feita pela inspeção do sinal operando-se no modo “full scan”, o qual se observa o sinal da massa esperada ($M+1$, ou $M-1$), o que depende da polaridade aplicada. Espera-se que compostos de caráter ácido apresentem uma intensidade de sinal maior no modo negativo, e que compostos contendo grupamentos de caráter básico, no modo positivo. Devido a disponibilidade limitada dos equipamentos LC/MS neste trabalho foram analisados apenas os compostos básicos.

Selecionada a polaridade de operação, o composto foi submetido a otimização dos parâmetros DP, EP, CE e CXP. A otimização destes parâmetros é realizada através de rampas que percorrem toda a faixa de aplicação destes potenciais, de modo a se obter um máximo de sinal. Primeiramente são otimizados os parâmetros DP e EP, estes parâmetros visam maximizar a quantidade do íon pai (previamente selecionado) que entra no sistema triplo quadrupolar. Em seguida são otimizados os parâmetros CE e CXP, os quais procuram maximizar a geração de fragmentos e o sinal gerado por esses fragmentos no detector respectivamente. Na Figura 8.1 é apresentado um exemplo da otimização dos parâmetros (DP, EP e CEP) para o composto carbamazepina.

Figura 8.1. Parâmetros DP, EP e CEP para o composto carbamazepina.

Na Figura 8.2 são apresentados os espectros de massa em “full scan” para a carbamazepina ($236 + H^+$), antes (inicial Q1) e após a otimização (final Q1).

Figura 8.2. Espectro no modo “full scan”, antes e após a otimização para o composto carbamazepina.

A Figura 8.2 indica um significativo aumento do sinal, o que demonstra a necessidade da otimização individual para cada composto.

Depois de otimizados os parâmetros da fonte, foi realizado um experimento chamado “product ion”, e com este experimento espera-se obter os fragmentos gerados a partir da fragmentação dos analitos estudados.

Na Figura 8.3 é apresentado um espectro de massas variando-se a energia de colisão, ainda para o exemplo carbamazepina. Estes espectros foram obtidos no modo MCA (“multi-channel acquisition”), modo no qual é variada a energia de colisão somando-se todos os espectros obtidos, e os de maior sinal são os escolhidos.

Figura 8.3. Espectros no modo MCA para carbamazepina.

Dos espectros apresentados na Figura 8.3 foram escolhidos quatro fragmentos mais intensos: 237/191,2, 237/192, 237/193, 237/165,2. Escolhidos os fragmentos, são determinadas as energias de colisão ótimas para a geração destes fragmentos. Na Figura 8.4 são apresentados os gráficos para a geração dos fragmentos selecionados em função da variação da energia de colisão, ainda para o exemplo carbamazepina.

Figura 8.4. Geração dos fragmentos selecionados (no modo MCA) em função da variação da energia de colisão para carbamazepina.

Determinadas as energias de colisão são então otimizados os potenciais de saída (CXP), potenciais estes que visam maximizar a energia dos fragmentos que são enviados ao detector (eletromultiplicadora). Na Figura 8.5 são apresentados os gráficos de intensidade de sinal com a variação do parâmetro CXP.

Figura 8.5 Intensidade do sinal *versus* CXP para o composto carbamazepina.

Na Tabela 8.1 são apresentados os valores otimizados no sistema *QTrap* para todos os compostos e na Tabela 8.2 os valores otimizados para o sistema HPLC/API 5000.

Tabela 8.1. Parâmetros de interfaceamento otimizados no sistema *QTrap*.

Analitos	<i>m/z</i> + 1	DP	EP	CEP	Fragm. 1 <i>m/z</i>	CE	CXP	Fragm. 2 <i>m/z</i>	CE	CXP
Paracetamol	152,0	51	10.5	8	110,2	21	4	65,1	39	4
Carbamazepina	237,1	56	10.5	12	194,2	21	4	193,2	43	4
Salbutamol	240,2	31	10	14	148,3	21	4	222,3	13	4
Sulfametoxazol	254,1	51	10.5	12	92,1	39	4	108,2	33	4
Propranolol	260,2	51	10.5	12	116,1	21	4	183,1	19	4
Diazepam	285,0	66	10.5	24	193,2	43	4	154,2	39	4
Trimetoprima	291,1	61	10.5	24	123,3	39	4	230,3	39	4
Fluoxetina	310,1	31	10.5	14	148,3	13	4	91,1	79	4
Bromazepam	318,0	66	10	14	182,2	43	4	209,2	41	4
Norfloxacin	320,1	66	10.5	26	233,2	39	4	276,2	19	6
Bezafibrato	362,1	61	11	14	139,2	31	4	121,3	41	4

Tabela 8.2. Parâmetros de interfaceamento otimizados no sistema API 5000.

Analitos	<i>m/z</i> + 1	Fragm. 1 <i>m/z</i>	DP	CE	CXP	Fragm. 2 <i>m/z</i>	DP	CE	CXP
Salbutamol	240	148	46	27	20	166	46	19	22
Trimetoprima	291	123	156	35	16	230,2	156	33	22
Propranolol	260	116,1	86	27	16	183	86	27	18
Enalapril	377	117,2	36	51	16	234,1	36	27	24
Bromazepam	318	182,2	81	45	24	209,1	81	37	20
Bezafibrato	362	139	141	37	18	316,2	141	21	24
Carbamazepina	237	165	96	61	22	194	96	29	20
Diazepam	285	154,1	166	39	20	193,1	166	45	26

8.3.1.1. Resultados para o sistema LC-*QTrap*

Na Figura 8.6 é apresentado um cromatograma no modo XIC (“extracted ion chromatogram”) dos onze padrões otimizados no modo positivo na concentração de 10 µg L⁻¹.

Figura 8.6. Cromatograma dos compostos otimizados no modo positivo para o sistema *QTrap*. 1, salbutamol, 2, paracetamol, 3, trimetoprima, 4, norfloxacin, 5, sulfametoxazol, 6, propranolol, 7, bromazepam, 8, carbamazepina, 9, fluoxetina, 10, bezafibrato, 11, diazepam.

Os limites de detecção e quantificação calculados a partir da relação sinal/ruído são apresentados na Tabela 8.3.

Tabela 8.3. LOD e LOQ para o método desenvolvido no equipamento LC-*QTrap*

Analitos	LOD (ng L⁻¹)	LOQ (ng L⁻¹)
Salbutamol	14.9	49.3
Paracetamol	104.5	344.8
Trimetoprima	3.9	12.7
Norfloxacina	162.0	534.8
Sulfametoxazol	14.2	46.7
Propanolol	6.1	20.1
Bromazepam	67.6	223.2
Carbamazepina	2.5	8.1

LOD, limite de detecção ($S/R=3$); LOQ, limite de quantificação ($S/R=10$).

A utilização do sistema *QTrap* permitiu a realização do modo MRM conjuntamente com o modo EPI (“Enhanced Product Ion Scan”), onde é possível obter simultaneamente o espectro de massa para um dado composto em três energias de colisão diferentes. Esta possibilidade é muito útil para construção de bibliotecas de massa, o que é interessante para aplicação a métodos de “screening” de composição qualitativa de amostras. Na Figura 8.7 são apresentados os espectros de massa nas energias de colisão 20, 35 e 50 para o composto trimetoprima.

Figura 8.7. Espectros de massa para o composto trimetoprima no sistema *QTrap*.

A partir dos dados obtidos para um dado composto, tais como tempo de retenção na coluna, MRM's, e espectros de massa em três energias diferentes é possível realizar uma identificação inequívoca da substância.

8.3.1.2 Resultados para o sistema API 5000

Na Figura 8.8 é apresentado um cromatograma para uma mistura de padrões otimizados no sistema API 5000. Os padrões estão na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 8.8. Cromatograma dos compostos otimizados no modo positivo no sistema API 5000. 1, salbutamol, 2, trimetoprima, 3, propranolol, 4, enalapril, 5, bromazepam, 6, bezafibrato, 7, carbamazepina, 8, diazepam.

Na Tabela 8.4 são apresentados os valores de limite de detecção e quantificação obtidos através da relação sinal/ ruído no sistema API 5000.

Tabela 8.4. Limites de detecção e quantificação obtidos no sistema API 5000.

Analitos	LOD (ng L⁻¹)	LOQ (ng L⁻¹)
Carbamazepina	0,3	0,8
Salbutamol	5,6	16,8
Propranolol	2,9	9,6
Diazepam	2,3	7,6
Trimetoprima	1,0	3,2
Bromazepam	2,2	7,1
Bezafibrato	4,3	14,1
Enalapril	4,8	15,8

LOD, limite de detecção ($S/R=3$); LOQ, limite de quantificação ($S/R=10$).

Como é possível observar, na Tabela 8.4, os valores de limite de detecção e quantificação são menores que os valores obtido utilizando-se o sistema *QTrap*, o que mostra a alta eficiência da fonte *QJet*.

Devido à alta sensibilidade alcançada com o uso do sistema API 5000, optou-se por utilizar este sistema na determinação de fármacos em água.

Para a análise de amostras de água foi utilizada uma amostra de água da represa Billings (São Paulo/SP).

8.3.2. Análise de amostra de água do reservatório Billings utilizando o sistema LC-MS/MS-API 5000

As amostras de água foram coletadas e acondicionadas em frascos âmbar e armazenados a 4 °C. O tratamento da amostra consistiu apenas de uma filtração em filtro de membrana 0,45 µm, logo a amostra foi injetada diretamente no sistema API 5000. Na Figura 8.9 é apresentado o cromatograma da amostra.

Figura 8.9. Cromatograma da amostra coletada na represa Billings.

O cromatograma obtido a partir da amostra coletada na represa Billings apresentou apenas o composto carbamazepina. É importante ressaltar que a amostra não passou por nenhum tratamento prévio, tal como pré-concentração, sendo apenas filtrada e injetada diretamente no equipamento.

