Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Desenvolvimento de métodos cromatográficos hifenados
(in-tube SPME/LC-FLD e GCxGC/qMS) para análises
de fármacos e agrotóxicos em amostras complexas**

Bruno José Gonçalves da Silva

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Eugênia Queiroz Nassur

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
como parte das exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

da Silva, Bruno José Gonçalves

Desenvolvimento de métodos cromatográficos hifenados (in-tube SPME/LC-FLD e GCxGC/qMS) para análises de fármacos e agrotóxicos em amostras complexas, Ribeirão Preto, 2011.

170 p.; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Nassur, Maria Eugênia Queiroz.

1. Separação enantiosseletiva. 2. “in-tube” SPME. 3. Fluoxetina. 4. Cromatografia Líquida. 5. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente. 6. Agrotóxicos. 7. Amostras complexas.

DEDICATÓRIA

*Agradeço a Deus e dedico esta tese à minha Família,
pelo apoio incondicional e
carinho imensurável.*

*À minha tão amada Mãe, Sobrinhos e queridas Irmãs!
Todo este trabalho dedico a vocês...*

AGRADECIMENTOS

À Deus...
O autor da vida,
A quem devemos apenas agradecer!

A minha família...
Ao meu Pai e minha Mãe,
Mãe, exemplo de mulher e fonte de inspiração...
Te amo muito!
As minhas irmãs, Karina e Patrícia,
Pelo apoio e carinho que sempre me ofereceram...
Meus cunhados, de quem sempre tive respeito e consideração,
Karina e Dedê, vocês foram fundamentais em muitos momentos,
obrigado!
Meus sobrinhos, Fernanda, Vanessa e Eduardo...
Como é bom ter todos vocês perto de mim!

A Prof^a Maria Eugênia,
Meus sinceros agradecimentos,
Pela dedicação, respeito, confiança e pelos ensinamentos dispensados...
Contribuindo sempre para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao grupo de cromatografia de Messina,
Prof^o Luigi Mondello,
Pela oportunidade da realização do estágio em seu laboratório,
Ao Prof^o Peter Tranchida e a pesquisadora Giorgia Purcaro,
Pela disponibilidade, paciência e interesse em compartilhar comigo seus conhecimentos.

Aos colegas de laboratório, Andréa, Bruno Rafael, Fernanda Salami,
Fernanda Zampieri, Juciene, Jordana, Lidervan, Luana, Valéria, Marcelo e

Míriam, agradeço o companheirismo e os momentos de descontração de todas as horas durante esses anos...

A todos os Professores e Pesquisadores que, de alguma forma, seja respondendo meus questionamentos ou incentivando minha busca pelo aperfeiçoamento como pesquisador, contribuíram para este trabalho.

Aquelas pessoas que conheci em Ribeirão Preto e que tenho orgulho de dizer que são meus amigos: Ana Paula, Andréa, Carô, Carol, Fã, Jamanta, Ju, Liliâne, Luciana, Marina, Paula, Pito, Rê, Tânia e tantos outros. A vocês desejo sucesso e que façam parte da minha vida por muito tempo...

A toda Família Adélio e Nina...pelo carinho e momentos ótimos que sempre passamos quando reunidos.

Aos funcionários do DQ-FFCLRP/USP por terem sido atenciosos e prestativos comigo.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, por me abrigar desde a graduação, servindo de morada durante todos estes anos de formação acadêmica.

A CAPES e CNPq,
Pelo apoio financeiro concedido durante a realização do meu doutorado e ao CNPq pelo apoio financeiro durante o estágio de Doutorado Sanduíche.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação e conclusão desta tese.

“Os seus problemas você deve esquecer,
isso é viver, é aprender...
Hakuna Matata!”

(Tema de “O Rei Leão”, Tim Rice)

RESUMO

As determinações, em níveis de traços, de fármacos em fluidos biológicos e de multirresíduos (contaminantes) em amostras alimentícias são de extrema importância, pois geram valiosos dados para fins, respectivamente, de monitorização terapêutica (individualização do regime de dosagem) e controle de qualidade (segurança alimentar).

A demanda por métodos analíticos de alta resolução e com baixos limites de quantificação, para análises de amostras complexas, tem impulsionado a química analítica para o desenvolvimento de soluções inovadoras, destacando-se aquelas voltadas ao desenvolvimento ou avaliação de novos sistemas analíticos.

Neste contexto, na primeira etapa desta tese, o sistema automatizado de microextração em fase sólida no capilar de polipirrol (“in-tube” PPY SPME) acoplado à cromatografia líquida com detecção fluorimétrica foi desenvolvido (“lab-made”) para a determinação enantiosseletiva de fluoxetina e de seu metabólito norfluoxetina em amostras de plasma, para fins de monitorização terapêutica. Na segunda etapa, o método cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas com analisador quadrupolo (GC $\times$ GC / qMS) foi padronizado e validado para análise de multirresíduos de agrotóxicos em tomates frescos, para fins de controle de qualidade.

Dentre os resultados obtidos podemos destacar: na primeira etapa o ganho de seletividade da fase extratora de polipirrol, em sistema miniaturizado e automatizado de preparo de amostra, hifenado à separação cromatográfica (LC) com detecção fluorimétrica; e na segunda etapa, o incremento da resolução cromatográfica e detectabilidade do sistema de cromatografia gasosa bidimensional com detecção espectrométrica com analisador quadrupolo.

As análises de amostras de plasma de pacientes em terapia com fluoxetina e de amostras de tomates comerciais comprovaram a aplicabilidade dos métodos propostos, padronizados e validados, em níveis de concentrações que incluem o intervalo terapêutico preconizado para a fluoxetina em plasma e os limites máximos de resíduos de agrotóxicos estabelecidos para a cultura de tomate.

ABSTRACT

Determination of trace levels of drugs in biological fluids and multiresidue (contaminants) in food samples is extremely important because this generates valuable data for therapeutic drug monitoring (individualization of dosage regimen) and quality control (food safety), respectively.

Because of the demand for analytical methods with high resolution and low limits of quantification for analysis of complex samples, analytical chemistry has stimulated the development of innovative approaches, especially those aimed at developing or evaluating new analytical systems.

In this context, in the first stage of this thesis the automated solid-phase microextraction capillary polypyrrole (in-tube "PPY SPME) coupled to liquid chromatography with fluorimetric detection was developed (lab-made) for enantioselective determination of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in plasma samples for therapeutic drug monitoring. In the second stage of this work, the GC x GC / qMS method was developed for multiresidues analysis of pesticides in fresh tomatoes for the purpose of quality control.

In the first stage of the research the gain in terms of the selectivity of the polypyrrole extraction phase in hyphenated and automated system for sample preparation and chromatographic separation (LC) with fluorimetric detection is worthy of note. As for the second step, the highlight is the improvement in chromatographic resolution as well as in the detectability system of the system consisting of two-dimensional gas chromatography and spectrometric detection with quadrupole analyzer.

Analyses of plasma samples from patients undergoing therapy with fluoxetine and of samples of commercially available tomatoes proved the applicability of the proposed methods, which were optimized and validated at concentrations levels that include the therapeutic range for the analyzed drugs in plasma and the maximum residue limits of pesticides for growing tomatoes.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. 1. Estruturas químicas da fluoxetina (FLX) e norfluoxetina (NFLX). Os asteriscos indicam o centro quiral de cada molécula.....	26
Figura I. 2. Dispositivo geral para “in-tube” SPME utilizando capilares abertos.....	33
Figura I. 3. Esquema do processo “in-tube” SPME/LC. (a) extração (posição carregar) e (b) dessorção (posição injetar).....	35
Figura I. 4. Estrutura química do pirrol.....	43
Figura I. 5. Espectro de fluorescência da fluoxetina.....	53
Figura I. 6. Cromatograma da solução padrão enriquecida com os enantiômeros na concentração de 300 ng mL ⁻¹	54
Figura I. 7. Estrutura química da fase estacionária tris-3,5 dimetilfenil carbamato de celulose em suporte de sílica gel (coluna Chiralcel OD-R®).....	56
Figura I. 8. Reação de silanização da superfície de sílica com o agente sililante APTES.....	57
Figura I. 9. Esquema da polimerização química oxidativa do pirrol.....	58
Figura I. 10. Imagens dos capilares “in-tube” PPY SPME; A - capilar de sílica antes da polimerização, B – capilar de PPY, após seis ciclos de polimerização.....	59
Figura I. 11. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (visão de secção transversal) dos capilares de sílica fundida: (A) sem o revestimento de PPY e (B) com o revestimento de PPY após 6 ciclos de polimerização.....	62
Figura I. 12. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (visão expandida da superfície interna) dos capilares de sílica fundida: (A) sem o revestimento de PPY e (B) com o revestimento de PPY após 6 ciclos de polimerização.....	63
Figura I. 13. Otimização dos valores de pH da matriz para as análises “in-tube” PPY SPME/LC.....	67
Figura I. 14. Otimização do volume de amostra aspirado/dispensado para as análises “in-tube” PPY SPME/LC.....	68
Figura I.15. Otimização do número de ciclos aspirar/dispensar para as análises “in-tube” PPY SPME/LC.....	69
Figura I. 16. Cromatogramas obtidos por “in-tube” PPY SPME/LC-FLD: a) plasma branco de referência e b) amostra de plasma enriquecida com FLU e NOR na concentração de 300 ng mL ⁻¹	72
Figura I. 17. Cromatograma obtidos por “in-tube” PPY SPME/LC-FLD da análise	

de amostra de plasma de paciente em terapia com fluoxetina (Prozac [®] , 20 mg/dia).....	77
Figura II. 1. Ilustração da configuração geral do sistema GC x GC: 1 - Injetor, 2 - coluna da primeira dimensão (1D), 3 - interface (modulador), 4 - coluna da segunda dimensão (2D), 5 - forno do cromatógrafo gasoso, 6 - detector.....	101
Figura II. 2. Ilustração da influência da ortogonalidade no plano de separação em GC x GC.....	104
Figura II. 3. (a) Pico não-modulado referente ao componente α . (b) Pico após modulação.....	105
Figura II. 4. (a) Pico não-modulado referente à mistura de três componentes (α , β e γ). (b) Pico após modulação (3 modulações).....	106
Figura II. 5. Detalhe do modulador por aprisionamento em fase estacionária e dessorção por barra rotatória de aquecimento (“Sweeper”).....	106
Figura II. 6. Processo geral da etapa de modulação com armadilhas criogênicas.....	108
Figura II. 7. Diagramas de moduladores criogênicos. A - LMCS; B - modulador criogênico de jato simples; C - modulador criogênico e jato duplo e D - modulador criogênico de jato frio e quente. 1D: coluna da primeira dimensão, 2D: coluna da segunda dimensão.....	109
Figura II. 8. Ilustração das diferentes formas de construção de diagramas tridimensionais sinal $\times t_{R1} \times t_{R2}$ em GC $\times$ GC.....	111
Figura II. 9. Ilustração da configuração do sistema GC x GC / qMS utilizada no trabalho. MS: espectrômetro de massas, GC: cromatógrafo gasoso.....	123
Figura II. 10. Configuração do sistema de modulação criogênica de jato duplo (frio e quente) utilizado. A - Posição das câmaras de jato frio e quente dentro do forno; B - Principais componentes (1. Câmara de jato frio, 2. Câmara de jato quente, 3. “loop”, 4. Suporte de metal (“holder”), 5. Filme de poliamida (Kapton), 6. Jato frio); C - Visão inferior da estrutura do modulador; D - Remobilização dos analitos à fase móvel para posterior separação na 2D (7. Jato quente).....	126
Figura II. 11. Avaliação da quantidade de amostra (g) na eficiência de extração. Condições LLE: amostras de tomate enriquecidas com os agrotóxicos na concentração de $1 \mu\text{g g}^{-1}$, proporção solvente:amostra 2:1 (v/m), 5 min de extração a 25 °C sob agitação a 900 rpm.....	128
Figura II. 12. Influência da proporção solvente:amostra (v/m) na eficiência de extração. Condições LLE: amostras de tomate enriquecidas com os agrotóxicos na concentração de $1 \mu\text{g g}^{-1}$, 5 min de extração a 25 °C sob agitação a 900 rpm.....	129

Figura II. 13. Influência do tempo de extração na eficiência de extração. Condições LLE: amostras de tomate enriquecidas com os agrotóxicos na concentração de $1 \mu\text{g g}^{-1}$, proporção 1:2 (solvente: amostra, v/m), agitação 25°C e 900 rpm.....	129
Figura II. 14. Cromatograma da análise 1D-GC/qMS de amostra de tomate enriquecida com os agrotóxicos na concentração de 200 ng g^{-1} após LLE.....	133
Figura II. 15. Cromatogramas representativos das cinco seções (A, B, C, D e E) do cromatograma da Figura II. 14.....	134
Figura II. 16. Cromatograma de íon total (TIC) obtido para análise 1D-GC/qMS de amostra de tomate enriquecida com agrotóxicos na concentração de 200 ng g^{-1} após LLE (em preto) e cromatogramas de monitoramento de íons (MIC) para composto interferente (ácido palmítico): $m/z = 74$, prometrina: $m/z = 184$ e heptacloro: $m/z = 100$ (em cores).....	136
Figura II. 17. Ilustração da ortogonalidade em GC $\times$ GC. 1D: primeira dimensão, 2D: segunda dimensão.....	139
Figura II. 18. Fração do cromatograma bruto GC $\times$ GC / qMS. As condições GC $\times$ GC/qMS estão descritas na seção II.4.5. P_M : período de modulação.....	140
Figura II. 19. Frações dos cromatogramas 1D-GC (acima) e GC $\times$ GC (abaixo) demonstrando aumento de detectabilidade em análise bidimensional para o pesticida forato (em vermelho são destacadas as larguras da base, W_b , dos respectivos picos)...	143
Figura II. 20. Diagrama de cores da análise GC $\times$ GC / qMS da matriz de tomate enriquecida com os agrotóxicos (concentração final de 200 ng g^{-1}) após LLE.....	144
Figura II. 21. Frações dos cromatogramas 1D-GC (esquerda) e bruto 2D (direita) ilustrando efeito de saturação e formação de picos com caudas em ambas dimensões. Os asteriscos vermelhos indicam os picos de compostos interferentes.....	146
Figura II. 22. (A) Fração do diagrama de cores ilustrando parcial coeluição entre os agrotóxicos terbufós e lindane, (B) Frações dos cromatogramas de íon extraído ($m/z = 57$ para terbufós e $m/z = 109$ para lindane) e (C) Espectros experimentais (1 e 2) e da biblioteca (3 e 4) para terbufós e lindane.....	149
Figura II. 23. Fração do cromatograma bruto 2D ilustrando a construção do pico modulado de maior intensidade do agrotóxico propargite com 9 pontos por pico.....	151
Figura II. 24. Diagrama de cores representativo da análise GC $\times$ GC / qMS, após LLE, de amostra de tomate fresco adquirida no comércio.....	154

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. 1

Aplicações da técnica “in-tube” SPME na análise de fármacos em amostras biológicas.....	34
---	----

Tabela I.2

Programa utilizado nas extrações “in-tube” SPME.....	46
--	----

Tabela I.3

Avaliação de diferentes fases extratoras para as análises dos enantiômeros de FLX e NFLX por “in-tube” SPME.....	63
--	----

Tabela I.4

Tempos de retenção dos fármacos estudados como possíveis interferentes.....	71
---	----

Tabela I.5

Regressão linear e limite de quantificação (LQ) para o método in-tube PPY SPME/LC desenvolvido.....	72
---	----

Tabela I.6

Valores de precisão e exatidão do método “in-tube” PPY SPME/LC-FL.....	73
--	----

Tabela II.1

Porcentagem de resultados insatisfatórios das análises de resíduos de agrotóxicos no Brasil realizadas pelo PARA em diferentes culturas entre os anos de 2002 e 2008.....	91
---	----

Tabela II. 2

Fórmulas estruturais, grupos químicos e LMRs dos agrotóxicos estudados.....	115
---	-----

Tabela II. 3

Tempos de retenção em 1D e 2D e íons selecionados para cada agrotóxico em análise GC x GC/qMS em amostra de tomate.....	143
---	-----

Tabela II. 4

Regressão linear e valores de LQ e LD para o método GC x GC / qMS desenvolvido	152
--	-----

Tabela II. 5

Valores de exatidão, precisão e recuperação para o método GC x GC / qMS desenvolvido.....	153
---	-----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1D – Primeira dimensão

2D – Segunda dimensão

1D-GC – Cromatografia gasosa monodimensional

ADT – Antidepressivos tricíclicos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APTES – Aminopropiltrietoxisilano

CV – Coeficiente de variação

FDA – *Food and Drug Administration*

FLD – Detector de fluorescência (*Fluorescence Detector*)

FLX – Fluoxetina

GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

GC x GC – Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (*Comprehensive Bidimensional Gas Chromatography*)

IMAO – Antidepressivos Inibidores de Monoaminoxidase

“in-tube” SPME – Microextração em fase sólida no capilar (*in-tube Solid Phase-Microextraction*)

LC – Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography*)

LD – Limite de Detecção

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

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LQ – Limite de Quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MDGC – Cromatografia Gasosa Multidimensional

MIC – Cromatograma de Monitoramento de Íons (*Monitoring Ion Chromatogram*)

MS – Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*)

NaSSa – Antidepressivos noradrenérgicos e específico serotoninérgicos

NFLX – Norfluoxetina

OC – Agrotóxico organoclorado

OF – Agrotóxico organofosforado

OMS – Organização Mundial da Saúde

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

P_M – Período de modulação

PY – Pirrol

PPY - Polipirrol

qMS – Espectrometria de massas com analisador quadrupolo (*Quadrupole Mass Spectrometry*)

SIM – Monitorização de íons seletivo (*Single Ion Monitoring*)

SNRI – Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina

SPE – Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

SPME – Microextração em Fase Sólida (*Solid-Phase Microextraction*)

SSRI – Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina

TIC – Cromatograma de Íon Total (*Total Ion Current*)

ToF-MS – Espectrometria de massas com analisador de tempo de voo (*Time-of-flight Mass Spectrometry*)

UV – Detector de Ultravioleta

w_b – Largura da base do pico cromatográfico

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	18

CAPÍTULO I

I. 1. INTRODUÇÃO.....	22
I.1.1. DEPRESSÃO	22
I.1.2. FLUOXETINA E NORFLUOXETINA.....	24
I.1.2.1. Atividades farmacológicas enantiosseletivas.....	26
I.1.3. MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA.....	28
I.1.4. PREPARO DA AMOSTRA.....	29
I.1.4.1. “in-tube” SPME.....	31
I.1.4.2. Otimização do processo “in-tube” SPME.....	37
I.1.4.3. PIRROL.....	41
I. 2. OBJETIVOS.....	43
I.2.1. OBJETIVO GERAL.....	43
I.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
I. 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44

I.3.1. PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES.....	44
I.3.2. DESENVOLVIMENTO DO CAPILAR PPY.....	44
I.3.3. INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA.....	46
I.3.3.1. Microscopia eletrônica de varredura.....	47
I.3.3.2. Espectrofluorescência.....	48
I.3.4. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO “in-tube” SPME.....	48
I.3.5. AMOSTRAS DE PLASMA.....	49
I.3.6. VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	50
I. 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
I.4.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	52
I.4.1.1. Detecção e separação cromatográfica.....	52
I.4.1.2. Reconhecimento quiral.....	54
I.4.2. CAPILAR DE PPY.....	56
I.4.2.1. Desenvolvimento.....	56
I.4.2.2. Caracterização morfológica – MEV.....	59
I.4.2.3. Comparação da eficiência do PPY com outros revestimentos comerciais para “in-tube” SPME.....	63
I.4.3. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO “in-tube” PPY SPME.....	65
I.4.4. VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO “in-tube” PPY SPME/LC-FLD.....	70
I.4.5. APLICAÇÃO CLÍNICA DO MÉTODO “in-tube” PPY SPME/LC-FLD.....	75
I. 5. CONCLUSÕES.....	77
I. 6. REFERÊNCIAS.....	78

CAPÍTULO II

II. 1. INTRODUÇÃO.....	88
II.1.1. A AGRICULTURA E O USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL.....	88
II.1.2. CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS.....	93
II.1.3. ANÁLISES DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS...	95
II.1.4. CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE.....	98

II. 2. OBJETIVOS.....	115
II.2.1. OBJETIVO GERAL.....	115
II.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	115
II. 3. COLABORAÇÃO.....	116
II. 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	116
II.4.1. AGROTÓXICOS SELECIONADOS PARA O ESTUDO.....	116
II.4.2. PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES.....	120
II.4.3. AMOSTRAS DE TOMATES.....	120
II.4.4. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	121
II.4.5. ANÁLISES GC $\times$ GC / qMS.....	121
II.4.6. CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA DE MODULAÇÃO.....	123
II.4.7. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	125
II. 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	126
II.5.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO.....	126
II.5.2. PRÉ-OTIMIZAÇÃO EM 1D-GC.....	129
II.5.3. PARÂMETROS DE OTIMIZAÇÃO EM GC $\times$ GC/qMS.....	135
II.5.4. ANÁLISES GC $\times$ GC / qMS.....	140
II.5.5. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO GC $\times$ GC/qMS	151
II.5.6. APLICAÇÃO DO MÉTODO GC $\times$ GC / qMS.....	155
II. 6. CONCLUSÕES.....	156
II. 7. REFERÊNCIAS.....	157
ANEXO	
CURRÍCULO RESUMIDO.....	167

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

O constante progresso nos diferentes campos da ciência e tecnologia tem exigido a evolução permanente dos métodos analíticos, especialmente daqueles baseados em técnicas de separação cromatográfica, como a cromatografia líquida, cromatografia gasosa e eletroforese capilar. Motivada pela demanda de métodos mais específicos e eficientes nas análises em matrizes complexas, o desenvolvimento constante de novos equipamentos, acessórios e métodos automatizados que atendam as diversas necessidades no campo das bioanálises tem sido requerido.

Neste contexto, podemos destacar o desenvolvimento de novas técnicas de preparo de amostras, uma das etapas mais morosas e complexas dos procedimentos analíticos, o desenvolvimento de detectores mais sensíveis e seletivos, onde a interferência da matriz é minimizada, e, finalmente, o recente interesse no desenvolvimento de métodos cromatográficos multidimensionais, propiciando alta resolução para análises de amostras extremamente complexas.

A etapa de preparo de amostras, eliminação de interferentes (compostos endógenos), extração e pré-concentração dos analitos, tem sido um procedimento indispensável e extremamente importante para o desenvolvimento de métodos cromatográficos com alta sensibilidade e seletividade analítica. Nos últimos anos, novas técnicas miniaturizadas de preparo de amostras têm ganhado destaque frente aos métodos convencionais, pois minimizam o volume da amostra e o consumo de solventes orgânicos, permitem a reutilização das fases extratoras, a pré-concentração dos analitos, além de possibilitar o acoplamento em linha (automação) com sistemas cromatográficos, resultando em rápido processo operacional, com alta precisão analítica e baixos limites de quantificação.

O acoplamento das técnicas cromatográficas a sistemas de detecção modernos vem permitindo um grande avanço nas análises de compostos em níveis de traços, presentes em

amostras complexas, como fluidos biológicos e alimentos. Deste modo, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de detectores específicos, e cada vez mais sensíveis, como os detectores de espectrometria de massas e de fluorescência, este último seletivo apenas para compostos que fluorescem em determinado comprimento de onda, tem sido uma vertente importante no desenvolvimento de novos métodos analíticos.

Além disso, a exigência por melhor qualidade de vida, imposta principalmente pelos países desenvolvidos, tem requerido um melhor controle sobre o meio ambiente, alimentos, e administração de medicamentos. As análises dessas amostras, extremamente complexas do ponto de vista do número e diversidade dos compostos químicos presentes, demandam o uso de técnicas analíticas de alta resolução. Muitas vezes torna-se necessário a associação de diferentes técnicas analíticas para a solução de problemas complexos. Assim, a cromatografia multidimensional, baseada no uso de duas ou mais colunas (diferentes mecanismos de separação) ou técnicas cromatográficas para gerar melhor separação, ou seja, aumento da resolução cromatográfica e da capacidade de picos representa uma poderosa ferramenta analítica, alternativa às técnicas clássicas baseadas em separações unidimensionais.

Neste trabalho, a cromatografia gasosa bidimensional abrangente e a hifenação do preparo da amostra miniaturizado à cromatografia líquida, foram avaliados para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em amostra alimentícia e análise enantiosseletiva de fármacos em fluido biológico, respectivamente. Para melhor entendimento, esta tese foi dividida em dois capítulos: **Capítulo I - Desenvolvimento do capilar de polipirrol (PPY) para análise in-tube SPME/LC-FLD de fluoxetina, norfluoxetina e seus enantiômeros em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica** e **Capítulo II - Determinação de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de tomates por Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada à Espectrometria de Massas (GCxGC/qMS)**, compreendendo a contextualização e

descrição da importância do trabalho realizado, fundamentos teóricos das técnicas analíticas, apresentação da metodologia proposta, a discussão dos principais resultados, a aplicação dos métodos e finalmente as conclusões, destacando os aspectos relevantes de cada trabalho.

O **Capítulo 1** descreve o desenvolvimento e validação analítica do método automatizado de microextração em fase sólida no capilar (polipirrol, “lab made”) acoplada à cromatografia líquida (“in-tube PPY SPME/LC”) com detecção fluorimétrica para a determinação enantiosseletiva de antidepressivos (fluoxetina e norfluoxetina) em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica. Uma breve introdução contempla revisão da literatura, ou seja, o “estado da arte” da miniaturização das técnicas de preparo de amostras para fármacos em fluidos biológicos, além da importância das análises enantiosseletivas de fármacos para fins de monitorização terapêutica.

No **Capítulo 2** descreve-se o desenvolvimento, otimização e validação analítica, do método de cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas com analisador quadrupolo (GC $\times$ GC / qMS) para análises de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de tomate, com intuito de abranger o quesito de segurança em certificados de qualidade de alimentos de órgãos regulamentadores, nacionais e internacionais, a respeito do cultivo e da comercialização de frutas de alto padrão de qualidade e sanidade. Na introdução deste capítulo, são apresentados os princípios fundamentais, a instrumentação (configuração do sistema cromatográfico, modulação e detecção) e as aplicações da GC $\times$ GC em amostras complexas, elucidando a motivação para o desenvolvimento deste trabalho.

CAPÍTULO I

**Desenvolvimento do capilar de
polipirrol (PPY) para análise in-tube
SPME/LC-FLD de fluoxetina,
norfluoxetina e seus enantiômeros em
amostras de plasma para fins de
monitorização terapêutica**

I. 1. INTRODUÇÃO

I.1.1. DEPRESSÃO

A depressão é uma condição médica comum, crônica e recorrente; frequentemente associada à incapacitação funcional e ao comprometimento da saúde física. Embora este distúrbio seja conhecido desde a Grécia antiga, descrito como melancolia, a depressão só foi considerada uma desordem psiquiátrica a partir do século XVIII com os estudos dos chamados alienistas, médicos que consideravam a melancolia como um tipo de loucura ou mania [1]. Atualmente, a depressão é considerada um distúrbio psiquiátrico complexo, sendo subdividida em classes, de acordo com os sintomas que o paciente apresenta.

Nos anos 90, a depressão foi considerada a quarta causa específica de incapacitação, quando utilizada uma escala global para comparação de várias doenças. Ainda considerando a incapacitação, a depressão, quando comparada às principais condições médicas, tem apresentado equivalência às doenças isquêmicas cardíacas graves. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a depressão será a principal causa da inaptidão e morte prematura da população mundial até 2020. Além disso, a terapia e as conseqüências, diretamente ou indiretamente associadas à depressão, resultam em alto custo à economia mundial. Na Europa, no ano de 2004, os gastos devido à morbidade e à mortalidade relacionadas ao transtorno depressivo, foram estimados em 76 bilhões de Euros [2].

Os sintomas mais frequentes atribuídos aos pacientes depressivos estão relacionados à perda de apetite, do interesse sexual, variações do humor, ansiedade, insônia e diminuição da atividade motora. O paciente tem se mostrado inútil, abandonado, desesperado e incapacitado para enfrentar as dificuldades do cotidiano, além de uma maior utilização de serviços de saúde [3].

Segundo estudos realizados em diferentes países ocidentais a depressão é um transtorno freqüente, atingindo todas as faixas etárias, desde crianças a idosos. A predominância anual na população tem atingido níveis de 3% a 11%, no entanto, em estudos realizados em populações específicas de pacientes, os resultados são superiores. Mais de 10% dos pacientes sob cuidados primários em saúde apresentaram sintomas de depressão, 22% a 33% dos pacientes internados com doença física, 33% em pacientes que apresentaram infarto recente, chegando a 47% nos casos de pacientes com câncer [3].

A depressão tem sido sub-diagnosticada e sub-tratada. Em torno de 50 a 60% dos casos de depressão não têm sido diagnosticados pelo clínico. Muitas vezes, os pacientes não recebem tratamento suficientemente adequado e específico. Os motivos para o sub-diagnóstico advêm de fatores relacionados aos pacientes e médicos, tais como: preconceito dos pacientes, em razão do diagnóstico da doença, descrença do tratamento, falta de treinamento, específico dos clínicos, os quais têm reconhecido apenas os sintomas físicos e identificado os sintomas da depressão como “compreensível”. No entanto, 70% da morbi-mortalidade associada à depressão pode ser prevenida com tratamento adequado [3,4].

A depressão é uma síndrome clínica muito comum e de longa duração, porém, tratável. O uso de fármacos no tratamento de desordens psiquiátricas tem uma história relativamente curta e ainda encontra-se em crescente fase de desenvolvimento. No final da década de 50, os fármacos antidepressivos e sua utilização junto à prática clínica trouxeram um avanço importante no tratamento e no entendimento de possíveis mecanismos subjacentes aos transtornos depressivos. A depressão foi diagnosticada como uma doença passível de tratamento, semelhante a outras doenças como o diabetes e à hipertensão arterial.

I.1.2. FLUOXETINA E NORFLUOXETINA

Até os anos 80 havia duas classes de antidepressivos, os tricíclicos (ADTs) e os inibidores de monoaminoxidase (IMAOs). Embora muito eficazes e ainda muito utilizados, apresentam efeitos adversos indesejáveis causados pela inespecificidade de sua ação farmacológica e em casos de superdosagem, têm sido potencialmente letais. Aproximadamente 70% dos pacientes com depressão têm sido beneficiados com os ADTs, no entanto, cerca de 30% a 40% não são contemplados com a resposta clínica desejada, necessitando a associação de outra classe de antidepressivos, ou até mesmo eletroconvulsoterapia [4,5].

Nas últimas duas décadas surgiram novas classes de antidepressivos, a partir da pesquisa de moléculas desprovidas dos efeitos adversos dos clássicos ADTs e IMAOs. Denominados antidepressivos da nova geração, ou antidepressivos não-tricíclicos, têm sido classificados em função da sua ação farmacológica, pois não compartilham estruturas comuns. Entre os antidepressivos da nova geração pode-se destacar os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs), os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (SNRIs) e os noradrenérgicos e específicos serotoninérgicos (NaSSa) [6,7].

Dentre os SSRIs, destaca-se a **fluoxetina (FLX)** ($C_{17}H_{18}F_3NO$: ($\pm$)-*N*-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propan-1-amina), um fármaco que tem sido prescrito para uma variedade de psicopatologias, incluindo depressão, distúrbios alimentares, desordens obsessivo-compulsivas e distímia [8], apresentando eficácia clínica semelhante aos clássicos ADTs, mas destituídos dos efeitos anticolinérgicos (boca seca, constipação, visão turva, retenção urinária e toxicidade cognitiva) e cardiovasculares (aumento do ritmo cardíaco e diminuição na condução cardíaca).

