Universidade de São Paulo
FFCLRP - Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Prospecção de novos capilares revestidos internamente com líquidos iônicos para *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC)”

ISRAEL DONIZÉTI DE SOUZA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da 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

2019

ISRAEL DONIZÉTI DE SOUZA

Prospecção de novos capilares revestidos internamente com líquidos iônicos para *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC)

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da 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**

Área de Concentração: Química

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur

Ribeirão Preto - SP

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

Souza, Israel Donizéti de

Prospecção de novos capilares revestidos internamente com líquidos iônicos para *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC)

167 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Nassur, Maria Eugênia Queiroz.

1. Microextração em fase sólida. 2. Líquidos iônicos. 3. *In-tube* SPME. 4. Cromatografia gasosa multidimensional. 4. Fase estacionária. 5. Prata.

Nome: Souza, Israel Donizéti de

Título: Prospecção de novos capilares revestidos internamente com líquidos iônicos para *in-tube*
SPME-UHPLC-MS/MS e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química
da 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, Área: **Química**

Aprovado em 15/08/2019:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur- USP/ FFCLRP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças - USP-São Carlos

Prof. Dr. Leandro Wang Hantao – IQ/UNICAMP-Campinas

Prof. Dr. Eduardo Figueiredo - UNIFAL-Alfenas

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes - USP/ FFCLRP – Ribeirão Preto

Prof. Dra. Andréa Rodrigues Chaves- UFG – Goiás

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, Maria e Ismar, que me ensinaram os valores e os princípios
da vida.**

AGRADECIMENTOS

Sinto-me profundamente satisfeito e feliz pelos frutos colhidos nesse período de dedicação à pós-graduação. Período este que me proporcionou grande crescimento, tanto no âmbito profissional quanto pessoal. Logo, não poderia deixar de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram nesta minha jornada.

*Agradeço a professora **Dra Maria Eugênia Queiroz Nassur** pela confiança, atenção, paciência e brilhante orientação. Sou extremamente grato pelos seus ensinamentos, acompanhamento e conhecimentos compartilhados. Tenho-a para mim como inspiração para a minha carreira acadêmica.*

*Ao professor **Dr Jared L. Anderson** e todo o seu grupo por ter me acolhido e me proporcionado experiência incrível durante o período de intercâmbio na Iowa State University (IA, Estados Unidos).*

À Universidade de São Paulo (Brasil) e à Iowa State University (Estados Unidos) por proporcionar oportunidades para a minha formação acadêmica.

*E finalmente agradeço as agências de fomento de pesquisa pelo apoio financeiro fundamentais para a elaboração dos trabalhos descritos nesta tese. Em especial agradecimentos a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (processos FAPESP números 2017/24721-0, 2016/01082-9 e 2017/02147-0), **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina** (INCT-TM 465458/2014-9) e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES).*

Foi o príncipezinho rever as rosas:

- Vós não sois absolutamente iguais à minha rosa, vós não sois nada ainda.

Ninguém ainda vos cativou, nem cativastes a ninguém. Sois como era a minha raposa. Era uma raposa igual a cem mil outras. Mas eu fiz dela um amigo. Ela é agora única no mundo.

E as rosas estavam desapontadas.

- Sois belas, mas vazias, disse ele ainda. Não se pode morrer por vós. Minha rosa, sem dúvida um transeunte qualquer pensaria que se parece convosco. Ela sozinha é, porém, mais importante que vós todas, pois foi a ela que eu reguei. Foi a ela que pus sob a redoma. Foi a ela que abriguei com o pára-vento. Foi dela que eu matei as larvas (exceto duas ou três por causa das borboletas). Foi a ela que eu escutei queixar-se ou gabar-se, ou mesmo calar-se algumas vezes. É a minha rosa.

E voltou, então, à raposa:

- Adeus, disse ele...

- Adeus, disse a raposa. Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível para os olhos.

- O essencial é invisível para os olhos, repetiu o príncipezinho, a fim de se lembrar.

- Foi o tempo que dedicaste com tua rosa que fez tua rosa tão importante.

(Trecho extraído do livro "O Pequeno Príncipe" escrito por Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