Na Tabela 8.5 são apresentados os dados de quantificação para carbamazepina.

Tabela 8.5. Concentração de carbamazepina encontrada na represa Billings.

Analito	Concentração (ng L⁻¹)	DP	CV(%)
Carbamazepina	20,4	0,6	3,0

Na Tabela 8.6 são apresentados os dados de recuperação para a carbamazepina em dois níveis.

Tabela 8.6. Dados de recuperação para o composto carbamazepina em dois níveis de concentração.

Analito	Concentração (ng L⁻¹)	Recuperação (%)
Carbamazepina	10	100,4
	20	92,4

8.3.2.1. Efeitos da matriz na ionização das substâncias

A fim de verificar o efeito da matriz na análise de fármacos em águas foram construídas duas curvas de calibração, uma em água desionizada e outra na matriz. A verificação do efeito de matriz foi feita comparando-se os valores dos coeficientes angulares das curvas de calibração. Com isso espera-se que um efeito de supressão de ionização reduza o valor de coeficiente angular e um efeito de promoção de ionização aumente o coeficiente angular em relação ao coeficiente angular obtido da curva em água desionizada. Na Tabela 8.7 são apresentados os valores de coeficiente angular e o coeficiente de correlação, bem como o desvio dos coeficientes obtidos. As curvas de calibração estavam em uma faixa de concentração entre 5 e 100 ng L⁻¹.

Tabela 8.7. Avaliação do efeito de matriz dos fármacos estudados em água.

Analitos	Inclinação da curva Água desionizada	Inclinação da curva Água Billings	Desvio das inclinações (%)	R²
Carbamazepina	2747,6	2887,4	5,1	0,9979
Salbutamol	2293,5	2502,4	9,1	0,9991
Propranolol	268,2	387,8	44,6	0,9982
Diazepam	393,0	421,1	7,2	0,9987
Trimetoprima	362,3	471,0	30,0	0,9906
Bromazepam	44,0	156,0	254,4	0,9988
Bezafibrato	188,3	193,1	2,5	0,9958
Enalapril	541,4	549,2	1,5	0,9968

Os dados obtidos durante os experimentos indicam que os analitos propranolol, trimetoprima e bromazepam sofreram um aumento em sua ionização, ou seja, o sinal na matriz é maior que o sinal em água desionizada. O efeito mais marcante ocorreu com o bromazepam. Para todos os outros compostos (incluindo a carbamazepina, encontrada na represa Billings) não houve uma variação significativa, o que está de acordo com os dados de recuperação apresentados na Tabela 8.6.

8.4. Considerações finais

A espectroscopia de massas mostrou-se eficiente para a análise de fármacos em água superficial. Ambos os sistemas apresentaram uma alta sensibilidade para os compostos avaliados, entretanto, o sistema API 5000 apresentou sensibilidade superior comparado ao sistema *QTrap*. Entretanto, o sistema *QTrap* permite a obtenção simultânea de espectros de massa em diferentes energias de colisão, o que é útil para a pesquisa de outros analitos em amostras de água. A utilização do sistema *QTrap* necessita de um passo de pré-concentração em fase sólida.

8.5. Referências bibliográficas

- [1] ENICK, O. V., MOORE, M. M. Assessing the assessments: Pharmaceuticals in the environment. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 27, p. 707-729, 2007.
- [2] CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 185-194, 2003.
- [3] STUMPTER, J. P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview. **Acta Hydrochimica et hydrobiologica**, v. 33, n. 1, p. 9-16, mar. 2005.
- [4] HALLING-SØRENSEN, B., NIELSEN, S. N., LANZKY, P. F., INGERSEV, F., LÜTZHØFT, H. C. H., JØRGENSEN, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – A review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357-393, 1998.
- [5] BUSETTI, F., LINGE, K. L., HEITZ, A. Analysis of pharmaceuticals in indirect potable reuse systems using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 31, p. 5807-5818, jul. 2009.
- [6] PAILLER, J. Y., KREIN, A., PFISTER, L., HOFFMANN, L., GUIGNARD, C. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 16, p. 4736-4743, aug. 2009.
- [7] GRUJIĆ, S., VASILJEVIĆ, T., LAUŠEVIĆ, M. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography – ion trap – tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 25, p. 4989-5000, jun. 2009.

Capítulo 9

Conclusões

É importante destacar, que apesar da sensibilidade limitada com a utilização de detectores ópticos em eletroforese capilar, o que denota uma reduzida faixa de detecção, esta condição pode ser alterada por características inerentes a técnica, com o uso de estratégias de enriquecimento em linha associadas a técnicas de preparo da amostra.

Eletroforese capilar permitiu o desenvolvimento de metodologias com análises rápidas, alta eficiência das bandas e boa repetitividade. Pode-se destacar que foi possível aumentar a seletividade das metodologias desenvolvidas variando-se as condições de operação (pH, presença de tensoativos aniônicos ou neutros) e as condições experimentais.

A eletroforese capilar permitiu a detecção de tensoativos em efluentes de uma região de alto impacto industrial, demonstrando a persistência destas substâncias e ainda a probabilidade de toxicidade aguda ou crônica a seres do ambiente aquático. O método desenvolvido foi rápido e eficiente.

A possibilidade de detecção de substâncias comumente empregadas em diversos produtos de uso diário, tais como os parabenos, utilizado como bacteriostático, foi explorada pela técnica, com o uso de estratégias de enriquecimento em linha para uma melhora significativa da sensibilidade do método, quando comparado a análises com injeção convencional.

A utilização da técnica de extração em fase sólida permitiu um aumento da concentração dos analitos contidos na amostra e ainda o “clean up” da mesma em todas as metodologias desenvolvidas. O estudo de parâmetros físico-químicos no desenvolvimento da metodologia utilizando extração em fase sólida permitiu modular o procedimento de extração e o comportamento das substâncias na amostra. A utilização de experimentos de eluição para determinação dos volumes de capacidade é uma estratégia eficaz podendo ser utilizada para estudos sobre a extração em fase sólida.

A utilização da espectrometria de massas associada a eletroforese e cromatografia líquida de alta eficiência permitiu o desenvolvimento de métodos seletivos e sensíveis. Ainda é necessário um estudo aprofundado da matriz de cada amostra, dos possíveis interferentes no processo de ionização, para que um aumento da sensibilidade possa ser alcançado quando tratamos da hifenização de eletroforese capilar com espectrometria de massas. Além disso, foi possível a utilização de um equipamento que proporciona valores de detecção muito baixos, através de um sistema de acoplamento entre HPLC e espectrometria de massas. Responsável pela detecção do fármaco carbamazepina no reservatório Billings localizado no estado de São Paulo, destinado ao abastecimento de uma parte da população paulista.

Todas as técnicas utilizadas neste trabalho demonstraram importantes resultados e as qualidades de cada técnica se complementam e são estabelecidas como as mais indicadas para a análise de micropoluentes emergentes em amostras de origem ambiental.

Apêndice I

I.1. Preparo da amostra

I.1.1. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE, do inglês “solid-phase extraction”) é uma das diversas técnicas de preparação de amostras disponíveis para o analista. Esta técnica proporciona um vínculo entre o estágio de coleta da amostra e a etapa da análise. A SPE é apresentada de muitas formas criativas, e raramente é utilizada sem outros passos de preparo da amostra, podendo ser acoplada com diversas técnicas analíticas ou outros métodos de preparação [1].

SPE é considerada uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de retenção idênticos aos envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Utiliza usualmente uma pequena coluna aberta, denominada cartucho de extração, a qual contém a fase sólida (conhecida como fase estacionária em cromatografia). Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, ou fase de extração, com alguns μm de diâmetro de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros. A solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada com vácuo moderado ou pressionada levemente com uma seringa ou gás, de forma a penetrar na fase de extração. Depois de drenada toda a fase líquida, o analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente. A Figura I.1 ilustra esquematicamente as principais etapas envolvidas na SPE quando o objetivo é isolar um determinado composto ou ainda uma classe de compostos presentes em uma amostra complexa.

Figura I.1. Ilustração esquemática das etapas envolvidas em um procedimento de SPE.

Normalmente, o procedimento de SPE envolve quatro etapas, descritas brevemente a seguir [2]:

- i. *Condicionamento do cartucho:* etapa destinada à ativação dos sítios existentes na fase sólida; o solvente utilizado dependerá principalmente do material a ser ativado. Um dos fatores mais relevantes é não deixar que o material contido no cartucho seque, ou seja, não permitir que todo o solvente seja eliminado, para evitar a formação de caminhos preferenciais, comprometendo com isso a extração;
- ii. *Introdução da amostra:* quando ocorre a retenção de um ou uma classe de analitos, e às vezes de alguns interferentes. Pode variar de microlitros até litros de amostra. A velocidade de aplicação da amostra pode ser crítica, idealmente esta etapa pode ser lenta, com vazão inferior

a 5 mL por minuto. Isso pode ser obtido controlando-se o vácuo, ou a pressão aplicada durante a etapa de adição da amostra;

- iii. *Remoção dos interferentes:* esta etapa é responsável pela limpeza da coluna para retirada dos interferentes menos retidos que os analitos. Esta etapa é realizada com um solvente que não possua força suficiente para remover os analitos de interesse da fase de extração. Tipicamente, a solução deve conter menos solvente orgânico, menor concentração salina ou encontrar-se em um pH ideal para eluição apenas dos interferentes;
- iv. *Eluição e coleta do analito:* o ideal é que a eluição dos analitos de interesse seja realizada em um pequeno volume de eluente, de forma que a solução coletada já se encontre na concentração adequada para análise; entretanto, também se costuma submeter o resíduo de eluição até secar e posteriormente ressuspendê-lo em outro solvente apropriado para análise, que pode ser diferente do solvente de eluição. A escolha do eluente é importante, pois este deverá ser idealmente seletivo para a eluição apenas dos analitos, e não dos interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior. Em geral, o solvente de eluição deverá ter maior força de eluição que o solvente utilizado na etapa anterior.