Após sua aprovação pelo FDA (“*Food and Drug Administration*” – órgão americano responsável pela regulamentação de alimentos e medicamentos em geral) em 1987, a fluoxetina foi comercializada primeiramente com o nome Prozac® (*Eli Lilly and Company* – Baltimore, US), sendo considerado um dos principais produtos farmacêuticos do século pela revista *Fortune* em Novembro de 1999 [9]. Embora presente no mercado aproximadamente há 25 anos, a fluoxetina continua sendo um dos antidepressivos mais prescritos em todo o mundo, além de ser um dos poucos que podem ser administrados em crianças, adolescentes e durante a gravidez [10,11].

A fluoxetina é administrada na forma de racemato, e após ingestão, é rapidamente metabolizada no fígado, onde sofre desmetilação, originando seu metabólito primário que também apresenta um centro quiral, exibindo atividade clínica significativa (inibição da recaptação de serotonina e inibição de isoenzimas do citocromo P-450), a **norfluoxetina** (**NFLX**). A **Figura I.1** ilustra as estruturas químicas da FLX e NFLX, bem como seus respectivos centros quirais.

Figura I.1. Estruturas químicas da fluoxetina (FLX) e norfluoxetina (NFLX). Os asteriscos indicam o centro quiral de cada molécula.

Os tempos de meia vida são aproximadamente de 1 a 4 dias para FLX e de 7 a 10 dias para NFLX, sendo que a FLX apresenta altas taxas de ligação às proteínas

plasmáticas, em torno de 94% [12], deslocando outros fármacos da ligação protéica, favorecendo assim, o aumento de seu nível plasmático. A dose administrada de FLX em pacientes depressivos variam entre 20 a 80 mg/dia e a faixa de concentração plasmática terapêutica recomendada tem sido de 50 a 500 ng mL⁻¹ [13]. No entanto, estudos clínicos recentes mostram a dificuldade de correlacionar à resposta clínica os níveis plasmáticos de FLX e NFLX. Este fato pode ser atribuído ao fato de que os métodos clássicos empregados na análise de FLU e NOR não são capazes de discriminar seus respectivos enantiômeros, mesmo possuindo diferentes propriedades farmacológicas [14].

I.1.2.1. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS ENANTIOSSELETIVAS

O estudo da quiralidade dos compostos químicos, principalmente os que apresentam ação terapêutica, tem sido importante do ponto de vista farmacológico, farmacocinético, toxicológico e de controle de qualidade de medicamentos. Os fármacos quirais têm sido administrados como racemato, no entanto, os enantiômeros podem apresentar os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (disposição cinética) de forma estereosseletiva [15].

Segundo estudos de disposição cinética da fluoxetina e norfluoxetina, Perucca *et al.* [16] propuseram, por razões relacionadas à ação das enzimas responsáveis pelo metabolismo (isoenzimas do citocromo P-450) de cada um dos enantiômeros, que estes fármacos apresentam atividades farmacológicas enantiosseletivas, sendo que os enantiômeros *R*-FLX, *S*-FLX e *S*-NFLX apresentaram maior atividade em relação à inibição da recaptação de serotonina que a *R*-NFLX (sendo que a *S*-NFLX é aproximadamente 20 vezes mais ativo que a *R*-NFLX [17]). Em outro estudo, Wong *et al.* demonstraram que a *S*-FLX é cerca de 6 vezes mais ativo que seu enantiômero *R*-FLX como inibidor da isoenzima CYP 2D6 (da família do citocromo P-450) [18]. Assim,

como as duas formas enantioméricas (*R* e *S*) de um fármaco podem apresentar diferenças quanto à atividade farmacológica e/ou toxicidade, a separação dos enantiômeros tem sido de extrema importância na análise de fármacos quirais.

A padronização de métodos analíticos enantiosseletivos possibilita maior segurança e eficácia na terapia com fármacos quirais, já disponíveis no comércio e/ou em desenvolvimento. A cromatografia líquida de alta eficiência (LC) tem sido a técnica mais utilizada para a separação de enantiômeros. Nesse caso, a separação pode ser conseguida por procedimentos indiretos e diretos, onde a formação do par diastereoisômeros, entre o analito e o seletor quiral (agente derivatizante ou fase estacionária quiral), espacialmente orientado e estável através de forças de ligação intermoleculares como ligação de hidrogênio, interações π - π , dipolo-dipolo e impedimento estérico, é que governa a separação dos enantiômeros.

No procedimento indireto, o par de enantiômeros é submetido a uma reação de derivatização com um reagente quiral e enantiomericamente puro, visando obter espécies diastereoisômeros transitórias, que podem ser separados empregando fases estacionárias não quirais. Agentes derivatizantes tais como *R*-1-(1-naftil)etil isocianato [14] e 4-(*N*-cloroformilmetil-*N*-metil)amino-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol [19] têm sido usados para o processo de derivatização da FLX e NFLX.

Nos procedimentos diretos, a separação do par de enantiômeros fundamenta-se na diferença entre as estabilidades das ligações dos pares diastereoisoméricos, formados entre os dois enantiômeros e as moléculas quirais imobilizadas em suportes adequados (fases estacionárias quirais). A diferença de estabilidade entre os complexos conduz a diferença nos tempos de retenção e, portanto, à separação cromatográfica. Diferentes fases estacionárias, como Ovomucoide [20], β -ciclodextrina [21] e polissacarídeos (amilose e celulose) [22,23] têm sido aplicadas para a separação dos enantiômeros de

FLX e NFLX sem o uso de derivatização, diminuindo consideravelmente o tempo requerido para o preparo de amostra.

I.1.3. MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA

A monitorização terapêutica tem sido descrita como valioso recurso clínico, na individualização do regime de dosagem, de acordo com a concentração do fármaco e/ou de seus produtos de biotransformação, em amostras de plasma ou soro, coletadas com base no contexto clínico e nos princípios da farmacocinética.

O objetivo da monitorização terapêutica é assegurar a eficácia e minimizar os efeitos adversos dos fármacos, prescritos na clínica. Os fármacos monitorados são aqueles que apresentam intervalos terapêuticos bem estabelecidos, ou seja, a maioria dos pacientes, que apresentam concentrações plasmáticas dentro deste intervalo fixo, tem as desordens psiquiátricas mantidas sob controle e efeitos adversos aceitáveis. A monitorização terapêutica também pode ser aplicada a fármacos de baixo índice terapêutico, alta variabilidade interindividual na farmacocinética, e resposta clínica não facilmente ou não imediatamente mensurável [24].

A aplicação clínica da monitorização terapêutica tem sido indicada em situações onde a eficácia do medicamento é questionada, quando o paciente exibe toxicidade provavelmente relacionada ao fármaco, quando há suspeita de não aderência do paciente ao regime de dosagem estabelecido, nas situações de interações de fármacos, nas patologias associadas, em situações de mudanças na formulação, ou ainda quando a condição do paciente é refratária ao regime de dosagem convencional [25].

I.1.4. PREPARO DA AMOSTRA

A determinação de fármacos em amostras biológicas, principalmente no plasma de pacientes, coletadas com base no contexto clínico e nos princípios da farmacocinética, tem sido um procedimento usual na área clínica, para assegurar a eficácia terapêutica e minimizar os efeitos adversos (sintomas de toxicidade) dos fármacos prescritos [26].

O tratamento prévio de amostras biológicas, eliminação de interferentes (compostos endógenos ou outros fármacos que os pacientes podem administrar de forma concomitante com os analitos), extração e pré-concentração dos analitos, tem sido um procedimento indispensável e extremamente importante para o desenvolvimento de métodos cromatográficos com sensibilidade e seletividade analítica adequados às análises de fármacos no intervalo terapêutico.

Os métodos convencionais, empregados no preparo de amostras biológicas para análises de antidepressivos por técnicas cromatográficas para fins de monitorização terapêutica ou propósitos toxicológicos, têm sido a extração líquido-líquido e extração em fase sólida [27-30].

A técnica de extração líquido-líquido (LLE - “liquid-liquid extraction”) apresenta desvantagens, tais como consumo de solventes orgânicos de alta pureza, exposição do analista a compostos tóxicos, requer a concentração da fase orgânica, várias etapas para sua execução e formação de emulsão entre as fases, o que resulta na perda do analito [31,32].

A extração em fase sólida (“solid-phase extraction” - SPE) apresenta uma grande variedade de fases extratoras, resultando em diferentes tipos de interações com os analitos. Este fato favorece a seletividade analítica, possibilitando a automação das análises e o acoplamento em linha com técnicas cromatográficas. Entretanto, tem apresentado algumas limitações como o bloqueio dos poros da fase extratora pelos

componentes da matriz biológica, utilização de solventes orgânicos para a eluição, variações analíticas entre cartuchos extratores e várias etapas operacionais para sua execução [33,34].

Os avanços recentes em preparo de amostra têm sido focados na miniaturização, automação, alto desempenho, além da possibilidade de hifenação com outros instrumentos analíticos e baixo custo de operação, através do baixo ou inexistente consumo de solventes e de configurações que requerem instrumentação simples, presente na maioria dos laboratórios especializados em desenvolvimento de metodologias cromatográficas. A diminuição das etapas de preparo de amostra é importante, não somente para reduzir o erro experimental, mas também para a redução do tempo e do custo das análises, especialmente nos casos onde a análise de traços é requerida.

Neste contexto, podemos destacar as técnicas de microextração, as quais não utilizam solvente orgânico (ou utilizam em menor quantidade, da ordem de alguns microlitros) e o volume da fase extratora é bem menor quando comparado ao volume da amostra. A extração é baseada no processo de partição do soluto entre a fase aquosa (amostra) e a fase extratora, não sendo um processo exaustivo, ou seja, quando o equilíbrio de partição do analito entre as fases é atingido, o aumento no tempo de extração não resulta no aumento da massa de analito extraída. Assim, quanto maior o coeficiente de partição do analito, semelhança entre as propriedades físico-químicas do soluto com a fase extratora, maior será a quantidade de analito extraído. Estas técnicas integram a extração e concentração do analito em única etapa e permitem a introdução do analito extraído no sistema cromatográfico utilizando o mesmo dispositivo empregado na extração, reduzindo a perda do analito e o tempo da análise.

A microextração em fase sólida (“solid-phase microextraction” - SPME), introduzida por Pawliszyn *et al.* em 1990 [35], é um exemplo típico de técnica

miniaturizada de preparo de amostras. Esta técnica, quando hifenada a sistemas analíticos propicia resultados em análises rápidas, baixo consumo de solvente, menor exposição dos analistas aos fluidos biológicos e aos solventes tóxicos, assim como, maior precisão analítica.

A SPME utiliza uma fibra de sílica fundida recoberta com uma fase extratora polimérica ou um sólido adsorvente, onde os solutos são diretamente extraídos da amostra para o recobrimento da fibra. Consiste de um processo baseado no equilíbrio de partição entre as fases: aquosa (amostra homogênea), polimérica extratora (fibra) e gasosa. Durante a extração em um sistema trifásico considerado ideal, os analitos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição seja atingido. Dessa forma, a massa extraída do analito pela fibra está relacionada ao equilíbrio de massas nas fases do sistema. A extração pode ser realizada pela exposição da fibra diretamente na amostra, ou na fase gasosa (“headspace”) [36-38].

Dentre as desvantagens de técnica SPME, pode-se destacar a fragilidade das fibras, baixa capacidade de sorção devido ao pequeno volume de fase extratora (0,5 µL), baixa estabilidade das fases extradoras na presença de solventes orgânicos ou em solução tampão com valores extremos de pH, e o número limitado de fases extradoras disponíveis no comércio, as quais são adequadas apenas para análises de solutos não iônicos

I.1.4.1. “in-tube” SPME

Um novo sistema SPME/LC (microextração em fase sólida acoplada a cromatografia líquida, LC), denominado **“in-tube” SPME**, foi desenvolvido para a microextração e pré-concentração de fármacos menos voláteis e/ou termicamente instáveis [39]. Utiliza um tubo capilar aberto de sílica fundida (um segmento de coluna capilar de cromatografia gasosa, GC), com a superfície interna revestida com fase

estacionária, o qual tem sido acoplado em linha com o sistema LC (**Figura I.2**). Esta técnica permite automação do processo de extração, resultando em maior precisão e menor tempo de análise, quando comparado às técnicas “off-line”, além de suprir as desvantagens citadas anteriormente da técnica SPME convencional (na fibra). Como as amostras biológicas são injetadas no sistema, praticamente em seu estado fisiológico, diminui a exposição dos analistas a estas amostras, além de minimizar perdas do analito durante o processo de extração.

Figura I.2. Dispositivo geral para “in-tube” SPME utilizando capilares abertos.

O sistema “in-tube” SPME/LC pode ser montado, fixando-se a coluna capilar entre a alça de amostragem (“loop”) e a agulha do injetor automático do LC, ou simplesmente, substituindo a alça de amostragem. O injetor automático aspira uma alíquota da amostra do frasco e esta é transportada para o capilar a vazão constante. O volume de amostra aspirado é então dispensado novamente no frasco de amostragem do injetor. Estas etapas são referidas como ciclos aspirar/dispensar, as quais têm sido executadas, repetitivamente, segundo programas do injetor automático. Na coluna capilar ocorre o processo de partição do analito com a fase extratora, até que o equilíbrio de distribuição seja atingido. Durante o processo de extração, a válvula seis pórticos do

injetor LC deverá estar na posição carregar (**Figura I.3a**). O capilar tem sido lavado e condicionado antes do processo de extração com solução de metanol/água ou com a fase móvel.

Os analitos extraídos são dessorvidos rapidamente da fase extratora do capilar pelo fluxo da fase móvel ou pela introdução de um solvente orgânico no capilar, após posicionar a válvula seis pórticos do injetor LC na posição injetar (**Figura I.3b**). Os analitos dessorvidos são transferidos para a coluna analítica do LC para separação e posterior detecção. Desta forma, a técnica “in-tube” SPME não necessita de uma interface especial SPME/LC para dessorção dos analitos.

Figura I.3. Esquema do processo “in-tube” SPME/LC. (a) extração (posição carregar) e (b) dessorção (posição injetar). Adaptado da ref [40].

A **Tabela I.1** ilustra alguns trabalhos utilizando o método “in-tube” SPME/LC para análise de fármacos em amostras biológicas.

Tabela I.1

Aplicações da técnica “in-tube” SPME na análise de fármacos em amostras biológicas

Fármacos	Matriz	Ciclos, volume e vazão de amostra	Capilar	Sistema e Detecção (LD)	Referências
Anfetaminas	Urina	15 ciclos , 35 μL 100 $\mu\text{L min}^{-1}$	Omegawax 250	LC-MS (0,3 - 0,8 ng mL ⁻¹)	Kataoka <i>et al.</i> 2000 (41)
Benzodiazepínicos	Soro e Urina	10 ciclos , 30 μL 0,3 mL min ⁻¹		LC-MS (0,02 – 2,0 ng mL ⁻¹)	Yuan <i>et al.</i> 2000 (42)
Antidepressivos	Urina	80 $\mu\text{L min}^{-1}$	HM / DB-5	CE-UV (44 - 153 ng mL ⁻¹)	Jinno <i>et al.</i> 2001 (43)
Verapamil e metabólitos	Plasma e Urina	40 ciclos, 30 μL 100 $\mu\text{L min}^{-1}$	Polímero PPY	LC-MS (5-8 ng mL ⁻¹)	Walles <i>et al.</i> 2002 (44)
Benzodiazepínicos	Plasma	4 ciclos, 20 μL 15 $\mu\text{L min}^{-1}$	RAM/ADS	LC-UV (24 – 29 ng mL ⁻¹)	Mullett <i>et al.</i> 2002. (45)
Ranitidina	Urina	10 ciclos, 30 μL 100 $\mu\text{L min}^{-1}$	Omegawax 250	LC-MS (10 ng mL ⁻¹)	Kumazawa <i>et al.</i> 2003 (46)
Derivados de Xantina	Soro	40 $\mu\text{L min}^{-1}$	Poli (MAA-EGDMA) monolítico	LC-UV (6,5 – 12 ng mL ⁻¹)	Fan <i>et al.</i> 2004 (47)
Alcalóides	Plasma	40 $\mu\text{L min}^{-1}$	Poli (MAA-EGDMA) monolítico	LC-UV– FLD (1,8 – 2,6 ng mL ⁻¹)	Wen <i>et al.</i> 2005 (48)
Anfetaminas	Urina	40 $\mu\text{L min}^{-1}$	Poli (MAA-EGDMA) monolítico	LC-UV (1,4 – 4,0 ng mL ⁻¹)	Fan <i>et al.</i> 2005 (49)
Antinflamatórios	Urina	500 $\mu\text{L min}^{-1}$	β -ciclodextrina	LC-UV (18 – 38 ng mL ⁻¹)	Fan <i>et al.</i> 2005 (50)
Fluoxetina	Soro	5 ciclos, 50 μL 400 $\mu\text{L min}^{-1}$	Imunoafinidade	LC-MS	Queiroz <i>et al.</i> 2007 (51)
Antidepressivos	Plasma	15 ciclos, 100 μL 315 $\mu\text{L min}^{-1}$	OV-1701	LC-UV (20 – 50 ng mL ⁻¹)	Silva <i>et al.</i> 2008 (52)
Alcalóides	Urina e Saliva	25 ciclos, 40 μL 150 $\mu\text{L min}^{-1}$	CP-Pora Plot	LC-MS (30 – 40 pg mL ⁻¹)	Kataoka <i>et al.</i> 2009 (53)
Esteróides	Urina	20 ciclos, 40 μL 150 $\mu\text{L min}^{-1}$	Supel-Q Plot	LC-MS (9 – 182 pg mL ⁻¹)	Saito <i>et al.</i> 2010 (54)

Omegawax: sílica fundida com gripes polietilínoglicol, Supel-Q Plot: sílica com grupos divinilbenzeno, PPY: polipirrol, HM: fibra de Zilon, DB-5: (5% fenil) metil polisiloxano, RAM/ADS: acesso à material restrito / alquil diol sílica, CE: eletroforese capilar, FLD: detector de fluorescência, UV: detector de ultravioleta, DAD: detector de arranjo de diodos, MS : espectrometria de massas, Poli (MAA-EGDMA) monolítico: poli (metacrilato ácido-etileno glicol dimetacrilato) monolítico, OV-1701: (14% cianopropilfenil) metil polisiloxano, CP-Pora Plot: sílica com grupos estireno básicos e divinilbenzeno.

Para evitar o bloqueio do capilar, as proteínas dos fluidos biológicos têm sido removidas através de diluição e filtragem em micro filtro com poros de 0,25-0,45 μm [55], em micro concentrador a 10000 g por 20 min [41], ou pela precipitação com solventes orgânicos [44].

A eficiência da extração SPME tem sido determinada através da quantidade de analito extraída pela fase extratora, que é fator dependente da polaridade e espessura da fase do revestimento. Para as fases estacionárias que extraem os analitos baseados no processo de adsorção, a quantidade de analito extraído pode ser expressa segundo a equação I.1:

$$n_A = K_A V_f V_s C_A^o (C_{fmax} - C_{fA}^{\infty}) / [V_s + K_A V_f (C_{fmax} - C_{fA}^{\infty})] \quad \text{Equação I. 1}$$

onde n_A representa a quantidade de analito A extraído pela fase estacionária quando estabelecido o equilíbrio de partição entre as fases, V_f e V_s os volumes do revestimento da fase e de solução de amostra, respectivamente; C_A^o a concentração inicial de analito na amostra; C_{fmax} a concentração máxima dos sítios ativos do revestimento; C_{fA}^{∞} a concentração do analito no revestimento no equilíbrio e K_A a constante de adsorção.

O tempo requerido para atingir o equilíbrio de partição do analito entre as fases durante o processo “in-tube” SPME pode ser expresso segundo a equação I.2.

$$t_e = L [1 + K_A x (V_f/V_v)] / \mu \quad \text{Equação I. 2}$$

onde L representa o comprimento do capilar, K_A : coeficiente de partição, V_f : volume do revestimento da fase, V_v : volume livre do capilar, μ : velocidade do fluxo do

fluido biológico. Durante as extrações SPME as dimensões físicas: L , V_f , V_v e o valor K_A são fixos; desta forma, o tempo de extração depende apenas da velocidade do fluxo do fluido, o qual é atingido rapidamente, pois a extração é realizada sob agitação pelo fluxo da amostra, entrando e saindo da coluna capilar.

Para obtenção de maior eficiência do processo “in tube” SPME, as variáveis: comprimento e fase estacionária do capilar, volume e ciclos de amostra aspirada/dispensada e velocidade do fluxo da amostra deverão ser otimizadas.

I.1.4.2. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO “in-tube” SPME

Efeito das modificações da amostra

As fases estacionárias dos capilares, em sua grande maioria, não são trocadoras de íons; extraem somente espécies quimicamente neutras presentes na amostra. Os ácidos fracos e bases poderão ser convertidos a sua forma neutra, na qual poderão ser extraídos. Para assegurar-se que 99% dos compostos ácidos, presentes em uma amostra, possam ser convertidos para a forma neutra, o pH deverá ter valor, no mínimo, duas unidades abaixo do pKa do analito. Para os analitos básicos, o pH deverá ter valor, no mínimo duas unidades acima do pKb do analito.

Wu *et al.* [58] obtiveram eficiente extração de β -bloqueadores, fármacos básicos, em pH 8,5 (Tampão tris-HCl, 100mM) e em solução saturada com NaCl. Embora o efeito “salting out” aumente a eficiência do processo “in tube” SPME, poderá causar obstrução do capilar através da deposição do sal.

A presença de solventes hidrofílicos na amostra diminui a eficiência da extração, pois aumenta a solubilidade dos analitos na mesma. A eficiência da extração não tem sido influenciada por adições de metanol em concentrações iguais ou menores a 5%. Na

análise de benzodiazepínicos em amostras de soro, 5% de metanol foi adicionado às amostras para liberação das proteínas ligadas aos fármacos [45].

Efeito do volume e número de ciclos de amostra aspirada/dispensada

O volume e número de ciclos de amostra aspirada/dispensada estão linearmente relacionados com a capacidade do capilar e quantidade de analito extraído.

Uma coluna capilar de 60 cm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno apresenta capacidade aproximada de 29,4 μL , já da agulha de injeção (10 μL) à extremidade final da coluna, a capacidade resultante será de 39,4 μL . O volume de amostra aspirada/dispensada tem sido de 30 a 100 μL com velocidade linear de 50 a 400 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Em condição ideal, a amostra deverá ser aspirada/dispensada até que atinja o equilíbrio de sorção dos compostos com a fase estacionária. Este equilíbrio tem sido avaliado através de gráficos do rendimento da extração *versus* número de ciclos de amostra aspirada/injetada. No entanto, quando alta sensibilidade analítica não é requerida, extrações fora do equilíbrio têm sido realizadas com o objetivo de diminuir o tempo de análise.

Em estudo anterior, nosso grupo (Silva *et al.* [51]) observou que a diminuição da velocidade linear de fluxo de 625 para 315 $\mu\text{L min}^{-1}$, durante 15 ciclos, resultou no aumento de eficiência do processo “in-tube” SPME para análises de antidepressivos em amostras de plasma. Abaixo desta velocidade, a extração requer longo tempo de análise e valores superiores a 315 $\mu\text{L min}^{-1}$ ocasionou a formação de bolhas ao longo do capilar, reduzindo a eficiência da extração.

Para a extração de esteróides em amostras de urina, 20 ciclos de 40 μL de amostra foram transportados para o capilar Supel-Q Plot de 60 cm de comprimento. Adicional aumento no número de ciclos, no volume de amostra e no comprimento do capilar resultou em maior tempo de análise, sem aumento significativo na sensibilidade analítica, e picos com cauda [54].

Dessorção dos compostos do capilar

A dessorção dos analitos do capilar tem sido rápida, pois a coluna capilar apresenta fase estacionária com espessura ao redor de 0,1 μm . Este processo tem sido realizado de dois modos: dinâmico (dessorção através da fase móvel) e estático (quando solvente orgânico é aspirado e transportado para o capilar). A dessorção estática tem sido aplicada para compostos fortemente adsorvidos à fase do capilar, neste caso a dessorção deverá ser rápida e eficiente, com reduzido volume de solvente. Para um capilar (60 cm x 0,25 mm d.i.) a dessorção tem sido realizada aspirando pequeno volume ($< 100 \mu\text{L}$) de solvente. Deve-se considerar a capacidade da coluna e solubilidade do solvente com a fase móvel. Já para o modo dinâmico é possível a dessorção direta com o fluxo da fase móvel, apenas girando a válvula seis pórticos do LC para a posição injetar.

Seleção da coluna capilar

Várias colunas capilares encontram-se disponíveis no comércio com diferentes fases estacionárias, diâmetros internos, comprimentos e espessuras de filme. A seleção da fase estacionária baseia-se na regra “similar solubiliza similar”. Por exemplo: em coluna de baixa polaridade, como a fase líquida polidimetilsilicone, compostos hidrofóbicos são

retidos de forma seletiva; no entanto, compostos hidrofílicos apresentam maior afinidade com a fase polietileno glicol (maior polaridade).

O diâmetro interno, comprimento e espessura do filme do capilar estão linearmente relacionados com a quantidade de analitos extraídos, no entanto, o aumento das variáveis descritas pode causar alargamento dos picos e dessorção não quantitativa dos analitos. Na maioria das análises têm-se utilizado colunas capilares de 50 a 60 cm de comprimento, com finos filmes, as quais têm resultado em extrações eficientes, rápidas, cromatogramas bem definidos e ausência de “carryover” (efeito de memória).

Embora colunas capilares com fase líquida quimicamente ligada ou “cross-linked” sejam estáveis na presença de água ou solventes orgânicos, estas podem ser facilmente deterioradas por ácidos inorgânicos ou bases fortes. Desta forma, torna-se necessário a avaliação da estabilidade da fase estacionária, quando exposta à fase móvel durante o processo de dessorção. Como exemplo, a coluna Omegawax 250 foi utilizada em mais de 500 extrações sem alteração da eficiência nas extrações de anfetaminas [56] e hipertensivos [57]. Outras aplicações da técnica “in-tube” SPME, ilustrando a avaliação de diferentes fases extratoras, estão apresentadas na **Tabela I.1** (seção I.1.4.1).

Como discutido nesta seção, muitas colunas capilares comerciais de cromatografia gasosa têm sido avaliadas na técnica “in-tube” SPME. Porém, o desenvolvimento de novas fases extratoras mais seletivas, estáveis e de baixo custo, tem sido necessário para o desenvolvimento da técnica “in-tube” SPME, buscando um maior leque de aplicações e métodos com sensibilidade analítica adequada (contemplando o intervalo terapêutico necessário) para análise de fármacos em fluidos biológicos [59]. Portanto, novos revestimentos, tais como: polímeros condutores, material de acesso restrito (RAM), polímeros molecularmente impresso (MIP), material imunosorvente, entre outros, têm sido avaliados [60 – 63].

I.1.4.3. PIRROL

Os polímeros condutores são materiais versáteis, ou seja, de acordo com o modo de preparo, apresentam diferentes interações com o analito durante processo de extração, tais como: interações hidrofóbicas, ácido-base e π - π , além de permitirem a adição de contra-íons ou de grupos funcionais ao monômero, que favorecem seletividade à extração dos analitos de interesse na matriz. Baseado nessas propriedades, os polímeros condutores têm sido avaliados, não somente como sensores químicos [64] e dispositivos eletrônicos [65], mas também como fase extratora para técnicas de microextração, especialmente empregando os polímeros como o poli (pirrol) (**PPY**), a poli (anilina) (**PANI**) e o poli (tiofeno) (**PTh**).

Uma dessas classes de materiais, o PPY, e seus derivados, tem sido um dos mais amplamente estudados nos últimos anos, devido a algumas vantagens adicionais, tais como: facilmente polimerizado em pH neutro por métodos eletroquímicos e químicos, relativamente estável, no seu estado oxidado, em solução em valores de pH não extremos e em fase gasosa, além do monômero pirrol e alguns de seus derivados serem disponíveis no mercado a custo acessível [58].

O pirrol (**PY**) (C_4H_4NH) é um composto que apresenta uma estrutura heterocíclica aromática de cinco membros, cujo heteroátomo é um nitrogênio e as insaturações estão situadas nos dois carbonos α e β , respectivamente (**Figura I.4**).

Em comparação às fases extratoras comerciais, o PPY tem apresentado maior eficiência e seletividade para as extrações SPME (na fibra ou “in-tube”) de solutos polares, aromáticos, básicos e aniônicos [58, 66, 67].

Figura I.4. Estrutura química do pirrol.

Para aplicações “in-tube” SPME/LC, Wu *et al.* demonstraram que, quando comparado às fases extratoras comerciais (GC), o capilar de PPY apresentou maiores taxas de recuperação para as extrações de compostos polares e aromáticos, tais como anfetaminas em amostras de urina e cabelo [51] e β -bloqueadores na urina e soro [58]. Já Walles *et al.* comprovaram a eficiência deste revestimento nas análises de verapamil e seus principais metabólitos em várias matrizes biológicas, como plasma, urina e cultura de célula [44]. O capilar PPY mostrou-se estável nas condições de análise permitindo a utilização em centenas de determinações.

Em razão dos bons resultados descritos nestes trabalhos, a seletividade e a eficiência do filme de PPY foi avaliada como fase extratora para “in-tube” SPME para a determinação enantiosseletiva (LC) de fluoxetina e norfluoxetina em amostras de plasma.

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. OBJETIVO GERAL

Padronização e a validação do método “in-tube” PPY SPME/LC-FLD para análise enantiosseletiva de fluoxetina e norfluoxetina em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

I.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Otimização das condições cromatográficas LC-FLD para separação enantiosseletiva de FLX e NFLX;
2. Desenvolvimento do capilar de PPY;
3. Acoplamento das técnicas “in-tube” SPME e LC;
4. Otimização das variáveis do processo “in-tube” PPY SPME/LC;
5. Comparação da eficiência do capilar de PPY desenvolvido com outros capilares comerciais utilizados para “in-tube” SPME;
6. Validação analítica do método padronizado “in-tube” PPY SPME/LC-FLD;
7. Avaliação do método proposto “in-tube” SPME/LC-FLD para análises de amostras de plasma de pacientes em terapia com a fluoxetina.

I.3. MATERIAIS E MÉTODOS

I.3.1. PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES

Os padrões de alta pureza ($> 98\%$) dos antidepressivos fluoxetina e de seu metabólito, norfluoxetina, foram adquiridos pelo fornecedor Sigma-Aldrich[®] (São Paulo – Brasil). As soluções padrão diluídas dos antidepressivos foram preparadas considerando o intervalo terapêutico, a partir da diluição de suas respectivas soluções estoques de 1 mg mL^{-1} em metanol. Essas soluções apresentaram estabilidade de 45 dias quando estocadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Metanol e a acetonitrila, grau HPLC, além de ácido clorídrico, citrato de sódio, borato de sódio, ácido tricloro acético, acetato de sódio, ácido sulfúrico, ácido acético, hidróxido de sódio, ácido perclórico 70%, peróxido de hidrogênio, trietilamina, hexano e isopropanol foram adquiridos do fornecedor J.T. Backer[®] (Phillipsburg, USA), hexafluorofosfato de potássio, cloreto de ferro III, pirrol 98% (destilado antes do uso) e aminopropiltrietoxissilano 99% (APTES) da Aldrich[®] (Steinheim, Alemanha) e o gás nitrogênio (99,999%) da Air Liquid[®] (São Paulo, Brasil). A água utilizada nos ensaios foi purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore[®] (São Paulo, Brasil).

I.3.2. DESENVOLVIMENTO DO CAPILAR PPY

A superfície interna de um capilar de sílica fundida (60 cm x 0,25 mm d.i) foi revestida com filme de PPY via processo de polimerização química [68]. As extremidades do capilar (aproximadamente 3 cm de cada lado) foram envolvidas com tudo PEEK (poliéter éter cetona, 0,5 mm I.D.) que serviram de suporte para as conexões

de aço inox que possibilitaram o acoplamento do capilar de PPY à válvula seis pórticos do injetor automático.

Inicialmente, o capilar de sílica foi lavado com uma mistura de peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico concentrado (30:70, v/v) durante uma hora, seguida de lavagem com água, etanol e novamente com água, para retirar a mistura ácida do interior do capilar.