SOUZA, I. D. de. **Prospecção de novos capilares revestidos internamente com líquidos iônicos para *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC).** 2019. 167 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Dentre os avanços das técnicas cromatográficas, o desenvolvimento de novas fases estacionárias favoreceu a seletividade e detectabilidade dos métodos analíticos. Neste contexto, os líquidos iônicos destacam-se como compostos inovadores do século XX, explorados principalmente como fases estacionárias para cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e para as técnicas de microextração em fase sólida (SPME). A potencialidade dos líquidos iônicos está relacionada aos mecanismos de retenção/separação únicos (interações hidrofóbicas, hidrofílicas, iônicas, ligação de hidrogênio, complexação, entre outros) e à facilidade no ajuste das propriedades físico-químicas dessas moléculas durante o procedimento de síntese. Na primeira parte deste trabalho, líquidos iônicos poliméricos foram sintetizados, caracterizados e imobilizados quimicamente na superfície interna de capilares de sílica fundida. Estes capilares inovadores foram empregados para a microextração no capilar em linha com a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (*in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS) para a determinação *online* dos endocanabinóides, anandamida (AEA) e 2-aracdonoilglicerol (2-AG) em amostras de plasma de pacientes com a Doença de Parkinson (DP). A inserção de longas cadeias alquílicas no cátion imidazólico favoreceu interações hidrofóbicas, por outro lado os anéis imidazólicos combinados com os ânions halogenetos favoreceram interações polares e ligações de hidrogênio com os endocanabinóides. Tais capilares promoveram a exclusão de compostos endógenos da matriz biológica e baixas pressões no sistema analítico. O método inovador desenvolvido apresentou linearidade na faixa de concentração de 0,05 a 100 ng mL⁻¹, precisão e exatidão variando de 1,6 a 14% (coeficiente de variação) e 19,6 a 13,2% (erro padrão relativo), respectivamente. Por isso, o método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS é adequado para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de plasma de pacientes com DP. Na segunda parte deste trabalho, colunas capilares de alta estabilidade térmica contendo líquidos iônicos complexados com íons Ag⁺ foram desenvolvidas, caracterizadas e empregadas na segunda dimensão do cromatógrafo gasoso bidimensional abrangente (GC × GC) com detector de ionização de chama (FID) para a separação multianalitos de diferentes classes (alcanos, alcenos, alquinos, dienos, ésteres, cetonas, aldeídos, terpenos e graxos poli-insaturados). Na primeira dimensão foi empregada a coluna capilar apolar Rtx-5MS (5% difenil/95% dimetilpolissiloxano), a qual propiciou mecanismo de separação baseado na volatilidade dos analitos. Quando comparada com a coluna SUPELCOWAX10, as colunas utilizadas na segunda dimensão [(C₁₀MIM)(MIM)Ag⁺][NTf₂⁻]/[C₁₀MIM⁺][NTf₂⁻] (1,2 m x 0,25 mm x 0,15 µm) e (0,9 m x 0,25 mm x 0,15 µm) propiciaram picos estreitos e adequada seletividade favorecendo a separação dos analitos, cujas interações foram baseadas na complexação entre as insaturações das moléculas e os íons Ag⁺ presentes nos cátions do IL-Ag⁺. As separações cromatográficas empregando as colunas ILs-Ag⁺ apresentaram boa resolução cromatográfica na segunda dimensão para a separação dos analitos 1-hexino e 3-hexino, *n*-pentano e 3-metil-1,4-pentadieno e butanal e 2-butanona, os quais coeluíram na coluna comercial. O tempo de retenção dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs de C14: 0 a C18: 3) foi proporcional ao número de insaturações contidas na estrutura desses analitos. Em resumo, este estudo apresentou o desenvolvimento de uma promissora geração de colunas analíticas para GC × GC contendo IL a base de íons Ag⁺.

Palavras-chave: 1. Microextração em fase sólida. 2. Líquidos iônicos. 3. *In-tube* SPME. 4. Cromatografia gasosa multidimensional. 5. Fase estacionária. 6. Prata

ABSTRACT

SOUZA, I.D. **Development of new capillaries coated with ionic liquids for in-tube SPME-UHPLC-MS/MS and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC).** 2019. 167 f. Thesis (Doctorate) - Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Considering the advances in chromatographic techniques, the development of new stationary phases has improved the selectivity and detectability of analytical methods. In this context, ionic liquids have been in the spotlight as innovative compounds of the 20th century: they are mainly applied as stationary phases for gas chromatography (GC), high-performance liquid chromatography (HPLC), and solid-phase microextraction (SPME). The benefits of ionic liquids are related to their unique retention/separation mechanisms (hydrophobic, hydrophilic, ionic interactions, hydrogen bonding, and complexation, among others) and to the possibility of tuning their physicochemical properties during the synthesis procedure. In the first part of this study, polymeric ionic liquids were synthesized, characterized, and chemically immobilized on the internal surface of fused silica capillaries. These innovative capillaries were used for capillary microextraction in line with ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (in-tube SPME-UHPLC-MS/MS) for online determination of endocannabinoids, anandamide (AEA), and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in plasma samples from patients with Parkinson's Disease (PD). Introducing long alkyl chains in the imidazole cation favored hydrophobic interactions; on the other hand, combining the imidazole rings with the halide anions elicited polar interactions and hydrogen bonds with the endocannabinoids. These capillaries promoted exclusion of endogenous compounds from the biological matrix and low backpressures in the analytical system. The linearity of this innovative method ranged from 0.05 to 100 ng mL⁻¹, whereas the precision and accuracy ranged from 1.6 to 14% (coefficient of variation) and from 19.6 to 13.2% (standard error deviation), respectively. Therefore, the in-tube SPME-UHPLC-MS/MS method is adequate for AEA and 2-AG determination in plasma samples from patients with PD. In the second part of this study, high thermal stability capillary columns containing silver-based ionic liquid stationary phases were developed, characterized, and applied in the second dimension of a comprehensive two-dimensional gas chromatograph (GC × GC) with flame ionization detector (FID) to separate alkanes, alkenes, alkynes, dienes, esters, ketones, aldehydes, terpenes, and polyunsaturated fatty acids. When the Rtx-5MS × [(C₁₀MIM)(MIM)Ag⁺][NTf₂⁻]/[C₁₀MIM⁺][NTf₂⁻] column set was employed, the separation in the first dimension was based on the volatility of each analyte; the separation mechanism in the second dimension was strongly influenced by π -complexation between the silver ions and the double or triple bonds of the analytes. Compared to the SUPELCOWAX10 column, the [(C₁₀MIM)(MIM)Ag⁺][NTf₂⁻]/[C₁₀MIM⁺][NTf₂⁻] (1.2 m x 0.25 mm x 0.15 μ m) and (0.9 m x 0.25 mm x 0.15 μ m) columns provided narrow peaks and unique selectivity, which improved separation of the analytes in the second dimension. The chromatographic separations using the silver-based ionic liquid columns presented exceptional chromatographic resolution in the second dimension for the separation of the analytes 1-hexyne and 3-hexyne, n-pentane and 3-methyl-1,4-pentadiene, and butanal and 2-butanone, which coelute when the commercial benchmark column is used. The retention times of the polyunsaturated fatty acids (PUFAs of C14: 0 to C18: 3) were proportional to the number of unsaturation within the structure of these analytes. In summary, this study presented the development of a promising generation of silver-based capillary columns for GC × GC experiments.