Dentre os benefícios mais citados da utilização desta técnica em relação a extração líquido-líquido (LLE, do inglês “liquid liquid extraction”) estão os reduzidos tempos de extração associados a um custo também reduzido, e o baixo consumo de solventes orgânicos, o que resulta em um contato reduzido do analista com estes solventes de toxicidade significativa. Outra vantagem é a de que solventes miscíveis com a matriz da amostra podem ser utilizados na eluição dos analitos. A possibilidade de automação da técnica aumenta a frequência analítica, pois extrações simultâneas podem ser realizadas. A SPE promove elevados fatores de concentração quando comparados a LLE, podendo ser utilizado como forma de armazenar substâncias (quando retidas na fase de extração) para posterior derivatização.

1.1.2. Mecanismos de separação

Os mecanismos de separação em SPE são os mesmos da cromatografia líquida, como consequência, as fases sólidas empregadas em SPE também são as mesmas. A escolha apropriada da fase depende da natureza do analito de interesse e da matriz na qual o mesmo se encontra. Os principais mecanismos compreendem: i) adsorção (fase normal), ii) partição (fase reversa), iii) troca iônica, e iv) exclusão por tamanho. Esses mecanismos estão associados a processos químicos, físicos e mecânicos que atuam durante a separação. Dentre as principais forças químicas atuantes entre as moléculas do analito e do sorvente (fase sólida) destacam-se: i) forças iônicas, ii) ligações de hidrogênio, iii) interações do tipo dipolo-dipolo, iv) dipolo-dipolo induzido, e v) dipolo induzido-dipolo induzido (forças de dispersão) [3].

1.1.3. Fases de extração

Uma vez que as fases sólidas utilizadas em SPE são similares àquelas empregadas em cromatografia líquida, os mecanismos de separação também são similares. Alguns materiais como sílica gel, alumina, silicato de magnésio (Florasil), carvão ativado, polímeros (poliestireno divinilbenzeno) e fases baseadas em sílica quimicamente ligadas são amplamente empregados em SPE [3,4]. Dependendo da natureza do grupamento ligado à sílica, ou do co-polímero, a fase poderá ser classificada como não polar, polar ou trocadora de íons. Algumas fases contendo cianopropil ou aminopropil quimicamente ligados à sílica podem ser utilizadas tanto no modo de fase normal quanto de fase reversa. Usualmente, as fases poliméricas apresentam como principal vantagem em relação à sílica quimicamente ligada o fato de poderem ser utilizadas na faixa completa de pH. A principal desvantagem é o maior tempo de condicionamento dos cartuchos contendo estas fases poliméricas.

Em SPE, a fase sólida deve possuir poros com uma grande área superficial, ser livre de impurezas lixiviáveis, exibir estabilidade em relação à matriz da

amostra e de solventes de eluição e, ainda, possuir uma boa superfície de contato com a solução da amostra.

I.1.4. Estratégias para o desenvolvimento da metodologia de extração em SPE

I.1.4.1. Seleção do modo de extração

A escolha do modo de extração depende de inúmeras variáveis experimentais, incluindo o fato de ser desejável aprisionar os analitos ou a matriz na fase sólida, a natureza da matriz e dos analitos de interesse, a concentração dos analitos na matriz, entre outros fatores.

Existem três modos principais de operação em SPE: limpeza da amostra (“clean-up”), concentração e remoção da matriz.

No modo de *concentração da amostra*, o interesse é passar através da fase sólida um grande volume de solução contendo os analitos de interesse em concentração baixa. Os compostos serão continuamente concentrados na fase de extração, enquanto a matriz e as impurezas indesejáveis serão eliminadas e descartadas. A eluição posterior dos analitos, em um pequeno volume de eluente não polar, causará uma concentração significativa dos analitos de interesse, para posterior análise empregando uma metodologia adequada.

Para análise de amostras ambientais, que contenham compostos de caráter ácido, durante o desenvolvimento do método, deve-se levar em consideração a presença de interferentes provenientes da matriz em estudo, tais com ácidos húmicos e fúlvicos, que são co-extraídos com os analitos de interesse, na etapa de SPE, podendo assim interferir na detecção dos mesmos [5,6].

1.1.4.2. Seleção da fase de extração

A seleção da fase sólida segue, na maioria das vezes, as mesmas regras utilizadas para a escolha da fase estacionária em cromatografia líquida. O primeiro critério a levar em consideração é a existência ou não de informações a respeito do(s) analito(s) de interesse e da matriz onde se encontra(m). Isso auxiliará na definição do mecanismo a ser empregado e, a partir daí, o modo de separação: adsorção, partição, troca iônica, exclusão por tamanho, etc. A natureza da matriz também é um fator importante a ser considerado, já que o conhecimento das impurezas a serem eliminadas também auxilia na escolha da fase.

As fases sólidas comumente utilizadas em SPE podem ser divididas em [7]:

- i. *Sorventes polares:* em geral os mais utilizados em SPE com fase normal são sílica (SiO_2)_x, alumina (Al_2O_3), silicato de magnésio (MgSiO_3 ou Florisil), e as sílicas ligadas quimicamente a grupos funcionais altamente polares tais como aminopropil $[(\text{SiO}_2)_x-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]$ -, cianopropil $[(\text{SiO}_2)_x-(\text{CH}_2)_3\text{CN}]$ -, e diol $[(\text{SiO}_2)_x-(\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})]$ -. As interações entre o soluto e o sorvente de natureza polar são controladas por fortes interações intermoleculares, incluindo ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, interações do tipo $\pi - \pi$ e dipolo-dipolo induzido.
- ii. *Resinas poliméricas apolares:* as fases poliméricas utilizadas no preenchimento de cartuchos de SPE possuem como característica principal uma maior capacidade que a sílica e seletividades normalmente superiores às aquelas obtidas com as fases derivadas de sílica [8]. Além disso, podem ser empregadas em toda faixa útil de pH e com os mais diversos tipos de solventes. No final dos anos 80, uma resina polimérica formada por ligações cruzadas de poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB, do inglês “polystyrene-divinylbenzene”) foi introduzida comercialmente. A resina de PS-DVB é caracterizada pelo seu tamanho de partícula pequeno – aproximadamente 85 Å – quando comparada a outras fases de extração.

Ainda, tem como uma de suas principais vantagens, o fato de a recuperação não ser afetada pelo tempo de secagem entre a etapa de condicionamento e equilíbrio, enquanto que para as fases do tipo C18 isto pode ser um parâmetro crítico, diminuindo as taxas de recuperação. O melhor desempenho alcançado pela resina de PS-DVB se deve a sua alta hidrofobicidade e área superficial – que pode atingir até $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Seu mecanismo de retenção é baseado em interações do tipo $\pi - \pi$ entre os grupamentos aromáticos da fase e dos compostos de estudo e ainda por meio de forças de Van der Waals.

- iii. Sorventes quimicamente ligados à sílica: são conhecidos por serem as fases de extração mais comercializadas nas últimas décadas. São baseadas em uma reação química entre a sílica e organosilanos através de seus grupamentos silanol presentes na superfície, produzindo ligações covalentes estáveis, Si-O-Si-C-. Além de poderem ser subdivididos em polares, não polares ou de troca iônica, de acordo com a natureza dos grupamentos que serão quimicamente ligados a sílica, são também classificados como *fase normal*, ou seja, o sorvente é mais polar que o eluente, e, de forma análoga, quando o sorvente é menos polar que o eluente, o termo empregado é *fase reversa*. São exemplos de sorventes quimicamente ligados à sílica aqueles produzidos como fase reversa, incluindo: grupamentos hidrofóbicos, alquil alifáticos, tais como octadecil (C18), octil (C8), etil (C2), ou ciclohexil, que interagem com a sílica através de mecanismos de interação covalente. Alguns grupamentos funcionais incluindo ácidos carboxílicos, ácido sulfônico, aminopropil, ou aminas quaternárias podem sofrer interações com a sílica, produzindo fases trocadoras de íons.
- iv. Existem outras classes de sorventes, utilizados em menor escala, mas com vários estudos na literatura, dentre os mais conhecidos estão as fases baseadas em reconhecimento molecular, resinas poliméricas funcionalizadas, sorventes de carbono grafitizado, de troca iônica, baseados em imunoafinidade, etc.

1.1.4.3. Escolha do pH e vazão da amostra

O pH da amostra é considerado um parâmetro importante na retenção dos analitos de interesse na fase sólida durante alguns processos de SPE.

Quando são empregados procedimentos envolvendo *fase reversa*, usualmente com um sorvente constituído de sílica quimicamente ligada, o pH da amostra e solvente de lavagem devem ser ajustados de modo a aumentar a retenção dos analitos. Se o soluto que será submetido ao cartucho de extração possuir caráter ácido ou básico, na maioria dos casos, o pH ideal de extração será aquele em que os grupamentos funcionais dos analitos encontram-se na forma neutra. Um artifício bastante utilizado também é o inverso deste procedimento, ou seja, o pH é ajustado para que os analitos não sejam retidos no cartucho de extração e sim as impurezas contidas na matriz, com isso é possível diminuir a concentração dos interferentes.

Quando se utiliza *fase normal* também em cartuchos de extração contendo uma fase de sílica quimicamente ligada, o pH normalmente não influenciará de forma significativa na extração, pois os solventes utilizados neste processo são tipicamente orgânicos e não polares, como por exemplo, hexano.

Em mecanismos de *troca iônica*, a retenção dos analitos é dependente do pH da amostra e da solução de condicionamento. Para que os solutos sejam retidos no sorvente escolhido, o pH deve ser ajustado de forma que o analito e seus grupos funcionais adquiram carga oposta ao grupamento funcional contido na superfície da sílica. Assim, será possível a ligação reversível entre os grupamentos funcionais dos analitos e da fase.