Na etapa seguinte, a superfície interna do capilar de sílica foi silanizada com solução etanólica de APTES (5% APTES, 5% água e 90% etanol), o qual foi percolada através do capilar por 24 horas à temperatura ambiente com auxílio de uma bomba de LC, e em seguida, extensivamente lavada com água e etanol. Para a secagem do capilar, uma de suas extremidades foi conectada a um injetor de um cromatógrafo gasoso, propiciando a passagem de gás nitrogênio (N_2) através do capilar em fluxo baixo ($0,2 \text{ mL min}^{-1}$) durante 12 horas, à 60°C .

Para o revestimento da superfície de sílica, a solução do monômero (pirrol em isopropanol, 50% v/v) foi percolada através do capilar, formando assim, uma fina camada do monômero na superfície interna do capilar, e em seguida, a solução oxidante (cloreto de ferro $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em ácido perclórico $0,4 \text{ mol L}^{-1}$) foi percolada através do capilar, com auxílio de uma microseringa de LC e passagem de N_2 . Este procedimento, referido como um ciclo de revestimento de PPY, foi repetido algumas vezes para obtenção de filme mais espesso. Neste estudo, a polimerização foi realizada durante 6 ciclos. Finalmente, o capilar foi lavado com metanol por 10 minutos e seco com N_2 .

Após o acoplamento do capilar de PPY ao sistema LC, o mesmo foi condicionado com a fase móvel com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ por 30 minutos. Neste trabalho o capilar foi fixado no lugar da alça de amostragem (“loop”) do injetor automático.

1.3.3. INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu[®] (Kyoto, Japão) modelo LC-20AT, equipado com injetor “*Rheodyne*” modelo 7125, amostrador de 20 µL, injetor automático Varian[®] (California, USA) modelo 430, detector de fluorescência (Shimadzu[®] modelo RF-AxL). Os enantiômeros foram separados em coluna Chiralcel OD-R (celulose tris 3,5-dimetilfenilcarbamato) (250 x 4,6 mm, 10 µm) – Chiral Tech[®] (West Chester, USA) à temperatura ambiente (25 °C). A denominação “R” é referente ao uso da coluna no modo fase reversa, já que a fase estacionária quiral baseada em celulose, imobilizada em sílica por meio de adsorção física, é solúvel em alguns solventes orgânicos, como tetrahidrofurano, dioxano, tolueno e acetato de etila, por exemplo, restringindo a escolha da fase móvel a solventes compatíveis [69]. O injetor automático foi programado para controlar os processos de extração, dessorção e injeção, como mostrado na **Tabela I.2**.

Para a obtenção de satisfatória resolução cromatográfica dos fármacos, em menor tempo de análise, diferentes composições de fases móveis foram avaliadas, em diferentes vazões, que variaram entre 0,5 e 1,2 mL min⁻¹. As soluções tampão avaliadas foram as seguintes: fosfato de sódio (0,05 a 0,25 mol L⁻¹ pH 3,8), hexafluorofosfato de potássio (0,005 a 0,10 mol L⁻¹ pH 3,0), perclorato de sódio (0,05 a 0,25 mol L⁻¹). As misturas de distintas soluções tampão, geralmente duas soluções, com modificadores orgânicos (acetonitrila (20 a 50%), metanol (20 a 40%) e trietilamina (0,01 a 0,1%)) também foram avaliadas. A fase móvel foi filtrada através de sistema de filtragem a vácuo com membrana de celulose e degaseificada em banho de ultrassom por aproximadamente 10 minutos.

Tabela I.2

Programa utilizado nas extrações/dessorções “in-tube” SPME

AÇÃO	POSIÇÃO	QUANTIDADE	FLUXO/ AJUSTE	ALTURA DA AGULHA*/ PASSOS
LAVAR AGULHA	-----	250 µL (água metanol, 50:50 v/v)	-----	-----
VÁLVULA INJETOR	CARREGAR	-----	-----	-----
ASPIRAR DE	FRASCO A	200 µL de água	3 (Alto)	5 mm
DISPENSAR EM	DESCARTE	200 µL de água	3 (Alto)	5 mm
REPETIR	-----	2 vezes	3 (Alto)	2 anteriores
ASPIRAR DE	AMOSTRA	100 µL	2 (Médio)	5 mm
DISPENSAR EM	AMOSTRA	100 µL	2 (Médio)	5 mm
REPETIR	-----	19 vezes	-----	2 anteriores
ASPIRAR DE	FRASCO B	60 µL metanol	2 (Médio)	5 mm
AGUARDAR	-----	2 minutos	-----	-----
VÁLVULA INJETOR	INJETAR	-----	-----	-----
AJUSTAR A SAÍDA	INJETAR	-----	-----	-----

* Altura correspondente à base do frasco até a ponta da agulha.

Velocidades: 2 (315 µL min⁻¹) e 3 (625 µL min⁻¹).**I.3.3.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

A caracterização da superfície do filme de PPY foi realizada por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isto foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura modelo Zeiss EVO 50, com potencial de aceleração de 20 KV. Como os materiais analisados (superfícies dos capilares de sílica recobertos internamente

ou não com filme de PPY) não são condutivos, a parede externa do capilar de sílica fundida foi recoberta com uma camada ultrafina de ouro, favorecendo também um melhor contraste para as imagens obtidas.

I.3.3.2. ESPECTROFLUOROMETRIA

Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram obtidos da análise de solução padrão de fluoxetina em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) no Espectrofluorímetro Hitachi F-4500 (Hitachi High-Tech® - Japão).

I.3.4. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO “in-tube” SPME

A otimização do processo “in-tube” SPME foi realizada em solução aquosa, em ensaios em quintuplicatas ($n = 5$), com o objetivo de preservar o capilar de PPY, pois as proteínas do plasma, compostos de alta massa molar, podem adsorver de forma irreversível à fase extratora. As variáveis do processo “in-tube” SPME foram otimizadas para a obtenção de eficiente extração em menor tempo de análise. Os seguintes parâmetros foram otimizados no processo “in-tube” SPME: número dos ciclos aspirar/dispensar, vazão da amostra, pH da matriz, volume de amostra aspirada e etapa de dessorção.

Para a otimização, o seguinte procedimento foi realizado: em um frasco (2 mL) com tampa de rosca e septo de silicone, específico para o injetor automático, 200 μL de água enriquecida com solução padrão de FLX e NFLX (concentração final de 300 ng mL^{-1}), foram diluídos com 800 μL de solução tampão. Os frascos contendo as amostras foram agitados em um mixer por 10 segundos e colocados na bandeja do injetor automático para a realização do processo de extração.

Para avaliar a influência do pH no processo de extração, quatro diferentes soluções tampão foram utilizadas, com os seguintes valores de pH: 3,0 (tampão citrato, 0,1 mol L⁻¹); 5,0 (tampão acetato, 0,1 mol L⁻¹); 7,0 (tampão fosfato, 0,1 mol L⁻¹); 9,0 e 10 (tampão borato, 0,1 mol L⁻¹).

Com base no volume do capilar (~ 30 µL) e da seringa do injetor automático (250 µL), os seguintes volumes de amostra aspirada foram avaliados: 50, 100, 150, 200 e 250 µL.

Após a otimização do volume de amostra, a influência do número dos ciclos aspirar/dispensar (1, 5, 10, 15, 20 e 30 ciclos) em três diferentes vazões, baixo (125 µL min⁻¹), médio (315 µL min⁻¹) e alto (625 µL min⁻¹) foi avaliada.

Entre as extrações, a tubulação, a seringa e a agulha do injetor automático foram lavados com 250 µL de uma solução de metanol e água Milli-Q (50:50 v/v). O capilar foi lavado com água entre as extrações para total eliminação das proteínas adsorvidas.

O processo de dessorção foi realizado aspirando 60 µL de metanol para o interior do capilar. Este volume de solvente foi mantido em contato com a superfície de PPY por 2 minutos, até completa dessorção dos analitos. Com auxílio do programa do injetor automático (posição carregar para posição injetar), a fase móvel foi então redirecionada para o capilar, propiciando o transporte dos analitos até a coluna analítica.

I.3.5. AMOSTRAS DE PLASMA

As amostras de plasma, branco de referência, livres de antidepressivos, sorologia negativa para hepatite B e C, chagas, HIV, HTLV-I/II, TGP e sífilis foram doadas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP. Estas amostras foram enriquecidas com soluções-padrão de FLX e NFLX em diferentes concentrações, as quais resultaram em concentrações plasmáticas que incluem os níveis terapêuticos. Estas

amostras de plasma foram utilizadas na etapa de validação analítica do método “in-tube” PPY SPME/LC-FLD.

As amostras de plasma de pacientes em terapia com fluoxetina, no mínimo por duas semanas, foram gentilmente doadas pela Prof^ª Dr^a Regina Helena Costa Queiroz, do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) e analisadas pelo método proposto, padronizado e validado. Essas amostras foram coletadas, após 12 horas da última administração do medicamento, segundo critérios estabelecidos pelo Comitê de Ética da FCFRP, da Universidade de São Paulo.

As proteínas das amostras de plasma foram precipitadas antes do procedimento “in-tube” SPME, para prevenir o entupimento do capilar e diminuir a interferência dos compostos endógenos do plasma na análise. Para isso, ACN foi adicionada ao plasma, na proporção de 3:1 (v/v), respectivamente, ou seja, para cada 200 µL de amostra de plasma, 600 µL de ACN foram adicionados. Estas amostras foram agitadas por 15 minutos em agitador mecânico e centrifugadas a 3500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido e a ACN foi seca. O extrato aquoso foi então utilizado nas análises “in-tube” PPY SPME, como descrito para as análises das amostras aquosas (seção I.3.4).

I.3.6. VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação analítica de um método bioanalítico assegura o adequado desempenho do método proposto afim de que este possa ser aplicado na rotina de um laboratório. De acordo com órgãos regulamentadores de todo o mundo, como o *FDA* [70], a *International Conference on Harmonization* (ICH) [71], além de diversas publicações científicas sobre o assunto, alguns parâmetros fundamentais devem ser incluídos na etapa de validação analítica de um método, tais como: exatidão, precisão,

seletividade, reprodutibilidade, linearidade e estabilidade. Neste trabalho, os parâmetros de validação analítica foram avaliados segundo normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – Resolução RE nº 899) para métodos analíticos e bioanalíticos [72], devendo ser considerada para as duas metodologias desenvolvidas nesta tese.

Para a validação analítica do método “in-tube” PPY SPME/LC-FLD padronizado, amostras de plasma (branco de referência) foram enriquecidas com soluções padrão de FLX e NFLX, que resultaram em concentrações que contemplam o intervalo terapêutico.

I.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

I.4.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

I.4.1.1. DETECÇÃO E SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Os comprimentos de onda de emissão (E_m) e de excitação (E_x) selecionados, foram avaliados através da varredura de uma solução de fluoxetina em metanol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) em espectrofluorímetro 3-D, excitando-se a molécula de 200 a 300 nm e, obtendo-se desta forma, a maior intensidade de fluorescência em 230 nm de excitação (λ_{E_x}) e 290 nm de emissão (λ_{E_m}), conforme demonstrado na **Figura I.5**.

Figura I.5. Espectro de fluorescência da fluoxetina.

A identificação dos enantiômeros *R* e *S* da FLX e NFLX foi realizada segundo resultado prévio da literatura, considerando a ordem de eluição destes fármacos na mesma coluna quiral e sistema de detecção [73].

Para a obtenção de satisfatória resolução cromatográfica dos fármacos, em menor tempo de análise, diferentes composições de fases móveis foram avaliadas, em diferentes vazões, como descrito na seção I.3.3. A fase móvel selecionada, entre as avaliadas, foi a solução de uma mistura de fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e hexafluorofosfato de potássio $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 3,0 (ajustado com solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorídrico) e ACN (75:25 v/v) com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, no modo isocrático. Antes do uso, a fase móvel foi filtrada e degaseificada.

A **Figura I.6** ilustra o cromatograma da solução padrão dos fármacos na concentração de 300 ng mL^{-1} , após análise LC-FLD na fase móvel selecionada. Segundo o cromatograma, adequada resolução em satisfatório tempo de análise (< 25 minutos) foi obtida nas condições cromatográficas selecionadas neste trabalho.

Figura I.6. Cromatograma da solução padrão enriquecida com os enantiômeros na concentração de 300 ng mL^{-1} . Condições cromatográficas - Fase móvel: solução de uma mistura de fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e hexafluorofosfato de potássio $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 3,0 e ACN (75:25 v/v) com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, no modo isocrático, Coluna: Chiralcel OD-R ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$), Detector: Fluorescência (Ex/Em: 230/ 290 nm).

I.4.1.2. RECONHECIMENTO QUIRAL

A celulose, um polissacarídeo não ramificado, de 10 a 15 mil unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo ($\beta 1 \rightarrow 4$)), presente na fase quiral utilizada neste trabalho, quando *in natura*, apresenta propriedades mecânicas fracas e limitada capacidade de resolução quiral [74]. Entretanto, a derivação desses polissacarídeos em acetatos, benzoatos, triésteres e fenilcarbamatos conduz à formação de novos sítios de reconhecimento quiral para a separação dos enantiômeros de uma variedade de compostos racêmicos, melhorando assim, as propriedades cromatográficas e enantiosseletivas [75].

Os mecanismos de reconhecimento quiral das fases estacionárias quirais (FEQ) têm sido extensamente investigados, usualmente através de métodos cromatográficos, gerando informações importantes especialmente a respeito dos parâmetros termodinâmicos das interações entre os analitos e a FEQ durante a resolução. Porém, para uma melhor compreensão a respeito deste reconhecimento quiral a nível molecular, métodos espectroscópicos (como a Ressonância Magnética Nuclear (MRN) e Infravermelho (IR)), Difração de Raio-X, Porosimetria e métodos computacionais têm sido necessários [76-78].

Recentemente, Lammerhofer [79] publicou uma revisão a respeito dos diferentes mecanismos de reconhecimento quiral, especialmente aqueles relacionados aos parâmetros termodinâmicos, dos principais seletores quirais e suas respectivas FEQ disponíveis no mercado para LC.

Na fase estacionária utilizada, tris 3,5-dimetilfenil carbamato de celulose (**Figura I.7**), os principais sítios de adsorção são os grupos carbamatos polares. Estes grupos foram capazes de interagir com os enantiômeros de FLX e NFLX via ligações de hidrogênio com os grupos C=O e NH através de ligações de hidrogênio, interações

dipolo-dipolo com os grupos C=O, e, ainda que menos expressivas que as interações polares, as interações $\pi - \pi$ entre o grupo fenila da fase estacionária e os grupos aromáticos dos enantiômeros devem ser consideradas [74, 80, 81], especialmente nas separações realizadas no modo reverso, demonstrando boa habilidade de resolução.

Figura I.7. Estrutura química da fase estacionária tris-3,5 dimetilfenil carbamato de celulose em suporte de sílica gel (coluna Chiralcel OD-R®).

Segundo estudos prévios, a discriminação quiral dos derivados de celulose é significativamente influenciada pela natureza, posição e número de substituintes do grupo fenila, que acarretam em modificações da polaridade do grupo carbamato, que é o mais importante sítio de reconhecimento e discriminação quiral dos derivados fenilcarbamatatos. Deste modo, derivados com substituintes doadores ou aceptores de elétrons nas posições *meta*- ou *para*- do grupo fenila aumentam a capacidade de resolução óptica dos fenilcarbamatatos em relação aos derivados não substituídos e aos substituídos na posição *orto*- [74, 79, 82]. Assim, estes resultados confirmam a influência da presença do substituinte dimetil nas posições 3- e 5- do grupo fenila da estrutura da fase estacionária

quiral avaliada neste trabalho, propiciando satisfatória resolução na separação dos enantiômeros de FLX e NFLX.

I.4.2. CAPILAR DE PPY

I.4.2.1. DESENVOLVIMENTO

Embora o filme de PPY seja facilmente formado via polimerização química, esse filme terá forte interação com a superfície interna do capilar, quando uma grande quantidade de grupos polares estiver disponível para tal reação [83]. Porém, para eliminar a interferência dos grupos silanóis residuais (Si-OH), presentes na superfície interna do capilar de sílica (após polimerização), durante o processo de extração, o capilar foi previamente silanizado, propiciando a interação entre a fase quimicamente ligada e o pirrol monômero. A **Figura I.8** ilustra a reação referente à etapa de silanização da superfície interna do capilar de sílica com o agente sililante APTES. Após silanização, o polímero foi formado pela oxidação do monômero na superfície e sílica. A **Figura I.9** ilustra o esquema de polimerização química do pirrol.

Figura I.8. Reação de silanização da superfície de sílica com o agente sililante APTES.

Figura I.9. Esquema da polimerização química oxidativa do pirrol.

Durante a polimerização, a coloração do capilar mudou gradualmente de amarelo para preto, como evidenciado na **Figura I.10**, indicando a formação do filme de PPY nas paredes internas do capilar, após seis ciclos de polimerização, onde cada ciclo correspondeu à passagem da solução do monômero (pirrol em isopropanol, 50% v/v) através do capilar e posteriormente na percolação da solução oxidante (cloreto de ferro $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em ácido perclórico $0,4 \text{ mol L}^{-1}$), com auxílio de uma microseringa de LC e passagem de N_2 .

Figura I.10. Imagens dos capilares “in-tube” PPY SPME; A - capilar de sílica antes da polimerização, B – capilar de PPY, após seis ciclos de polimerização.

O comprimento do capilar foi selecionado de acordo com trabalho encontrado na literatura [84], onde comprimentos menores que 60 cm ocasionam diminuição da eficiência de extração, enquanto que valores acima do valor descrito acarretam em alargamento dos picos cromatográficos. Como o capilar utilizado apresenta diâmetro interno de 0,25 mm, o volume interno total do capilar de sílica é de aproximadamente 30 μL , porém, o capilar de PPY possui um volume ligeiramente inferior a este valor, devido à espessura do revestimento de PPY formado na superfície interna do capilar.

I.4.2.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA - MEV

A morfologia e a qualidade dos filmes poliméricos são fatores determinantes no desempenho do capilar como dispositivo “in-tube” SPME. Dentre os parâmetros de morfologia, o efeito da espessura e características dos revestimentos é uma das mais importantes variáveis em SPME [85]. O estudo da morfologia dos filmes de PPY foi investigado através das imagens de MEV (**Figura I.11**). A imagem de MEV da superfície interna do capilar sem o revestimento de PPY, ou seja, o capilar de sílica apenas com tratamento de silanização é apresentado na **Figura I.11a** e **Figura I.12a**, para fins de comparação.

Segundo a **Figura I.11b**, que ilustra a superfície interna do capilar de PPY após os ciclos de polimerização, o recobrimento com o filme polimérico pode ser visualizado, bem como sua estrutura rugosa e a presença de agregados poliméricos não-uniformes. Este resultado está de acordo com trabalhos prévios da literatura para a polimerização de PPY em barra metálica para SPME via polimerização eletroquímica e em capilar de sílica para “in-tube” SPME via polimerização química [55, 84].

Para revestimentos porosos, como o PPY [55, 84], quanto maior for a espessura do filme, maior será, não só o volume total de revestimento, mas também a área superficial. Portanto, espera-se que a quantidade de analito extraída pelo filme de PPY aumenta proporcionalmente com o aumento da espessura do filme, o que pode ser conseguido, em “in-tube” SPME, aumentando o número de ciclos da etapa de polimerização. Porém, deve-se evitar um número muito elevado de ciclos, o que pode ocasionar entupimento do capilar durante a polimerização do filme, assim, neste trabalho, o número de ciclos realizados foi seis.

Neste trabalho, sob as condições descritas para o desenvolvimento do capilar de PPY, o filme de PPY apresentou espessura linear de aproximadamente 210 nm, com conglomerados poliméricos de até 1,915 μm (**Figura I.12b**), o que corresponde a um volume de fase extratora médio de 0,5 μL , semelhante aos volumes das fases extratoras comerciais das fibras de SPME com espessura de 100 μm de filme polimérico [86], porém menor que aquele alcançado para a fibra de PPY-SPME desenvolvida por meio de polimerização eletroquímica (19,6 μL) [87]. Contudo, apesar do relativo baixo volume de fase extratora alcançado, uma alta eficiência de extração é esperada, já que a porosidade do filme de PPY contribui para o aumento da área superficial do revestimento, e assim, mais sítios de adsorção estarão disponíveis durante o processo de extração (pré-concentração).

A qualidade do polímero também pode ser influenciada pelo tipo de contra-íon utilizado durante o processo de polimerização do PPY na superfície de sílica. Se contra-íons hidrofílicos como o ClO_4^- ou BF_4^- são utilizados, o filme de PPY sintetizado terá caráter hidrofílico [88], o que propicia melhor interação entre o revestimento e os analitos. Assim, neste trabalho, íons cloreto (proveniente do cloreto de ferro III) foram selecionados como contra-íon, favorecendo a extração dos enantiômeros de FLX e NFLX, devido a presença de grupos polares em suas respectivas estruturas.

Figura I.11. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (visão de secção transversal) dos capilares de sílica fundida: (A) sem o revestimento de PPY e (B) com o revestimento de PPY após 6 ciclos de polimerização.

Figura I.12. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (visão expandida da superfície interna) dos capilares de sílica fundida: (A) sem o revestimento de PPY e (B) com o revestimento de PPY após 6 ciclos de polimerização.

I.4.2.3. COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PPY COM OUTROS REVESTIMENTOS COMERCIAIS PARA “in-tube” SPME

Estudos recentes têm mostrado que a robustez (estabilidade) do filme de PPY para a técnica “in-tube” SPME é semelhante ou melhor que as outras fases extratoras comerciais utilizadas para o mesmo fim [83, 84, 87]. Neste trabalho, não foi observado variações significativas na eficiência de extração, mesmo após a centésima extração realizada com o mesmo capilar de PPY. Estas extrações corresponderam a aproximadamente 1.500 ciclos aspirar/dispensar.

Para comprovar a eficiência do capilar de PPY, ensaios de extração dos enantiômeros em amostras de plasma foram realizados, sob as mesmas condições (nas condições cromatográficas otimizadas anteriormente, descritas na seção I.4.1.a), com diferentes capilares comerciais, tais como: polietileno glicol (PEG) (60cm, 0,32 mm d.i., 0,05 µm de espessura de filme - polar), OV-1701 (14% cianopropilfenil metilpolisiloxano - 60cm, 250 µm d.i., 0,1 µm de espessura de filme – média polaridade) e capilar de sílica fundida (60 cm e 0,25 mm d.i.), sendo que o último foi o mesmo utilizado para o desenvolvimento do capilar de PPY neste trabalho.

A quantidade de analito extraído por diferentes revestimentos, nas mesmas condições de extração, pode ser determinada como descrito na Equação I. 1 (seção I.1.4.1.). Porém, alguns parâmetros, como K_A , $C_{f \max}$, C_{fA} e V_f são muitas vezes desconhecidos ou difíceis de serem medidos. Por esta razão, a quantidade de analito extraído (n_A) pelo revestimento do capilar “in-tube” SPME pode ser facilmente obtido por dados experimentais através da equação I. 3:

$$n_A = F \times A = (m/A_d) \times A$$

Equação I. 3

onde n_A é a quantidade (massa) de analito extraído pelo capilar “in-tube” SPME, F é o fator de resposta do detector que pode ser calculado pela razão da quantidade de analito injetado (m) e da área do pico (A_d) obtida pela injeção direta de solução padrão ($F = m/A_d$) e A representa a resposta (área do pico) obtida pelo processo “in-tube” SPME.

Como mostrado na **Tabela I.3**, o capilar de PPY demonstrou maior eficiência de extração devido suas propriedades multifuncionais e morfologia porosa, como discutido na seção anterior (seção I.4.2.b).

Tabela I.3

Avaliação de diferentes fases extratoras para as análises dos enantiômeros de FLX e NFLX por “in-tube” SPME ^a

Analitos	Média das áreas dos picos (10 ⁵ mV), n = 3				n_A ^b (%)			
	Sílica	OV-1701	PEG	PPY	Sílica	OV-1701	PEG	PPY
S-NFLX	10,48	51,99	7,69	99,58	3,4	16,9	2,5	32,4
R-NFLX	10,72	53,02	6,45	100,43	3,6	18,3	2,1	39,9
S-FLX	15,13	82,24	9,67	142,65	4,1	22,1	2,6	38,4
R-FLX	15,28	82,79	10,11	145,90	4,9	23,0	3,2	41,6

^a Condições “in-tube” SPME: em um frasco contendo 1 mL de amostra (200 µL de plasma e 800 µL de tampão borato pH 9,0), 100 µL de amostra foram aspiradas e dispensadas 20 vezes em vazão de 315 µL/min; Dessorção com 60 µL de metanol.

^b n_A : quantidade de analito extraído, calculadas através da Equação I. 3.

Outra vantagem, descrita na literatura [58, 66], do filme de PPY frente às outras fases extratoras é a capacidade de modificar a eficiência de extração do PPY variando a espessura do filme e modificar a seletividade do mesmo, através da inserção de grupos funcionais, como o grupo fenila, na estrutura do PPY, durante a etapa de polimerização, originando o polímero PPPY (polifenilpirrol), que possui maior sensibilidade para compostos aromáticos. Porém, como a polimerização do fenilpirrol (PhPY) é reconhecidamente desvantajosa, quando realizada por métodos químicos devido ao seu

alto potencial de oxidação (1,2 V para o PhPY contra 0,9 V para o PY) [83], esta modificação da seletividade do PPY tem sido realizada apenas quando o polímero é sintetizado via polimerização eletroquímica.

I.4.3. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO “in-tube” PPY SPME

A primeira variável avaliada na padronização do método “in-tube” PPY SPME/FLD foi o pH da solução utilizada na diluição da amostra. De acordo com os resultados (**Figura I.13**), as taxas de recuperação dos analitos foram crescentes com a diluição da amostra com soluções tampão com valores de pH de 3,0 a 9,0. Portanto, a solução tampão borato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 9,0 foi selecionada para os demais experimentos.

Estes resultados podem ser facilmente entendidos quando o equilíbrio ácido-base dos analitos (pKa da fluoxetina: 8,7) em soluções de diferentes valores de pH é considerado. De acordo com Wu [55], o filme de PPY está carregado positivamente quando na sua forma oxidada. Como os analitos também estão carregados positivamente em valores baixos de pH (forma ácida, pH ≤ 7,0), a repulsão eletrostática é observado entre o revestimento PPY e os analitos, diminuindo a eficiência de extração. Com o aumento do pH da solução, as cargas positivas nos analitos são reduzidas, a quantidade de analitos em sua forma básica aumenta, e como consequência, as interações intermoleculares atrativas entre analitos e PPY tornam-se dominantes, resultando em maiores taxas de extração dos enantiômeros.

Além de ser importante no controle do pH da solução, a adição de solução tampão à amostra resultou na diminuição da viscosidade da matriz biológica, considerando que a etapa de precipitação de proteínas não foi 100% eficiente, favorecendo a difusão dos analitos à fase extratora.

Figura I.13. Otimização dos valores de pH da matriz para as análises “in-tube” PPY SPME/LC. Condições “in-tube” SPME: 0,2 mL de amostra aquosa enriquecida com FLX e NFLX (300 ng mL^{-1}), diluído em 0,8 mL de solução tampão; Volume aspirado/dispensado: 100 μL , 10 ciclos aspirar/dispensar e vazão de 315 $\mu\text{L min}^{-1}$; Dessorção com 60 μL de metanol.

O volume de amostra aspirada/dispensada está diretamente relacionado com a capacidade do capilar e da seringa do injetor automático, ou seja, volumes menores que a capacidade do capilar ($\sim 30 \mu\text{L}$) e maiores que o volume máximo da seringa (250 μL) são impraticáveis. Portanto, os volumes de amostra de 50 a 250 μL foram avaliados.

A eficiência do processo “in-tube” PPY SPME foi favorecida com o aumento do volume de amostra de 50 μL a 100 μL (**Figura I.14**), acima deste valor foi observada diminuição da quantidade de analito extraída. No processo “in-tube” SPME, a amostra é aspirada e dispensada do capilar várias vezes, até que se alcance o equilíbrio de adsorção. No entanto, este resultado indica que o aumento do volume da amostra e do número de ciclos aspirar/dispensar resulta em dessorção parcial do analito durante a etapa dispensar.

Figura I.14. Otimização do volume de amostra aspirado/dispensado para as análises “in-tube” PPY SPME/LC. Condições “in-tube” SPME: 0,2 mL de amostra aquosa enriquecida com FLX e NFLX (300 ng mL⁻¹), diluído em 0,8 mL de tampão borato (0,05 mol L⁻¹, pH 9,0), 10 ciclos aspirar/dispensar, vazão de 315 μL min⁻¹; Dessorção com 60 μL de metanol.

Segundo os resultados obtidos na otimização do número de ciclos aspirar/dispensar (**Figura I.15**), o equilíbrio de partição foi obtido após 20 ciclos, ou seja, a partir deste valor, incrementos de ciclos aspirar/dispensar não acarretou em aumento na eficiência de extração. O procedimento aspirar/dispensar equivale à agitação no processo SPME convencional (fibra SPME).

Figura I.15. Otimização do número de ciclos aspirar/dispensar para as análises “in-tube” PPY SPME/LC. Condições “in-tube” SPME: 0,2 mL de amostra aquosa enriquecida com FLX e NFLX (300 ng mL⁻¹), diluído em 0,8 mL de tampão borato (0,05 mol L⁻¹, pH 9,0); Volume aspirado/dispensado: 100 µL, vazão de 315 µL min⁻¹; Dessorção com 60 µL de metanol.

A vazão da amostra no processo aspirar/dispensar está diretamente relacionada com o tempo total requerido para alcançar o equilíbrio de partição, onde a sensibilidade máxima é alcançada. Este tempo, expresso pela equação I. 2 (seção I.1.4.1.), é elevado quando utiliza-se capilares de grande comprimento (L), quando as constantes de afinidade (K_A) entre fármaco e fase extratora são altas, ou ainda, no caso de grandes volumes de fase extratora (V_f). Por outro lado, o tempo de extração é inversamente proporcional ao volume morto da tubulação (V_M) e à vazão (aspirar/dispensar) da amostra [89]. Como durante a extração as dimensões L , V_f , V_M e valores de K_A foram fixos, o tempo de extração dependeu apenas da vazão da amostra durante o processo in-tube SPME.

Para confirmar este efeito, três diferentes vazões da amostra foram avaliados: 125, 315 e 625 µL min⁻¹, utilizando-se 20 ciclos aspirar/dispensar. Para as vazões maiores que

625 $\mu\text{L min}^{-1}$ foi observado formação de bolhas em toda tubulação do injetor, o que dificultou a repetitividade dos volumes aspirados, além da possibilidade de causar danos à coluna analítica.

No processo “in-tube” SPME é esperado maior sensibilidade analítica quando se utiliza pequenas vazões ($\leq 100 \mu\text{L min}^{-1}$) [41-49, 90], favorecendo a transferência de massas do analito, da amostra para a fase extratora. Porém, neste estudo, não foi observado significativa variação na eficiência de extração, nas três vazões avaliadas. Portanto, levando-se em conta que não existe perda na sensibilidade analítica com o aumento do fluxo, e para evitar a formação de bolhas na tubulação do equipamento, optou-se pela vazão média, de 315 $\mu\text{L min}^{-1}$, obtendo-se assim extrações eficientes em menor tempo de análise (aproximadamente 12,5 minutos, levando-se em consideração apenas o tempo dispensado para os 20 ciclos aspirar/dispensar do processo “in-tube” SPME).

Para o processo de dessorção, a eluição “on-line” é geralmente realizada redirecionando a fase móvel através do capilar. Porém, neste trabalho, como foi observada uma forte interação entre analitos e o filme de PPY, a dessorção ocorreu de forma estática, através da interação de pequeno volume de metanol (60 μL) com a superfície interna no capilar, por dois minutos, antes do redirecionamento da fase móvel através do capilar para o transporte dos analitos à coluna analítica. Este volume foi suficiente para preencher todo o capilar com metanol (volume interno: 30 μL). Efeito de memória não foi observado após análises “in-tube” SPME, indicando que a dessorção com metanol e a etapa de lavagem entre as extrações com água (3 ciclos de 200 μL cada) foram eficientes para total remoção dos analitos.