Keywords: Solid phase microextraction. 2. Ionic liquids. 3. *In-tube* SPME. 4. Multidimensional gas chromatography. 5. Stationary phase. 6. Silver

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Principais cátions e ânions de líquidos iônicos.	23
Figura 1.2 – Número de publicações contendo o termo “ <i>ionic liquids</i> ” entre o período 1988-2018....	24
Figura 1.3 - Cromatogramas típicos obtidos de experimentos (a) cromatografia gasosa e (b) cromatografia gasosa bidimensional . Os pares de analitos 1 e 2, 3 e 4, 6 e 7 apresentam propriedades físico-químicas muito semelhantes entre si.	29
Figura 1.4 – Desenho esquemático do equipamento de cromatografia gasosa bidimensional equipado com modulador criogênico de dois estágios.	31
Figura 2.5 – Diferentes tipos de líquidos iônicos poliméricos.....	44
Figura 2.6 - Configuração do sistema IT-SPME-LC-MS/MS	61
Figura 2.7 – Síntese dos monômeros dos líquidos iônicos polimerizáveis a) cloreto de 1-hexadecil-3-vinilimidazólio, b) brometo de 1-hexadecil-3-vinilimidazólio e c) dibrometo de 1,10-di(3-vinilimidazolio)decano	70
Figura 2.8 – Produtos brutos de síntese, [C16VIM][Br], obtidos em diferentes temperaturas de síntese: (a) 110 °C e (b) 45 °C. Solvente utilizado: tolueno, tempo de reação: 12 (a) e 36 h (b), as imagens foram obtidas após etapa de evaporação (rotoevaporador) do solvente	72
Figura 2.9 – Espectros ESI-MS (modo positivo) do (A) cloreto de 1-hexil-3-vinilimidazólio, (B) brometo de 1-hexadecil-3-vinilimidazólio e (C) dibrometo de 1,10-di(3-vinilimidazolio)decano em metanol.....	73
Figura 2.10 – Processo de derivatização com viniltrimetoxissilano (VTMS) para inserção de grupos vinílicos na superfície interna dos capilares de sílica.	75

Figura 2.11 – Imagens MEV com ampliações de 200, 1000, 5000 e 10000x dos capilares vazios (a-d), C6 (e-h), C6C16 (i-m) e C16 (n-p)	77
Figura 2.12 – Avaliação do volume de plasma para a determinação de AEA e 2-AG. As proteínas do plasma foram precipitadas utilizando acetonitrila:plasma 2:1 (v/v). Após coleta e evaporação da fase orgânica, o extrato seco foi reconstituído com 100 µL com solução de acetato de amônio pH 7,0:acetonitrila 90:10 (v/v) e 80 µL foram injetados no sistema cromatográfico.	78
Figura 2.13 – Otimização da proporção dos monômeros na síntese do capilar e influência na pré-concentração de AEA e 2-AG. Os capilares foram sintetizados nas seguintes proporções: C6 = [VC ₆ IM][Cl]:[(VIM) ₂ C ₁₀] ₂ [Br] 2:1; C16 = [VC ₁₆ IM][Br]:[(VIM) ₂ C ₁₀] ₂ [Br] 2:1 e C6/C16 [VC ₆ IM][Cl]:[VC ₁₆ IM][Br]:[(VIM) ₂ C ₁₀] ₂ [Br] 1:1:1	79
Figura 2.14 – Estrutura química dos monômeros de líquidos iônicos polimerizáveis (a, b, c) e dos analitos abordados neste estudo (d, e).....	80
Figura 2.15 – Otimização dos parâmetros IT-SPME: (a) pH da amostra, (b) proporção de acetonitrila na dessorção dos analitos, e (c) fluxo da fase móvel na bomba quaternária. Condições experimentais: 3 replicatas (n=3), capilar C16 (10,0 cm × 0,53 mm DI), UHPLC-MS/MS (condições descritas no item 2.3.8, pag. 63)	82
Figura 2.16 - Otimização do tempo de exclusão das macromoléculas do plasma da amostra de plasma injetada na coluna capilar; condições da corrida cromatográfica: 0-6 min., 100% de água; 6-10 min água/acetonitrila acidificada com 0,5% de ácido fórmico (3:7, v/v); comprimento de onda monitorado: 280 nm.	83
Figura 2.17 – Cromatogramas mostrando o desacoplamento (Posição 1 da válvula de 6 pórticos) e acoplamento (Posição 2 da válvula de 6 pórticos) das dimensões 1D e 2D do método IT-SPME-LC-MS/MS. Dimensão 1D: coluna capilar, detector DAD; dimensão 2D: conexão de volume morto (substituindo a coluna analítica), detector MS/MS	85
Figura 2.18. Teste de capacidade de sorção do capilar (volume de injeção de 80 µL).....	88
Figura 2.19 - Análise dos resíduos do modelo linear para as curvas analíticas	91