Para *sorventes poliméricos*, nos quais o principal mecanismo de retenção é do tipo interações π - π , a extração não depende do pH na maioria das vezes. Espera-se com isso que estes sorventes possam ser aplicados para extração simultânea de analitos ácidos, básicos e neutros, sem a necessidade de ajuste de pH da amostra.

A vazão da amostra e seu volume também são fatores importantes para o sucesso da extração, pois quanto maior for o tempo em que a solução da amostra permanece em contato com o sorvente, maior será a retenção dos analitos de interesse.

1.1.4.4. Determinação do volume de capacidade da fase

O volume de capacidade (“breakthrough volume”) pode ser definido como o volume máximo de amostra que pode ser percolado por um tubo de extração sem que ocorram perdas do analito de interesse, e, portanto diminuição de sua recuperação. Este parâmetro é dependente das interações entre o analito, o solvente da amostra e o tipo de sorvente empregado.

O volume de capacidade é estabelecido por uma curva, como indicado na Figura 1.2.

Figura 1.2. Representação de uma curva de “breakthrough”. V_B é o volume de “breakthrough”; V_R é o volume de retenção, ou seja, de eluição dos analitos; V_C corresponde ao máximo volume de amostra com a máxima concentração de analito; C_0 é a máxima concentração do analito na amostra; σ_v é o desvio padrão da derivada da curva. Adaptado referência [9].

Na fase inicial, uma amostra de concentração fixa, e normalmente a uma velocidade constante, é submetida ao cartucho de extração. Os analitos são quantitativamente retidos durante esta fase inicial pelo sorvente até o momento em que o volume de amostra excede a capacidade de retenção do mesmo. A quantidade de amostra excedente não será retida quantitativamente, e com isso, a concentração dos analitos que entram e saem do cartucho é igual. No ponto da curva em que qualquer concentração de amostra é detectada na extremidade de saída do cartucho, é então chamado de volume de “breakthrough” (V_B). O volume de “breakthrough”, é definido como 1, 5 ou 10% da concentração inicial do analito que é submetido ao cartucho de extração. Preferivelmente 1% é utilizado como volume de “breakthrough”, pois se espera que a recuperação fique mais próxima de 100%. Este é um parâmetro importante em SPE, pois indica qual o volume máximo de amostra que pode ser pré-concentrado, sendo que dois fatores são os principais responsáveis pelo volume de breakthrough: *retenção insuficiente do analito pelo sorvente e sobrecarga do sorvente* [52].

1.1.4.4.1. Determinação do volume de capacidade a partir da constante de distribuição sólido-líquido

Um método interessante para determinação do volume de capacidade foi apresentado por Ferreira e colaboradores [10], sendo o volume de capacidade dado por:

$$V_B = \frac{1}{\sqrt{a_0 + a_1 / N + a_2 / N^2}} (1 + k_s) V_M$$

(1.1)

onde a_0 , a_1 e a_2 são constantes [54], N é o número de pratos da coluna, que pode se aproximado ou determinado experimentalmente, k_s é o fator de retenção para o analito S e V_M é o volume morto da coluna de SPE. O valor de

k_s pode ser obtido a partir da constante de distribuição, K_s , do analito S entre a fase móvel e a fase sólida:

$$k_s = K_s \phi$$

(1.2)

onde Φ é a razão de volumes entre as fases líquida e sólida no cartucho de SPE. Assim sendo, o volume de capacidade pode ser determinado a partir da constante de distribuição K_s e valores de V_M e Φ .

1.1.4.5. Seleção do solvente de lavagem

Um parâmetro importante após a passagem da amostra pelo cartucho de extração é a lavagem do sorvente. Normalmente esta lavagem é realizada submetendo-se um pequeno volume de solvente ou uma mistura de solventes pela fase de extração; com isso espera-se que apenas impurezas sejam eliminadas. É importante levar em consideração a série eluotrópica do solvente – descrita a seguir.

1.1.4.6. Seleção do solvente de eluição

A exemplo da escolha da fase sólida, a escolha do solvente de eluição em SPE segue os critérios utilizados em cromatografia líquida. A escolha será baseada nas propriedades dos solventes candidatos, levando em consideração a toxicidade do mesmo, bem como seu ponto de ebulição. A Tabela 1.1 apresenta uma lista dos principais solventes utilizados em SPE, e misturas de solventes, juntamente com a polaridade relativa de cada um, denominada valor eluotrópico, simbolizada por ε° . O valor eluotrópico demonstra a força dos solventes na eluição de determinados solutos adsorvidos em um tipo de fase

sólida. Quanto maior o valor de ε° do solvente, maior será sua força de eluição e, portanto, mais facilmente removerá o analito da fase sólida [7].

Solventes apolares, como por exemplo, o hexano, apresentam ε° próximo de zero, enquanto solventes fortemente polares como o metanol possuem ε° próximo de um. Solventes com polaridade intermediária como acetonitrila e isobutanol apresentarão valores de ε° próximo de 0,5.

Série eluotrópica consiste em uma série de solventes de diferenças forças usados para eluir os analitos, ou para limpar a coluna.

Tabela I.1. Série eluotrópica utilizada na seleção do solvente de eluição em SPE. Adaptada da referência [7].

Solvente	Valor eluotrópico (ε°)
Pentanol	0,00
n-hexano	0,00
Ciclohexano	0,03
Benzeno	0,27
Dietil éter	0,29
Éter terc-butil metílico	0,29
Clorofórmio	0,31
Diclorometano	0,32
Acetona	0,43
Acetato de etila	0,45
Acetonitrila	0,50
Álcool isobutílico	0,54
2-propanol	0,63
Metanol, diclorometanol (20:80)	0,63
Metanol, éter dietílico (20:80)	0,65
Metanol, acetonitrila (40:60)	0,67
Metanol	0,73
Ácido acético glacial	> 0,73
Água	> 0,73

1.2. Características importantes das fases sólidas poliestireno divinilbenzeno e C18

Poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno é uma fase versátil, que resulta da copolimerização do estireno com divinilbenzeno, de acordo com a reação da Figura 1.3.

Figura 1.3. Reação de copolimerização do estireno com divinilbenzeno resultando na fase estacionária poliestireno divinilbenzeno.

A fase PS-DVB é ideal para a análise simultânea de resíduos em amostras de caráter ambiental, as quais normalmente apresentam compostos de caráter ácido, básico e neutro simultaneamente. Devido ao mecanismo de retenção com interações do tipo $\pi - \pi$, é possível a utilização desta resina em qualquer faixa de pH, sem a necessidade de ajustar o pH independentemente para compostos ácido (redução do pH) e básicos (aumento do pH). Espera-se com o uso desta fase, poder extrair simultaneamente os analitos de interesse.

Figura I.4. Estrutura da fase reversa C18.

A fase C18 foi escolhida, pois espera-se que os analitos de interesse sejam menos polares que as impurezas contidas na matriz, portanto, uma fase sólida operando com característica de fase reversa é recomendada. C18 é uma fase sólida típica, neste caso constituído de sílica quimicamente ligada a um grupamento orgânico apolar. Enquanto os analitos não polares ficam retidos na fase sólida não polar, as impurezas polares serão eluídas juntamente com a matriz. Finalmente os analitos não polares serão removidos da fase sólida com uma pequena quantidade de solvente menos polar que água como, por exemplo, MeOH. Assim os analitos de interesse podem ser pré-concentrados e há também uma redução na quantidade de interferente.

As duas fases, C18 e PS-DVB possuem além da diferença estrutural, diferentes propriedades físico-químicas, descritas na Tabela I.1 [8].

Tabela I.1. Propriedades físico-químicas das duas fases utilizadas nos estudos de extração.

Fase	Suporte	Área superficial média (m² g⁻¹)	Tamanho de partícula média (μm)	Tamanho de póro médio (Å)	Mecanismo de retenção
C18 PS- DVB	sílica	450 - 550	50 - 60	65 - 75	fase reversa
	polímero	500 - 1000	75 - 150	50 - 300	π - π

(Å, angstrom; μm, micrômetros.)

Além das diferentes propriedades físico-químicas, a estabilidade do pH de extração para as fases PS-DVB e C18 variam de 1 a 14 e 3 a 11, respectivamente. Uma das principais vantagens de uma fase polimérica, além da ampla faixa de pH de extração é o fato de a recuperação não ser afetada pelo tempo de secagem entre a etapa de condicionamento e eluição, enquanto que para fases do tipo C18 isto pode ser crítico [2].

1.3. Referências bibliográficas

- [1] WINEFORDNER, J. D. **Sample preparation techniques in analytical chemistry**, John Wiley & Sons, New Jersey, 2003.
- [2] Supelco – **Guide to solid phase extraction**, 1998. Disponível em: <www.supelco.com>. Acesso em maio de 2007.
- [3] POOLE, S. K., DEAN, T. A., OUDSEMA, J. W., POOLE, C. F. Sample preparation for chromatographic separation: an overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 236, n. 1, p. 3-42, 1990.
- [4] FONT, G., MAÑES, J., MOLTÓ, J. C., PICÓ, Y. Solid-phase extraction in multi-residue pesticide analysis of water. **Journal of Chromatography A**, v. 642, n. 1-2, p. 135-161, 1993.
- [5] JÁUREGUI, O., GÁLGERAN, T. Determination of phenols in water by on-line solid-phase disk extraction and liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytical Chimica Acta**, v. 340, n. 1-3, p. 191-199, mar. 1997.
- [6] AGUILLAR, C., FERRER, I., BORRULL, F. MARCÉ, R. M., BACELÓ, D. Comparison of automated on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization and particle beam mass spectrometry for the determination of a priority group of pesticides in environmental waters. **Journal of Chromatography A**, v. 794, n. 1-2, p. 147-163, jan. 1998.
- [7] LANÇAS, F. M. **Métodos cromatográficos de análise – Extração em fase sólida (SPE)**. RiMa Ed., São Carlos, SP, 2004.
- [8] **Polymeric sorbents for sample preparation**. Disponível em: <www.phenomenex.com>. Acesso em outubro de 2007.
- [9] BOUVIER, E. S. P. Polymer sorbents for solid-phase extraction. In: **American Chemical Society National Meeting**, Las Vegas, 1997.