I. 4.4. VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO “in-tube” PPY SPME/LC-FLD

A validação do método “in-tube” SPME/LC-FLD foi realizada para a minimização de erros, no sentido de assegurar a máxima qualidade do trabalho analítico e, conseqüentemente, a obtenção de resultados laboratoriais confiáveis.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), preconiza a avaliação dos seguintes parâmetros de validação analítica: recuperação, exatidão, precisão, linearidade, especificidade, limite de quantificação (LQ), detecção (LD), bem como estabelece os limites de tolerância [72]. Porém, como o capilar de PPY foi fixado no lugar da alça de amostragem (“loop”) do injetor automático, os ensaios de recuperação não foram realizados, pois poderiam fornecer resultados não proporcionais à solução padrão, uma vez que não se pode afirmar ao certo o volume exato de amostra (pré-concentração no capilar) enviada à coluna analítica, inviabilizando assim, a comparação entre as injeções de solução padrão introduzida através do sistema convencional do injetor automático e as injeções após as análises “in-tube” SPME.

A especificidade (seletividade) do método “in-tube” PPY SPME/LC-FLD é demonstrada pelos cromatogramas das análises de plasma branco de referência e amostra de plasma de referência enriquecida com os enantiômeros na concentração de 300 ng mL^{-1} (**Figura I.16a** e **Figura I.16b**, respectivamente). Nestes cromatogramas não foram observadas interferências significativas (componentes endógenos) nos tempos de retenção dos analitos. Além disso, como a fluoxetina pode ser prescrita em combinação com diferentes agentes psicotrópicos e/ou outros fármacos, é importante avaliar a coeluição destes com os enantiômeros estudados. Os tempos de retenção dos enantiômeros estudados e dos possíveis interferentes, analisados individualmente, são

mostrados na **Tabela I.4**. Segundo a Tabela 4, os fármacos avaliados não coeluíram com os enantiômeros em estudo.

Figura I.16. Cromatogramas obtidos por “in-tube” PPY SPME/LC-FLD: a) plasma branco de referência e b) amostra de plasma enriquecida com FLU e NOR na concentração de 300 ng mL^{-1} . Condições “in-tube” PPY SPME: 0,2 mL de amostra

aquosa enriquecida com FLX e NFLX (300 ng mL⁻¹), diluído em 0,8 mL de tampão borato (0,05 mol L⁻¹, pH 9,0); Volume aspirado/dispensado: 100 µL, vazão de 315 µL min⁻¹; Dessorção com 60 µL de metanol.

Tabela I.4

Tempos de retenção dos fármacos estudados como possíveis interferentes

Fármacos	Tempo de retenção (min)
4-metil primidona	7,197
Amitriptilina	ND*
Anfetamina	ND
Cafeína	ND
Carbamazepina	ND
Cocaína	5,140
Citalopram (enantiômeros)	9,982 / 10,369
Clomipramina	ND
Desipramina	ND
Diazepam	3,518
Fenil hidantoína	ND
Fenitoína	ND
Fenobarbital	7,360
Imipramina	ND
Metanfetamina	ND
Mirtazapina	ND
Moclobemida	ND
Nortriptilina	ND
Paroxetina	ND
PEMA	2,904
Primidona	3,634
R-fluoxetina	20,618
R-norfluoxetina	16,735
Setralina	ND
S-fluoxetina	18,883
S-norfluoxetina	15,252
THC	ND

*ND: Não detectado até 30 minutos de corrida.

O LQ dos enantiômeros, em plasma, foi de 10 ng mL⁻¹ para *R*- e *S*-FLX e 15 ng mL⁻¹ para *S*- e *R*-NFLX (**Tabela I.5**). Este limite foi determinado como sendo a menor concentração na curva de calibração com coeficiente de variação (CV, precisão) menor que 15% (**Tabela I.6**). Já o limite de detecção (LD), correspondente à concentração superior a três vezes o ruído da linha de base (S/R = 3), foi de 5 ng mL⁻¹ para os quatro enantiômeros. Esta determinação, realizada através da injeção das soluções

padrão dos fármacos, demonstrou que os enantiômeros obtiveram resposta adequada ao detector de fluorescência.

A linearidade correspondeu ao intervalo de concentração onde os resultados obtidos são diretamente proporcionais às concentrações dos analitos na amostra. A linearidade do método “in-tube” PPY SPME/LC-FLD foi determinada em amostra de plasma de referência enriquecida com os antidepressivos nas concentrações plasmáticas referente ao LQ à 700 ng mL^{-1} . Este intervalo foi linear, com coeficientes de correlação acima de 0,9941 e coeficientes de variação menores que 13% (**Tabela I.5**). O método desenvolvido apresentou adequada exatidão, com valores na faixa entre 92% e 110% (**Tabela I.6**). Estes resultados mostram que o método proposto pode ser utilizado na quantificação dos enantiômeros da FLU e NOR para fins de monitorização terapêutica.

Tabela I.5

Regressão linear e limite de quantificação (LQ) para o método in-tube PPY SPME/LC desenvolvido

Composto	Regressão linear (LQ – 700 ng mL^{-1})			LQ (ng mL^{-1}) (CV - %, n=5)
	Inclinação	Intercepto	R	
S-NFLX	16558,14	- 264786,49	0,9985	15 (10,2%)
R-NFLX	12229,81	- 114511,59	0,9982	15 (9,7%)
S-FLX	14906,94	- 63482,70	0,9941	10 (12,9%)
R-FLX	17941,69	78145,06	0,9979	10 (8,1%)

R: coeficiente de regressão linear; LQ: limite de quantificação; CV: coeficiente de variação.

A precisão interensaios (n=4) e intraensaios (n=5) do método padronizado (“in-tube” PPY SPME/LC-FLD) foi determinada utilizando-se amostras de plasma (branco de referência) enriquecidas com os enantiômeros em três diferentes níveis de concentrações, baixo, médio e alto (50 , 300 e 500 ng mL^{-1}) (**Tabela I.6**). Os coeficientes de variação nas

três concentrações analisadas foram menores que 8%, para os quatro enantiômeros avaliados, mostrando que o método proposto pode ser utilizado na quantificação destes antidepressivos em concentrações referentes às utilizadas na terapia da depressão. O método desenvolvido apresentou valores de LQ e linearidade próximos aos descritos previamente na literatura, para as técnicas de extração líquido-líquido (LLE/LC-UV) [73], extração em fase sólida (SPE/LC-FLD) [14] e LLE/CG-NPSD (detector seletivo de nitrogênio-fósforo) [93], para análise dos mesmos enantiômeros em matrizes biológicas.

A precisão intercapilares, ou seja, a reprodutibilidade dos resultados obtidos para dois diferentes capilares de PPY, desenvolvidos nas mesmas condições, foi satisfatória, apresentando coeficientes de variação entre 6 e 10% para determinações “in-tube” PPY SPME/LC-FLD de amostras de plasma enriquecida com 300 ng mL⁻¹ dos enantiômeros.

Tabela I.6

Valores de precisão e exatidão do método “in-tube” PPY SPME/LC-FLD

Compostos	[C] (ng mL ⁻¹)	Intraensaio (n=5)			Interensaio (n=4)		
		Concentração medida (ng mL ⁻¹)	CV (%)	Exatidão (%)	Concentração medida (ng mL ⁻¹)	CV (%)	Exatidão (%)
<i>S</i> -NFLX	50	49,2 ± 2,5	5,2	98	47,0 ± 3,3	7,0	94
	300	295,2 ± 12,4	4,3	98	311,4 ± 18,1	5,8	103
	500	502,5 ± 14,3	2,8	100	506,9 ± 19,7	3,9	101
<i>R</i> -NFLX	50	48,0 ± 3,2	6,7	96	54,8 ± 4,1	7,4	109
	300	305,7 ± 4,0	3,9	101	289,5 ± 10,9	3,7	96
	500	490,3 ± 9,9	2,0	98	487,4 ± 15,6	3,2	97
<i>S</i> -FLX	50	51,9 ± 1,7	3,3	103	48,0 ± 2,2	4,6	96
	300	294,0 ± 13,8	4,7	98	308,1 ± 17,7	5,7	102
	500	487,6 ± 5,1	1,0	97	491,3 ± 8,9	1,8	92
<i>R</i> -FLX	50	47,2 ± 2,0	4,2	94	55,2 ± 3,8	6,8	110
	300	291,2 ± 6,3	2,2	97	308,0 ± 10,2	3,3	102
	500	511,5 ± 7,4	1,4	102	509,3 ± 19,7	3,8	101

[C]: concentração teórica; CV: coeficiente de variação.

A estabilidade das soluções padrão de FLX e NFLX, bem como das amostras de plasma foi baseada em estudos prévios [92, 93]. De acordo com Kovacevic *et al.* [92], os

enantiômeros são estáveis em extratos metanólicos de amostras de plasma armazenados por 18 meses a - 20 °C ou após 9 meses de repetidos ciclos de congelar/descongelar, quando comparados às análises de amostras recém preparadas. Neste trabalho, a estabilidade das amostras de plasma enriquecidas com os enantiômeros foi avaliada à temperatura ambiente, quando deixadas no injetor automático por 24 horas. Os resultados obtidos, após as análises “in-tube” PPY SPME/LC, não apresentaram variações significativas, quando comparados aos obtidos com amostras recém preparadas. Estes resultados comprovam a estabilidade das amostras de plasma e das soluções padrões dos enantiômeros nas condições propostas neste estudo.

O processo completo “in-tube” PPY SPME, que abrange as etapas de extração e dessorção, para as análises de FLX e NFLX e seus enantiômeros, foi realizado em um tempo total de 15 minutos, e a separação cromatográfica foi obtida em 25 minutos. Portanto, em sistemas automatizados de análise, é possível analisar aproximadamente 35 amostras diárias, garantindo que o método proposto é rápido, propiciando a aplicação deste em laboratórios clínicos, onde resultados confiáveis gerados em curto espaço de tempo são requeridos.

I. 4. 5. APLICAÇÃO CLÍNICA DO MÉTODO “in-tube” PPY SPME/LC-FLD

O método “in-tube” PPY SPME/LC-FLD padronizado e validado foi aplicado na análise de amostra desconhecida de plasma de paciente em terapia com a fluoxetina (Prozac[®], 20 mg/dia). A eficiência do método foi demonstrada, e as concentrações encontradas na amostra de paciente foram: 161 ng mL⁻¹ para *S*-NFLX, 108 ng mL⁻¹ para *R*-NFLX, 130 ng mL⁻¹ para *S*-FLX e 22 ng mL⁻¹ para *R*-FLX (**Figura I.17**), as quais

estão dentro da faixa de intervalo terapêutico comumente aplicado para este fármaco (50 – 500 ng mL⁻¹) [13].

Baseado nos resultados de validação analítica e aplicabilidade do método proposto, a metodologia “in-tube” PPY SPME/LC-FLD padronizada permite a análise dos enantiômeros de FLX e NFLX em níveis terapêuticos para fins de monitorização terapêutica.

Figura I.17. Cromatograma obtidos por “in-tube” PPY SPME/LC-FLD da análise de amostra de plasma de paciente em terapia com fluoxetina (Prozac[®], 20 mg/dia). Concentrações obtidas: 161 ng mL⁻¹ para S-NFLX, 108 ng mL⁻¹ para R-NFLX, 130 ng mL⁻¹ para S-FLX e 22 ng mL⁻¹ para R-FLX. Condições “in-tube” PPY SPME: 0,2 mL de amostra aquosa enriquecida com FLX e NFLX (300 ng mL⁻¹), diluído em 0,8 mL de tampão borato (0,05 mol L⁻¹, pH 9,0); Volume aspirado/dispensado: 100 µL, vazão de 315 µL min⁻¹; Dessorção com 60 µL de metanol.

I. 5. CONCLUSÕES

O uso da coluna quirál comercial Chiralcel OD-R (celulose tris 3,5-dimetilfenil carbamato) permitiu satisfatória resolução cromatográfica dos enantiômeros de FLX e NFLX, em tempo de análise inferior que 25 minutos, onde o reconhecimento quirál baseou-se principalmente por meio das diferentes interações entre os enantiômeros e os sítios de adsorção dos grupos carbamatos polares presentes na fase estacionária quirál.

A técnica “in-tube” SPME, quando comparada às técnicas convencionais de extração, além de minimizar o volume da amostra, permitiu a extração e concentração dos solutos em linha com a separação e detecção cromatográfica, ou seja, a automação do método cromatográfico, resultando em maior precisão analítica em menor tempo de análise. Como as amostras são injetadas no sistema, praticamente em seu estado fisiológico, diminuiu a exposição dos analistas aos fluidos biológicos.

O capilar de PPY desenvolvido neste trabalho através do método via polimerização química apresentou boa seletividade e estabilidade (robustez), quando comparados com outros capilares comerciais ou desenvolvidos para o sistema “in-tube” SPME.

O método “in-tube” PPY SPME/LC-FLD padronizado e validado foi aplicado com sucesso na análise de amostras de plasma de pacientes em terapia com a fluoxetina, comprovando sua habilidade na análise enantiosseletiva de FLX e NFLX em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

I. 6. REFERÊNCIAS

- [1] KENDELL, R. E. The classification of depressive illness, London, Oxford, U.P., p. 1 – 3, 1968.
- [2] KISS, J. P., Theory of active antidepressants: A nonsynaptic approach to the treatment of depression. **Neurochemistry International**, 52 (2007) 34.
- [3] FLECK, M. P. A., SOURCEY, E. B., DEL PORTO, J. A., BRASIL, M. A., JURUENA, M. F., Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão. **Rev. Bras. Psiquiatr.** 25 (2003) 114.
- [4] MORENO, R. A., MORENO, D. H., SOARES, M. B. M., Psicofarmacologia de antidepressivos. **Rev. Bras. Psiquiatr.** 21 (1999) 24.
- [5] KOZISEK, M. E., MIDDLEMAS, D., BYLUND, D. B., Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. **Pharmacology & Therapeutics**, 117 (2008) 30.
- [6] ANDERSON, I. M., Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. **J. Affective Disorders**, 58 (2000) 19.
- [7] NASH, J., NUTT, D., Antidepressants: specific treatment and disorders, **Psychiatric**, 6 (2007) 289.
- [8] ALTAMURA, A.C., MOTO, A.R., PERCUDANI, M., Clinical Pharmacokinetics of Fluoxetine. **Clin. Pharmacokinet.** v. 26, p. 201, 1994.
- [9] WONG, D.T., PERRY, K.W., BYMASTER, F.P., The Discovery of Fluoxetine Hydrochloride (Prozac). **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 4, p. 764, 2005.
- [10] LUDWING, J., MARCOTTE, D.E., NORBERG, K., Anti-depressants and suicide. **J. Health Econ.** v. 28 (2009) 659.
- [11] COOPER, W.O., WILLY, M.E., PONT, S.J., RAY, W.A., Increasing use of antidepressants in pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 196 (2007) 544.
- [12] FREITAS, D. F., PORTO, C. E. D., VIEIRA, E. P., SIQUEIRA, M. E. P. B., Three-phase, liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 51 (2010) 170.

- [13] BAUMANN, P., Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationship of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. **Clin. Pharmacokinet.** 31 (1996) 444.
- [14] UNCETA, N., BARRONDO, S., AZÚA, I. R., GÓMEZ-CABALLERO, A., GOICOLEA, M. A., SALLÉS, J., BARRIO, R. J., Determination of fluoxetine, norfluoxetine and their enantiomers in rat plasma and brain samples by liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B**, 852 (2007) 519.
- [15] CALDWELL, J., Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug metabolism. **J. Chromatogr. A**, 694 (1995) 39.
- [16] SCORDON, M.G., SPINA, E., DAHL, M-L., GATTI, G., PERUCCA, E., Influence of CYP2C9, 2C19 and 2D6 Genetic Polymorphisms on the Steady-State Plasma Concentrations of the Enantiomers of Fluoxetine and Norfluoxetine. **Basic & Clinial Pharmacology & Toxicology**, 97 (2005) 296.
- [17] RING, B.J., ECKSTEIN, J.A., GILLESPIE, J.S., Shelly N. Binkley, Mark VandenBranden, Steven A. Wrighton. Identification of the Human Cytochromes P450 Responsible for in Vitro Formation of R- and S-Norfluoxetine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 297, (2001) 1044.
- [18] WONG, D.T., FULLER, R.W., ROBERTSON, D.W., Fluoxetine and its two enantiomers as selective serotonin uptake inhibitors. **Acta Pharm. Nord.** 2 (1990) 171.
- [19] GUO, X., FUKUSHIMA, T., LI, F., IMAI, K., Determination of fluoxetine and norfluoxetine in rat plasma by HPLC with pre-column derivatization and fluorescence detection . **Biomed. Chromatogr.** 17 (2003) 1.
- [20] OLSEN, B. A., WIRTH, D. D., LAREW, J. S., Determination of fluoxetine hydrochloride enantiomeric excess using high-performance liquid chromatography with chiral stationary phases. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 17 (1998) 623.
- [21] PIPERAKI, S., TSANTILI-KAKAULIDOU, A., PARISSI-POULOU, M., Solvent selectivity in chiral chromatography using a β -cyclodextrin-bonded phase. **Chirality** 7 (1995) 257.
- [22] YU, L., MEI-LI, F., JIE-GUO, X., Enantiomeric Separation of Fluoxetine Derivatives on Polysaccharide-Based Chiral Columns. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci.** 339 (2006) 461.
- [23] JIE, Z., YI-WEN, Y., FENG, W., PING-DONG, W., Comparison of the performance of chiral stationary phase for separation of fluoxetine enantiomers. **J. Zhejiang Univ. Sci.** 8 (1) (2007) 56.

- [24] TAYLOR, W. J., ROBINSON J. D., SPIVEY-MILLER, S. Handbook of therapeutic monitoring. 2 ed. Cincinnati: Harvey Whitney Books Company, p. 1-10, 1993.
- [25] WORDEN, J. P., Therapeutic Drug Monitoring, **Current Surgery**, 7 (1994) 4299.
- [26] QUEIROZ, M. E. C., LANÇAS, F. M., Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida "no tubo" e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**. 28 (2005) 880.
- [27] HACKETT, J., ELIAN, A. A., Extraction and analysis of flunitrazepam/7-aminoflunitrazepam in blood and urine by LC-PDA and GC-MS using butyl SPE columns. **Forensic Science International**. 157 (2006) 156.
- [28] LI, K. M., THOMPSON, M. R., MCGREGOR, I. S., Rapid quantitation of fluoxetine and norfluoxetine in serum by micro-disc solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection. **J. Chromatogr.B**. 804 (2004) 319.
- [29] ERNY, G.L., CIFUENTES, A., Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral analysis of pharmaceuticals compounds and their metabolites in biological fluids. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 40 (2006) 509.
- [30] KIM, I., DARWIN, W.D., HUETIS, M.A., Simultaneous determination of nicotine, cotinine, norcotinine, and trans-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**. 814 (2005) 233.
- [31] FRAHNERT, C., RAO, M. L., GRASMADER, K., Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. **J. Chromatogr. B**, 794 (2003) 35.
- [32] WALLES, M. MULLET, W. M., PAWLISZYN, J., Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1025 (2004) 85.
- [33] ERNY, G. L., CIFUENTES, A., Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral analysis of pharmaceuticals compounds and their metabolites in biological fluids. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 40 (2006) 509.
- [34] ARESTA, A., PALMISANO, F., ZAMBONIM, C. G., Determination of naproxen in human urine by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 39 (2005) 643.

- [35] ARTHUR, C.L., PAWLISZYN, J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Anal. Chem.** 62 (1990) 2145.
- [36] PAWLISZYN, J., Applications of solid phase microextraction. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
- [37] PAWLISZYN, J., Theory of Solid-Phase Microextraction. **J. Chromatogr. Sci.** 38 (2000) 270.
- [38] PROSEN, H., ZUPANCIC-KRALJ, L., Solid-phase microextraction. **Trends Anal. Chem.** 18 (1999) 272.
- [39] EISERT, R., PAWLISZYN, J., Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. **Anal. Chem.** 69 (1997) 3140.
- [40] KATAOKA, H., NARIMATSU, S., LORD, H. L., PAWLISZYN, J., Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Determination of β -Blockers and Metabolites in Urine and Serum Samples. **Anal. Chem.** 71 (1999) 4237.
- [41] KATAOKA, H., LORD, H. L., PAWLISZYN, J. Simple and Rapid Determination of Amphetamine, Methamphetamine, and Their Methylenedioxy Derivatives in Urine by Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **J. Anal. Toxicol.** 24 (2000) 257.
- [42] YUAN, H., MESTER, Z., LORD, H., PAWLISZYN, J., Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Determination of Selected Benzodiazepines. **J. Anal. Toxicol.** 24 (2000) 718.
- [43] JINNO, K., KAWAZOE, M., SAITO, Y., TAKEICHI, T., HAYASHIDA, M., Sample preparation with fiber-in-tube solid-phase microextraction for capillary electrophoretic separation of tricyclic antidepressant drugs in human urine. **Electrophoresis** 22 (2001) 3785.
- [44] WALLIS, M., MULLETT, W. M., LEVSEN, K., BORLAK, J., WUNSCH, G. PAWLISZYN, J., Verapamil drug metabolism studies by automated in-tube solid phase microextraction. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 30 (2002) 307.
- [45] MULLETT, W. M., LEVSEN, K., LUBDA, D., PAWLISZYN, J. Bio-compatible in-tube solid-phase microextraction capillary for the direct extraction and high-performance liquid chromatographic determination of drugs in human serum. **J. Chromatogr. A** 963 (2002) 325.

- [46] KUMAZAWA, T., LEE, X.-P., SATO, K., SUZUKI, O., Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis. **Anal. Chim. Acta** 492 (2003) 49.
- [47] FAN, Y., FENG, Y.-Q., DA, S.-L., SHI, Z.-G., Poly (methacrylic acid–ethylene glycol dimethacrylate) monolithic capillary for in-tube solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography and its application to determination of basic drugs in human serum. **Anal. Chim. Acta** 523 (2004) 251.
- [48] WEN, Y., FAN, Y., ZHANG, M., FENG, Y. Q., Determination of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in human plasma using polymer monolithic in-tube solid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. **Anal. Bioanal. Chem.** 382 (2005) 204.
- [49] FAN, Y., FENG, Y.-Q., ZHANG, J.-T., DA, S.-L., ZHANG, M. Zhang., Poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith in-tube solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography and analysis of amphetamines in urine samples, **J. Chromatogr. A** 1074 (2005) 9.
- [50] FAN, Y., FENG, Y.-Q., Da, S.-L., WANG, Z.-H., In-tube solid phase microextraction using a β -cyclodextrin coated capillary coupled to high performance liquid chromatography for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine samples, **Talanta** 65 (2005) 111.
- [51] QUEIROZ, M. E. C., OLIVEIRA, E. B., BRETON, F., PAWLISZYN, J., Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry for analysis of fluoxetine in serum samples, **J. Chromatogr. A** 1174 (2007) 72.
- [52] SILVA, B. J. G., LANÇAS, F. M., QUEIROZ, M. E. C., In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma, **J. Chromatogr. B** 862 (2008) 181.
- [53] KATAOKA, H., INOUE, R., YAGI, K., SAITO, K., Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry, **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 49 (2009) 108.
- [54] SAITO, K., YAGI, K., ISHIZAKI, A., KATAOKA, H. Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 52 (2010) 727.

- [55] WU, J., LORD, H., PAWLISZYN, J., Determination of stimulants in human urine and hair samples by polypyrrole coated capillary in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray mass spectrometry **Talanta** 54 (2001) 655.
- [56] WU, J., LORD, H., PAWLISZYN, J., KATAOKA, H., Polypyrrole-coated capillary in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of beta-blockers in urine and serum samples, **J. Microcol. Sep.** 12 (2000) 255.
- [57] LORD, H., PAWLISZYN, J., Microextraction of drugs **J. Chromatogr. A** 902 (2000) 17.
- [58] KATAOKA, H., LORD, H., YAMAMOTO, S., NARIMATSU, S., PAWLISZYN, J., Development of automated in-tube SPME/LC/MS method for drug analysis **J. Microcol. Sep.** 12 (2000) 493.
- [59] KATAOKA, H., SAITO, K., Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis, **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 54 (2011) 926.
- [60] FONTANALS, N., MARCE, R.M., BORRULL, F., New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds, **J. Chromatogr. A** 1152 (2007) 14.
- [61] TAMAYO, F.G., TURIEL, E., MARTIN-ESTEBAN, A., Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends, **J. Chromatogr. A** 1152 (2007) 32.
- [62] DIETZ, C., SANZ, J., CAMARA, C., Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques, **J. Chromatogr. A** 1103 (2006) 183.
- [63] AUGUSTO, F., CARASEK, E., SILVA, R.G.C., RIVELLINO, S.R., BATISTA, A.D., MARTENDAL, E., New sorbents for extraction and microextraction techniques, **J. Chromatogr. A** 1217 (2010) 2533.
- [64] ULRICH, L., ROZNYATOVSKAYA, N. V., MIRSKY, V. M., Conducting polymers in chemical sensors and arrays, **Anal. Chim. Acta**, 614 (2008) 1.
- [65] AMEER, Q., ADELOJU, S. B., Polypyrrole-based electronic noses for environmental and industrial analysis, **Sensors and Actuators B: Chemical** 106 (2005) 541.
- [66] WU, J., YU, X. M., LORD, H., PAWLISZYN, J., Solid phase microextraction of inorganic anions based on polypyrrole film, **Analyst** 125 (2000) 391.

- [67] CHAVES, A. R., CHIERICATO, G., QUEIROZ, M. E. C., Solid-phase microextraction using poly(pyrrole) film and liquid chromatography with UV detection for analysis of antidepressants in plasma samples, **J. Chromatogr. B** 877 (2009) 587.
- [68] ADELOJU, S. B., WALLACE, G. G., Conducting polymers and the bioanalytical sciences: New tools for biomolecular communications - A review, **Analyst** 121 (1996) 699.
- [69] FRANCOTTE, E., Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers, **J. Chromatogr. A** 906 (2001) 379.
- [70] U.S. Food and Drug Administration. *Guide for industry: bioanalytical method validation*. Rockville: Drug Information Branch, 2001. 22 p.
- [71] *International Conference on Harmonization. Validation of analytical procedures: text and methodology – Q2(R1)*, 2005, 13 p. Disponível em http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Acesso em: 10/03/2011.
- [72] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Seção 1, p. 56 – 59.
- [73] GATTI, G., BONOMI, I., PERUCCA, E. J., Improved enantioselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by liquid chromatography, **J. Chromatogr. B** 784 (2003) 375.
- [74] YASHIMA, E., Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation, **J. Chromatogr. A** 906 (2001) 105.
- [75] JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: **Fundamentos de Cromatografia**. Editora da UNICAMP: Campinas, 2006, p. 273-398.
- [76] DODZIUK, H., KOZMINSKI, W., LUKIN, O., SYBILSKA, D., NMR manifestations and molecular dynamics modeling of chiral recognition of α -pinenes by α -cyclodextrin, **Journal of Molecular Structure** 523 (2000) 205.
- [77] NANDI, N., VOLLHARDT, D., Chiral discrimination and recognition in Langmuir monolayers, **Current Opinion in Colloid & Interface Science** 13 (2008) 40.
- [78] PIRAS, P., ROUSSEL, C., A screening study of ChirBase molecular database to explore the expanded chiral pool derived from the application of chiral chromatography, **J. Pharm. Biomed. Anal.** 46 (2008) 839.

- [79] LAMMERHOFER, M., Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases, **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 814.
- [80] ZHAO, Y., PRITTS, W., Chiral separation of selected proline derivatives using a polysaccharide type stationary phase by high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A**, 1156 (2007) 228.
- [81] ZDZISLAW, C. Enantioselective Separation of 1,4-Disubstituted Piperazine Derivatives on Two Cellulose Chiralcel OD and OJ and one Amylose Chiralpak AD Chiral Selectors, **Chirality**, 11 (1999) 790.
- [82] CHANKVETADZE, B., YASHIMA, E., OKAMOTO, Y., Tris(chloro- and methyl-disubstituted phenylcarbamate)s of Cellulose as Chiral Stationary Phases for Chromatographic Enantioseparation, **Chemistry Letters** (1993) 617.
- [83] WU, J., PAWLISZYN, J., Preparation and applications of polypyrrole films in solid-phase microextraction, **J. Chromatogr. A**, 909 (2001) 37.
- [84] WU, J., PAWLISZYN, J., Polypyrrole coated capillary coupled to HPLC for in tube solid phase microextraction and analysis of aromatic compounds in aqueous samples, **Anal. Chem.**, 73 (2001) 55.
- [85] KATAOKA, H., ISHIZAKI, A., NONAKA, Y., SAITO, K., Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review, **Anal. Chim. Acta**, 655 (2009) 8.
- [86] QUEIROZ, M. E. C., LANÇAS, F. M., Practical tips on preparing plasma samples for drug analysis using SPME, **LCGC North America**, 22 (2004) 970.
- [87] CHAVES, A. R., CHIERICATO, G., QUEIROZ, M. E. C., Solid-phase microextraction using poly(pyrrole) film and liquid chromatography with UV detection for analysis of antidepressants in plasma samples, **J. Chromatogr. B**, 877 (2009) 587.
- [88] BAGHERI, H., MOHAMMADI, A., Pyrrole-based conductive polymer as the solid-phase extraction medium for the preconcentration of environmental pollutants in water samples followed by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometry detection, **J. Chromatogr. A**, 1015 (2003) 23.
- [89] MULLET, W.M., MARTIN, P., PAWLISZYN, J., In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol, **Anal. Chem.**, 73 (2001) 2383.
- [90] WEI, F., FAN, Y., ZHANG, M., FENG, Y. Q., Poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith in-tube solid-phase microextraction applied to

simultaneous analysis of some amphetamine derivatives in urine by capillary zone electrophoresis, **Electrophoresis** 26 (2005) 3141.

[91] ULRICH, S., Direct stereoselective assay of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma or serum by two-dimensional gas–liquid chromatography with nitrogen–phosphorus selective detection, **J. Chromatogr. B** 783 (2003) 481.

[92] KOVACEVIC, I., POKRAJAC, M., MILJKOVIC, B., JOVANOVIC, D., PROSTRAN, M., Comparison of liquid chromatography with fluorescence detection to liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma, **J. Chromatogr. B** 830 (2006) 372.

[93] ADDISON, R. S., FRANKLIN, M. E., HOOPER, W. D., Sensitive, high-throughput gas chromatographic–mass spectrometric assay for fluoxetine and norfluoxetine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies, **J. Chromatogr. B** 716 (1998) 153.

CAPÍTULO II

**Determinação de multirresíduos de
agrotóxicos em amostras de tomates por
Cromatografia Gasosa Bidimensional
Abrangente acoplada à Espectrometria de
Massas (GC x GC / qMS)**

II. 1. INTRODUÇÃO

II.1.1. A AGRICULTURA E O USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL

Desde o final dos anos 1990, poucos países cresceram no comércio internacional do agronegócio quanto o Brasil. Nosso País é um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários produtos agropecuários, empregando, somente no campo, cerca de 18 milhões de trabalhadores no ano de 2008. É o primeiro produtor e exportador de café, açúcar, etanol e suco de laranja. Além disso, lidera o ranking das vendas externas do complexo de soja (grão, farelo e óleo), que é o principal gerador de divisas cambiais [1,2].