Figura 2.20. Cromatogramas obtidos na respectiva sequência: solução aquosa não enriquecida (sobreposição a esquerda), solução aquosa no LSQ e 2 injeções consecutivas de solução aquosa não enriquecida (sobreposição a direita).	93
Figura 2.21. Cromatogramas das amostras de plasma enriquecidas com AEA-d4 e 2-AG-d5 na concentração do LIQ e cromatograma obtido da amostra sem adição dos padrões (sobrescrito a esquerda).	94
Figura 2.22. Cromatogramas obtidos da amostra de plasma de paciente, as concentrações de AEA e 2-AG determinadas foram 0,28 e 0,09 ng mL ⁻¹ , respectivamente.	95
Figura 3.23 - Cromatogramas 1D-GC-FID da separação de hexano e 1-hexeno empregando fases estacionárias (a) [BMIM ⁺][NTf ₂ ⁻] (b) [Ag ⁺ (MIM)(BIM)][NTf ₂ ⁻] e (C) [Ag ⁺ (MIM)(BIM)][NTf ₂ ⁻]. .	114
Figura 3.24 - Estrutura dos líquidos iônicos sintetizados	118
Figura 3.25 – Esquema do aparato instrumental para deposição do filme de fase estacionária nos capilares de sílica pelo método estático.	119
Figura 3.26 - Estrutura química dos ácidos graxos insaturados presentes na amostra comercial (PUFA N° 2)	125
Figura 3.27 - Síntese do líquido iônico contendo íons Ag ⁺	126
Figura 3.28 – Imagens de microscopia ótica de capilares recobertos com fase estacionária [(C ₄ IM)(MIM)Ag ⁺][NTf ₂ ⁻]:([C ₁₀ MIM ⁺][NTf ₂ ⁻] 1:30 (m/m). Em a) é representado um capilar obtido com solução de recobrimento contendo traços de impurezas e em b) com solução de recobrimento após remoção completa das impurezas. A seta em vermelho destaca as “gotas” de fase estacionária formadas na superfície do capilar devido ao recobrimento não homogêneo.	127
Figura 3.29 - Cromatogramas GC×GC-FID da separação de uma mistura contendo (1) n-hexano, (2) 2-hexeno, (3) 4-pentenoato de metila, (4) pentanoato de metila, (5) 3-pentenoato de metila e (6) 2,4-pentadienoato de metila utilizando a combinação de colunas Rtx-5MS (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm) ×	

[(C₄IM)(MIM)Ag⁺][NTf₂⁻] (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm). Temperatura programada: 35 °C a 54 °C a 2 °C min⁻¹; aumento para 90 °C a 5 °C min⁻¹. 128

Figura 3.30 - Cromatogramas GC×GC-FID da separação de uma mistura contendo (1) n-hexano, (2) 2-hexeno, (3) 4-pentenoato de metila, (4) pentanoato de metila, (5) 3-pentenoato de metila e (6) 2,4-pentadienoato de metila utilizando a combinação de colunas Rtx-5MS (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm) × IL-Ag⁺:IL (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm). As fases estacionárias da segunda dimensão foram preparadas utilizando as seguintes proporções de [(C₄IM)(MIM)Ag⁺][NTf₂⁻]/[C₁₀MIM⁺][NTf₂⁻] a) 1:10, b) 1:20, c) 1:30, d) 1:40, e) 1:50 e f) 0:1 (m/m). Temperatura programada: 35 °C a 54 °C a 2 °C min⁻¹; aumento para 90 °C a 5 °C min⁻¹. 129

Figura 3.31 – Avaliação da espessura do filme de fase estacionaria (a) e comprimento da coluna 2D (b) para a separação dos ésteres 3-pentenoato de metila e 2,4-pentadienoato de metila. Na segunda dimensão foi utilizada a fase estacionária [(C₁₀IM)(MIM)Ag⁺][NTf₂⁻]/[C₁₀MIM⁺][NTf₂⁻] 1:30 (m/m). 130

Figura 3.32 – a) Diagrama de sangria da coluna capilar cromatográfica ilustrando a termoestabilidade da fase estacionária 350IL21IL-Ag⁺; b) Avaliação da resolução cromatográfica da separação do 2,4-pentadienoato de metila e 3-pentenoato de metila após ciclos de condicionamento isotérmico em diferentes temperaturas por 1 h. 131

Figura 3.33 – Representação esquemática da interação entre [(C₁₀MIM)(MIM)Ag⁺][NTf₂⁻] e 1-hexeno. 132

Figura 3.34 - Cromatogramas GC × GC-FID da separação de aldeídos, cetonas e ésteres empregando a combinação de colunas a) Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μm) × 350IL21IL-Ag⁺ (1,2 m, 0.25 mm ID, 0.15 μm), b) Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μm) × SUPELCOWAX10 (1,2 m, 0,2 mm ID, 0,2 μm) e c) Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μm) × 31IL (1,2 m, 0.25 mm ID, 0.15 μm). Temperatura programada: aumento de 40 °C até 44 °C a 2 °C min⁻¹; aumento para 100 °C a 5 °C min⁻¹ e 100 °C por 3 min. Tempo de modulação: 10 s. Consultar o Quadro 3.3 para identificação dos picos. 134

Figura 3.35 - Cromatogramas GC × GC-FID da separação de alcanos, alcenos, cicloalcanos, dienos e terpenos empregando a combinação de colunas a) Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μm) × 320IL21IL-Ag⁺ (0,9 m, 0.25 mm ID, 0.15 μm), b) Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μm) × SUPELCOWAX10 (0,9 m, 0,2 mm ID, 0,2 μm) e c) Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μm) × 31IL (0.9 m, 0.25 mm ID,

0.15 μm). Temperatura programada: 25 $^{\circ}\text{C}$ por 3 min, aumento para 44 $^{\circ}\text{C}$ a 2 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$; aumento para 90 $^{\circ}\text{C}$ a 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, 90 $^{\circ}\text{C}$ por 2.3 min. Tempo de modulação: 10 s. Consultar o Quadro 3.3 para identificação dos picos..... 136

Figura 3.36 – Cromatogramas a) GC-FID e b) GC $\times$ GC-FID da amostra de ácidos graxos poli-insaturados obtidos empregando a combinação de colunas SUPELCOWAX10 (30 m, 0,2 mm ID, 0,2 μm) $\times$ 350IL21IL- Ag^{+} (0,40 m, 0,25 mm ID, 0,15 μm). Os picos marcados com (*) referem-se a impurezas presente na amostra comercial..... 139