Apêndice II

II.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “high performance liquid chromatography”) é uma das técnicas cromatográficas mais utilizadas para separar e determinar espécies em uma grande variedade de matrizes. Cromatografia é um método físico-químico de separação, onde ocorre um equilíbrio de distribuição do soluto entre duas fases: uma fase fixa sólida ou com líquido polar ou apolar ligado (chamada fase estacionária) recheando o interior de uma coluna e uma fase móvel que atravessa a fixa contida na coluna. Assim, a fase móvel proveniente de um reservatório de solvente é bombeada constantemente através da coluna cromatográfica. A análise inicia quando a amostra é introduzida na coluna por meio de uma válvula de injeção. A partir desta, a amostra é empurrada para a coluna pela fase móvel, onde ocorrerá a separação [1,2].

Uma ampla gama de detectores pode ser empregada com esta técnica cromatográfica, tais como absorbância, fluorescência, eletroquímico, índice de refração, condutividade, espalhamento de luz, fotoionização e, ultimamente, a combinação da cromatografia líquida com a espectrometria de massas tem proporcionado análises com alta seletividade, uma vez que picos não resolvidos podem ser isolados, monitorando-se apenas um valor de m/z selecionado. Esta combinação também pode fornecer a massa molar e informação estrutural e uma análise quantitativa exata [3,4].

II.2. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica poderosa utilizada para auxiliar na identificação de compostos desconhecidos e quantificar substâncias conhecidas. Basicamente um espectrômetro de massas se divide em uma fonte de íons, um analisador da relação carga/massa destes íons e um detector [5]. O princípio em que a técnica se baseia é simples e envolve a

geração de íons que a seguir são detectados, entretanto, a sofisticação surge nos métodos que são utilizados para a geração desses mesmos íons e no modo de analisá-los.

A fim da obtenção de resultados sensíveis e seletivos a espectroscopia de massas normalmente é utilizada em conjunto com técnicas cromatográficas como, por exemplo, a cromatografia a gás (GC) [6,7], a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [8-10] e a eletroforese capilar [11].

II.2.1. Hifenização HPLC com espectrometria de massas

O acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas é uma ferramenta atrativa para análise de fármacos em água devido aos baixos valores de limite de detecção alcançados.

A seguir serão apresentados os esquemas de duas fontes de electrospray utilizadas neste trabalho [12], sendo a primeira delas utilizada juntamente com o espectrômetro de massas *QTrap* (sistema híbrido triplo quadrupolo “ion trap”), Figura II.1, e a segunda do sistema triplo quadrupolo API 5000 (*Qjet* – *ion guide*), Figura II.2, ambos Applied Biosystems.

Figura II.1. Esquema da fonte de “electrospray” do sistema *QTrap* (sistema híbrido triplo quadrupolo “ion trap”, Applied Biosystems) (adaptado referência 13).

Curtain Plate: nesta placa se aplica uma tensão controlada e ajustada com a polaridade desejada, atua como contra eletrodo para formação de íons e atração eletrostática destes para o orifício.

Curtain gas: fluxo de gás nitrogênio de alta pureza, controlado e aquecido pela temperatura aplicada no “orifice plate”, tendo a função de eliminar a camada de solvatação dos íons e solventes que interferem no sinal detectado.

Orifice plate: possui um orifício por onde os íons e um pequeno volume de “curtain gas” deve passar antes de entrar na câmara de vácuo. Os íons são transferidos da câmara de ionização, atravessam a interface e entram na câmara de vácuo (analisadores de massa) através do gradiente de pressão. O “orifice plate” separa a região de baixa pressão, primeiro estágio de vácuo, da pressão atmosférica. Contudo, o fluxo ou direcionamento dos íons pode ser controlado pelo ajuste da voltagem aplicada no “orifice plate”, chamada de “declustering potential” (DP).

Focusing Potential (FP): tensão aplicada para focalização dos íons no “skimmer”.

Skimmer: transmite o feixe de íons de uma região de alta pressão (bomba mecânica – 1.4 Torr) para baixa pressão (bomba turbo interface – 8 mTorr), com eficiência, eliminando os traços da “curtain gas”.

Q 0: quadrupolo zero, transmite os íons do “skimmer” para a lente *Q1* (quadrupolo um - analisador de massas sob alto vácuo). Para focalizar os íons e manter a trajetória harmônica deste, sem perdas, são aplicadas forças de radio frequência (RF) nas quatro hastes dispostas em paralelo (tensão conhecida como EP).

A principal diferença entre a fonte apresentada anteriormente e a fonte *QJet* é a ausência do “skimmer”. Na Figura 1.2 é apresentado um esquema desta fonte, parte do sistema triplo quadrupolo API 5000.

Figura II.2. Esquema da fonte de “electrospray” do sistema triplo quadrupolo API 5000, Applied Biosystems (*Qjet – ion guide*).

Na fonte *QJet*, em substituição ao “skimmer”, existe um pequeno quadrupolo que orienta uma maior fração de íons para o interior do analisador de massas, o que confere a este sistema uma maior sensibilidade.

II.2.1.1. Analisador

Neste trabalho foram utilizados um sistema triplo quadrupolo (API 5000) e um sistema híbrido triplo quadrupolo “ion trap” (*QTrap*).

Brevemente, no analisador de massas quadrupolar os íons são separados ou selecionados de acordo com sua razão m/z , aplicando-se um campo elétrico. Os íons tramitam no eixo central de quatro hastes dispostas em paralelo e equidistantes, onde são aplicadas tensões DC (corrente contínua) e AC (corrente alternada, RF). Dependendo do campo elétrico aplicado e sua força, apenas íons de massa/carga específica são selecionados e atingem o detector, sendo os outros íons (não selecionados) defletidos e acabam por colidir com as hastes.

Na Figura 1.3 é apresentado um esquema de um analisador de massas triplo quadrupolo.

Figura 1.3. Esquema do analisador triplo quadrupolo.

Os quadrupolos Q1 e Q3 são analisadores de massas enquanto que o quadrupolo Q2 é uma célula de colisão. Um dado íon pode ser selecionado em Q1, fragmentado em Q2 e os fragmentos gerados analisados em Q3, gerando assim o espectro de massas do íon. Um modo de operação que confere ao sistema uma alta seletividade e sensibilidade é o chamado MRM (“multiple reaction monitoring”). Neste modo de operação é possível realizar a aquisição monitorando-se um composto que apresente uma massa molecular m (denominado de íon precursor) e de um ou mais fragmentos deste íon (íons filhos) [14].

Num sistema híbrido triplo quadrupolo “ion trap”, o quadrupolo Q3 pode ser utilizado com um “ion trap” linear mediante a utilização de energias na entrada e na saída deste quadrupolo.

O acoplamento da fonte de íons como o “electrospray” com técnicas cromatográficas que operam em meio líquido é bastante conveniente, pois a fonte “electrospray” necessita de um fluxo constante de líquido. Desta forma a própria fonte funciona como interface. São, no entanto, vários os parâmetros que afetam a estabilidade do “spray”, tais como tensão superficial, constante dielétrica, viscosidade, condutividade e velocidade de fluxo do solvente.

Condições estáveis do “spray” são alcançadas com uma ampla gama de solventes, sendo os solventes mais utilizados o metanol e a acetonitrila.

II.3. Referências bibliográficas

- [1] SNYDER, L. R., KIRLAND, J. J. **Introdution to Modern Liquid Chromatography**, 2 Ed., Nova York, Ed. John Wiley & Sons, 1979.
- [2] SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Ed.Thomson, São Paulo,2006.
- [3] YEUNG, E. S., SYNOVEC, R. E. Detectors for liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 2353-1256A, oct. 1986.
- [4] ERICKSON, B. E. Product Review: HPLC and the ever popular LC/MS. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 21, p. 711A-716A, nov. 2000.
- [5] MORAES, M. C. B., DO LAGO, C. L. Electrospray ionization mass spectrometry applied to study inorganic and organo-metallic species. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, jul. 2003.
- [6] FINE, D. D., BREIDENBACH, G. P., PRICE, T. L., HUTCHINS, S. R. Quantitation of strogens in ground water and swine lagoon samples using solid-phase extraction, pentafluorobenzyl/trimethylsilyl derivatizations and gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1017, n. 1-2, p. 167-185, oct. 2003.
- [7] VYNCHT, G. V., GASPAR, P., DEPAUW, E., MAGHUIN-ROGISTER, G. Multi-residue screening and confirmatory analysis of anabolic steroids in urine by gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 683, n. 1, p. 67-74, oct. 1994.
- [8] ZYEHLKE, S., DUENNBIEER, U., HEBERER, T. Determination of polar drug residues in sewage and surface water applying liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 22, p. 6548-6554.
- [9] BECK, I-C., BRUHN, R., GANDRASS, J., RUCK, W. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, n. 1-2, p. 98-106, oct. 2005.
- [10] HUCK, C. W., HUBER, C. G., OGANIA, K-H., BONN, G. K. Isolation and characterization of methoxylated flavones in the flowers of *Primula veris* by liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 870, n. 1-2, p. 453-462, feb. 2000.
- [11] MACIÀ, A., BORRUL, F., CALULL, M., AGUILLAR, C. Determination of some acidic drugs in surface and sewage treatment plant waters by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 25, n. 20, p. 3441-3449, oct. 2004.