No início de 2010, um entre quatro produtos do agronegócio em circulação no mundo era brasileiro. A projeção do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é que, até 2030, um terço dos produtos comercializados seja do Brasil, em função da crescente demanda dos países asiáticos [1]. Após a crise econômica internacional de 2009, onde o Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio brasileiro registrou queda de 5,51%, a produção em alta e a recuperação dos preços melhoraram a rentabilidade dos diversos segmentos do agronegócio em 2010. Estima-se que este índice deva crescer entre 3,5% e 4% em 2011, segundo dados da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) [3].

Neste contexto, o desenvolvimento da agricultura moderna, a ampliação das fronteiras agrícolas, a modernização dos meios da produção e, principalmente, a demanda dos mercados de produtos em quantidade e em qualidade, tem exigido o uso de agrotóxicos para a garantia de sua produtividade. Os agrotóxicos, denominados também

por pesticidas, praguicidas ou defensivos agrícolas, são definidos no Decreto nº 4074, de 04 de janeiro de 2002, do Ministério da Agricultura como: “produtos e agentes de processos físicos, químicos e biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” [4].

Na década de 40, os agrotóxicos começaram a serem utilizados no Brasil, inicialmente para controlar doenças endêmicas, tal como a doença de Chagas, Malaria e Febre Amarela. Porém, neste mesmo período, inicia-se o uso de compostos organoclorados visando o combate a doenças e pragas nas atividades agrícolas e pecuárias [5].

A partir da década de 70, inicia-se no Brasil, a política de estímulo ao crédito agrícola, financiando agricultores e condicionando este empréstimo financeiro ao uso de insumos, muitas vezes desnecessários à plantação. Ainda na década de 70, surgiram os primeiros casos de contaminação ambiental e problemas de saúde associados ao uso excessivo e desordenado dos agrotóxicos, dentre os quais se destacam as intoxicações de trabalhadores rurais, contaminações de solos e águas, além da constatação de resíduos de agrotóxicos [6].

No entanto, já na década de 1980, o Brasil procura implementar, através da criação de órgãos regulamentadores e fiscais, tais como o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o Ministério do Meio Ambiente, o Ministério da Saúde, MAPA e a ANVISA, normas para o uso de agrotóxicos para fins de controle de pragas, já vigente em outros países. Assim, a regularização, o descarte e o uso em geral de agrotóxicos passaram a ser avaliados, quanto aos aspectos de impactos ao meio ambiente, à saúde humana e à eficácia agronômica [5]. A partir daí, alguns

compostos químicos foram proibidos no Brasil ou tiveram o seu uso restrito, como o caso de alguns agrotóxicos organoclorados, devido sua baixa taxa de degradação no meio ambiente.

Ao longo das décadas de 1980 e 1990, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos no Brasil foi marcado por esforços isolados de órgãos estaduais de saúde, agricultura e instituições de pesquisas. Esse fato sempre impediu que o País tivesse uma noção clara dos níveis de agrotóxicos encontrados em seus produtos agrícolas. Para suprir essa carência, surgiu, em 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com coordenação da ANVISA, o qual tem como objetivos avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam aos consumidores e fortalecer a capacidade do Governo em atender a segurança alimentar, evitando assim, possíveis agravos à saúde da população. Tal controle tem sido realizado através das análises do parâmetro de limite máximo de resíduo (LMR), que representa a concentração máxima de resíduo de agrotóxico legalmente aceita no alimento, sem que haja prejuízo à saúde humana.

Os LMRs estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (coletânea de orientações relativas a alimentos, produção de alimentos e segurança alimentar, reconhecida internacionalmente e estabelecida pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS)), baseiam-se em práticas agrícolas internacionais e visam proteger e preservar a saúde humana, garantindo o comércio internacional de alimentos livres de barreiras com respeito ao parâmetro e resíduos. Entretanto, como o nível de resíduos de agrotóxicos em alimentos depende de fatores agronômicos e climáticos, muitos países estabelecem seus próprios limites baseados nas boas práticas agrícolas para a determinada cultura.

Mais recentemente, o MAPA, como definido no Decreto 5.981 de 06 de dezembro de 2006 [7], renova e inclui normas que regulamenta a legislação que dispõe sobre a

pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. No entanto, dados de 2008 mostram que o Brasil assumiu o posto de maior mercado consumidor de agrotóxicos no mundo. As vendas do produto somaram U\$\$ 7,125 bilhões, diante U\$\$ 6,6 bilhões do segundo colocado, os Estados Unidos, de acordo com o Sindag (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola) [8].

Segundo a ANVISA, até março de 2011, haviam sido registradas 1.468 marcas de agrotóxicos no Brasil, onde 61% destas são classificadas pelo MAPA, como de risco 3 ou 4, o que indica menor toxicidade. Com relação à legislação que rege o uso de agrotóxicos em meio agrícola, domissanitário, ambientes aquáticos e preservante de madeira, o programa de reavaliação desses compostos químicos, em operação desde 2001, já proibiu 95 ingredientes ativos na formulação de tais agrotóxicos, ainda assim, existem hoje 588 ingredientes ativos autorizados para serem utilizados como agrotóxicos no Brasil, de acordo com a cultura específica, sendo que 14 desses ingredientes estão em reavaliação toxicológica, devido ao alerta de perigo desses compostos para a saúde humana [9,10].

Ainda segundo a ANVISA, análises realizadas pelo PARA, em parceria com as secretarias estaduais de saúde, em diferentes culturas de alimentos, indicam que o tomate, o morango, a cenoura, o pimentão, a uva e a alface foram os alimentos com maior índice de resíduos de agrotóxicos em 2008. De nove produtos avaliados (alface, batata, morango, tomate, maçã, banana, mamão, cenoura e laranja), o índice de amostras colhidas em 2007 e consideradas insatisfatórias ficou em 17,28%, com maior prevalência nas amostras de tomate, onde das 123 amostras analisadas, 55 apresentaram resultados insatisfatórios, o que corresponde a aproximadamente 45% da cultura com algum nível de contaminação [11]. A **Tabela II.1** ilustra os resultados das análises realizadas pelo

PARA entre 2002 e 2008. Os resultados insatisfatórios referem-se àquelas amostras que apresentaram ingredientes ativos de agrotóxicos acima do LMR permitido, ou de resíduos não autorizados para uma determinada cultura, como foi o caso da detecção dos resíduos Ciproconazol e Bioaletrina, banidos da legislação brasileira para culturas de tomates. Portanto, estes resultados vêm a viabilizar o monitoramento não só dos ingredientes ativos regularizados no país, mas também daqueles que têm seu uso proibido pelas legislações nacionais (ANVISA, [9]) e estrangeiras, como o *Codex Alimentarius* [12].

Este cenário demonstra a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos precisos, exatos, e com baixos limites de quantificação, para monitorar resíduos diversos de agrotóxicos em frutas e outros produtos de origem vegetal, a fim de garantir a segurança alimentar da população e minimizar os impactos ambientais ocasionados pelo uso destes agrotóxicos.

Tabela II.1

Porcentagem de resultados insatisfatórios das análises de resíduos de agrotóxicos no Brasil realizadas pelo PARA em diferentes culturas entre os anos de 2002 e 2008*

Cultura	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Alface	8,64	6,67	14,00	46,45	28,68	40,00	19,80
Banana	6,53	2,22	3,59	3,65	X	4,32	1,03
Batata	22,20	8,65	1,79	0	0	1,36	2,0
Cenoura	0	0	19,54	11,30	X	9,93	30,39
Laranja	0	0	4,91	4,70	0	6,04	14,85
Mamão	19,50	37,56	2,50	0	X	17,21	17,31
Maçã	4,04	3,67	4,96	3,07	5,33	2,90	3,92
Morango	46,03	54,55	39,07	X	37,68	43,62	36,05
Tomate	26,10	0	7,36	4,38	2,01	44,72	18,27
Abacaxi	X	X	X	X	X	X	9,47
Arroz	X	X	X	X	X	X	4,41
Cebola	X	X	X	X	X	X	2,91
Feijão	X	X	X	X	X	X	2,92
Manga	X	X	X	X	X	X	0,99
Pimentão	X	X	X	X	X	X	64,36
Repolho	X	X	X	X	X	X	8,82
Uva	X	X	X	X	X	X	32,67

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (ANVISA).

* Os resultados referem-se aos estados: AC, BA, DF, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SE, TO.

X: Análises não realizadas.

Fonte: Resultados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA. Brasil, 2002 a 2008. Ref [11].

II.1.2. CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos podem ser classificados quanto à sua ação (inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, acaricidas entre outros) e quanto ao grupo químico a que pertencem. A seguir serão apresentadas, brevemente, as principais classes de agrotóxicos que serão estudados neste trabalho (as estruturas químicas destes agrotóxicos estão apresentadas na Tabela II.2, seção II. 4. 1.).

Organoclorados

Os agrotóxicos organoclorados são compostos muito estudados devido à alta toxicidade, baixa biodegradabilidade (devido à alta estabilidade das ligações carbono-cloro) e biossolubilidade em tecido lipídico [13], o que acarreta no acúmulo destes compostos ao longo da cadeia alimentar, especialmente nos tecidos ricos em gorduras dos organismos vivos. Estes agrotóxicos foram inicialmente desenvolvidos principalmente na II Guerra Mundial para proteção contra a malária, tifo e outras moléstias provocadas por insetos e para o controle de pragas nas lavouras. No Brasil alguns de seus ingredientes ativos foram proibidos desde a década de 1980 e outros tiveram seu uso restringido [10, 11].

Podem-se destacar como pertencentes a este grupo os seguintes agrotóxicos: DDTs (diclorodifeniltricloetanos), DDEs (diclorodifenildicloroetilenos), DDDs (diclorodifenil-cloroetanos), Endossulfan, Aldrin, Dieldrin, HCB (Hexaclorobenzeno), Lindane, Dicofol, Quintozen e Heptacloro.

Organofosforados

Formado por ésteres de ácido fosfórico e outros ácidos a base de fósforo, os organofosforados foram desenvolvidos na década de 1940 e os primeiros a substituírem

os organoclorados. São mais tóxicos que os Carbamatos e que os agrotóxicos clorados, em relação à toxicidade aguda (transtornos de visão, vômitos, ansiedade, confusão mental, hipertensão arterial, efeitos neurológicos diversos e até mesmo a morte), porém se degradam rapidamente e não se acumulam nos tecidos gordurosos [14].

Os organofosforados são os inseticidas mais utilizados na agricultura brasileira e no controle de pragas em domicílios. Fazem parte deste grupo a Malationa e a Fentiona, que têm sido amplamente utilizados no combate à mosca-das-frutas [15], termo que designa diversas espécies de moscas das famílias *Drosophilidae* e *Tephritidae*, cujas larvas atacam a polpa dos frutos de diversas culturas. Outros exemplos de agrotóxicos organofosforados são a Carbofenotiona, Parationa, Dissulfotom, Etiona, Terbufós, Etrinfos, Fenitrotona, Paraoxon e Forato.

Carbamatos

Os carbamatos são compostos por ésteres de ácido metil carbâmico ou dimetil carbâmico, degradam-se rapidamente no meio ambiente e não se acumulam nos tecidos gordurosos. Comparativamente aos agrotóxicos organoclorados e organofosforados, os carbamatos possuem baixa toxicidade, fato que colocaram esta classe de agrotóxicos bastante popular nos últimos anos [10, 14]. O Carbofurano, um exemplo desta classe de agrotóxicos, é geralmente encontrado na formulação do “chumbinho”, um produto clandestino, irregularmente utilizado como raticida em plantações de diversas culturas [11].

Piretróides

Esta classe representa os agrotóxicos derivados das Flores de Piretro, uma planta herbácea, semelhante à Margarida, de onde se obtém o Extrato do Piretro, que apresenta grande potencial de atuação no combate a insetos e possui baixa taxa residual. Com a

descoberta da Aletrina na década de 1930, a molécula natural presente na flor foi sendo substituída pelos piretróides sintéticos, um pouco mais estáveis e com excelente ação inseticida [16]. Os piretróides surgiram em âmbito comercial a partir de 1976 sendo bastante empregados na agricultura e na área de saúde devido a sua alta eficiência usando-se pequena quantidade do produto com menor contaminação do ambiente [14]. Os principais compostos deste grupo são o Fenvalerato, λ -cialotrina e Bioaletrina.

Triazóis

Os fungicidas triazóis representam uma das principais classes de agrotóxicos, utilizados amplamente em diversas culturas de frutas, vegetais e grãos. Compartilham de uma mesma estrutura química básica, o anel 1,2,4,-triazol, que é ligado ao restante da estrutura carbônica através da posição 1. Suas características, tais como alta estabilidade química e fotoquímica, baixa biodegradabilidade e facilidade pelos quais são transportados pelo meio ambiente, fazem dos triazóis contaminantes da água e do solo por longos prazos [17]. São exemplos de agrotóxicos triazóis o Ciproconazol, Epoxiconazol e Miclobutanil.

II.1.3. ANÁLISES DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

Idealmente, um método analítico para a determinação de multirresíduos deve ser rápido, de fácil execução, eficiente, requerer baixas quantidades de reagentes e amostras, proporcionar certo grau de seletividade para evitar etapas para a eliminação de interferentes, além de abranger, em um único procedimento, uma ampla faixa de analitos com propriedades distintas de diferentes classes de compostos.

Devido aos baixos níveis de resíduos de agrotóxicos permitidos pelas agências regulamentadoras (ver Tabela II.2, seção II. 4. 1.) e a complexidade das matrizes naturais, aspectos como a eficiência da etapa de preparo de amostra e o uso de detectores onde seja possível a análise em nível de traço (alta sensibilidade), tornam-se extremamente importantes no desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação quantitativa de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos [18].

Para a etapa de preparo de amostra, a LLE tem sido vastamente utilizada para a extração dos resíduos de agrotóxicos das matrizes alimentares, não somente pela sua simplicidade, mas principalmente por apresentar eficiência para extração de multirresíduos de agrotóxicos que contemplam uma ampla faixa de polaridade, além de satisfatória seletividade, limpeza da matriz e compatibilidade com as técnicas de separação, simplesmente selecionando de forma adequada os solventes, ou a mistura desses para o processo [19].

No caso de amostras sólidas, como as amostras de frutas, estas têm sido primeiramente trituradas e homogeneizadas, e então uma alíquota representativa é recolhida para a LLE, realizada sobre agitação (em barra magnética ou em agitador mecânico de tubos), seguida de etapa de centrifugação antes da injeção no sistema de separação e identificação destes resíduos. Neste aspecto, nos últimos anos, solventes como a acetona e a mistura deste com diclorometano, acetato de etila, hexano e ACN têm sido utilizados para este fim [20-22]. Por apresentar baixa miscibilidade com a água, mas ao mesmo tempo capaz de solubilizar os resíduos com baixa polaridade, o acetato de etila tem sido selecionado para as extrações com pequenos volumes de solventes orgânicos, uma vez que dispensa a necessidade da etapa de partição após processo de extração [23].

Apesar das técnicas de preparo de amostras baseadas em processos de sorção do analito com a fase extratora, como ocorre em SPE, e mais recentemente SPME e SBSE (“Stir-Bar Sorptive Extraction”), garantirem alta seletividade ao método e promover

menor interferência dos compostos endógenos da matriz [24], o seu uso torna-se dispensável nos casos onde configurações cromatográficas envolvendo etapa de separação eficiente e detectores de alta sensibilidade estão disponíveis para o desenvolvimento do método analítico.

Após a etapa de preparo de amostras, os resíduos de agrotóxicos têm sido analisados por LC ou GC, dependendo de suas características físico-químicas, como volatilidade e estabilidade térmica [23]. Para resíduos de agrotóxicos com ponto de ebulição abaixo de 300°C, a GC torna-se mais viável quando comparada à LC devido a alguns fatores, como a capacidade de picos (separação de um maior número de compostos em uma mesma análise), alta resolução cromatográfica, análises livres de solventes orgânicos, além da facilidade do acoplamento com detectores de alta sensibilidade, como o detector de espectrometria de massas (“mass spectrometry” - MS).

Diversos métodos GC-MS têm sido desenvolvidos para análise multirresíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes alimentares, como frutas e vegetais [25, 26], leite [27] e vinho [28], apresentando baixos limites de quantificação (LQ), na ordem de 20 – 50 mg kg⁻¹, e linearidade que contemplam as concentrações referentes aos LMRs estabelecidos pelos diferentes órgãos regulamentadores para as determinadas culturas.

Neste contexto, o desenvolvimento de novas tecnologias em GC tem como objetivo geral viabilização da separação, identificação e quantificação rápidas do maior número de constituintes nas referidas misturas complexas, usando equipamentos simples e robustos. Essas metas têm sido atingidas através de aperfeiçoamentos nos diversos módulos dos sistemas cromatográficos, como por exemplo, o aumento de eficiência através do uso de colunas capilares de diâmetros muito pequenos (0,05 – 0,1 mm d.i.) associado a vazões elevadas do gás de arraste (modo denominado de “*Fast GC*”), além do uso de detectores espectrométricos, que podem proporcionar grande seletividade e

detectabilidade, como a detecção por MS, emissão atômica, ou espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier [29].

Entretanto, muitos desses recursos já atingiram seus limites máximos de desempenho e aperfeiçoamento. Além disso, a determinação e confirmação dos resíduos de agrotóxicos por GC-MS pode ser muitas vezes problemática devido à presença de inúmeros interferentes da matriz que frequentemente coeluem com os analitos de interesse, especialmente nos casos onde os íons dos analitos gerados pelo MS possuem baixos valores de razão massa/carga do fragmento iônico (m/z), dificultando as análises onde baixos LMRs são requeridos [30].

Uma das vertentes mais promissoras para o desenvolvimento de tecnologia capaz de suprir tais dificuldades baseia-se em um conceito já há muito conhecido: o de separação multidimensional, no qual a amostra é submetida sequencialmente a diferentes processos de separação, e será discutido na próxima seção desta tese.

II.1.4. CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE

Desde o início da cromatografia, a separação de analitos em misturas complexas (onde podem estar presentes mais de 100 compostos), entre analitos e interferentes endógenos, tem se tornado obstáculo para o desenvolvimento de metodologias com alta resolução cromatográfica.

No ano de 1944, o primeiro trabalho em cromatografia multidimensional já havia sido descrito na literatura por Martin *et al.* [31], que reportaram a separação ortogonal de uma mistura de proteínas realizada em papel.

Anos depois, na década de 1960, a cromatografia gasosa multidimensional (“multidimensional gas chromatography” - MDGC) foi desenvolvida em grande escala através de diferentes configurações do sistema GC e para as mais diversas aplicações.

Neste contexto, destaca-se o sistema multidimensional denominado de técnica “heartcut” (GC – GC - Cromatografia Gasosa Bidimensional de Frações Parciais), onde uma pequena fração da amostra (não-resolvida) geralmente pré-concentrada na primeira coluna é reinjetada na segunda coluna, com diferente seletividade, promovendo ganho na resolução da zona correspondente àquela fração [32]. Porém, poucos grupos de pesquisas dedicaram-se ao desenvolvimento desta técnica, motivado principalmente pela alta tecnologia e dificuldade operacional demandada pelo novo sistema. Por isso, durante os anos seguintes, o enfoque das separações de compostos em amostras complexas foi o desenvolvimento das colunas capilares, as quais resultaram no aumento da eficiência nas separações cromatográficas em GC.

O enfoque das separações complexas foi revertido somente em 1991, quando Phillips e Liu descreveram um novo sistema bidimensional constituído de duas colunas capilares conectadas em série a uma interface, que concentrava e transferia continuamente frações do eluato da primeira coluna (primeira dimensão, 1D) para a segunda coluna (segunda dimensão, 2D). Esta técnica foi chamada de **Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente** (“Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography” – **GC x GC**) [33]. Diferentemente da técnica de “heartcut”, em GC x GC, dois diferentes e independentes processos de separação são aplicados em toda a amostra. Desde então, a GC x GC tem sido uma atrativa ferramenta na busca por alta resolução nas análises de amostras complexas e aumento da seletividade nos sistemas de MDGC [34]. A **Figura II. 1** ilustra, de forma geral, a configuração de um sistema GC x GC.

Figura II. 1. Ilustração da configuração geral do sistema GC x GC: 1 - Injetor, 2 - coluna da primeira dimensão (1D), 3 – interface (modulador), 4 – coluna da segunda dimensão (2D), 5 – forno do cromatógrafo gasoso, 6 – detector.

Segundo Shoenmakers *et al.* [35], as condições que definem um sistema como sendo verdadeiramente bidimensional abrangente em sua totalidade são:

- Todos os componentes da mistura são sujeitos a dois diferentes e independentes mecanismos de separação;
- Dois componentes separados na 1D devem permanecer separados após a 2D;
- Os perfis de eluição das duas dimensões são preservados.

Algumas revisões na literatura contemplam os princípios gerais da técnica GC x GC, suas aplicações e as novas tecnologias no desenvolvimento de instrumentação e sistemas de tratamentos de dados mais eficazes e robustos [29, 34, 36-38]. A seguir serão abordados resumidamente alguns parâmetros a respeito das principais características dos sistemas GC x GC, como a instrumentação (configuração de colunas e sistema de modulação), aquisição de dados, detectores, bem como as diferentes aplicações nas separações de diversos analitos em amostras complexas.

Capacidade de picos

Como já demonstrado por Blomberg *et al.* [39], o poder de separação, expresso pela capacidade de picos (número máximo de compostos que podem ser separados em uma mesma análise cromatográfica), é drasticamente aumentada em GC x GC. Normalmente, em análise 1D-GC, a capacidade de picos é conseguida aumentando-se o comprimento da coluna, porém, as custas de substancial acréscimo do tempo de análise, muitas vezes impraticáveis. Esta pode ser considerada a grande vantagem da GC x GC frente à técnica de “heartcut” e a 1D-GC.

Considerando que a capacidade de pico de uma coluna é o número máximo de picos separáveis por ela, e assumindo que a capacidade de pico da 1D é n_1 picos, enquanto que a da 2D é n_2 picos, pode-se dizer que a capacidade de picos da GC x GC será $n_1 \times n_2$ picos, visto que toda a amostra é submetida à separação em ambas as colunas. Comparativamente, a capacidade de pico da GC – GC será $n_1 + n_2$, uma vez que apenas uma fração da amostra é submetida à separação na 2D [29, 40].

Características das colunas na 1D e 2D

Na GC x GC é fundamental o uso de uma segunda dimensão curta e eficiente [33]. Deste modo, misturas simples (como as frações coletadas e transferidas) podem ser separadas em alguns segundos (2 – 10 seg), possibilitando ciclos de modulação rápidos e fracionamento completo da amostra eluída, sem aumento significativo do tempo total de análise em relação a uma separação por uma única dimensão GC (1D GC).

O conjunto de colunas típico para GC x GC é constituído de uma coluna capilar convencional – com até 30 m de comprimento e diâmetro internos de 0,25 a 0,32 mm – conectada por conectores de baixo volume a um pedaço curto (≤ 2 m) de uma coluna fina,

do tipo empregado para *Fast GC* (d.i. $\leq 0,1$ mm). A segunda coluna deve ser curta o suficiente para que o material coletado e posteriormente reinjetado seja completamente eluído antes que a próxima fração seja nela introduzida [29].

Em princípio, todos os tipos de fases estacionárias podem ser utilizados em GC x GC, porém, o arranjo baseado no uso de uma coluna apolar ou de baixa polaridade na 1D (polidimetilsiloxano ou 5% fenil-polimetilsiloxano, por exemplo) e outra polar seletiva na 2D (polietilenoglicol ou 50% fenil-polidimetilsiloxano, por exemplo) é viável, mas não imprescindível, quando se requer ortogonalidade, ou seja, para que os mecanismos de separação sejam independentes e diferentes nas duas dimensões [35].

A principal vantagem da obtenção da ortogonalidade nas separações entre as duas dimensões é que os componentes da mistura acabam por se organizarem, no plano de separação (cromatograma gerado pelas análises GC x GC), de acordo com suas estruturas químicas. Em outras palavras, o cromatograma irá fornecer uma relevante idéia sobre a identidade (composição e diversidade) da amostra analisada por meio da formação de bandas e “clusters” de componentes pertencentes a uma mesma classe química [34, 35]. A **Figura II. 2** ilustra este efeito em GC x GC, onde, em uma análise hipotética de uma amostra contendo três diferentes classes de compostos com três características intrínsecas distintas, exemplificadas por tamanho, cor e formato, não pode ser separada satisfatoriamente em qualquer análise 1D-GC. Porém, quando aplicada ao sistema GC x GC, a mistura é mais bem resolvida, gerando claramente um plano de separação.

Figura II. 2. Ilustração da influência da ortogonalidade no plano de separação em GC x GC. Adaptado da ref [34].

Porém, como regra geral, as características das colunas são dependentes dos compostos presentes na amostra analisada e, por isso, o conjunto de colunas ideal deve ser investigado previamente às análises.

Modulação e sistemas de modulação

Em qualquer sistema multidimensional, a interface entre as dimensões pode ser considerada a componente chave da configuração do equipamento. Esta interface, mais conhecida como modulador, deve coletar continuamente pequenas frações do eluato da 1D, reconcentrá-las em uma banda estreita (efeito de focalização ou focagem) e reinjetá-las rapidamente na 2D, em denominados ciclos de modulação. Em geral, as análises GC x GC são realizadas com, ao menos, 3 ou 4 ciclos de modulação por pico [41].

O efeito deste processo pode ser melhor compreendido na **Figura II.3**, que ilustra um pico não-modulado (**a** - 1D-GC) e modulado (**b** - GC x GC), sendo que este último,

na verdade, é dividido em cinco distintas frações detectadas em intervalos específicos, correspondentes ao período de modulação (duração completa de um ciclo de modulação, que é igual ao tempo de análise na 2D). Neste caso, apesar do substancial aumento nas intensidades dos picos modulados, ou seja, da maior detectabilidade, a soma das áreas dos cinco picos modulados é igual a área do pico não-modulado [42]. Já na **Figura II.4**, a separação de um pico contendo três componentes **(a)** através da modulação pode ser observada no cromatograma bruto 2D **(b)**, que pode ser considerado como a soma de três análises secundárias sequenciais, na qual as frações da 1D são resolvidas em três componentes (α , β e γ). Os picos presentes no cromatograma bruto 2D são caracterizados pelo mesmo tempo de retenção na 1D, porém, com diferentes tempos de eluição na 2D.

Os moduladores podem ser classificados em três tipos, de acordo com seu princípio operacional. O primeiro engloba dispositivos baseados em válvulas diversoras de comando eletrônico ou pneumático instaladas entre as colunas, que coletam frações do efluente da 1D e as transferem para a 2D [43]. Apesar de robustos, esses moduladores apresentam como grande inconveniente o fato de não haver reconcentração das frações.

Figura II.3. (a) Pico não-modulado referente ao componente α . (b) Pico após modulação. Adaptado da ref [42].

Figura II.4. (a) Pico não-modulado referente à mistura de três componentes (α , β e γ). (b) Pico após modulação (3 modulações). Adaptado de ref [42].

A segunda forma de realizar a modulação consiste na captura do eluato da 1D em uma armadilha situada entre as duas dimensões, contendo um sorvente adequado, seguida de dessorção térmica para a 2D [44]. O movimento rotatório de um aquecedor dessorve e arrasta continuamente os analitos ao longo do capilar, até a introdução dos mesmos na 2D, **Figura II. 5**. Uma das desvantagens este modulador, conhecido como “Sweeper”, é a limitação quanto ao uso de temperaturas altas, já que o aquecedor deve se manter a uma temperatura de 100 °C acima da temperatura de modulação, ou seja, do forno do GC.

Figura II. 5. Detalhe do modulador por aprisionamento em fase estacionária e dessorção por barra rotatória de aquecimento (“Sweeper”). Adaptado da ref [34].

Os dispositivos baseados em válvulas ou interfaces sorventes têm sido substituídos, ao longo dos anos, por uma terceira forma de modulação, que é realizada através de moduladores criogênicos, que são mais simples e robustos. Nestes moduladores, a coleta e reconcentração de frações do eluato da 1D são feitas por armadilhas criogênicas.

Nestes casos, o resfriamento é feito através de jatos de CO_2 ou de N_2 líquidos diretamente lançados sobre o início da coluna 2D, ou sobre um curto segmento de capilar situado entre as duas dimensões, onde os analitos serão retidos e focalizados em bandas estreitas, originando picos com largura de base substancialmente menores quando comparados àqueles originados pela modulação por aprisionamento em fase estacionária. Em geral, para que ocorra este efeito, é necessário que a diferença de temperatura entre o segmento resfriado e o restante da coluna (ou segmento de capilar) seja de, aproximadamente, 100°C . Após o resfriamento ser interrompido, o segmento resfriado é aquecido novamente (com auxílio do próprio forno do GC), e a fração reconcentrada na forma de estreitas bandas químicas é então redirecionada à parte restante da coluna 2D para seguinte separação (**Figura II. 6**).

Figura II. 6. Processo geral da etapa de modulação com armadilhas criogênicas.

Moduladores criogênicos baseados em jatos frios estão sendo cada vez mais empregados. Para controlar a velocidade destes jatos, e, portanto, a frequência de modulação, válvulas instaladas fora do forno são abertas e fechadas sincronizadamente, criando ciclos de modulação através do resfriamento alternado de seções da 2D, ou do referido segmento de capilar [29]. As principais vantagens destes moduladores em comparação com os primeiros moduladores criogênicos de resfriamento indireto, como o sistema criogênico longitudinalmente modulado (LMCS – “*Longitudinally Modulating Cryogenic System*”, **Figura II. 7-A**) [45], o qual o resfriamento é realizado através de uma camisa de refrigeração móvel de aço, resfriada internamente pela passagem de CO₂, são sua robustez, já que não possuem partes móveis que possa danificar o capilar, e a alta eficiência de resfriamento.

Dentre os moduladores criogênicos de jatos destacam-se o de jato frio simples (“single jet, single stage”, **Figura II. 7-B**) [46] e o de jato frio duplo (“dual Jet”, **Figura II. 7-C**) [47], que utilizam CO₂ como fluido criogênico, e ainda aquele com um jato frio e um quente sobre um segmento de capilar sem revestimento interno (“loop”) situado entre as duas dimensões (“loop modulator”, **Figura II. 7-D**) [34].

Além do sistema de modulação, o período de modulação, e, portanto, o número de modulações por pico deve ser considerada, já que este parâmetro tem grande interferência na preservação da separação gerada na 1D e no ganho de resolução na análise final em GC x GC [34].

Figura II. 7. Diagramas de moduladores criogênicos. A - LMCS; B - modulador criogênico de jato simples; C – modulador criogênico e jato duplo e D – modulador criogênico de jato frio e quente. 1D: coluna da primeira dimensão, 2D: coluna da segunda dimensão. Adaptado da ref [34].

Representação gráfica e aquisição de dados

Outra diferença da GC x GC frente à 1D-GC é a forma de representação gráfica dos cromatogramas. O registro do sinal do detector em função do tempo em um sistema GC x GC é uma sequência contínua e encadeada dos cromatogramas curtos para cada fração eluída na 2D. A partir desse registro digitalizado, e conhecido o período de modulação (intervalo de tempo para cada ciclo de modulação) pode-se construir gráficos tridimensionais sinal do detector $\times$ tempo de retenção na 1^a coluna (t_{R1}) $\times$ tempo de retenção na 2^a coluna (t_{R2}).

Na **Figura II. 8** uma banda cromatográfica larga, consistindo de três analitos não separados na 1D (A) é fracionada e eluída na 2D, gerando um cromatograma bruto (B), onde os picos apresentam largura na base até 800 vezes menor que os picos gerados na 1D, o que corresponde a aproximadamente de 10 – 200 ms. Este fato garante o aumento significativo de amplitude do pico gerado na 2D, que pode apresentar, dependendo do tipo de modulação, altura de 20 a 150 vezes superior aos picos gerados nas análises 1D-GC [34].