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Líquidos iônicos poliméricos como sorventes nas técnicas de preparo de amostras: microextração em fase sólida (SPME), microextração em fase sólida com múltiplas fibras monolíticas (MMF-SPME), microextração em fase sólida dispersiva (SPME-dispersiva), microextração sortiva em disco de agitação (SCSE) e online-SPME.	51
Tabela 2.2 - Composição da mistura reacional dos diferentes capilares sintetizados	57
Tabela 2.3 - Transições MS/MS (SRM), voltagem do cone (DP), energia de colisão (CE) e tempo de retenção (t_R) dos endocanabinóides estudados.....	61
Tabela 2.4 – Atribuições dos sinais de RMN 1H dos monômeros sintetizados	74
Tabela 2.5 - Principais resultados da validação analítica do método IT-SPME-UHPLC-MS/MS para análise de anandamida (AEA) e 2- araquidonoglicerol (2-AG) em amostras de plasma.....	90
Tabela 2.6 - Teste T para a comparação da inclinação das retas obtidas em diferentes matrizes.....	94
Tabela 2.7. Concentração plasmática de anandamida (AEA) e 2-araquidonoglicerol (2-AG) em pacientes com DP.....	95
Tabela 2.8 - Determinação de anandamida (AEA) e 2-araquidonoglicerol (2-AG) em amostras de plasma	97
Tabela 3.9 – Composição (m/m) das fases estacionárias utilizadas para o recobrimento de capilares de sílica fundida (0,25 mm d.i.). Todos os compostos apresentados nesta tabela foram combinados com o ânion NTf $_2^-$	120
Tabela 3.10 – Desempenho das colunas IL-Ag $^+$:IL a e SUPELCOWAX10, usadas em 2D , para a separação de diferentes pares de analitos por GC $\times$ GC-FID	137

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 - Etapas contendo a sequência dos parâmetros na otimização do método IT-SPME-LC-MS/MS.....	62
Quadro 2.2 - Condições IT-SPME-LC-MS/MS utilizando a coluna capilar contendo fase estacionária a base de líquidos iônicos polimerizáveis (1D) e coluna analítica C18 (2D) para a determinação de endocanabinóides em amostras de plasma.....	87
Quadro 3.3 – Compostos utilizados para o preparo da Mistura 1 (1 ao 33) e Mistura 2 (34 ao 57) utilizadas para avaliar as colunas 2D.....	123

LISTA DE SIGLAS

2-AG	2-aracdonoilglicerol
1t_R	Tempo de retenção na primeira dimensão
2t_R	Tempo de retenção na segunda dimensão
ACN	Acetonitrila
AEA	Anandamida
DVB	Divinilbenzeno
EDMA	Etilenodimetacrilato
EGDMA	Etilenoglicoldimetacrilato
IT-SPME	<i>In-tube</i> SPME
GC	Cromatografia gasosa
GC $\times$ GC	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente
GC – GC	Cromatografia gasosa bidimensional de frações parciais
MDGC	Cromatografia gasosa multidimensional
PIL	Líquido iônico polimerizável
SPME	Microextração em fase sólida
PEG	Polietilenoglicol

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
μL	microlitro
min	minuto
°C	grau Celsius
L/h	litro/hora
kV	kilovolt
λ	comprimento de onda
μm	micrômetro
Da	Dalton
mg	miligrama
mL.min ⁻¹	mililitros/minuto
pg.mg ⁻¹	picogramas/miligrama
nm	nanômetro
v/v	volume/volume
P	Poise

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1	21
1.1 INTRODUÇÃO	21
1.1.1 LÍQUIDOS IÔNICOS NA QUÍMICA ANALÍTICA	22
1.1.2 <i>IN-TUBE</i> SPME (IT-SPME)	26
1.1.3 CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL	28
1.2 REFERÊNCIAS	33
2 CAPÍTULO 2	41
2.1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	41
2.1.1 DOENÇA DE PARKINSON E ENDOCANABINÓIDES	41
2.1.2 LÍQUIDOS IÔNICOS POLIMÉRICOS COMO MEIOS SORVENTES PARA AS TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	44
2.2 OBJETIVOS	54
2.2.1 OBJETIVO GERAL	54
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	55
2.3.1 MATERIAIS	55
2.3.2 SÍNTESE DOS MONÔMEROS DE LÍQUIDOS IÔNICOS POLIMERIZÁVEIS	55
2.3.3 PREPARO DOS CAPILARES	56
2.3.4 POLIMERIZAÇÃO <i>IN-SITU</i>	57
2.3.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL DAS FASES POLIMÉRICAS	58
2.3.6 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	59
2.3.7 TRATAMENTO PRÉVIO DA AMOSTRA	59
2.3.8 CONDIÇÕES ESPECTROMÉTRICAS	60
2.3.9 CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA PARA OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO IT-SPME-LC-MS/MS	61
2.3.10 CAPACIDADE DE SORÇÃO (Q) DOS CAPILARES	66
2.3.11 FATOR DE ENRIQUECIMENTO	66
2.3.12 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO IT-SPME-LC-MS/MS	67
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
2.4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS MONÔMEROS DE LÍQUIDO IÔNICO POLIMERIZÁVEIS	70
2.4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS CAPILARES CONTENDO FASE ESTACIONÁRIA LÍQUIDO IÔNICO POLIMERIZADO	74
2.4.3 TRATAMENTO PRÉVIO DA AMOSTRA	78
2.4.4 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO IT-SPME-LC-MS/MS	79
2.4.5 CAPACIDADE DE SORÇÃO	88
2.4.6 FATOR DE ENRIQUECIMENTO	89