[12] Disponível em: <www.appliedbiosystems.com>. Acesso em novembro de 2006.

[13] NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**, 2nd Ed., Marcel Dekker, New York, 1999.

[14] Espectrometria de massas e suas aplicações – Applied Biosystems/MDS Sciex, Brasil, 2003.

Apêndice III

III.1. Eletroforese capilar

A eletroforese capilar (CE, do inglês “capillary electrophoresis”) é uma técnica instrumental de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, sob a ação de um campo elétrico. Historicamente, a eletroforese foi introduzida por Tiselius, já no início da década de 30, através do elegante método da fronteira móvel, aplicada à separação de alguns constituintes protéicos em soro humano. Por este trabalho pioneiro, Tiselius foi o ganhador do Prêmio Nobel de 1948 [1].

Em CE, a separação é conduzida em tubos de dimensões capilares, com 15 a 100 μm de diâmetro interno, e 30 a 150 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico através de eletrodos de platina conectados a uma fonte de alta tensão. Tais fontes podem, em geral, ser operadas à tensão e/ou corrente constante, com valores que variam de 0-30 kV e de 0-300 μA respectivamente. Um sistema de detecção, e um dispositivo que permita a introdução da amostra no capilar também são necessários. A resposta do detector é um gráfico do sinal gerado pelo detector em função do tempo, e é chamado de eletroferograma [2,3].

III.1.1. Fluxo eletrosmótico

A utilização de capilares (normalmente de sílica fundida) na execução da técnica introduziu uma importante peculiaridade, a geração do chamado fluxo eletrosmótico (Figura III.1).

Figura III.1. Representação esquemática do fluxo eletrosmótico.

O fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês “electroosmotic flow”) é consequência de uma interação entre a solução e as paredes do capilar. Quimicamente, a sílica fundida é caracterizada pela presença de grupos silanol (SiOH), os quais apresentam um caráter ácido. Em contato com uma solução com valor de pH acima de 2, esses grupos são desprotonados e, com a dissociação, a superfície do capilar torna-se negativamente carregada. Para contrabalancear as cargas da parede há na região próxima à parede, um excesso de cargas positivas, provenientes dos cátions da solução. Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície, forças elétricas causam um movimento unilateral dos íons, presentes na camada difusa, em direção ao cátodo. Os íons transportam moléculas de água, induzindo a um fluxo de solução como um todo, conhecido como fluxo eletrosmótico normal. Como consequência, o EOF permite separações com alta eficiência, e é o responsável pela condução dos analitos sem distinção de carga em direção ao detector, permitindo assim a análise simultânea de amostras contendo solutos catiônicos, neutros e aniônicos [4].

III.1.2. Princípio da separação em CE

Se uma solução contendo íons ou moléculas orgânicas, com diferentes tamanhos e cargas é posicionada na extremidade anódica do capilar, e uma diferença de potencial for aplicada, os íons da solução migrarão através do capilar em sentidos diferentes. A taxa e direção de migração dependem do tamanho dos íons e da magnitude e sinal das cargas. Espécies positivamente carregadas migrarão em direção ao eletrodo de carga negativa, o catodo, e as espécies negativamente carregadas migrarão em direção ao eletrodo de carga positiva, o anodo. A velocidade com que os íons irão migrar no interior do tubo capilar depende da relação carga/raio hidratado. Os íons menores migrarão mais rápido que íons maiores de mesma carga, e um íon com maior número de cargas irá migrar mais rápido do que um com menor carga, se possuírem o mesmo tamanho. Cátions migram mais rápido do que o fluxo eletrosmótico, neutros na mesma velocidade, e os ânions migram mais lentamente, e a ordem de migração é, portanto, cátions, neutros e ânions [1].

As separações em eletroforese capilar podem ser divididas em dois modos: co-eletrosmótico e contra-eletrosmótico, Figura III.2.

Figura III.2. Representação esquemática dos modos de operação em eletroforese capilar: A) contra-eletrosmótico; B) co-eletrosmótico.

No primeiro caso (Fig. III.2 A), a amostra é introduzida no capilar pela extremidade onde se encontra o anodo, os analitos migram no sentido contrário ao EOF, que é o responsável por carregá-los em direção ao detector, já que sua velocidade normalmente será maior que a dos analitos em estudo. No segundo caso (Fig. III.2 B), os analitos migram na mesma direção do fluxo eletrosmótico, ou seja, são exemplos de análise no modo co-eletrosmótico a análise de cátions, com o fluxo normal (migração do pólo positivo para o pólo negativo), e a análise de ânions, quando se faz uso de um inversor de fluxo, como, por exemplo, o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).

Moléculas neutras podem ser separadas em um modo de eletroforese conhecido como cromatografia capilar eletrocinética micelar, onde micelas são adicionadas ao tampão.

III.1.3. Instrumentação

O interesse crescente pela técnica nos últimos anos promoveu o desenvolvimento de instrumentos comerciais dotados de sistemas sofisticados de injeção de amostra, detecção em linha e aquisição de dados, que tornam a técnica atraente para a utilização em análises de rotina. A Figura III.3 ilustra de forma esquemática uma possível configuração de um sistema de eletroforese capilar.

Figura III.3. Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar.

O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre os outros meios utilizados para eletroforese. Devido a fatores geométricos, a relação entre a área superficial interna e o volume é apreciavelmente grande. Sendo assim, um capilar possibilita a dissipação eficiente do calor, gerado pela passagem da corrente elétrica através do meio condutor (efeito Joule). Além disso, a alta resistência

elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 1000 V/cm), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede 10^3 pratos), resolução inigualável e tempos de análise apreciavelmente curtos. Outras vantagens da eletroforese capilar são: a demanda de amostra é pequena, com volumes tipicamente da ordem de nanolitros e a possibilidade de injeção e detecção em fluxo.

III.1.4. Introdução da amostra

Em eletroforese capilar, as amostras podem ser introduzidas no capilar por métodos eletrocinéticos ou hidrodinâmicos.

Na injeção hidrodinâmica, uma alíquota representativa da composição do soluto na amostra é introduzida no capilar. Na prática, é aplicada uma pressão determinada, por um breve período no recipiente da amostra, havendo uma transferência de volume para o interior do capilar. Em seguida, as duas extremidades do capilar são inseridas nos recipientes do eletrólito de corrida, uma diferença de potencial é aplicada e a separação é então iniciada.

A injeção eletrocinética é realizada pela aplicação de um determinado potencial no recipiente da amostra por um dado período de tempo. Analitos iônicos são injetados como resultado da combinação entre as velocidades eletroforética e eletrosmótica, enquanto analitos neutros são injetados somente devido ao fluxo eletrosmótico. Um problema inerente à injeção eletrocinética é que a quantidade injetada de um determinado soluto depende da condutividade da amostra. Desse modo, quando soluções de padrão apresentam diferenças de condutividade em relação à amostra ou as amostras diferem entre si, a quantidade de analito injetada será diferente. Uma maneira de se contornar o problema é adicionar tanto à amostra quanto ao padrão uma elevada concentração de um eletrólito condutor, de modo a minimizar diferenças de condutividade entre ambos. O eletrólito adicionado preferencialmente não deve ser detectado, e deve apresentar mobilidade eletroforética inferior à mobilidade dos analitos.

III.1.5. Detecção

Usualmente, os detectores utilizados em eletroforese capilar podem ser classificados em dois tipos: os universais e os específicos. Os detectores universais medem alguma propriedade do soluto em relação à solução, portanto o sinal não depende das propriedades do soluto. Nesta classe estão incluídos os detectores de índice de refração e condutividade, entre outros que empregam métodos indiretos. Os detectores específicos medem uma propriedade específica do soluto, e a detecção é, portanto, limitada aos solutos que possuem a referida propriedade. Esta classe compreende os fotodetectores (baseados na absorção na região do UV/VIS, na fluorescência ou no espalhamento Raman), os espectrômetros de massas, os detectores amperométricos e os radiométricos. A utilização de detectores específicos é muito vantajoso quando a matriz da amostra é complexa. Este tipo de detector é normalmente mais sensível que os detectores universais e fornece intervalos mais amplos de resposta linear [1].

III.2. Modos de eletroforese capilar

A eletroforese capilar agrupa um grande número de separações eletrodirigidas utilizando diferentes mecanismos de separação. O intervalo de aplicações desta técnica varia desde a análise de moléculas pequenas até moléculas de milhares de Daltons. Os modos podem ser agrupados em subclasses [5]: a) eletroforese capilar de zona; b) eletroforese capilar de afinidade; c) eletroforese capilar de peneiramento; d) eletroforese capilar em gel; e) focalização isoeletrica capilar; f) isotacoforese capilar; g) cromatografia eletrocinética; h) cromatografia eletrocinética micelar; i) cromatografia eletrocinética em microemulsão; e j) eletrocromatografia capilar.

Neste trabalho foram utilizados a eletroforese capilar em solução livre e a cromatografia eletrocinética micelar capilar, as quais são apresentadas mais detalhadamente a seguir:

III.2.1. Eletroforese capilar de zona

Também conhecida por eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês "capillary zone electrophoresis"), é baseada somente na diferença de mobilidade das espécies carregadas, em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos, podendo conter aditivos tais como complexantes ou ligantes, ciclodextrinas, etc, os quais interagem com os analitos e modificam suas mobilidades eletroforéticas.

Quando uma espécie carregada eletricamente é exposta a um campo elétrico (E), esta migrará com velocidade (v_i) característica, que é proporcional ao campo elétrico aplicado [6], Equação III.1:

$$v_i = (\mu_{ep} + \mu_{eo}) E \quad (\text{III.1})$$

onde μ_{ep} é mobilidade eletroforética e μ_{eo} é a mobilidade do fluxo eletrosmótico.