Cada um dos cromatogramas individuais das frações pode ser destacado do cromatograma bruto (C) e a partir deles podem-se gerar gráficos $\text{signal} \times t_{R1} \times t_{R2}$ como diagrama tridimensional (“3D Plot”, D), como uma série de curvas de nível monocromáticas chamadas de diagrama de contorno (“Contour Plot”, E) ou ainda, usando escalas cromáticas de intensidade de sinal, o diagrama de cores (“Colour Plot”, F). Outro aspecto fundamental de GC x GC também pode ser destacado na mesma figura: a compressão das bandas cromatográficas decorrente da modulação ocasiona um aumento significativo da detectabilidade, ou seja, ao invés de eluir como um pico largo e pouco intenso, cada analito elui como uma série de picos estreitos e intensos (altas relações sinal/ruído), sendo facilmente detectados [29].

Figura II. 8. Ilustração das diferentes formas de construção de diagramas tridimensionais $\text{sin} \times t_{R1} \times t_{R2}$ em GC x GC. Fonte: Ref. [29].

A quantificação em GC x GC depende da medida da área dos picos detectados ou, mais corretamente, do seu volume, já que aqui esses são definidos em três dimensões ($\text{sin} \times t_{R1} \times t_{R2}$). A forma mais fácil de integração de picos de GC x GC é pela soma das áreas dos picos modulados usados para construir o diagrama tridimensional: algoritmos apropriados detectam os pontos de início e fim dos picos e somam os sinais entre os dois pontos, descontando a área sob a linha de base. No entanto, esta operação geralmente é realizada por um programa de computador à parte, em uma etapa posterior à aquisição dos dados, já que, como será discutido posteriormente, a quantidade de informação nos diagramas gerados por esses sistemas requer estratégias diferenciadas para sua avaliação,

sendo absolutamente imprescindível a adoção de rotinas computacionais com alto grau de automação, além de recursos de ferramentas quimiométricas [29].

Neste sentido, a escassez de softwares especialmente dedicados ao tratamento de dados em GC x GC acaba por motivar o número relativamente pequeno de estudos quantitativos em GC x GC. A maior parte dos grupos de pesquisa em GC x GC utiliza-se de programas feitos em laboratório, que realizam a transformação e visualização, convertendo os dados originais em arranjos bidimensionais e o tratamento dos dados é complementado por softwares comercialmente disponíveis que geram diagramas de contorno (**Figura II.8**) [29, 34, 42, 48].

Detectores

Como descrito anteriormente, em GC x GC, a separação na 2D deve ser rápida para promover a eluição total dos analitos de uma estreita banda modulada antes que a próxima banda alcance o detector. A largura das bases dos picos (w_b) é fator dependente do sistema de modulação empregado, das dimensões das colunas, da vazão do gás de arraste e do tempo de retenção na 2D (modo isotérmico). Porém valores típicos de W_b dos picos eluídos da 2D, entre 50 – 600 ms, exigem detectores extremamente rápidos, com frequência de aquisição da ordem de 100 Hz, e com pequenos volumes internos [36, 49]. Esta alta taxa de coleta (número de leituras do sinal digitalizado do detector por segundo) acaba por implicar em arquivos de dados extremamente extensos, da ordem de dezenas ou até centenas de megabytes por cromatograma, fazendo-se necessário o uso de computadores para processamento de dados com alta velocidade de processamento e memória interna.

Para suprir esta necessidade, o uso do detector por ionização em chama (FID – “Flame Ionization Detection”), com volumes internos desprezíveis e taxas de aquisição

de até 300 Hz, tem sido difundido em GC x GC [50, 51]. Apesar de alguns trabalhos recorrerem ao uso do detector de captura de elétrons (ECD – “Electron Capture Detector”), estes relatam o efeito de alargamento da banda cromatográfica devido ao seu significativo volume interno [52]. Outros detectores mais específicos, como os de quimiluminescência de enxofre (SCD – “Sulphur Chemiluminescence Detector”) [53] e de nitrogênio-fósforo (NPD – “Nitrogen-Phosphorus Detector”) [54], com aquisição de dados satisfatória, entre 50 e 100 Hz, também foram reportados para análises de óleo diesel e de compostos voláteis do grão de feijão, respectivamente.

Já a detecção por MS, que alia satisfatória velocidade de aquisição com informações extras fornecidas pelos espectros de massas, tem sido o detector mais utilizado em GC x GC. Neste caso, analisadores do tipo tempo de voo (ToFMS – “Time of Flight Mass Spectrometer”) permitem coleta de dados de até 500 espectros de massas/segundo [55], fazendo destes potenciais detectores para fins qualitativos e quantitativos [56, 57].

Espectrômetros de massas com analisadores quadrupolares clássicos (qMS – “Quadrupole Mass Spectrometer”) apresentam taxa de aquisição de pouco mais que dois espectros de massas por segundo, sendo idealmente lentos para as bandas cromatográficas estreitas de GC x GC. Contudo, é possível diminuir a faixa de massas investigada ou monitorar apenas alguns íons durante a corrida, resultando assim em uma maior taxa de aquisição. Adahchour *et al.* [58] relataram a interdependência entre taxa de coleta do sinal, faixa de massas investigada e 2w_b (largura do pico à meia altura), de forma que taxa de aquisição de até 50 Hz pode ser obtida desde que a faixa de massas seja reduzida para 95 u.m.a. e que 2w_b seja maior que 140 ms, o que determina, pelo menos, sete pontos por pico.

Aplicações

Atualmente, a GC x GC, pelos seus benefícios discutidos anteriormente, como o aumento de sensibilidade e poder de separação, tem sido amplamente utilizada nos mais diversos tipos de amostras, em especial aquelas que apresentam alto grau de complexidade. O expressivo número de artigos científicos com diferentes aplicações GC x GC, nas mais diversas matrizes, ilustra o grande interesse no desenvolvimento de metodologias baseadas nesta técnica. Destes, pode-se destacar aqueles artigos de revisão que tratam das diferentes aplicações da GC x GC [38, 42, 59].

Neste sentido, atenção especial é assistida às matrizes petroquímicas. As primeiras aplicações da GC x GC neste tipo de amostra resultaram na caracterização de grupos de compostos através da observação de sua distribuição espacial característica em diagramas de contorno [60].

Em estudo prévio, Blomberg *et al.* [61] apresentaram um diagrama de contorno da separação de uma amostra de gás-óleo leve por GC x GC-FID, utilizando um modulador térmico de varredura, para demonstrar o potencial da técnica. Em apenas 20 min foi obtida a completa separação por grupo de compostos saturados, mono- e di-aromáticos. Interessantes trabalhos incluem ainda a caracterização da matriz de petróleo bruto [62], importantes nas investigações geoquímicas e estudos forenses, e ainda aqueles com objetivo de quantificação de determinados compostos, ou classe de compostos, em querosene [63]. Tais estudos corroboram no acompanhamento mais detalhado e eficiente de etapas do processamento do petróleo, o que torna possível a aquisição de novas informações sobre sub-produtos obtidos e mecanismos de reação, possibilitando a melhoria dos processos e do monitoramento dos mesmos.

Como no caso das matrizes petroquímicas, óleos essenciais oferecem similar complexidade, apresentando um amplo número de classes de compostos químicos, e, por isso, motivando estudos em GC x GC. No primeiro relato do uso da GC x GC-FID, realizado por Dimandja *et al.* [64], o estudo em duas espécies de hortelã resultou em maior número de compostos detectáveis (de 30 para 89), quando comparado ao método GC/MS convencional.

Nas análises de contaminantes em alimentos, a presença de analitos em concentrações em nível de traços tem viabilizado a aplicação da técnica GC x GC. Ambos os métodos, GC x GC com detecção ECD [65] e ToF-MS [66], foram aplicados para análises de dioxinas, dibenzofuranos e bifenil policlorados em diferentes matrizes alimentícias (óleo de peixe, vegetais e leite). Neste estudo, em análises de extratos de cenoura, foram identificados mais de 100 compostos, sendo que o composto clorfenvinfós, foi detectado em concentração de 10 pg μ L e satisfatoriamente separado dos interferentes endógenos da matriz, como ácido hexadecanóico e ácido octadecanóico. Além disso, análises de agrotóxicos em vinho [67], compostos voláteis em frutas [68] e aromatizantes em sopas industrializadas [69] foram relatadas.

Outras aplicações, como análises de alergênicos em amostras de perfumes e cosméticos [70], compostos orgânicos voláteis (“VOCs”) em amostras ambientais [71], além da aplicação em separações enantiosseletivas (colunas com fases estacionárias na 2D) [72], e estudos de metabolomas (caracterização de fenótipos metabólicos) [73] têm sido reportadas em GC x GC.

II.2. OBJETIVOS

II.2.1. OBJETIVO GERAL

Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento do método GC x GC / qMS para análise de multirresíduos de agrotóxicos em tomates frescos para fins de controle de qualidade, a fim de atender aos órgãos regulamentadores, nacional (ANVISA) e internacional (Codex Alimentarius), quanto aos limites máximos de resíduos de agrotóxicos aceitos para esta cultura.

II.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Otimização da etapa de preparo de amostras (extração líquido-líquido);
2. Pré-otimização em sistema 1D-GC/qMS;
3. Avaliação dos parâmetros de configuração do sistema GC x GC/qMS;
4. Otimização das condições cromatográficas GC x GC/qMS para separação dos componentes da mistura multirresíduos de agrotóxicos no plano 2D;
5. Estudo de parâmetros de validação analítica para o método padronizado GC x GC/qMS;
6. Avaliação da eficiência da técnica GC x GC frente às técnicas clássicas de separação unidimensionais;
7. Avaliação do método proposto GC x GC/qMS para análises de amostras de tomates frescos disponíveis no mercado.

II. 3. COLABORAÇÃO

Este projeto foi realizado junto à *Facoltà di Farmacia, Università di Messina*, Itália, sob supervisão do Prof^o Dr^o Luigi Mondello, através do *Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior*, concedido pelo CNPq, no período de Março a Agosto de 2010.

II. 4. MATERIAIS E MÉTODOS

II.4.1. AGROTÓXICOS SELECIONADOS PARA O ESTUDO

A **Tabela II.2** ilustra as estruturas químicas dos agrotóxicos estudados neste trabalho, bem como o grupo químico aos quais pertencem e LMRs em tomate, aceitos pela ANVISA [9] e pelo *Codex Alimentarius* [12].

Tabela II. 2

Fórmulas estruturais, grupos químicos e LMRs dos agrotóxicos estudados

	Nome	Fórmula Estrutural	Grupo Químico	LMRs (mg kg ⁻¹)*	
				Anvisa ^a	Codex Alimentarius ^b
1	λ-Cialotrina		Piretróide	0,05	NA
2	2,4-DDT		OC	NA	NA
3	4,4-DDT		OC	NA	NA
4	Aldrin		OC	NA	NA

Tabela II. 2. Continuação					
5	Bioaletrina		Piretróide	NA	NA
6	Carbofenotiona		OF	NA	NA
7	Carbofuran		Carbamato	0,1	NA
8	Clorobenzilato		OC	NA	NA
9	Ciproconazol		Triazol	NA	NA
10	Dicofol		OC	NA	1,0
11	Dieldrin		OC	NR	NA
12	Dimetoato		OF	1,0	NA
13	Dissulfotom		OF	NA	NA
14	Endosulfan		OC	NA	NA
15	Epoxiconazol		Triazol	NA	NA

Tabela II.2. Continuação

16	Etiona		OF	2,0	NA
17	Etrinfos		OF	NA	NA
18	Fenitrotona		OF	NA	NA
19	Fenpropatrin		Piretróide	0,2	1,0
20	Fentiona		OF	NA	NA
21	Fenvalerato		Piretróide	NA	1,0
22	Forato		OF	0,1	NA
23	Heptacloro		OC	NA	NA
24	HCB		OC	NR	NA
25	Lindane		OC	NA	NA

Tabela II.2. Continuação

26	Malationa		OF	3,0	0,5
27	Miclobutanil		Triazol	NA	0,3
28	o,p-DDD		OC	NA	NA
29	Oxifluorfem		Éter difenílico	NA	NA
30	p,p-DDD		OC	NA	NA
31	p,p-DDE		OC	NA	NA
32	Paraaxon		OF	NA	NA
33	Parationa		OF	NA	NA
34	Prometrina		Triazina	NA	NA
35	Propargite		Sulfito	2,0	2,0

Tabela II.2. Continuação					
36	Quintozen		OC	0,1	0,05
37	Terbufós		OF	NA	NA

* LMR: Limite Máximo de Resíduos, expresso pela razão entre a massa (mg) do ingrediente ativo e a massa (kg) de tomate;

^a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dados retirados da ref [9];

^b Dados retirados da ref [12];

OC: agrotóxicos organoclorados, OF: agrotóxicos organofosforados; NA: Não autorizado; NR: Não registrado no país; HCB: hexaclorobenzeno.

II. 4. 2. PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES

Os padrões dos agrotóxicos de interesse com pureza acima de 98% foram adquiridos pelo fornecedor Sigma-Aldrich® (Milão, Itália). Acetato de etila e ciclohexano (grau HPLC) foram obtidos pela Carlo Erba® (Milão, Itália). As soluções padrão diluídas dos agrotóxicos foram preparadas a partir da diluição de suas respectivas soluções estoques individuais de 1mg mL⁻¹ em mistura de ciclohexano : acetato de etila (1:1, v/v). Todas as soluções de agrotóxicos foram estocadas a - 18 °C durante o estudo.

II. 4. 3. AMOSTRAS DE TOMATES

As amostras de tomates frescos foram adquiridas em propriedades de agricultura de subsistência, onde a cultura não recebe nenhum tipo de aplicação de agrotóxicos, podendo ser considerados dessa forma, como uma cultura orgânica. Deste modo, tais amostras foram utilizadas como “branco de referência”, após serem enriquecidas com a mistura dos padrões dos agrotóxicos, para a padronização da etapa de preparo de amostra (LLE) e avaliação dos parâmetros de validação analítica.

As amostras de tomates utilizadas na etapa de aplicação do método GC x GC / qMS, para fins de controle de qualidade, foram adquiridas em mercados locais da cidade de Messina, Itália.

II. 4. 4. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Primeiramente, as amostras de tomates, sem o talo, foram lavadas com água, trituradas em processador de alimentos, pesadas e as alíquotas foram enriquecidas com as soluções padrão dos agrotóxicos nas concentrações desejadas e estocadas a - 18° C.

Para o processo LLE, quatro diferentes massas de tomate foram testadas: 1, 5, 10 e 20 g. Acetato de etila foi usado como solvente de extração, sendo que três proporções solvente : fruta foram avaliadas: 1:5, 1:2 e 1:1 (solvente : tomate, v/m, respectivamente). Após adição das soluções padrão dos agrotóxicos e homogeneização, as amostras foram agitadas magneticamente (5, 15 e 30 minutos foram os tempos avaliados à velocidade de 900 rpm) em frasco de vidro de fundo chato com tampa (50 mL) e centrifugadas a 4000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi então recolhido e dispensado em frasco de vidro (2 mL) com tampa de rosca e septo de silicone. Em sequência, o solvente remanescente da extração foi evaporado à secura sob N_{2(g)} e redissolvido com 200 µL de acetato de etila, e finalmente, posicionados no injetor automático para as análises GC x GC / qMS. Nenhuma etapa posterior de purificação foi realizada.

II. 4. 5. ANÁLISES GC x GC / qMS

As análises GC x GC / qMS foram realizadas em sistema Shimadzu GC x GC / MS consistindo em um cromatógrafo gasoso GC2010 equipado com injetor split-splitless a 300 °C, detector de espectrometria de massas quadrupolar QP2010 de varredura rápida

(“rapid-scanning qMS”), além de injetor automático AOC-20i (Shimadzu®, Kyoto, Japão). A **Figura II. 9** ilustra a configuração do sistema GC x GC / qMS utilizado neste trabalho.

Figura II. 9. Ilustração da configuração do sistema GC x GC / qMS utilizada no trabalho. MS: espectrômetro de massas, GC: cromatógrafo gasoso. Adaptado de ZOEX Corporation®.

O programa de temperatura do forno do GC foi o seguinte: temperatura inicial de 150 °C com rampa linear de 4 °C min⁻¹ até 300 °C, mantendo-se por 5 minutos. O volume de injeção de 4 µL no modo split (1:10) foi aplicado. O tempo dispensado para eluição do solvente (“solvent cut time”) foi de 6 min. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com pressão inicial de 229 kPa, no modo de velocidade linear constante. As amostras foram analisadas no modo de varredura (“Full Scan”) com velocidade de varredura de 10.000 amu/s, faixa de massa investigada de 50-460 *m/z* e frequência de aquisição de 20 Hz. As temperaturas da interface e da fonte de íons foram 250 e 220 °C, respectivamente. O modo de ionização empregado foi o de ionização por elétrons a 1,0 kV. As condições

descritas acima foram aplicadas nas análises 1D-GC e GC x GC. Os dados foram coletados pelo software *GCMS solution* (Shimadzu®), e a visualização bidimensional foi realizada utilizando o software *Comprehensive Chromatography Manager v.1.0* (Chromaleont®, Messina, Itália). Para as análises qualitativas foi utilizada a biblioteca de espectros de agrotóxicos construída no laboratório e a NIST05, enquanto que cromatogramas de íons extraídos (“extracted ion chromatogram”) foram utilizados para quantificação (ver Tabela II. 3, seção II. 5. 4.).

II. 4. 6. CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA DE MODULAÇÃO

A coluna utilizada na primeira dimensão foi a SLB-5ms (polímero silfenileno - 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm - Supelco®, Milão, Itália), conectada com auxílio de mini-uniões SGE SilTite (Ringwood®, Victoria, Austrália) a uma coluna capilar sem revestimento (1,4 m x 0,25 mm d.i.), que foi utilizada como “loop” para os ciclos de modulação. Ao final deste “loop” foi conectada a coluna da segunda dimensão, a SLB-IL59 (líquido iônico - 1,0 m x 0,10 mm x 0,10 µm - Supelco®, Milão, Itália).

O modulador criogênico do tipo “loop”, com dois estágios de modulação, um jato frio (vapor de N₂(l)) e um quente (N₂(g) aquecido a 325°C em câmara localizada dentro do forno GC), foi utilizado (sob licença da Zoex Corporation®, Houston, USA) com períodos de modulação de 4 segundos. A **Figura II. 10** ilustra a configuração do sistema de modulação criogênico de jato duplo utilizado neste trabalho, semelhante àquele apresentado na **Figura II.7-D**. A posição das câmaras de jato frio e jato quente dentro do forno do cromatógrafo gasoso é apresentada na **Figura II. 10-A**.

Neste sistema, a montagem mecânica do modulador do tipo “loop” é composta por cinco componentes principais (**Figura II. 10-B**). O subconjunto de jato frio de N₂ consiste de um tubo de aço inox de cerca de 3 mm de diâmetro alojado em um tubo de

aço exterior de 19 mm de diâmetro interno (câmara de resfriamento). Com auxílio de uma bomba mecânica, forma-se vácuo no espaço entre os tubos interno e externo, essencial para manter o gás de N₂ suficientemente resfriado. O subconjunto de jato quente foi montado em ângulo reto com o jato frio. O “loop” (capilar de modulação) foi alojado em um suporte de metal (“holder”) e sustentado por um pedaço de filme de poliamida (Kapton, Dupon[®]), que tem a função de manter o capilar tensionado na posição desejada.

A **Figura II. 10-C** ilustra a visão inferior da estrutura do “loop” mais claramente.

O jato frio é dirigido verticalmente para baixo (**Figura II. 10-B**) para o “loop”, criando assim, dois pontos de resfriamento distantes 3 mm um do outro (**Figura II. 10-C**), promovendo o aprisionando os analitos nestas regiões. O jato frio é executado continuamente, sendo desviado para longe dos pontos de resfriamento do “loop” pelo jato quente, pulsado em intervalos de tempo referente ao período de modulação e duração de 375 ms, liberando os analitos retidos para posterior separação na coluna 2D (**Figura II. 10-D**).

Figura II. 10. Configuração do sistema de modulação criogênica de jato duplo (frio e quente) utilizado. A – Posição das câmaras de jato frio e quente dentro do forno; B - Principais componentes (1. Câmara de jato frio, 2. Câmara de jato quente, 3. “loop”, 4. Suporte de metal (“holder”), 5. Filme de poliamida (Kapton), 6. Jato frio); C – Visão inferior da estrutura do modulador; D – Remobilização dos analitos à fase móvel para posterior separação na 2D (7. Jato quente). Adaptado de ZOEX Corporation®.

II. 4. 7. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Neste trabalho, como descrito no Capítulo I, a validação analítica foi realizada seguindo as normas da ANVISA [74] para o desenvolvimento de metodologia analítica. Os parâmetros de validação analítica avaliados foram: seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão, exatidão e recuperação.

Para a validação analítica do método GC x GC / qMS padronizado, amostras de tomates (branco de referência) foram enriquecidas com soluções padrão de misturas dos agrotóxicos em concentrações que contemplam o intervalo de 25 a 1000 ng g⁻¹.

II. 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

II. 5. 1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

Para este trabalho, a técnica LLE, em razão de sua simplicidade, foi selecionada para etapa de pré-concentração dos agrotóxicos. Apesar de algumas desvantagens do uso desta técnica, como a formação de emulsão entre as fases (aquosa e orgânica) e a necessidade de concentração da fase orgânica, o uso de pequeno volume de solvente orgânico associado a alta resolução da técnica GC x GC / qMS resultou em adequada separação cromatográfica dos analitos e compostos endógenos da matriz de tomate, com significativo ganho de detectabilidade.

O procedimento LLE foi otimizado, em ensaios realizados em triplicata, variando-se um parâmetro por vez, mantendo-se os outros constantes. O acetato de etila foi selecionado para o procedimento LLE, pois as extrações realizadas com este solvente apresentam altas taxas de recuperação para agrotóxicos que possuem ampla faixa de polaridade [75]. Diferentes quantidades de amostras de tomate (1,0; 5,0; 10,0 e 20,0 g) fortificadas com os agrotóxicos na concentração de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ foram inicialmente utilizadas nos experimentos. A **Figura II. 11** ilustra, de forma representativa (5 agrotóxicos: parationa, fenvalerato, p,p-DDD, hexaclorobenzeno e propargite), a influência da quantidade de tomate na eficiência de extração. Estudos prévios indicam que a eficiência de extração (recuperação) aumenta com a diminuição da quantidade de amostra avaliada. No entanto, de acordo com Nakamura *et al.* [76], a real quantidade extraída (sensibilidade) aumenta quando maiores massas de amostra são utilizadas, particularmente para analitos com coeficientes de distribuição ($\log K_o/w$) na faixa entre 3

e 6. Portanto, com o intuito de se alcançar valores de limite de detecção mais baixos possíveis, a massa de tomate de 20 g foi selecionada para os experimentos seguintes.

Figura II. 11. Avaliação da quantidade de amostra (g) na eficiência de extração. Condições LLE: amostras de tomate enriquecidas com os agrotóxicos na concentração de $1 \mu\text{g g}^{-1}$, proporção solvente:amostra 2:1 (v/m), 5 min de extração a 25°C sob agitação a 900 rpm.

Como passo seguinte, diferentes proporções acetato de etila : tomate (1:5, 1:2, 1:1, v/m) foram avaliadas. Os resultados (**Figura II. 12**) mostram que uma maior eficiência de extração foi obtida quando 10 mL de solvente foram adicionados em 20 g de tomate (1:2, v/m). Após este valor, as áreas dos picos mantiveram-se constante com o aumento da quantidade de solvente.

Neste trabalho, a homogeneização da amostra e a extração foram realizadas com auxílio de agitação magnética à temperatura ambiente (25°C). Três tempos de extração foram avaliados sob agitação de 900 rpm: 5, 15 e 30 minutos. De acordo com os resultados (**Figura II. 13**), as áreas dos picos dos analitos aumentaram quando o tempo de extração aumentou de 5 para 15 minutos. Após 15 minutos, diminuição da eficiência de extração foi observada para alguns analitos, associada à possível degradação do

resíduo de agrotóxico em questão. Deste modo, a LLE foi procedida da seguinte forma: as amostras de tomate foram enriquecidas com os agrotóxicos na concentração de $1 \mu\text{g g}^{-1}$, 10 mL de acetato de etila foram adicionados à 20 g de tomate, agitadas com auxílio de barra magnética por 15 min a 25°C na velocidade de 900 rpm.

Figura II. 12. Influência da proporção solvente:amostra (v/m) na eficiência de extração. Condições LLE: amostras de tomate enriquecidas com os agrotóxicos na concentração de $1 \mu\text{g g}^{-1}$, 5 min de extração a 25°C sob agitação a 900 rpm.

Figura II. 13. Influência do tempo de extração na eficiência de extração. Condições LLE: amostras de tomate enriquecidas com os agrotóxicos na concentração de $1 \mu\text{g g}^{-1}$, proporção 1:2 (solvente: amostra, v/m), agitação 25°C e 900 rpm.

II. 5. 2. PRÉ-OTIMIZAÇÃO EM 1D-GC

A otimização da temperatura e da vazão do gás de arraste durante a separação é de grande importância na obtenção de bons resultados nas separações multidimensionais. Segundo Dallüge *et al.* [55], uma metodologia estabelecida para análise monodimensional convencional pode ser utilizada como base nos sistemas GC x GC. Neste trabalho, com o intuito de alcançar maior resolução possível na 1D, a seleção da temperatura e da vazão do gás de arraste foi baseada nas análises no sistema bidimensional sem etapa de modulação, ou seja, com as duas colunas conectadas em série, porém com o controlador de modulação desligado, similar à uma análise 1D-GC. Os parâmetros otimizados foram posteriormente aplicados ao sistema bidimensional com modulação.

Considerando-se o tempo típico de análise (comprimento do cromatograma) em 2D em torno de 3 a 8 s, é desejável que os picos da primeira dimensão tenham largura de base em torno de 10 a 25 s (para 3 modulações por pico), maiores que aqueles conseguidos em condições otimizadas de análises 1D-GC convencional, da ordem de 5 a 10 s. Portanto, a análise na 1D não foi realizada em condições ótimas, a fim de alcançar eficiente processo de modulação.

A temperatura aplicada à coluna 1D irá influenciar diretamente a largura dos picos dos compostos eluídos da primeira dimensão [36]. De acordo com Beens *et al.* [34], a elevação mais acelerada da temperatura, na programação de temperatura, geralmente acarreta em perda de resolução adquirida em 1D, já que um maior número de compostos estarão presentes em uma mesma fração modulada, comprometendo o poder de separação do sistema GC x GC. Esta medida também tornará os picos da 1D mais estreitos, o que poderá causar um número reduzido de modulações destes picos, comprometendo o processo de modulação. Neste contexto, embora aumentando o tempo de análise, um

programa de temperatura relativamente lento (150 – 300 °C, 4 °C min⁻¹), em relação àquele usualmente aplicado nas análises 1D-GC, foi selecionado, pois este garantiu picos mais largos com número satisfatório de modulações por pico (2 – 3), como será demonstrado posteriormente.

A influência da vazão do gás de arraste no sistema GC x GC é ainda mais complexa. Uma vez que as duas colunas são conectadas em série, as vazões do gás de arraste não podem ser selecionadas independentemente, ou seja, a vazão selecionada deverá resultar em separação aceitável em ambas as dimensões.

Para a seleção da vazão do gás de arraste foi considerado o sistema monodimensional, consistindo de uma única coluna de dimensões relativa as dimensões das colunas 1D (30 m x 0,25 mm d.i.), 2D (1 m x 0,1 mm d.i.), e ainda do “loop” utilizado (1,4 m x 0,25 mm d.i.). Para isso, consideramos o mesmo diâmetro interno para as colunas (0,25 mm), ou seja, o sistema monodimensional (composto pelas 3 colunas) deve apresentar mesma resistência à vazão da fase móvel na sua totalidade. Segundo Mondello *et al.* [77], assumindo-se que as resistências à vazão de duas colunas com mesmo d.i. são equivalentes, pode-se calcular o comprimento ideal da coluna 2D que possui d.i. de 0,25 mm, através da equação II.1:

$$L_2 \times r_1^4 = L_1 \times r_2^4 \quad \text{Equação II. 1}$$

onde L_1 e L_2 representam os comprimentos das colunas 2D (real e ideal), com d.i. de 0,1 mm (L_1 , 1 m) e 0,25 mm (L_2), respectivamente, e r_1 e r_2 , os raios internos da coluna 2D, 0,05 mm (r_1) e 0,125 mm (r_2), respectivamente. Substituindo estes valores na equação II. 1, encontramos o comprimento da coluna 2D (L_2) de d.i. de 0,25 mm, com

resistência à vazão da fase móvel, a qual é equivalente à coluna de 1 m de comprimento e d.i. de 0,1 mm. O comprimento (L_2) determinado foi de 39,06 m.

Com este valor foi fácil calcular as dimensões da coluna relativa à soma das dimensões das colunas 1D, 2D e do “loop”. Como o “loop” possui diâmetro interno semelhante à coluna 1D, este foi considerado como uma extensão da primeira dimensão. Portanto, as dimensões da coluna do sistema monodimensional são: 70,5 m de comprimento e 0,25 mm de d.i. (estes valores devem ser inseridos no software *GCMS* utilizado, para que os parâmetros de análise sejam ajustados corretamente).

Se considerarmos essa nova coluna para o sistema 1D-GC, uma pressão inicial de aproximadamente 400 kPa (correspondente a uma velocidade linear de $41,6 \text{ cm s}^{-1}$) seria necessária, de acordo com o software *GCMS* utilizado. Porém, a seleção de uma pressão inicial inferior, de 229 kPa em 1D (no modo velocidade linear constante), resultou em vazão do gás de arraste de 22 cm s^{-1} para esta dimensão. A diminuição da vazão do gás de arraste, em comparação ao valor ótimo de $41,6 \text{ cm s}^{-1}$, acarretou em efeito semelhante ao encontrado quando se utiliza programa de temperatura lento, ou seja, a eluição dos compostos da 1D foram mais lentos, provocando ligeiro alargamento da base dos picos, e assim, contribuindo para uma etapa de modulação mais eficiente.

Na prática, assumindo-se que a coluna 2D possui comprimento de 1 m e 0,1 mm de d.i., a velocidade linear nesta dimensão foi de 233 cm s^{-1} , valor muito acima do valor ideal (aproximadamente 100 cm s^{-1} para essas dimensões). Este fato pode, no entanto, ser tolerado devido ao perfil com pequena inclinação da curva de Van Deemter (altura equivalente a um prato teórico *versus* velocidade linear do gás de arraste) para esse tipo de coluna [55], permitindo o uso de altas vazões do gás de arraste sem grandes perdas de eficiência. A situação inversa, ou seja, o aumento da vazão do gás de arraste na coluna 1D buscando uma análise mais rápida acarreta em pressões impraticáveis na coluna 2D.

Essa etapa de pré-otimização das condições GC x GC, ainda sem o processo de modulação, possibilitou a obtenção de maior resolução cromatográfica possível na 1D para a análise das amostras de tomate, após LLE, enriquecida com as soluções padrão dos agrotóxicos.

Porém, a técnica de extração empregada neste estudo, por apresentar baixa seletividade, forneceu extratos contendo altas concentrações de interferentes, ou seja, compostos endógenos da matriz de tomate. A **Figura II. 14** ilustra o cromatograma da separação 1D-GC/qMS, realizada segundo condições descritas na seção II.4.5, após LLE. As regiões destacadas no referido cromatograma foram ampliadas para melhor visualização da separação cromatográfica alcançada em análise monodimensional (**Figura II. 15**). Apenas os picos referentes aos agrotóxicos foram nomeados. Como previsto, não foi alcançada resolução cromatográfica satisfatória entre os analitos de interesse e os compostos endógenos da matriz. Coeluições entre os analitos também foram observadas.

Figura II. 14. Cromatograma da análise 1D-GC/qMS de amostra de tomate enriquecida com soluções padrão dos agrotóxicos na concentração de 200 ng g^{-1} após LLE. As regiões destacadas (A, B, C, D e E) foram ampliadas e estão apresentadas na Figura II. 15. As condições GC/qMS estão descritas na seção II.4. 5.

Figura II. 15. Cromatogramas representativos das cinco seções (A, B, C, D e E) do cromatograma da Figura II. 14. As condições GC/qMS estão descritas na seção II.4. 5.