2.4.7 VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO.....	89
2.4.8 APLICABILIDADE DO MÉTODO <i>IN-TUBE</i> SPME-UHPLC-MS/MS PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PLASMA DE PACIENTES COM DP	95
2.4.9 COMPARAÇÃO DO MÉTODO IT-SPME-UHPLC-MS/MS PROPOSTO COM MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA	96
2.5 CONCLUSÃO	98
2.6 REFERÊNCIAS	99
3 CAPÍTULO 3	108
3.1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	108
3.1.1 IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS E COMPOSTOS OXIGENADOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR	108
3.1.2 DESENVOLVIMENTO DE FASES ESTACIONÁRIAS SELETIVAS PARA CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL	109
3.1.3 INTERAÇÃO ENTRE Ag^+ E COMPOSTOS INSATURADOS	112
3.1.4 OBJETIVO GERAL.....	115
3.1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	115
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	116
3.2.1 MATERIAIS	116
3.2.2 INSTRUMENTAÇÃO	116
3.2.3 SÍNTESE DOS COMPOSTOS DA FASE ESTACIONARIA (IL E IL- Ag^+)	117
3.2.4 RECOBRIMENTO DOS CAPILARES COM FILME FINO DE FASE ESTACIONÁRIA.....	118
3.2.5 OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA FASE ESTACIONARIA 2D	119
3.2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS COLUNAS CAPILARES 2D	121
3.2.7 AVALIAÇÃO DAS COLUNAS CAPILARES 2D	121
3.2.8 APLICAÇÃO DO MÉTODO GC $\times$ GC-FID.....	125
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
3.3.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS DA FASE ESTACIONARIA (IL E IL- Ag^+)	126
3.3.2 OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DA COLUNA 2D CONTENDO FASE ESTACIONÁRIA CONSTITUÍDA DE IL- Ag^+	127
3.3.3 MECANISMO DE RETENÇÃO NAS COLUNAS CONTENDO FASE ESTACIONARIA A BASE DE IONS Ag^+	132
3.3.4 AVALIAÇÃO DAS COLUNAS CAPILARES 2D	133
3.3.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO GC $\times$ GC-FID.....	138
3.4 CONCLUSÃO	140
3.5 REFERÊNCIAS	141
4 ANEXOS	146

Capítulo 1

Introdução geral

Capítulo 1

1.1 Introdução

Os líquidos iônicos emergiram como uma classe promissora de compostos inovadores do século XX cobrindo uma ampla faixa de aplicações. Os líquidos iônicos utilizados na sua forma nativa, modificada, polimerizada, complexado com diferentes centros metálicos ou combinado com outros tipos de materiais têm gerado avanços científicos significativos em inúmeras áreas.

Capilares de líquidos iônicos inovadores hifenados às técnicas *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS e cromatografia gasosa bidimensional abrangente ($GC \times GC$) foram os temas centrais dos dois trabalhos principais de doutorado descritos nesta tese em três capítulos.

O Capítulo 1 descreve os principais temas e técnicas analíticas utilizadas em ambos os trabalhos como por exemplo, o uso de líquidos iônicos na química analítica (item 1.1.1), fundamentos teóricos das técnicas *in-tube* SPME (item 1.1.2) e $GC \times GC$ (item 1.1.3).

O Capítulo 2 descreve o procedimento de síntese, caracterização e aplicação de líquidos iônicos poliméricos como sorvente em capilares de sílica fundida. Estes capilares foram avaliados no método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS para a determinação dos endocanabinóides, anandamida e 2-aracdonoilglicerol, em amostras de plasma de pacientes com Doença de Parkinson. Uma introdução destacando a relevância destas determinações (item 2.1.1) bem como uma revisão bibliográfica do uso dos líquidos iônicos poliméricos nas técnicas de microextração em fase sólida (item 2.1.2) foram descritas na introdução deste capítulo. Este trabalho foi desenvolvido na sua totalidade no laboratório de química analítica da professora Dra Maria Eugênia Queiroz Nassur, localizado no Departamento de Química da USP (campus de Ribeirão Preto).

O Capítulo 3 descreve a síntese e aplicação de uma nova fase estacionária de líquidos iônicos contendo íons Ag^+ . Esta fase estacionária foi utilizada no preparo de colunas capilares ^{2}D para $GC \times GC$. Tais capilares apresentaram desempenho superior na separação de hidrocarbonetos e compostos oxigenados de baixa massa molecular quando comparado com as fases comerciais a base de polietilenoglicol. A introdução do capítulo 3 descreve a importância da determinação desses analitos (item 3.1.1), faz uma breve revisão bibliográfica sobre a prospecção de novas e seletivas fases estacionárias $GC \times GC$ (item 3.1.2) e apresenta um breve

histórico da motivação do uso de Ag^+ em colunas capilares (item 3.1.3). Este trabalho resultou em uma nova geração de colunas GC $\times$ GC com a seletividade diferenciada inerente aos íons Ag^+ para uma ampla gama de analitos. Este trabalho foi desenvolvido durante período de intercâmbio (bolsa estágio de pesquisa no exterior, BEPE - FAPESP) no laboratório do professor Dr Jared L. Anderson (USA).

Nesta tese, a descrição da nomenclatura abreviada dos líquidos iônicos foi realizada com base na tendência comum dos trabalhos publicados na literatura. Os substituintes alquílicos dos cátions foram descritos pela letra C juntamente com o número subscrito indicando o tamanho da cadeia carbônica. Por exemplo, C_{10} foi utilizado para designar o substituinte decil, C_4 para o butil, M para metil, Bz para benzil, Ph para fenil, etc. O elemento seguinte tratou da descrição da classe do líquido iônico: IM para imidazólio, VIM para vinilimidazol, P para fosfônio, N para amônio, Py para piridínio, etc. O tipo de ânion foi descrito logo em seguida: Br^- para brometo, Cl^- para cloreto, NTf_2^- para bis [(trifluorometil)sulfonil]imidato e PF_6^- para hexafluorofosfato.

A título de ilustração, segue dois exemplos de nomenclatura e abreviação: tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio ($[\text{C}_4\text{MIM}][\text{BF}_4^-]$) e cloreto de 1-vinilbenzil-3-metillimidazolio ($[(\text{VBz})\text{MIM}][\text{Cl}]$).

1.1.1 Líquidos iônicos na química analítica

Os líquidos iônicos (IL) são sais orgânicos constituídos, na maioria das vezes, por um cátion orgânico e um ânion orgânico ou inorgânico. Normalmente, os cátions são assimétricos e contem nitrogênio ou fosforo como heteroátomo (1). A Figura 1.1 ilustra os principais cátions e ânions comumente reportados.