Para soluções de eletrólitos constituídos de um ácido ou base fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio: a molécula não ionizada (com mobilidade zero), e a base ou ácido conjugado, cada qual com um valor particular de mobilidade. Assim, da mesma forma que os íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica (μ_j) [7], o conceito de mobilidade efetiva é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos [8]. A mobilidade efetiva (μ_{ef}) pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius [9], na qual qualquer substância i presente em solução em diferentes formas j , relacionadas entre si por um equilíbrio ácido-base rápido, irá migrar em um campo elétrico como um soluto único, possuindo certa mobilidade efetiva dada pela Equação III.2:

$$(\mu_{ef})_i = \sum (\mu_j \alpha_j) \quad (\text{III.2})$$

onde α_j é a fração molar ou função de distribuição e μ_j a mobilidade iônica de cada espécie individual j .

O conhecimento dos valores de mobilidade iônica e pK_a dos analitos e dos constituintes do eletrólito de corrida pode ser utilizado para a construção de curvas de mobilidade efetiva *versus* pH para a escolha do co-íon e do contra-íon do eletrólito de corrida, pH e modo de separação. É possível também obter eletroferogramas simulados. Esse procedimento permite diminuir o tempo e o custo na obtenção do método de separação.

III.2.2. Cromatografia eletrocinética micelar

Um marco no campo de separações foi estabelecido em 1984 por Terabe e colaboradores [10], com a introdução de uma versão modificada de eletroforese capilar, a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, do inglês “micellar electrokinetic chromatography”). Também conhecida por cromatografia capilar eletrocinética micelar (MECC, “micellar electrokinetic capillary chromatography”) é um caso especial da cromatografia eletrocinética, na qual a fase dispersa do capilar é constituída por micelas.

A MEKC combina os mecanismos de separação da cromatografia com o movimento eletroforético e eletrosmótico de solutos e soluções. O desenvolvimento da MEKC representou um avanço para a eletroforese capilar, pois permitiu a separação de compostos neutros, ou seja, em MEKC, compostos extremamente hidrofóbicos, como por exemplo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos podem ser separados, além da possibilidade da separação de compostos eletricamente neutros [11,12].

Este modo de eletroforese capilar é baseado normalmente na adição de tensoativos ao eletrólito de corrida e caracteriza-se pela partição dos analitos entre uma fase micelar e o eletrólito.

Quando um tensoativo está presente na solução em uma concentração maior do que a concentração micelar crítica (CMC), o mesmo forma micelas,

que são agregados de moléculas de tensoativos, e de acordo com o tensoativo empregado, a micela será constituída de um número diferente de monômeros, este numero é chamado de número de agregação (NA). As micelas formadas são normalmente de formato esférico, desta forma, os grupos hidrofílicos do tensoativo posicionam-se do lado externo da micela, enquanto que o hidrocarboneto hidrofóbico estará no centro da molécula, distante da fase aquosa.

Quando um composto insolúvel em água é adicionado a uma solução aquosa contendo micelas, o mesmo particiona com a porção hidrofóbica da micela. Caso um composto solúvel em água seja adicionado à solução, este não terá afinidade pela micela, pois não é solúvel na fase micelar. Um composto de solubilidade intermediária particionará entre a solução aquosa e as micelas, dependendo da hidrofobicidade do composto. As separações cromatográficas ocorrem devido à diferença de distribuição das moléculas da amostra entre a fase estacionária e a fase móvel. As micelas são consideradas *fases pseudoestacionárias*, e esta técnica permite a separação simultânea de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos.

A Figura III.4 ilustra os princípios de MEKC no modo normal. Para esta discussão, é considerado como fase micelar o SDS (dodecilsulfato de sódio), tensoativo aniônico, os analitos são eletricamente neutros e que a velocidade eletroforética das micelas é menor do que a velocidade do EOF no pH utilizado.

Figura III.4. Representação esquemática de uma separação utilizando MEKC.

Na representação, as micelas negativamente carregadas são atraídas em direção ao anodo, entretanto o EOF as carrega em direção ao catodo. A solução do eletrólito, que contém as micelas, move-se do anodo para o catodo. Os analitos particionam entre a fase micelar e aquosa, e o tempo em que permanecem nas micelas é proporcional a sua hidrofobicidade. Moléculas muito hidrofílicas, permanecem todo o tempo na fase aquosa, já que não particionam com as micelas, e são conduzidas através do capilar pelo EOF e, portanto, são as primeiras a migrar e chegar ao detector. Estes analitos são totalmente insolúveis nas micelas e migram com tempo t_0 . Moléculas muito hidrofóbicas, são totalmente solubilizadas pelas micelas, permanecem nas micelas durante todo o tempo e são carregadas na mesma velocidade das micelas. Estes analitos migrarão com o tempo t_{mc} . Moléculas que são parcialmente solúveis nas micelas particionam entre as micelas e a fase aquosa e migram entre t_0 e t_{mc} . A Figura III.5 apresenta uma ilustração esquemática de um eletroferograma de MEKC.

Figura III.5. Representação de um eletroferograma em MEKC no modo normal.

Desse modo, fica definida a chamada janela de migração, intervalo de tempo entre o t_0 e t_{mc} , onde todos os analitos neutros migram.

Solutos ionizados também podem ser separados por MEKC, desde que possuam em sua estrutura grupos hidrofóbicos, tais compostos migram devido a diferença na mobilidade eletroforética e também devido a interações com a micelas.

MEKC em modo reverso é praticada na ausência de fluxo.

III.3. Hifenização com eletroforese capilar

Em 1987 Olivares e colaboradores reportaram o uso inédito do espectrômetro de massas como detector eletroforético [13]. Desde então, a técnica de CE-MS tem ganhado crescente aceitação complementando, ou substituindo, detectores convencionais como os de absorção UV, eletroquímicos e LIF (do inglês, “laser induced fluorescence”) que são menos informativos e menos universais [14-17]. Uma característica de processos eletroforéticos é a pequena quantidade de amostra analisada, o que requer um detector com alta sensibilidade. A compensação de pequenas variações no tempo de migração de

cada soluto ou até mesmo a diferenciação de solutos que co-migram é atingida pela segunda dimensão (massa molecular e estrutura – MS em tandem) oferecida por um MS. Assim, acoplar a eletroforese capilar com a espectrometria de massas alia a velocidade e alta eficiência da primeira com a alta seletividade e sensibilidade da segunda técnica.

Os métodos de ionização utilizados na interface CE-MS são ionização química a pressão atmosférica (APCI) [18-20], ionização por “electrospray” (ESI) [11] e ionização /dessorção a laser assistida em matriz (MALDI, do inglês “matrix assisted laser desorption /ionization”) – geralmente com acoplamento “off-line” [21] - considerados métodos de ionização brandos. Alguns sistemas de ionização mais específicos também são relatados na literatura para o acoplamento CE-MS, como: bombardeamento de átomos rápidos com fluxo contínuo [22], ionização com vaporização a laser utilizando laser UV [23] e ionização com “spray” sônico [24]. Porém, apesar de vários artigos reportarem o uso de MALDI, o modo de ionização ESI é o mais adequado e freqüentemente aplicado no acoplamento CE-MS.

III.3.1. Ionização por “electrospray”

A técnica de ionização por ESI passou por duas fases distintas de investigação e desenvolvimento, a primeira decorreu antes de 1970 e centrou-se mais nos aspectos fundamentais do processo de produção de carga, assim como no modo experimental de concretizá-lo, trabalho este realizado principalmente por Dole e colaboradores [25]. A segunda fase deu-se a partir de 1970, e com um destaque para o trabalho desenvolvido em 1984 por Yamashita e Fenn [26], considerado pioneiro da espectrometria de massas com ionização por “electrospray”.

Ao longo da evolução histórica das interfaces CE-ESI dois tipos de sistemas foram desenhados: sistemas que incorporam um fluxo externo de líquido, coaxial ao capilar (“sheath liquid interfaces”) e sistemas onde a tensão é aplicada diretamente ao eletrólito de separação (neste último caso, um anel ou depósito

metálico recobre a extremidade do capilar). Os sistemas baseados no “sheath liquid” são os mais usados, uma vez que o solvente ajuda a estabilizar e mesmo aumentar o sinal ESI.

Há essencialmente três características que fazem com que o ESI seja considerado uma técnica distinta das outras técnicas de ionização: i) capacidade para produzir íons multiplamente carregados, com número de cargas elevado, reduzindo assim, a razão massa/carga, de tal modo que seja possível analisar compostos de elevada massa molecular; ii) as amostras a serem analisadas devem ser introduzidas em solução, o que permite o acoplamento com diversas técnicas de separação; iii) e, por último, e não menos importante, é o fato de ser o “electrospray” uma técnica de ionização suave que permite que as interações não covalentes entre moléculas que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa [27].

Outra técnica de ionização também muito utilizada para o acoplamento de técnicas cromatográficas em meio líquido é a chamada APCI (do inglês “Atmospheric Pressure Chemical Ionization”).