Figura II. 15. (continuação). Cromatogramas representativos das cinco seções (A, B, C, D e E) do cromatograma da Figura II. 14. As condições GC/qMS estão descritas na seção II.4. 5.

A **Figura II. 15** ilustra de forma clara a baixa resolução cromatográfica obtida em algumas seções do cromatograma da análise 1D-GC. Além das coeluições entre os agrotóxicos, como por exemplo, terbufós e lindane (**Figura II. 15-A**), parationa e aldrin (**Figura II. 15-B**) e dieldrin e o,p-DDD (**Figura II. 15-C**), a presença de interferentes, compostos endógenos do tomate, também acarretou na baixa resolução cromatográfica, sendo que, em alguns casos, houve coeluição destes interferentes com os agrotóxicos estudados.

A **Figura II. 15-B** exemplifica este tipo de coeluição. Neste caso, o agrotóxico malationa coelui totalmente com um pico intenso, caracterizado por dois componentes endógenos do tomate, o ácido esteárico (92% de similaridade*) e o ácido ascórbico (ou Vitamina C, com 91% de similaridade*). Na **Figura II. 16** (fração expandida da Figura II. 15-B), observa-se a coeluição entre os agrotóxicos heptacloro e prometrina com outro interferente, caracterizado como sendo o ácido palmítico (94% de similaridade*). Neste caso, a distinção entre os três componentes somente foi possível através dos cromatogramas de monitoramento de íons (MIC – “monitoring ion chromatogram”). Já

* Similaridade adquirida pela biblioteca de espectros *NIST05*.

segundo a **Figura II. 15-D**, o agrotóxico dicofol é totalmente mascarado pela coeluição com o ácido oléico (89% de similaridade*), composto presente na semente do tomate.

Figura II. 16. Cromatograma de íon total (TIC) obtido para análise 1D-GC/qMS de amostra de tomate enriquecida com agrotóxicos na concentração de 200 ng g^{-1} após LLE (em preto) e cromatogramas de monitoramento de íons (MIC) para composto interferente (ácido palmítico): $m/z = 74$, prometrina: $m/z = 184$ e heptacloro: $m/z = 100$ (em cores).

Embora seja possível otimizar a resolução cromatográfica para a análise 1D-GC, este procedimento resultaria em longos tempos de análise e em baixa detectabilidade, além da necessidade de inserção de uma etapa de limpeza no preparo da amostra, que poderia resultar na perda do analito, comprometendo as taxas de recuperação do método.

II. 5. 3. PARÂMETROS DE OTIMIZAÇÃO EM GC x GC/qMS

Efeito das dimensões das colunas

A seleção de uma coluna capilar com dimensões convencionais (30 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,25 μm de espessura de filme), utilizada na primeira dimensão, fundamentou-se no fato de que tais colunas são geralmente utilizadas em

análises 1D-GC, e, deste modo, facilitou a otimização da resolução cromatográfica no sistema GC x GC através das mudanças dos parâmetros experimentais em 1D (temperatura e vazão do gás de arraste), como discutido anteriormente.

O tempo de análise foi também fator limitante na seleção das dimensões da coluna 2D. Como apresentado anteriormente, a análise em 2D deve ser rápida o suficiente para que o material coletado e, posteriormente reinjetado, seja completamente eluído antes que a próxima fração seja introduzida na coluna 2D. Isto deixa clara a necessidade da utilização de colunas com comprimentos consideravelmente menores na segunda dimensão. Se a segunda coluna tiver diâmetro interno semelhante ao da primeira, ou ocorrer um número baixo de reinjeções na segunda coluna (motivado pelo comprimento relativamente longo da coluna 2D), perda de resolução cromatográfica adquirida em 1D poderá ser observado [29, 36]. A fim de evitar este inconveniente, utilizou-se coluna de 1 m de comprimento, diâmetro interno reduzido (0,1 mm) e espessura de filme (d.f.) de 0,1 μ m, promovendo análises rápidas em 2D, sem perda de resolução adquirida em 1D.

Neste sentido, o uso de colunas de dimensões ainda menores tem sido reportado [78,79], com a grande vantagem de redução do tempo de análise, sem perda de resolução. Segundo Brinkman *et al.* [80], o uso de coluna de dimensões 0,5 m x 50 μ m d.i. e 50 μ m d.f. em 2D possibilitou a diminuição do tempo de análise de 100 para 27 minutos e o uso de condições ótimas em 1D. Porém, o limitado número de colunas com 50 μ m de d.i. disponível no comércio dificulta a avaliação destas para os diferentes arranjos GC x GC [36].

Efeito das fases estacionárias

Como descrito na seção II.1.3., para que um sistema possa ser definido como verdadeiramente bidimensional abrangente, este deve apresentar mecanismos de

separação diferentes e independentes em cada uma das colunas e, além disso, que os compostos, separados na 1D, mantenham-se completamente separados até o final da análise [35].

Para atender estes dois requisitos, além da necessidade de selecionar adequadamente o período de modulação (P_M , em segundos), torna-se altamente desejável (mas não imprescindível) que os mecanismos de separação em GC x GC sejam ortogonais. Desta forma, a seleção do arranjo de colunas, bem como de suas características (fase estacionária e dimensões), é fator importante para que se alcance eficiente processo de separação em GC x GC.

Neste trabalho, a configuração das colunas utilizadas foi a seguinte: uma coluna de baixa polaridade (SLB-5ms, composta por polímeros silfenilenos) na 1D, com polaridade equivalente a 5% difenil / 95% dimetil siloxano; uma coluna polar (SLB-IL59, composta por 1,12 di(tripropilfosfônio)dodecano bis (trifluorometasulfonil)amida) na 2D, com características (polaridade e seletividade) semelhantes às colunas de polietileno glicol, porém, com maior estabilidade térmica, e uma coluna capilar sem revestimento (1,4 m x 0,25 mm d.i.), que foi utilizada como “loop” para os ciclos de modulação.

Nessa configuração, pela ausência de interações polares entre os analitos e a fase estacionária, a separação na 1D foi governada pela pressão de vapor dos analitos, e desta forma, cada fração coletada pelo modulador continha espécies com pontos de ebulição próximos. Como a separação na 2D foi extremamente rápida (alguns segundos), o programa de temperatura aplicado na análise na 1D apresentou pouca influência na separação seguinte (separação isotérmica), portanto, o uso da fase estacionária seletiva polar na 2D promoveu a completa separação da mistura de compostos com pontos de ebulição próximos por interações específicas entre esses e a fase estacionária, como por exemplo interações do tipo $\pi - \pi$, pontes de hidrogênio e efeito estérico, dependendo da estrutura química do agrotóxico. A **Figura II. 17** ilustra o conceito de ortogonalidade

adquirido (arranjo apolar x polar) na resolução cromatográfica GC x GC dos agrotóxicos estudados.

Figura II. 17. Ilustração da ortogonalidade em GC x GC. 1D: primeira dimensão, 2D: segunda dimensão. Adaptado das ref [34].

Apesar das vantagens citadas para o uso da ortogonalidade em GC x GC, alguns trabalhos reportam configurações não-ortogonais, com arranjos de colunas do tipo polar-polar [80] e polar-apolar [81], onde foram alcançadas resoluções satisfatórias e informações a respeito da identidade química dos componentes da amostra.

Efeito do período de modulação

Embora seja desejável que as frações amostradas pelo modulador possuam períodos de modulação menores do que $\frac{1}{4}$ da largura dos picos cromatográficos da dimensão 1D [82], a largura dos picos provenientes das análises 1D-GC, entre 9 e 15 segundos, impossibilitou a aplicação de um valor ótimo para o número de ciclos de modulação (3 – 4 por pico) para todos os agrotóxicos avaliados.

Com o uso de um programa de temperatura lento, o que aumenta as temperaturas de eluição da 1D, e a alta vazão do gás de arraste imposta em 2D, a retenção dos agrotóxicos na coluna de dimensões reduzidas pode ser prejudicada, se utilizado tempos de análise extremamente pequenos, em torno de 2 à 3 segundos, podendo acarretar em coeluições dos compostos já separados em 1D. Neste sentido, o período de modulação de 4 segundos foi selecionado, fornecendo de 2 a 3 modulações por pico, suficientes para aprimorar a resolução cromatográfica em GC x GC. Esta consideração pode ser melhor compreendida pelas figuras **Figura II. 16**, onde se verifica a coeluição entre os agrotóxicos prometrina e heptacloro e o interferente da matriz de tomate (ácido palmítico), quando análise 1D-GC é realizada, e **Figura II. 18** (cromatograma 2D bruto), onde se verifica total resolução dos agrotóxicos em análise no sistema GC x GC com P_M de 4 segundos. Para esses dois agrotóxicos, prometrina e heptacloro, um número de 3 e 2 modulações por pico foi alcançado, respectivamente.

Figura II. 18. Fração do cromatograma bruto GC x GC / qMS. As condições GC x GC/qMS estão descritas na seção II.4.5. P_M : período de modulação.

Neste caso, também é observado diferente ordem de eluição dos agrotóxicos, promovida pelas interações com as diferentes fases estacionárias, ou seja, pela ortogonalidade imposta à separação bidimensional. No período de modulação onde ambos os agrotóxicos, prometrina e heptacloro, estão presentes, há inversão da ordem de eluição, em comparação à ordem de eluição da 1D, e o heptacloro apresenta menor tempo de retenção que a prometrina na coluna 2D. Porém, esta diferença da ordem de eluição não acarretou em perda de resolução no plano de separação GC x GC, como será apresentado na próxima seção.

II. 5. 4. ANÁLISES GC x GC / qMS

As análises GC x GC / qMS dos extratos das amostras de tomate, após LLE, contendo os agrotóxicos em concentrações que variam entre 25 ng g⁻¹ e 1000 ng g⁻¹, foram realizadas segundo descrito nas seções II. 4. 5 e II. 4. 6. Os resultados e discussão acerca da avaliação do desempenho do sistema modulador utilizado, bem como o estudo de resolução e detectabilidade nas separações, serão apresentados a seguir.

Como descrito anteriormente, o sistema de modulação pode ser considerado o componente chave nas análises bidimensionais abrangente. Neste trabalho, a modulação do tipo criogênico de jato duplo (um frio e outro quente) em capilar sem revestimento (“loop”) foi utilizado (segundo configuração e funcionamento descrito na seção II. 4. 6). Segundo a literatura, o uso de CO₂(l) (- 77 °C) como jato frio promove adequada modulação (focagem) apenas àqueles compostos com pontos de ebulição acima de 200 °C, porém, quando N₂(l) (- 189 °C) é utilizado para este fim, compostos extremamente voláteis (que se apresentam no estado gasoso à temperatura ambiente, por exemplo) podem ser modulados eficientemente [83], gerando frações focadas bastante estreitas, da ordem de poucos milissegundos.

Este grande poder de modulação promovido pelo uso de vapores de $N_2(l)$ no sistema de modulação, empregado neste trabalho, foi especialmente importante pela presença de agrotóxicos com pontos de ebulição consideravelmente baixos ($< 200\text{ }^{\circ}\text{C}$), como nos casos do terbufós ($69\text{ }^{\circ}\text{C}$), dimetoato ($117\text{ }^{\circ}\text{C}$), forato ($122\text{ }^{\circ}\text{C}$) e malationa ($156\text{ }^{\circ}\text{C}$), por exemplo.

Após a focagem realizada pelo jato frio, a cada período de modulação (4 seg), o jato quente ($N_2(g)$ aquecido em câmara de aço inox) foi pulsado sobre o “loop” de modulação, promovendo a liberação da fração modulada à coluna 2D. Enquanto que em sistemas criogênicos onde a remobilização é realizada através das altas temperaturas do forno do cromatógrafo, o que geralmente acarreta em efeito de alargamento de bandas [34], o uso do jato quente à $325\text{ }^{\circ}\text{C}$ favoreceu a rápida remobilização dos agrotóxicos, mantendo a largura da fração modulada estreita, e, além disso, impediu o congelamento da extremidade da câmara de jato frio.

Além disso, o estreitamento das bandas cromatográficas, decorrente da modulação criogênica utilizada, possibilitou aumento significativo da detectabilidade: ao invés de eluir como um pico largo e baixo, cada analito elui como uma série de picos estreitos, com maior sinal analítico e maiores relações sinal/ruído e, portanto, mais facilmente detectáveis. Este ganho nos níveis de detecção, mesmo sendo às vezes superestimados em alguns trabalhos, pode ser considerado uma das principais vantagens do uso da técnica GC x GC. As frações dos cromatogramas 1D-GC e bruto 2D (gerado em GC x GC / qMS) evidenciam o aumento da detectabilidade discutido (**Figura II. 19**). Enquanto o pico do agrotóxico forato analisado em 1D-GC apresenta w_b de 11,5 segundos e intensidade de aproximadamente $1,3 \times 10^6$, o pico mais intenso deste agrotóxico (total de 3 picos), após análise GC x GC apresentou largura de base de aproximadamente 420 ms (valores entre 360 e 660 ms para os outros agrotóxicos), 25 vezes mais estreito que aquele gerado em 1D-GC, e intensidade de $1,25 \times 10^7$. Desta forma, devido à

conservação de massa nas análises bidimensionais abrangentes, houve incremento de detectabilidade (intensidade do pico) da ordem de 10 vezes (considerando-se apenas o pico modulado de maior intensidade), em comparação à análise 1D-GC. A taxa de incremento de detectabilidade para os outros agrotóxicos estudados variou de 3 a 12 vezes quando comparada à análise monodimensional convencional.

Figura II. 19. Frações dos cromatogramas 1D-GC (acima) e GC x GC (abaixo) demonstrando aumento de detectabilidade em análise bidimensional para o agrotóxico forato. (em vermelho são destacadas as larguras da base, W_b , dos respectivos picos).

A **Figura II. 20** ilustra o diagrama de cores da análise GC x GC / qMS da matriz de tomate enriquecida com os agrotóxicos (concentração final de 200 ng g^{-1}), após LLE. Satisfatória distribuição dos picos no plano de separação é observada, demonstrando a grande capacidade de picos da técnica, porém, sem evidente formação de bandas

(“clusters”) de compostos que dividem as mesmas características físico-químicas entre si. Destaca-se a excelente resolução adquirida para a separação dos isômeros dos agrotóxicos bioaletrina e fenvalerato, sendo que este último já havia sido separado em análise 1D-GC.

Figura II. 20. Diagrama de cores da análise GC x GC / qMS da matriz de tomate enriquecida com os agrotóxicos (concentração final de 200 ng g^{-1}) após LLE. Condições de análise e extração estão apresentadas nas seções II.4.4, II.4.5, II.4.6 e Tabela II.3.

A **Tabela II. 3** mostra os tempos de retenção dos 39 resíduos de agrotóxicos em ambas dimensões nas análises de amostra de tomate por GC x GC, bem como os íons selecionados para quantificação (o íon de maior intensidade) e para confirmação (dois íons para análise qualitativa) para detecção por MS. De acordo com a tabela, o tempo total de análise foi de 39 minutos, gerando plano de separação 2D onde os picos dos agrotóxicos distribuem-se em intervalo de aproximadamente 26 minutos relativos à 1D.

Tabela II. 3

Tempos de retenção em 1D e 2D e íons selecionados para cada agrotóxico em análise GC x GC/qMS em amostra de tomate

Agrotóxico	MM	t _{R1} (1D – min)	t _{R2} (2D – seg)	Íons selecionados * (m/z)
Forato	260	12,838	1,165	75 / 97,121
HCB	284	13,493	0,506	284 / 249,142
Carbofuran	221	13,858	2,430	164 / 122,149
Dimetoato	229	13,945	3,741	87 / 93,125
Quintozen	295	14,499	0,861	237 / 214,295
Terbufos	288	14,637	1,114	57 / 103,231
Lindane	290	14,702	1,063	109 / 111,219
Disulfoton	274	15,373	1,316	88 / 60,142
Etrinfos	292	15,574	1,367	181 / 292,153
Prometrina	241	17,845	1,570	184 / 58,241
Heptacoloro	373	17,895	0,658	100 / 65,272
Paraoxon	275	18,127	2,481	109 / 81,149
Fenitrotona	277	18,545	3,787	125 / 109,277
Malationa	330	18,813	3,696	127 / 93,173
Parationa	291	19,562	0,658	109 / 97,291
Fentiona	278	19,389	2,278	278 / 109,125
Aldrin	364	19,603	3,190	66 / 91,263
Bioaletrin I	302	21,045	1,960	123 / 79,136
Bioaletrin II	302	21,245	1,620	123 / 79,136
Endosulfan	406	23,036	1,114	195 / 159,241
p,p-DDE	318	23,835	1,013	246 / 318,176
Oxifluorfen	361	24,002	3,038	252 / 300,361
Miclobutanil	288	24,111	1,570	179 / 82,150
o,p-DDD	320	24,241	1,367	235 / 165,199
Dieldrin	380	24,306	1,316	79 / 108,263
Ciproconazol	291	24,932	2,886	222 / 83,139
Clorobenzilato	325	25,317	1,975	139 / 251,111
Etiona	384	25,655	2,127	231 / 97,153
p,p-DDD	320	25,846	1,671	235 / 165,199
2,4-DDT	354	25,903	1,114	235 / 165,199
Carbofenotiona	342	26,915	1,873	157 / 97,121
4,4-DDT	354	27,507	1,367	235 / 165,199
Propargite	350	28,048	1,823	135 / 81,173
Epoxiconazol	329	29,227	1,119	192 / 138,165
Fenpropatrin	349	29,920	2,127	97 / 55,181
Dicofol	370	30,565	0,810	139 / 111,250
λ-Cialotrina	449	31,792	2,481	181 / 197,208
Fenvalerate I	419	38,006	3,342	125 / 167,225
Fenvalerate II	419	38,545	3,797	125 / 167,225

* íon selecionado para quantificação / íons selecionados para confirmação (seleção baseada em injeções de soluções padrão de cada agrotóxico no sistema GC/qMS;

MM: massa molecular

t_R: tempos de retenção (1D – primeira dimensão, 2D – segunda dimensão).

Após análise GC x GC, a inspeção cuidadosa dos formatos dos picos gerados no diagrama de cores deve ser realizada a fim de se compreender melhor os efeitos causados pela baixa resolução adquirida em 1D-GC na análise bidimensional.

Como a coluna 1D possui dimensões convencionais e a coluna 2D empregada possui dimensões reduzidas (comprimento, diâmetro e espessura do filme), efeitos de saturação da fase estacionária (“overloading”) ocorridos na primeira dimensão geralmente acarretam em problema similar na separação na segunda dimensão [34]. Este fenômeno pode explicar o formato do pico evidenciado na Região A, delimitado pelo tracejo em verde do diagrama de cores (**Figura II. 20**). Neste caso, o perfil do pico em 2D (cromatograma bruto 2D), apresentando caudas, segue o original em 1D, como ilustrado na **Figura II. 21**, promovendo aumento do tempo de retenção na segunda dimensão ($w_b \approx 2$ seg). Contudo, a separação entre os interferentes presentes no pico sobrecarregado (no caso, os ácidos esteárico e ascórbico, representados por asteriscos vermelhos) e o agrotóxico malationa, não evidenciada na análise 1D-GC, foi satisfatoriamente alcançada no plano de separação 2D, facilitando a identificação e quantificação deste agrotóxico.

Figura II. 21. Frações dos cromatogramas 1D-GC (esquerda) e bruto 2D (direita) ilustrando efeito de saturação e formação de picos com caudas em ambas dimensões. Os asteriscos vermelhos indicam os picos de compostos interferentes.

Outro efeito causado pelo elevado tempo de retenção na segunda dimensão, conhecido como pico fora do ciclo (“wrap-around”), onde um determinado composto apresenta um tempo de retenção na segunda coluna superior ao P_M , e, portanto, este é representado na forma de dois picos distintos em dois ciclos sucessivos de modulação, pode ser evidenciado para outro composto interferente (não caracterizado) na Região B, delimitada pelo tracejo em amarelo do diagrama de cores da **Figura II. 20**. A parte restante associada ao pico deste interferente é visualizada como uma pequena mancha na parte superior do diagrama em questão, em tempo de retenção equivalente ao da 1D. Tal efeito, que pode comprometer a análise dos picos dos compostos de interesse, não foi verificado para os analitos. Apesar do elevado tempo de retenção em 2D para o agrotóxico paraoxon (**Figura II. 20**, próximo à Região A), em razão da alta afinidade desse com a fase estacionária 2D, o pico relacionado à este analito situou-se em região central do diagrama de cores, não sendo evidenciado como pico fora de ciclo.

Em casos onde estes picos (fora do ciclo) coeluem com os composto de interesse, Brinkman *et al.* [84] sugerem o uso de um forno secundário, mantendo a temperatura da segunda coluna maior que a temperatura do forno principal, realizando um “ajuste fino” da separação, minimizando o efeito de picos fora de ciclo.

Ainda sobre o diagrama de cores da **Figura II. 20** nota-se na Região C, delimitada pelo tracejo em vermelho, a presença de picos de grande intensidade provenientes da matriz de tomate. Trata-se de compostos de alta massa molecular e baixa polaridade e, por isso, localizam-se na parte inferior direita do plano de separação, distante daquela onde estão presentes os agrotóxicos estudados. Por meio de busca de similaridade em biblioteca de espectros de massas (NIST05), foi possível identificar alguns destes compostos, como por exemplo, o esterol de origem vegetal stigmasterol ($C_{31}H_{50}O_2$ – 96% de similaridade) e o α -tocoferol (ou Vitamina E, $C_{35}H_{60}O_7$ – 93% de similaridade).

Apesar da parcial coeluição entre os agrotóxicos terbufós e lindane, evidenciada no referido diagrama de cores, a análise quantitativa não foi prejudicada, já que a integração foi realizada gerando-se cromatogramas de íons extraídos (“extracted ion chromatogram”) para cada agrotóxico (neste exemplo, íon $m/z = 57$ para terbufos e $m/z = 109$ para lindane). A **Figura II. 22** ilustra a aparente insatisfatória resolução apresentada pelos referidos agrotóxicos no plano 2D (**Figura II. 22-A**), bem como seus respectivos cromatogramas de íons extraídos (**Figura II. 22-B**) e espectros de massas adquiridos experimentalmente (**Figura II. 22-C**), comprovando a identificação (similaridades de 97% para terbufós e 96% para lindane, em livraria de espectros de agrotóxicos construída no laboratório) e possibilitando posterior quantificação dos mesmos.

Nos casos onde a identificação dos analitos é comprometida em análises de matrizes extremamente complexas, outra ferramenta, senão a seleção de íons de confirmação, pode ser utilizada. Como em GC x GC a retenção é caracterizada por dois valores independentes – t_{R1} e t_{R2} –, alguns autores têm sugerido o uso de mapas de retenção [85] ou índices de retenção para a segunda dimensão [86] (semelhantes àqueles utilizados em 1D-GC), aceitos universalmente para a identificação dos analitos, quando as separações são realizadas usando programa linear de temperatura.

Figura II. 22. (A) Fração do diagrama de cores ilustrando parcial coeluição entre os agrotóxicos terbufós e lindane, (B) Frações dos cromatogramas de íon extraído ($m/z = 57$ para terbufós e $m/z = 109$ para lindane) e (C) Espectros experimentais (1 e 2) e da biblioteca (3 e 4) para terbufós e lindane.

Como descrito anteriormente, na introdução deste capítulo, o uso de detectores com alta velocidade de aquisição de dados é primordial para a definição (ou construção)

dos picos modulados gerados em GC x GC (com w_b variando entre 50 e 600 ms). Apesar dos detectores espectrométricos do tipo ToF-MS serem os mais utilizados para este fim, seu alto custo e a geração de arquivos de dados extremamente grandes, em razão da alta frequência de aquisição (> 100 Hz), torna a popularização desse sistema de detecção morosa.

A velocidade de aquisição destes detectores influencia diretamente na capacidade de construção dos picos modulados em GC x GC. Mesmo assim, parece não haver ainda um consenso geral quanto ao número de pontos necessários para satisfatória precisão na reconstrução destes picos. Por exemplo, enquanto Hinshaw [87] propõe a construção dos picos modulados com um número de 10 pontos por pico, Dyson [88] conclui que são mandatórios entre 15 – 20 pontos por pico para garantir eficiente quantificação dos analitos. Já Adahchour *et al.* [58], avaliando a eficiência de detectores de massas quadrupolares em análises GC x GC, afirmou que apenas 7 pontos por pico são necessários para a reconstrução precisa e exata dos picos modulados.

Em estudo recente, Purcaro *et al.* [89], demonstraram que o uso de um novo equipamento qMS com aquisição ultra-rápida (“very fast scanning - qMS”), operando com velocidade de varredura de 20.000 amu/s no modo “full scan” (40 – 300 m/z), foi capaz de gerar 50 espectros/s, promovendo a construção dos picos modulados com mais de 15 pontos/pico, para análises quantitativas de alérgenos em perfume. Como sendo um dos primeiros estudos da literatura aplicando a espectrometria de massas com analisador quadrupolo para análises quantitativas, o grupo comprova o recente interesse e viabilidade do uso desse equipamento para futuras aplicações em GC x GC.

Em nosso trabalho, com o uso de detector qMS com escaneamento rápido e ionização por elétron, operando no modo “full scan” com velocidade de varredura de 10.000 amu/s entre 50 - 460 m/z e frequência de aquisição de 20 Hz (“event time” = 0,05 s), ou seja, gerando-se 20 espectros por segundo, foi possível a construção dos picos

modulados, de w_b médio de 420 ms, com aproximadamente 8 à 9 pontos por pico. Este valor, calculado teoricamente multiplicando-se w_b pela frequência de aquisição e comprovado experimentalmente (exemplificado pelo pico do agrotóxico propargite, **Figura II. 23**), pode ser considerado satisfatório baseado nos resultados de precisão (média das áreas dos picos) alcançados para os agrotóxicos analisados, como será apresentado na próxima seção.

Figura II. 23. Fração do cromatograma bruto 2D ilustrando a construção do pico modulado de maior intensidade do agrotóxico propargite com 9 pontos por pico.

Para processo de quantificação, a geração de cromatogramas de íons extraídos para cada agrotóxico foi preferida frente à análise no modo SIM (“single ion monitoring” ou “monitoramento seletivo de íons”), no qual apenas alguns íons são selecionados para a gerar o cromatograma durante a análise, com intuito de aumentar não somente a sensibilidade e seletividade da análise, mas também a razão sinal/ruído. Esta seleção deve-se ao fato de que o emprego de 29 íons de fragmentos utilizados (Tabela II. 3), nesta etapa, acarretou em considerável perda na velocidade de aquisição do detector. Enquanto que no modo “full scan” (com posterior análise por meio dos cromatogramas de íons extraídos), o analisador quadrupolar utilizado foi capaz de obter 20 espectros por segundo

(20 Hz), no modo SIM, essa frequência cai para 3,3 espectros por segundo (3,3 Hz), comprometendo de forma significativa a construção dos picos modulados.

II. 5. 5. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO GC x GC / qMS

Alguns parâmetros de validação analítica para o método GC x GC / qMS foram avaliados para a minimização de erros, no sentido de assegurar a máxima qualidade do trabalho analítico e, conseqüentemente, a obtenção de resultados laboratoriais confiáveis. A seletividade demonstra a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto na presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Nas análises de agrotóxicos em amostras de tomate não foram observadas interferências significativas (componentes da matriz) nos tempos de retenção dos analitos para o plano de separação 2D.

As curvas analíticas do método GC x GC / qMS foram realizadas com amostras de tomate (branco de referência) enriquecidas com as soluções padrão dos agrotóxicos em concentrações que incluem os valores de LMR estabelecidos pela Anvisa e *Codex Alimentarius* (**Tabela II. 2**, de 50 a 3000 ng g⁻¹ [9, 12]). A linearidade, correspondente ao intervalo de concentração, onde os resultados obtidos são diretamente proporcionais às concentrações dos analitos na amostra, foi avaliada através da curva analítica construída utilizando regressão linear, em uma faixa de concentração de 25 a 1000 ng g⁻¹ (25, 100, 200, 500, 1000 ng g⁻¹), realizada em triplicata. Este intervalo foi linear, com coeficientes de regressão linear (*R*) maior que 0,9826 (**Tabela II. 4**). Nota-se que a faixa linear alcançada contempla os valores de LMR para os agrotóxicos avaliados. Para as análises dos agrotóxicos etiona, propargite e malationa, os quais apresentam LMR superior a

1000 ng g⁻¹ (limite máximo de quantificação), os extratos LLE obtidos deverão ser diluídos, para contemplar a faixa linear do método proposto.

Os limites de detecção (LDs – de 1,3 a 6,3 ng g⁻¹) e de quantificação (LQs – de 3,4 a 14,3 ng g⁻¹) foram determinados, através da curva analítica, como sendo as concentrações correspondentes a 3 e 10 vezes o ruído da linha de base, respectivamente (**Tabela II.4**). Quando comparado aos métodos clássicos 1D-GC/MS, o método desenvolvido apresentou menores valores de LQ e faixa linear mais ampla, evidenciando o ganho de detectabilidade da técnica GC x GC. Em seus respectivos estudos, utilizando SPE como técnica de preparo de amostras, Yang *et al.* [25] e Satpathy *et al.* [26], apresentaram valores de linearidade em níveis de concentrações variando entre 25 – 500 ng g⁻¹ e LQs entre 20 – 150 ng g⁻¹, para análise multirresíduos de agrotóxicos, semelhante aos estudados neste trabalho, em matrizes alimentícias, como frutas e vegetais.

O método desenvolvido apresentou adequada exatidão, com valores na faixa entre 84% e 117%, calculada para dois níveis de concentração, baixo (25 ng g⁻¹) e alto (500 ng g⁻¹), com coeficientes de variação menores que 14% (precisão interensaios). Valores de recuperação, variando entre 64 e 104%, foram determinados comparando-se as áreas dos picos dos agrotóxicos na análise após extração, com as áreas dos picos das injeções diretas dos padrões dos agrotóxicos na mesma concentração (25 ng g⁻¹), **Tabela II. 5**.

Deste modo, mesmo mantendo-se incontestável a validade do uso do detector ToF-MS para busca de precisão e exatidão em análises quantitativas, os resultados mostrados neste trabalho, comprovam que o uso de detector do tipo qMS (com escaneamento rápido – 20 Hz) para sistemas GC x GC, associado muitas vezes à aplicação unicamente para fins qualitativos, pode ser promissora opção nas análises onde etapa de quantificação é requerida.