Na literatura, os IL são designados pelos os termos “*ionic liquids*”, “*room-temperature IL*” ou ainda “*molten salts*”. Este trabalho não se ateve em descrever toda a abordagem histórica e evolutiva dos líquidos iônicos, pois este contexto pode ser encontrado em excelentes artigos de revisão escrito por grupos de grandes expertise na área (2,3).

Figura 1.1 - Principais cátions e ânions de líquidos iônicos.

Fonte: Próprio autor.

Com relação as propriedade físico-químicas, os líquidos iônicos possuem ponto de fusão menor do que 100 °C e, na maioria das vezes, são líquidos altamente viscosos com valores de viscosidade variando de 35 a 500 cP (2,4). Para fins comparativos, solventes usuais como por exemplo tolueno e água apresentam viscosidade de 0,6 e 0,9 cP, respectivamente (4). Assim, os IL se destacam-se como um grupo interessante de solvente quando comparado com solventes orgânicos usuais, pois apresentam baixa pressão de vapor e ponto de fulgor desprezível minimizando tanto as perdas por volatilização quanto a susceptibilidade a explosões (4). Além disso, os IL geralmente exibem alta estabilidade térmica e capacidade de solvatação possíveis de serem ajustadas.

As propriedades físico-químicas dos IL dependem principalmente da natureza, estrutura, tamanho e combinação de cátion e ânion. Devido a ampla diversidade de modificações estruturais e permutações possíveis, 10¹⁸ IL podem ser obtidos teoricamente. Entretanto deste total exorbitante, apenas 500 tipos já foram sintetizados na prática em escala laboratorial e 10 deles já são produzidos em escala industrial para fins comerciais (1).

Desde a sua descoberta em 1914, os IL rapidamente ganharam popularidade e foram responsáveis por brilhantes inovações em todas as áreas da ciência (5). A versatilidade desses materiais tem os feito alvo de pesquisas nas mais diversas áreas. A Figura 1.2, ilustra o número de artigos publicados entre os anos 1988-2018 contendo o termo “*ionic liquids*”. Esses dados mostram que as publicações cresceram exponencialmente desde 1914. Diariamente inovações referentes a modificações estruturais, propriedades e aplicações dos IL são reportadas na

literatura fazendo com que esses materiais sejam um tema bastante atual ainda nos dias de hoje. Essas publicações têm garantido um avanço tecnológico e desenvolvimento multidisciplinar, sobretudo no campo da Química Analítica.

Figura 1.2 – Número de publicações contendo o termo “*ionic liquids*” entre o período 1988-2018.

Fonte: Banco de dados do *Web of Science* (acessado em 23/06/2019).

Nos parágrafos abaixo encontra-se uma breve descrição de trabalhos ilustrando aplicações na área da Química Analítica.

Nos últimos anos, um desenvolvimento significativo foi direcionado para a fabricação e aplicação de sensores eletroquímicos baseados em líquidos iônicos. Pois, estes compostos apresentam excelentes propriedade eletrocatalíticas incluindo alta condutividade e ampla janela eletroquímica (6). Mais especificamente, líquidos iônicos têm sido utilizados como eletrólitos e na confecção de eletrodos (6).

Diferentes cátions imidazólio, piridínio, pirrolidínio e amônio combinados com os ânions BF_4^- e NTf_2^- foram avaliados como eletrólitos em meios não polares para estudos eletroquímicos (7). Nestes estudos os autores comprovaram que diferentes combinações de cátions com ânions levaram a diferentes propriedades como condutividade e estabilidade eletroquímica.

Numa aplicação diferente Khoshroo et al (8) preparou um eletrodo de carbono vítreo modificado com o nano composto (prata nanoestruturada/ $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{BF}_4^-]$). Este eletrodo foi

utilizado no desenvolvimento de um sensor eletroquímico para detecção de clonazepam. O efeito sinérgico da combinação do nanocompósito de prata com o líquido iônico aumentou a corrente do pico de redução do analito. O método apresentou uma ampla faixa de intervalo linear e limite de detecção de 66 nM.

Mudando o cenário de estudo, o uso de líquidos iônicos na espectrometria de massas tem sido um assunto bastante promissor (9).

Líquidos iônicos foram explorados, por exemplo, como matrizes na Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-MS). Foi comprovado por Zhao et al (10) que combinações de líquidos iônicos com 2,5-di-hidroxibenzoato (IL/[DHB⁻]) e utilização com matriz melhorou a detecção de carboidratos por MALDI-MS. O método utilizando a matriz IL/[DHB⁻] apresentou limite de detecção de 10 fmol, cujo valor foi 2 ordens de magnitude menor do que com o uso de apenas DHB.

Outro campo promissor tem sido o uso de IL como aditivos em fase móvel para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (11).

Um método HPLC-UV/Vis foi desenvolvido para a determinação simultânea de iodeto e iodato em amostras de bebidas comerciais (12). Os resultados deste trabalho mostraram que o uso de [C₆MIM][BF₄⁻] foi mais efetivo como agente de pareamento iônico do que os agentes convencionais tetrabutilamônio. Utilizando a fase móvel constituída de metanol: [C₆MIM][BF₄⁻] 0,3 mmol L⁻¹ 12:88 (v/v), o método apresentou limites de detecção de 0,02 e 0.03 mg L⁻¹ para o iodeto e iodato, respectivamente.

Em outro trabalho foi demonstrado que o uso de [(CH₂O-Men)MIM][Cl] e [(CH₂O-Men)C₅IM][Cl], como aditivos de fase móvel, favoreceu o desempenho da coluna cromatográfica Chiral Astec Chirobiotic T® para a separações enantioméricas (13).