III.4. Analisador “ion trap”

CE tem sido acoplada a diferentes analisadores de massas, como: triplo quadrupolo [28], transformada de Fourier com ressonância ciclotrônica de íons (FT-ICR) [29], setor magnético [30], tempo de voo (TOF) [31] e “ion trap” [32]. Os analisadores do tipo quadrupolar são os analisadores comumente usados em CE-MS provavelmente devido as suas disponibilidades na maioria dos laboratórios e custo relativamente baixo em relação a outros analisadores. Entretanto, a baixa velocidade de varredura (fator limitante na detecção de picos eletroforéticos que apresentam alta eficiência), baixa resolução e sensibilidade (especialmente no modo “full scan”) são as principais limitações desses analisadores. Já os analisadores “ion trap”, também encontrados em muitos laboratórios, representam uma melhor opção no acoplamento CE-MS por apresentarem melhores velocidades de varredura e sensibilidade, além de poder

realizar múltiplos estágios de fragmentação (MS^n). O analisador “ion trap” consiste normalmente de três eletrodos, sendo um dos eletrodos em formato de anel com uma superfície interna hiperbólica e dois eletrodos terminais. O eletrodo em formato de anel é operado através de rádio frequência (RF), com isso consegue-se manter os íons positivos oscilando em órbitas no centro do “ion trap”. Por uma questão de inércia os íons mais leves (menor m/z) oscilam em órbitas maiores e os íons mais pesados (maior m/z) oscilam em órbitas menores. Neste tipo de detecção os íons são injetados na região do analisador e permanecem aprisionados durante um intervalo de tempo da ordem de milissegundos, longo para os padrões de espectrometria de massas. O controle dos potenciais elétricos aplicados permite que íons de determinadas relações m/z sejam ejetados do “trap”. No período de tempo em que os íons permanecem aprisionados, pode-se fazer, por exemplo com que os mesmos colidam com um gás residual injetado, levando-os a reações que vão desde a simples dissociação induzida por colisão até reações íon-molécula mais complexas, permitindo com isso que cada um dos fragmentos da amostra gerados inicialmente na ionização sejam *separados* dos outros e submetidos a novas fragmentações e análises [33].

III.5. Referências bibliográficas

- [1] TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, mar./abr. 1996. Divulgação.
- [2] TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, set./out. 1997.
- [3] BIER, M. (Ed.). **Electrophoresis: Theory, Methods and Applications**, New York: Academic Press Inc., 1959. 563 p.
- [4] BAKER, D. R. **Capillary electrophoresis**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.
- [5] SILVA, J. A. F., COLTRO, W. K. T., CARRILHO, E., TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740-744, may./jun. 2007.
- [6] BECKERS, J. L. System peaks and disturbances to the baseline UV signal in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 662, n. 1, p. 153-166, feb. 1994.
- [7] BECKERS, J. L. UV detection in capillary zone electrophoresis peaks or dips – that is the question. **Journal of Chromatography A**, v. 679, n. 1, p. 153-165, sep. 1994.
- [8] DESIDERIO, C., SALVATORE, F., GEBAUER, P., BOČEK, P. System peaks in capillary zone electrophoresis: II. Experimental study of vacancy peaks. **Journal of Chromatography A**, v. 772, n. 1-2, p. 81-89, jun. 1997.
- [9] GEBAUER, P., BOČEK, P. System peaks in capillary zone electrophoresis: I. Simple model of vacancy electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 772, n. 1-2, p. 73-79, jun. 1997.
- [10] TERABE, S., OTSUKA, K., ICHIKAWA K., TSUCIYA, A., ANDO, T. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 111-113, sep. 1984.
- [11] KHALEDI, M. G. Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 780, n. 1-2, p. 3-40, sep. 1997.
- [12] TAGLIARO, F., BORTOLOTTI, F. Review of: clinical and forensic applications of capillary electrophoresis, first edition. **Journal of Forensic Sciences**, v. 47, n. 3, p. 713-728, may. 2002.
- [13] OLIVARES, J. A., NGUYEN, N. T., YONKER, C. R., SMITH, R. D. On-line mass spectrometric detection for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 1230-1232, apr. 1987.

- [14] NIESSEN, W. M. A., TJADEN, U. R., VAN DER GREEF, J. Capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 636, n. 1, p. 3-19, apr. 1993.
- [15] CAI, J., HENION, J. Capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 703, n. 1-2, p. 667-692, jun. 1995.
- [16] KOPPLIN-SCHIMITT, P., FROMMBERGER, M. Capillary electrophoresis-mass spectrometry: 15 years of developments and applications. **Electrophoresis**, v. 24, n. 22-23, p. 3837-3867, dec. 2003.
- [17] SCHIMITT-KOPPLIN, P., ENGLMANN, M. Capillary electrophoresis – mass spectrometry: Survey on developments and applications 2003-2004. **Electrophoresis**, v. 26, n. 7-8, p. 1209-1220, apr. 2005.
- [18] JOHANSSON, I. M., HUANG, E. C., HENION, J. D., ZWEIGENBAUM, J. Capillary electrophoresis – atmospheric pressure ionization mass spectrometry for the characterization of peptides: Instrumental considerations for mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 554, n. 1-2, p. 311-327, aug. 1991.
- [19] TAKADA, Y., SAKAIRI, M., KOIZUMI, H. Atmospheric pressure chemical ionization interface for capillary electrophoresis/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 8, p. 1474-1476, apr. 1995.
- [20] TANAKA, Y., OTSUKA, K., TERABE, S. Evaluation of an atmospheric pressure chemical ionization interface for capillary electrophoresis – mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 6, p. 1889-1895, jan. 2003.
- [21] FORET, F., PREISLER, J. Liquid phase interfacing and miniaturization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Proteomics**, v. 2, n. 4, p. 360-372, apr. 2002.
- [22] VERHEIJ, E. R., TJADEN, U. R., NIESSE, W. M. A., VAN DER GREEF, J. Pseudo – electrochromatography-mass spectrometry: a new alternative. **Journal of Chromatography A**, v. 554, n. 1-2, p. 339-349, aug. 1991.
- [23] CHANG, S. Y., YEUNG, E. S. Laser vaporization/ionization interface for capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 13, p. 2251-2257, jul. 1997.
- [24] HIRABAYASHI, Y., HIRABAYASHI, A., KOIZUMI, H. A sonic spray interface for capillary electrophoresis mass spectrometry. **Rapid Communications in mass spectrometry**, v. 13, n. 8, p. 712-715, 1999.
- [25] DOLE, M., MACK, L. L., HINES, R. L. Molecular beams of macroions. **Journal of Chemical Physics**, v. 49, n. 5, p. 2240, 1968.

- [26] YAMASHITA, M., SANO, T., KOTAKE, S., FENN, J. B. Dimer depletion by solute species in free jet expansion. **Journal of Chemical Physics**, v. 75, n. 11, p. 5355-5361, 1984.
- [27] COLE, R. B. **Electrospray Mass Spectrometry**, John Wiley & Sons, New York, Inc. Chinchester, 1997.
- [28] SOGA, T., KAKAZU, Y., ROBERT, M., TOMITA, M., NISHIOKA, T. Qualitative and quantitative analysis of amino acids by capillary electrophoresis – electrospray ionization – tandem mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 25, n. 13, p. 1964-1972, jul. 2004.
- [29] ZHANG, S., ZHAO, Z. W., XIONG, L., XIN, B., HU, W. H., XIONG, S. X. On-line separation and detection of peptides by capillary electrophoresis/electrospray FT-ICR-MS. **Chinese Chemical Letters**, v. 14, n. 2, p. 191-194, feb. 2003.
- [30] PERKINS, J. R., TOMER, K. B. Capillary electrophoresis electrospray mass – spectrometry using a high-performance magnetic-sector mass-spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 18, p. 2835-2840, sep. 1994.
- [31] MUSYIMI, H. K., NARCESSE, D. A., ZHANG, X., STRYJEWSKI, W., SOPER, S. A., MURRAY, K. K. On line CE-MALDI-TOF MS using a rotating ball interface. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 19, p. 5968-5973, oct. 2004.
- [32] SIMÓ, C., RIZZI, A., BARBAS, C., CIFUENTES, A. Chiral capillary electrophoresis – mass spectrometry of amino acids in foods. **Electrophoresis**, v. 26, n. 7-8, p. 1432-1441, apr. 2005.
- [33] SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMEE, D. J. **Spectrometry Identification of organic compounds**, John Wiley & Sons, New York, Inc Chinchester, 2005.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Ana Carolina de Oliveira Costa

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, em 26 de dezembro de 1978

EDUCAÇÃO

Escola de 1º Grau Nossa Senhora do Horto (Rosário do Sul, RS), 1985 – 1992.

Primeiro grau.

Colégio São José Escola de 1º e 2º Graus (Pelotas, RS), 1993 – 1995. Segundo grau.

Universidade Católica de Pelotas Farmácia e Bioquímica (Pelotas, RS), 1996 – 2000. Ensino superior: Farmácia e Bioquímica.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS), 2001 – 2002. Curso de Especialização em Toxicologia Aplicada/ Pós-graduação/ Lato Sensu.

Universidade de São Paulo, Instituto de Química (São Paulo, SP), 2004. Doutorado.

PUBLICAÇÕES

Artigos Científicos

1. COSTA, A. C. O., PERFEITO, L. D., TAVARES, M. F. M. MICKE, G. A. Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis – Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. **Journal of Chromatography A**, v. 1204, n. 1, p. 123-127, 2008.
2. MASSARI, J., FUJIY, D. E., DUTRA, F., VAZ, S. M., COSTA, A. C. O., MICKE, G. A., TAVARES, M. F. M., TOKIKAWA, R., ASSUNCAO, N. A., BECHARA, E. J. H. Radical acetylation of 2'-deoxyguanosine and L-histidine coupled to the reaction of diacetyl with peroxynitrite in aerated medium. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 879-887, 2008.
3. COSTA, A. C. O., DA COSTA, J. L., TONIN, F. G., TAVARES, M. F. M., MICKE, G. A. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1171, n. 1-2, p. 140-143, 2007.
4. MICKE, G. A., FUJIYA, N. M., TONIN, F. G., COSTA, A. C. O., TAVARES, M. F. M. Method development and validation for isoflavones in soy germ pharmaceutical capsules using micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1625-1632, 2006.

Capítulo de Livro

10. COSTA, A. C. O., MICKE, G. A., PEREIRA, E. A., SILVA, C. L., TAVARES, M. F. M. Environmental Analysis. In: **Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation and Applications**, PYELL, U. (Ed.), John Wiley & Sons, LTD, 2006.