Tabela II. 4

Regressão linear e valores de LQ e LD para o método GC x GC / qMS desenvolvido

Agrotóxico	Regressão linear (Faixa linear: 25 – 1000 ng g ⁻¹)			LD (ng g ⁻¹)	LQ (ng g ⁻¹)
	Inclinação (x10 ⁵)	Intercepto (x 10 ⁶)	R		
Forato	0,63111	2,012089	0,9949	2,5	6,7
HCB	0,13161	0,867101	0,9945	3,2	7,3
Carbofuran	0,32608	1,133817	0,9826	3,6	10,0
Dimetoato	0,56458	0,880176	0,9982	3,0	8,8
Quintozen	0,04526	0,361067	0,9935	3,0	8,9
Terbufós	0,42397	3,719091	0,9845	2,2	7,3
Lindane	0,06392	0,314823	0,9960	1,8	6,0
Disulfoton	0,37956	4,501380	0,9860	1,5	4,3
Etrinfos	0,19764	2,481811	0,9879	1,7	3,9
Prometrina	0,14951	0,930009	0,9982	4,4	12,7
Heptacloro	0,16460	0,195980	0,9920	3,3	9,7
Paraoxon	0,55398	2,150252	0,9976	2,7	6,0
Fenitrothion	0,17519	0,965869	0,9924	2,8	9,3
Malationa	0,15611	1,109489	0,9837	1,3	3,4
Parationa	0,19005	0,800374	0,9962	2,6	7,7
Fentiona	0,27008	1,721802	0,9948	2,3	5,3
Aldrin	0,14471	0,769245	0,9962	2,9	9,7
Bioaletrina I	0,15619	0,127245	0,9888	4,2	10,3
Bioaletrina II	0,39650	2,489683	0,9924	3,1	8,8
Endosulfan	0,01234	0,076404	0,9917	3,7	9,3
p,p-DDE	0,29815	0,812377	0,9973	2,1	5,0
Oxifluorfen	0,13474	0,641027	0,9929	2,5	8,3
Miclobutanil	0,17923	- 0,004878	0,9964	1,8	4,7
o,p-DDD	0,17465	0,616685	0,9982	2,5	8,3
Dieldrin	0,19471	0,490553	0,9982	4,8	10,0
Ciproconazol	0,26955	- 0,132291	0,9897	4,6	13,3
Clorobenzilato	0,46557	2,857108	0,9919	3,3	7,3
Etiona	0,32265	0,778993	0,9901	2,1	7,0
p,p-DDD	0,30365	0,426964	0,9894	2,1	7,0
2,4-DDT	0,16212	0,364819	0,9917	3,2	10,7
Carbofenotiona	0,22023	0,915986	0,9879	3,0	10,0
4,4-DDT	0,15455	0,319561	0,9943	4,3	11,0
Propargite	0,30189	0,974384	0,9894	2,2	7,3
Fenpropatrin	0,24026	1,136653	0,9884	3,6	10,0
Dicofol	0,03600	0,136856	0,9983	6,3	14,3
λ-Cialotrina	0,14407	0,242771	0,9972	5,1	13,7
Epoxiconazol	0,16027	0,154006	0,9972	5,4	11,7
Fenvalerate I	0,19738	0,282611	0,9983	3,9	10,7
Fenvalerate II	0,19385	0,244356	0,9966	2,6	8,7

R: coeficiente de regressão linear; LQ: limite de quantificação; LD: limite de detecção.

Tabela II. 5

Valores de exatidão, precisão e recuperação para o método GC x GC / qMS desenvolvido*

Agrotóxico	Concentração média determinada (ng g ⁻¹)		Exatidão (%)		CV (%)		Recuperação (%) (25 ng g ⁻¹)
	25 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹	25 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹	25 ng g ⁻¹	500 ng g ⁻¹	
Forato	22,0	503	88	101	4,7	2,5	84
HCB	25,9	513	104	103	4,6	2,3	91
Carbofuran	24,2	545	97	109	7,1	4,0	90
Dimetoato	23,1	519	92	104	7,6	6,3	94
Quintozen	28,1	512	113	102	1,3	2,7	84
Terbufós	26,8	501	107	100	3,4	2,5	81
Lindane	22,4	510	89	102	2,6	3,7	67
Disulfoton	26,6	519	106	104	13,2	5,7	101
Etrinfos	26,2	501	105	100	4,9	4,0	71
Prometrina	23,4	515	94	103	13,9	10,2	74
Heptacloro	21,7	492	87	98	4,4	4,5	82
Paraoxon	21,9	510	88	102	9,4	6,4	79
Fenitrothion	24,8	517	99	103	8,4	2,8	72
Malationa	26,2	557	105	111	8,1	3,4	64
Parationa	22,2	528	89	106	1,6	3,7	87
Fentiona	21,1	493	84	99	4,2	3,4	97
Aldrin	24,5	509	98	102	5,8	1,7	104
Bioaletrina I	21,4	517	86	103	6,3	3,3	97
Bioaletrina II	28,9	527	116	105	8,5	1,4	90
Endosulfan	21,2	533	85	107	4,2	4,5	69
p,p-DDE	22,4	470	90	94	8,8	4,8	78
Oxifluorfen	25,7	519	103	104	11,2	5,8	73
Miclobutanil	29,1	533	117	107	3,9	6,5	86
o,p-DDD	23,9	520	96	104	6,3	3,6	101
Dieldrin	24,1	503	96	101	1,0	2,4	76
Ciproconazol	28,6	501	114	100	4,2	3,2	65
Clorobenzilato	26,6	505	106	101	2,5	5,4	102
Etiona	27,3	517	109	103	3,7	6,3	91
p,p-DDD	24,3	487	97	97	13,8	8,8	84
2,4-DDT	28,8	547	115	109	11,5	2,1	80
Carbofenotona	25,8	495	103	99	9,1	6,0	75
4,4-DDT	29,6	537	118	107	11,0	7,9	82
Propargite	26,3	504	105	101	2,6	3,5	80
Fenpropatrin	22,9	517	92	103	11,6	8,0	89
Dicofol	24,2	519	97	104	3,5	5,2	68
λ-Cialotrina	27,7	530	111	106	14,0	11,6	86
Epoxiconazol	28,4	530	114	106	12,5	7,8	70
Fenvalerate I	22,8	523	91	105	2,9	1,3	92
Fenvalerate II	21,1	533	84	107	2,4	1,2	95

* Ensaios realizados em triplicatas; CV : coeficiente de variação.

II. 5. 6. APLICAÇÃO DO MÉTODO GC x GC / qMS

O método GCxGC / qMS proposto foi aplicado para análise residual de agrotóxicos em dez diferentes amostras desconhecidas comerciais de tomates frescos, cultivados de acordo com procedimentos convencionais de agricultura. Tais amostras foram preparadas como descrito anteriormente, na seção II. 4. 4., porém, sem a adição das soluções padrão dos agrotóxicos. A **Figura II. 24** ilustra o diagrama de cores para uma dessas análises, onde é possível verificar apenas a presença dos picos referentes aos componentes endógenos e/ou resíduos de impurezas da matriz de tomate. Nenhum resíduo de agrotóxico avaliado neste trabalho, em concentrações na faixa entre o LD e 1000 ng g⁻¹ foi detectado nestas amostras.

Figura II. 24. Diagrama de cores representativo da análise GC x GC / qMS, após LLE, de amostra de tomate fresco adquirida no comércio. Condições de análise e extração estão apresentadas nas seções II.4.4, II.4.5, II.4.6 e Tabela II.3.

II. 6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados para este trabalho mostram claramente que a técnica de cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas com analisador quadrupolo com escaneamento rápido (GC x GC / qMS) pode ser aplicada para análises de multirresíduos de agrotóxicos para fins de controle de qualidade em amostras de tomate, e possivelmente, por meio de pequenas modificações no preparo de amostra, estendida às análises de outras matrizes alimentícias para o mesmo fim.

O uso de técnica simples e barata de preparo de amostra, extração líquido-líquido, com baixo consumo de solvente orgânico (acetato de etila), promoveu eficiente processo de extração dos resíduos de agrotóxicos da matriz de tomate. Apesar da baixa seletividade durante o processo de extração, a interferência dos compostos endógenos da matriz foi banalizada pela alta resolução cromatográfica da técnica GC x GC, comprovada pelo plano de separação (diagrama de cores) adquirido.

Por meio do sistema de modulação criogênica de jato duplo em “loop”, e pré-otimização do sistema 1D-GC, a focagem e reinjeção dos analitos à coluna 2D promoveu de 2 a 3 modulações por pico, resultando em significativo estreitamento da largura da base desses picos modulados, construídos com aproximadamente 8 – 9 pontos por pico, e, portanto, incremento de detectabilidade da ordem de 10 vezes, quando comparados à análise monodimensional convencional.

Os parâmetros de validação analítica comprovaram a precisão e exatidão das análises quantitativas, com baixos limites de quantificação e ampla faixa de linearidade, o que possibilita a análise dos resíduos dos 37 agrotóxicos estudados neste trabalho em níveis de concentrações que contemplam os limites máximos de resíduos de agrotóxicos para a cultura de tomate, estabelecidas pela ANVISA e pelo *Codex Alimentarius*.

II. 7. REFERÊNCIAS

- [1] *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)*. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 19/03/2011.
- [2] *Estatísticas do Meio Rural 2008/Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos (DIEESE)*. Disponível em: <<http://www.dieese.org.br>>. Acesso em: 21/03/2011.
- [3] *Agenda Propositiva da Agropecuária/Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA)*. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 19/03/2011.
- [4] *Sistema Integrado de Legislação/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)*. Decreto 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 jan. 2002.
- [5] FILHO, J. P. A., *Uso de agrotóxicos no Brasil controle social e interesses corporativos*. Annablume, SP. 188 p., 2002.
- [6] LIMA, P. J. P.. *Possíveis doenças físicas e mentais relacionadas ao manuseio de agrotóxicos em atividades rurais, na região de Atibaia, SP/Brasil*. 2008. 158 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- [7] *Sistema Integrado de Legislação/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)*. Decreto 5.981, de 06 de dezembro de 2006. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 07 dez. 2006.
- [8] *Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, (Sindag)*. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em 22/03/2011.
- [9] *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Agrotóxicos e Toxicologia, Monografias de Agrotóxicos*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 22/03/2011.
- [10] *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Agrotóxicos e Toxicologia – Reavaliação de Produtos Agrotóxicos*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 23/03/2011.
- [11] *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Agrotóxicos e Toxicologia - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 23/03/2011.
- [12] *Codex Alimentarius, Pesticides Residues in Food and Feed*. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net>>. Acesso em: 24/03/2011.

- [13] RISSATO, S. R., LIBÂNIO, M., GIAFFERIS, G. P., GERENUTTI, M., Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). **Quím. Nova** 27 (2004) 739.
- [14] COSTA, F. L. F., ROHLFS, D. B. *Resíduos de agrotóxicos em alimentos: implicações para saúde pública e meio ambiente*. PUC – Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Programa de Pós-Graduação em Biociências Forenses. Disponível em: <<http://www.cpgls.ucg.br/ArquivosUpload/1/File/Saude/52.pdf>>. Acesso em: 15/03/2011.
- [15] EDWARDS, J. W., LEE, S., HEATH, L. M., PISANIELLO, D. Worker exposure and a risk assessment of Malathion and Fenthion used in the control of Mediterranean fruit fly in South Australia. **Environmental Research** 103 (2007) 38.
- [16] FUNASA. *Fundação Nacional de Saúde. Brasil. Ministério da Saúde. Controle de Vetores: Procedimentos de Segurança*. Brasília, DF, 1ª edição, 208 p. 2001.
- [17] WANG, C., WU, Q., WU, C., WANG, Z., Application of dispersion–solidification liquid–liquid microextraction for the determination of triazole fungicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography. **J. Hazardous Materials** 185 (2011) 71.
- [18] BEYER, A., BIZIUK, M., Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. **Food Chemistry** 108 (2008) 669.
- [19] KOLBERG, D. I., PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., ZANELLA, R., Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS. **Food Chemistry**, 125 (2011) 1436.
- [20] HERCEGOVÁ, A., DÖMÖTÖROVÁ, M., MATISOVÁ, E., Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **J. Chromatogr. A**, 1153 (2007) 54.
- [21] PINHO, G. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., SILVÉRIO, F. O., Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, 21 (2010) 1307.
- [22] RISSATO, S. R., GALHIANE, M. S., ALMEIDA, M. V., GERENUTTI, M., APON, B. M., Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry and application in environmental contamination. **Food Chemistry**, 101 (2007) 1719.

- [23] AHMED, F. E., Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. **Trends in Analytical Chemistry**, 20 (2001) 649.
- [24] CHEN, J., DUAN, C., GUAN, Y., Sorptive extraction techniques in sample preparation for organophosphorus pesticides in complex matrices. **J. Chromatogr. B**, 878 (2010) 1216.
- [25] YANG, X., ZANG, H., LIU, Y., WANG, J., ZHANG, Y. C., DONG, A. J., ZHAO, H. T., SUN, C. H., CUI, J., Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC–MS. **Food Chemistry**, 127 (2011) 855.
- [26] SATPATHY, G., KUMAR, Y. T., GUPTA, R. K., A novel optimised and validated method for analysis of multi-residues of pesticides in fruits and vegetables by microwave-assisted extraction (MAE)–dispersive solid-phase extraction (d-SPE)–retention time locked (RTL)–gas chromatography–mass spectrometry with Deconvolution reporting software (DRS). **Food Chemistry**, 127 (2011) 1300.
- [27] RODRIGUES, F. M., MESQUITA, P. R. R., OLIVEIRA, L. S., OLIVEIRA, F. S., FILHO, A. M., PEREIRA, P. A. P., ANDRADE, J. B., Development of a headspace solid-phase microextraction/gas chromatography–mass spectrometry method for determination of organophosphorus pesticide residues in cow milk. **Microchemical Journal**, 98 (2011) 56.
- [28] PATIL, S. H., BANERJEE, K., DASGUPTA, S., OULKAR, D. P., PATIL, S. B., JADHAV, M. R., SAVANT, R. H., ADSULE, P. G., DESHMUKH, M. B., Multiresidue analysis of 83 pesticides and 12 dioxin-like polychlorinated biphenyls in wine by gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1216 (2009) 2307.
- [29] PEDROSO, M. P., GODOY, L. A. F., FIDÉLIS, C. H. V., FERREIRA, E. C., POPPI, R. J., AUGUSTO, F., Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC x GC). **Quim. Nova**, 32 (2009) 421.
- [30] ZROSTLÍKOVÁ, J., HAJŠLOVÁ, J., CAJKA, T., Evaluation of two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in fruit. **J. Chromatogr. A**, 1019 (2003) 173.
- [31] CONSDEN, R., GORDON, A. H., MARTIN, A. J. P., Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. **Biochem. J.**, 38 (1944) 224.

- [32] BERTSCH, W., Two-Dimensional Gas Chromatography. Concepts, Instrumentation, and Applications – Part 1: Fundamentals, Conventional Two-Dimensional Gas Chromatography, Selected Applications. **J. High Res. Chromatogr.** 22 (1999) 647.
- [33] LIU, Z.Y., PHILLIPS, J. B., Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography using an On-Column Thermal Modulator Interface. **J. Chrom. Science** 29 (1991) 227.
- [34] BEENS, J., Comprehensive two-dimensional gas chromatography - The state-of-separation-arts, Chromedia® – Chromatography Knowledge Base – Online Book, 2009.
- [35] SHOENMAKERS, P., MARRIOT, P., BEENS, J., Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography. **LC–GC Eur.** 16 (2003) 335.
- [36] ADAHCHOUR, M., BEENS, J., VREULS, R. J. J., BRINKMAN, U. A., Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC): I. Introduction and instrumental set-up. **Trends in Analytical Chemistry**, 25 (2006) 438.
- [37] ADAHCHOUR, M., BEENS, J., VREULS, R. J. J., BRINKMAN, U. A., Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC): II. Modulation and detection. **Trends in Analytical Chemistry**, 25 (2006) 540
- [38] ADAHCHOUR, M., BEENS, J., VREULS, R. J. J., BRINKMAN, U. A., Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC): III. Applications for petrochemicals and organohalogenes. **Trends in Analytical Chemistry**, 25 (2006) 726.
- [39] BLOMBERG, J., SHOENMAKERS, P. J., BEENS, J., TIJSSEN, R., Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) and its applicability to the characterization of complex (petrochemical) mixtures. **J. High Resolut. Chromatogr.** 20 (1997) 539.
- [40] PHILLIPS, J. B., BEENS, J., Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between the two dimensions. **J. Chromatogr. A**, 856 (1999) 331.
- [41] MURPHY, R. E., SCHURE, M. R., FOLEY, J. P., Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography. **Anal. Chem.** 70 (1998) 1585.
- [42] TRANCHIDA, P. Q., DUGO, P., DUGO, G., MONDELLO, L., Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis. **J. Chromatogr. A**, 1054 (2004) 3–16

- [43] BRUCKNER, C. A., PRAZEN, B. J., SYNOVEC, R. E., Comprehensive Two-Dimensional High-Speed Gas Chromatography with Chemometric Analysis. **Anal. Chem.** **1998**, 70, 2796.
- [44] PHILLIPS, J. B., GAINES, R. B., BLOMBERG, J., VAN DER WIELEN, F. W. M., DIMANDJA, J. M., GREEN, V., GRANGER, J., PATTERSON, D., RACOVALIS, L., DE GEUS, H. J., DE BOER, J., HAGLUND, P., LIPSKY, J., SINHA, V., LEDFORD, E. B. A., A Robust Thermal Modulator for Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. **J. High Resol. Chromatogr.**, 22 (1999) 3.
- [45] KINGHORN, R. M., MARRIOTT, P. J., High Speed Cryogenic Modulation – A Technology Enabling Comprehensive Multidimensional Gas Chromatography. **J. High Resol. Chromatogr.**, 22 (1999) 235.
- [46] MARRIOTT, P. J., KINGHORN, R.M., ONG, R., MORRISON, P., HAGLUND, P., HARJU, M., Comparison of Thermal Sweeper and Cryogenic Modulator Technology for Comprehensive Gas Chromatography. **J. High Resolut. Chromatogr.**, 23 (2000) 253.
- [47] BEENS, J., ADAHCHOUR, M., VREULS, R. J. J., VAN ALTENA, K., BRINKMAN, U. A. Th., Simple, non-moving modulation interface for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, 919 (2001) 127.
- [48] KALLIO, M., KIVILOMPOLO, M., VARJO, S., JUSSILA, M., HYOTYLAINEN, T., Data analysis programs for comprehensive two-dimensional chromatography. **J. Chromatogr. A**, 1216 (2009) 2923.
- [49] BEENS, J., BOELEN, H., TIJSSEN, R., BLOMBERG, J., Quantitative Aspects of Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography (GCxGC). **J. High Resol. Chromatogr.** 21 (1998) 47.
- [50] AMORIM, L. C. A., DIMANDJA, J. M., CARDEAL, Z. L., Analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography with a flame ionization detector. **J. Chromatogr. A**, 1216 (2009) 2900.
- [51] WEGHE, H. V. D., VANERMEN, G., GEMOETS, J., LOOKMAN, R., BERTELS, D., Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography for the assessment of oil contaminated soils. **J. Chromatogr. A**, 1137 (2006) 91.
- [52] KRISTENSON, E. M., KORYTÁR, P., DANIELSSON, C., KALLIO, M., BRANDT, M., MÄKELÄ, J., VREULS, R. J. J., BEENS, J., BRINKMAN, U. A. Th., Evaluation of modulators and electron-capture detectors for comprehensive two-dimensional GC of halogenated organic compounds. **J. Chromatogr. A**, 1019 (2003) 65.

- [53] HUA, R., WANG, J., KONG, H., LIU, J., LU, X., XU, G., Analysis of sulfur-containing compounds in crude oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography with sulfur chemiluminescence detection. **J. Sep. Sci.** 27 (2004) 691.
- [54] RYAN, D., MARRIOTT, P., Studies on thermionic ionisation detection in comprehensive two-dimensional gas chromatography. **J. Sep. Sci.**, 29 (2006) 2375.
- [55] DALLUGE, J., BEENS, J., BRINKMAN, U. A. T., Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. **J. Chromatogr. A**, 1000 (2003) 69.
- [56] VAN DER MEER, J. A., TRAP, H. C., NOORT, D., VAN DER SCHANS, M. J., Comprehensive gas chromatography with Time of Flight MS and large volume introduction for the detection of fluoride-induced regenerated nerve agent in biological samples. **J. Chromatogr. B**, 878 (2010) 1320.
- [57] VAN DER LEE, M., VAN DER WEG, G., TRAAG, W. A., MOL, H. G. J., Qualitative screening and quantitative determination of pesticides and contaminants in animal feed using comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1186 (2008) 325.
- [58] ADAHCHOUR, M., BRANDT, M., BAIER, H. U., VREULS, R. J. J., BATENBURG, A. M., BRINKMAN, U. A. Th., Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a rapid-scanning quadrupole mass spectrometer: principles and applications. **J. Chromatogr. A**, 1067 (2005) 245.
- [59] ADAHCHOUR, M., BEENS, J., BRINKMAN, U. Th., Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, 1186 (2008) 67.
- [60] MUHLEN, C. V., ZINI, C. A., CARAMÃO, E. B., MARRIOTT, P. J., Caracterização de amostras petroquímicas e derivados utilizando cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC). **Quim. Nova**, 29 (2006) 765.
- [61] BLOMBERG, J., SCHOENMAKERS, P. J., BEENS, J., TIJSSEN, R., Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) and its applicability to the characterization of complex (petrochemical) mixtures. **J. High Resol. Chromatogr.** 20 (1997) 539.
- [62] FRYSSINGER, G. S., GAINES, R. B., Forensic Analysis of Ignitable Liquids in Fire Debris by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. **J. Forens. Sci.** 47 (2002) 471.

- [63] FRYSSINGER, G. S., GAINES, R. B., Determination of Oxygenates in Gasoline by GCxGC. **J. High Resolut. Chromatogr.** 23 (2000) 197.
- [64] DIMANDJA, J. M., STANFILL, S. B., GRANGER, J., PATTERSON, D., Application of Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography (GCxGC) to the Qualitative Analysis of Essential Oils. **J. High Resol. Chromatogr.**, 23 (2000) 208.
- [65] DANIELSSON, C., WILBERG, K., KORYTAR, P., BOER, J., HAGLUND, P., Trace analysis of PCD/Fs and WHO-PCBs in food and feed using comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC). **Organohalogen Comp.**, 60 (2003) 395.
- [66] DALLUGE, J., RIJN, M., BEENS, J., VREULS, R. J. J., BRINKMAN, U. A. Th., Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection applied to the determination of pesticides in food extracts. **J. Chromatogr. A**, 965 (2002) 207.
- [67] DASGUPTA, S., BANERJEE, K., PATIL, S. H., GHASTE, M., DHUMAL, K. N., ADSULE, P. G., Optimization of two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for separation and estimation of the residues of 160 pesticides and 25 persistent organic pollutants in grape and wine. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 3881.
- [68] SCHMARR, H. G., BERNHARDT, J., Profiling analysis of volatile compounds from fruits using comprehensive two-dimensional gas chromatography and image processing techniques. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 565.
- [69] CHEONG, K. W., TAN, C. P., MIRHOSSEINI, H., CHIN, S. T., CHE, Y. B., HAMID, M. N. S. A., OSMAN, A., BASRI, M., Optimization of equilibrium headspace analysis of volatile flavor compounds of malaysian soursop (*Annona muricata*): Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS). **Food Chemistry**, 125 (2011) 1481.
- [70] CORDERO, C., BICCHI, C., JOULAIN, D., RUBIOLO, P., Identification, quantitation and method validation for the analysis of suspected allergens in fragrances by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with quadrupole mass spectrometry and with flame ionization detection. **J. Chromatogr. A**, 1150 (2007) 37.
- [71] LEE, A. L., BARTLE, K. D., LEWIS, A. C., A Model of Peak Amplitude Enhancement in Orthogonal Two-Dimensional Gas Chromatography. **Anal. Chem.** 73 (2001) 1330.
- [72] JUNGE, M., HUEGEL, H., MARRIOTT, P. J., Enantiomeric analysis of amino acids by using comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Chirality** 19 (2007) 228.

- [73] WELTHAGEN, W., SHELLIE, R. A., SPRANGER, J., RISTOW, M., ZIMMERMAN, R., FIEHN, O., Comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry (GC × GC-TOF) for high resolution metabolomics: biomarker discovery on spleen tissue extracts of obese NZO compared to lean C57BL/6 mice. **Metabolomics** 1 (2005) 65.
- [74] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Seção 1, p. 56 – 59.
- [75] SHARMA, D., NAGPAL, A., PAKADE, Y. B., KATNORIA, J. K., Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. **Talanta**, 82 (2010) 1077.
- [76] OCHIAI, N., SASAMOTO, K., KANDA, H., NAKAMURA, S., Fast screening of pesticide multiresidues in aqueous samples by dual stir bar sorptive extraction-thermal desorption-low thermal mass gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1130 (2006) 83.
- [77] TRANCHIDA, P. Q., CASILLI, A., DUGO, P., DUGO, G., MONDELLO, L., Generation of Improved Gas Linear Velocities in a Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography System. **Anal. Chem.** 79 (2007) 2266.
- [78] ADAHCHOUR, M., TASOZ, A., BEENS, J., VREULS, R. J. J., BATENBURG, A. M., BRINKMAN, U. A. Th., Fast comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) using 50-µm ID second-dimension columns. **J. Sep. Sci.**, 26 (2003) 753.
- [79] TRANCHIDA, P. Q., PURCARO, G., FANALI, C., DUGO, P., DUGO, G., MONDELLO, L., Optimized use of a 50 µm ID secondary column in comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1217 (2010) 4160.
- [80] BUENO, P. A., SEELEY, J. V., Flow-switching device for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, 1027 (2004) 3.
- [81] MONDELLO, L., CASILLI, A., TRANCHIDA, P. Q., DUGO, P., COSTA, R., FESTA, S., DUGO, G., Comprehensive multidimensional GC for the characterization of roasted coffee beans. **J. Sep. Sci.** 27 (2004) 442.
- [82] SEELEY, J. V., Theoretical study of incomplete sampling of the first dimension in comprehensive two-dimensional chromatography. **J. Chromatogr. A**, 962 (2002) 21.
- [83] KORYTÁR, P., HAGLUND, P., DE BOER, J., BRINKMAN, U.A.Th., Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the analysis of

organohalogenated micro-contaminants, **Trends in Analytical Chemistry**, 25 (2006) 373.

[84] ADAHCHOUR, M., BEENS, J., VREULS, R. J. J., BATENBURG, A. M., BRINKMAN, U. A. Th., Comprehensive two-dimensional gas chromatography of complex samples by using a 'reversed-type' column combination: application to food analysis, **J. Chromatogr. A**, 1054 (2005) 47.

[85] BIERI, S., MARRIOT, P. J., Dual injection system with multiple injections for determining bi-dimensional retention indices in comprehensive two-dimensional gas chromatography, **Anal. Chem.**, 80 (2008) 760.

[86] ZHAO, Y., ZHANG, J., WANG, B., KIM, S., FANG, A., BOGDANOV, B., ZHOU, Z., MACCLAIN, C., ZHANG, X., A method of calculating the second dimension retention index in comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry **J. Chromatogr. A**, "in press" (2011).

[87] HINSHAW, J. V., Handling fast peaks, **LCGC North Am.**, 21 (2003) 268.

[88] DYSON, N., Peak distortion, data sampling errors and the integrator in the measurement of very narrow chromatographic peaks, **J. Chromatogr. A**, 842 (1999) 321.

[89] PURCARO, G., TRANCHIDA, P. Q., RAGONESE, C., CONTE, L., DUGO, P., DUGO, G., MONDELLO, L., Evaluation of a Rapid-Scanning Quadrupole Mass Spectrometer in an Apolar x Ionic-Liquid Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography System, **Anal. Chem.**, 82 (2010) 8583.

ANEXO

CURRÍCULO RESUMIDO

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2001 – 2004: Bacharelado e Licenciatura em Química, FFCLRP/USP

2005 – 2007: Mestrado em Química, FFCLRP/USP

Título: Avaliação da técnica SPME/HPLC na análise de antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

2007 – 2011: Doutorado em Química, FFCLRP/USP

Título: Desenvolvimento de métodos cromatográficos hifenados (in-tube SPME/LC-FLD e GCxGC/qMS) para análises de fármacos e agrotóxicos em amostras complexas.

ESTÁGIO NO EXTERIOR

Facoltà di Farmacia, Università di Messina, Messina, Itália

Período: 03/2010 – 09/2010

Supervisor: Prof.º Dr.º Luigi Mondello

Atividade realizada: Parte do projeto de doutorado (“Doutorado sanduíche”, auxílio financeiro: CNPq) – Determinação de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de tomates por Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada à Espectrometria de Massas (GCxGC/qMS).

AUXÍLIO À PESQUISA

Desenvolvimento de métodos cromatográficos hifenados (“in-tube” SPME/LC-FLD e GCxGC/qMS) para análises de fármacos e agrotóxicos em amostras complexas.

Início: 05/2007 – Término: 06/2011

Agências financiadoras (bolsa de doutorado): Capes (05/2007 – 03/2009)

CNPq (04/2009 – 05/2011)

PUBLICAÇÕES

Artigos publicados

1. Silva, B. J. G., R. H. C., Queiroz, M. E. C. "Simultaneous determination of nontricyclic antidepressants in human plasma by solid-phase microextraction and liquid chromatography (SPME/LC)" – *Journal of Analytical Toxicology* – v. 31, p. 313-320, 2007.
2. Silva, B. J. G., Lanças, F. M., Queiroz, M. E. C. "In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma" – *Journal of Chromatography B*, v. 862, p. 181 – 188, 2008.
3. Silva, B. J. G., Lanças, F. M., Queiroz, M. E. C. "Determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by polypyrrole-coated capillary in-tube spme coupled with liquid chromatography-fluorescence detection" – *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 8590 – 8597, 2009.
4. Chaves, A. R., Silva, B. J. G., Lanças, F. M., Queiroz, M. E. C. "Biocompatible in-tube spme coupled with liquid chromatography-fluorescence detection for determination of interferon α in plasma" – *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 3376 – 3381, 2011.
5. Bueno, J. S., Silva, B. J. G., Queiroz, M. E. C. "Enantioselective Analysis of Fluoxetine and Norfluoxetine in Plasma Samples by Protein Precipitation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection" – *Journal of Brazilian Chemical Society*, , v. 22, n. 7, p. 1221 – 1228, 2011.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS (2007 – 2011)

- **Silva, B. J. G.**, Lanças, F. M., Queiroz, M E. C. In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma. *Tenth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography & Advances in Extraction Techniques (ExTech)*, Janeiro de 2008 – Bruges, Bélgica.
- **Silva, B. J. G.**, Lanças, F. M., Queiroz, M E. C. Polypyrrole-coated capillary in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography for analysis of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers. *XII Congresso Latinoamericano de*

Cromatografia e Ciências Afins (COLACRO), Outubro de 2008 – Florianópolis, SC, Brasil.

- Chaves, A. R., **Silva, B. J. G.**, Queiroz, M. E. C. Microextração em fase sólida aplicada às análises forenses. *I Encontro Nacional de Química Forense (ENQFor)*, Dezembro de 2008 – Ribeirão Preto, SP, Brasil.

- Bueno, J. S., **Silva, B. J. G.**, de Oliveira, A. H. C., Queiroz, M. E. C. Avaliação da técnica de precipitação de proteínas de amostras de plasma na análise enantiosseletiva de fluoxetina e norfluoxetina por cromatografia líquida de alta eficiência.

Chaves, A. R., **Silva, B. J. G.**, Melo, L. P., Lanças, F. M., Queiroz, M. E. C. Otimização das variáveis SBSE/LC-UV nas análises de parabenos em produtos cosméticos. *XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia*, Outubro de 2009 – Belo Horizonte, MG, Brasil.

- Chaves, A. R., **Silva, B. J. G.**, Lanças, F. M. Queiroz, M. E. C. Biocompatible in-tube SPME coupled with LC/FLD for interferon alpha analysis in plasma samples. *International Symposium on Hiphenated Techniques for Sample Preparation (HTSP)*, Janeiro de 2010 – Bruges, Bélgica.

- **Silva, B. J. G.**, Chaves, A. R., Lanças, F. M., Queiroz, M. E. C. In-tube solid phase microextraction capillary coupled to liquid chromatography for determination of drugs in plasma samples. *34th International Symposium on Capillary Chromatography*, Maio de 2010 – Riva Del Garda, Itália.

- **Silva, B. J. G.**, Caris, J. A., Lanchote, V. L., Queiroz, M. E. C. Analysis of Lidocaine and its Metabolite in Plasma Samples of Parturient Women with Gestational Diabetes Mellitus by In-tube Solid Phase Microextraction Coupled to Liquid Chromatography (in-tube SPME/LC). *36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Junho de 2011 – Budapeste, Hungria.

ATIVIDADES EXTRA CURRICULARES

- Participação como debatedor no 15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, Novembro de 2007, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

- Estagiário do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - Departamento de Química, FFCLRP-USP. Disciplina: Métodos Instrumentais, 2º semestre de 2008 sob orientação do Profº Drº José Fernando de Andrade.

- Estagiário do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - Departamento de Química, FFCLRP-USP. Disciplina: Química Analítica Quantitativa, 2º semestre de 2009, sob orientação da Profª Drª Maria Eugênia Queiroz Nassur.