Uma aplicação bastante interessante é o uso de líquidos iônicos como agentes de pareamento iônico para melhorar a ionização de analitos por eletrospray (ESI) (14). Wang et al (15) desenvolveu um método HPLC-MS/MS para a determinação de aminoácidos modificados com cloroformato de 9-fluorenilmetilo em amostras de urina. Neste método os autores introduziram uma infusão pós-coluna de líquidos iônicos dicatiônicos para melhorar a ionização dos analitos no modo ESI⁻. Essa infusão pós-coluna favoreceu a detectabilidade em até 100 vezes.

Ainda na área da química analítica, os líquidos iônicos têm sido utilizados no desenvolvimento de novas fases estacionárias tanto para colunas cromatográficas GC (16), HPLC (17) quanto para sorventes nas técnicas de microextração (18).

Os líquidos iônicos têm permitido a confecção de fases estacionárias polares e de alta estabilidade térmica para separações 1D-GC e GC $\times$ GC. Surpreendentemente, estas colunas possibilitaram a realização de separações cromatográficas em temperaturas superiores a 300 °C (19)(20).

Colunas comerciais a base de líquidos iônicos SLB-IL59, SLB-IL60, SLB-IL65 e SLB-IL111 foram avaliadas para a análise de ácido graxos de cadeia longa por 1D-GC (21). Este trabalho demonstrou a excelente performance das colunas SLB-IL60 e SLB-IL111 em gerar picos extremamente estreitos quando comparados com as fases estacionárias convencionais a base de polietilenoglicol (PEG). Além disso, essas colunas foram capazes de separar os isômeros cis-trans dos analitos, os quais coeluíram na coluna de PEG. Outros exemplos de avanços no que diz respeito ao uso de IL como fases estacionárias para 1D-GC podem ser encontrados nos artigos de revisão escritos por renomados grupos de pesquisa (16)(1)(19)(22).

Com relação às técnicas de microextração em fase sólida os líquidos iônicos têm sido relatados como sorventes em diferentes aplicações (18). Excelente capacidade de sorção e seletividade única têm sido propiciados por meio de diferentes tipos de interações incluindo interações hidrofóbicas, hidrofílicas, dispersivas, ligação de hidrogênio, iônicas, dipolo-dipolo e mecanismos exclusão. Esses sorventes inovadores são capazes de isolar e preconcentrar seletivamente diversos tipos de analitos presentes em amostras. O item 2.1.2 (pag. 44) apresenta uma discussão mais detalhada deste tópico.

Por fim, vários trabalhos referente ao uso de líquidos na química analítica foram descritos recentemente por Anderson e Clark na edição especial da revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (23).

1.1.2 *In-tube* SPME (IT-SPME)

A microextração em fase sólida foi introduzida inicialmente no formato tradicional de fibras, SPME em fibra. SPME em fibra é uma técnica miniaturizada de preparo de amostra, não exaustiva, proposta inicialmente por Pawliszyn e co-autores em meados de 1990 (24,25). As principais vantagens desta técnica envolvem simplicidade na utilização e a miniaturização do preparo de amostra permitindo a redução do volume amostra utilizada, solventes e resíduos gerados (26).

O dispositivo comercial da SPME em fibra consiste numa espécie de seringa modificada, que contém um microtubo de aço inoxidável exercendo a função de uma agulha. Este microtubo abriga uma fibra de aproximadamente 1 cm revestida com um filme de polímero orgânico (fase estacionária) de 10 a 100 μm de espessura (27). A movimentação do êmbolo desta seringa permite que esta fibra assuma duas posições: uma recolhida dentro da agulha e a outra fora da agulha exposta ao ambiente. Durante a extração, esta fibra é exposta à solução por um período definido. A dessorção dos analitos pode ser realizada pela exposição da fibra diretamente no injetor do GC (dessorção térmica) ou expondo em solução adequada (27).

Devido a compatibilidade e praticidade da dessorção térmica, a técnica convencional SPME ganhou grande aceitação e têm sido expressivamente empregada principalmente para a análise de compostos orgânicos voláteis ou semi voláteis por 1D-GC (28).

Com o sucesso do acoplamento da técnica SPME em fibra com os métodos GC, diferentes grupos de pesquisa buscaram também o acoplamento desta técnica com os métodos HPLC. Uma tentativa pioneira do interfaceamento SPME em fibra com HPLC foi proposto em meados de 1995 (29). Contudo este interfaceamento não foi tão efetivo apresentando limitações tais como baixa capacidade de extração, dificuldade de automação e baixa estabilidade das fibras frente as fases móveis utilizadas.

Desta forma, a técnica SPME em fibra ganhou uma variante denominada *in-tube* SPME (IT-SPME). IT-SPME foi introduzida em 1997 (30) com a proposta de não só contornar os problemas encontrados no acoplamento SPME-HPLC mas também de facilitar a completa automação do preparo de amostra hifenado com o sistema HPLC (31). Assim, IT-SPME pode ser considerado como um caso específico da técnica online-SPME onde todo o processo de extração e dessorção dos analitos é realizado no interior da coluna capilar de extremidade aberta.

IT-SPME faz uso de um segmento de tubo capilar o qual está contida a fase estacionária ligada física ou quimicamente à superfície interna deste capilar (32). Quando comparada com a SPME em fibra, os capilares IT-SPME apresentam maior estabilidade mecânica e facilidade de automação. Por outro lado, quando comparada com as demais técnicas *online*-SPME que fazem uso de microcolunas empacotadas com partículas ao invés de capilares revestidos, IT-SPME apresenta menor pressão no sistema analítico, maior eficiência na limpeza e reuso do sorvete de extração (33).

IT-SPME pode ser acoplado ao HPLC em duas configurações.

A primeira configuração é denominada modo aspirar/dispensar (no inglês denominado como *draw/eject mode*). Neste modo, a coluna capilar é fixada entre o loop de injeção e a agulha de injeção do injetor automático do HPLC. A amostra é aspirada/dispensada por vários ciclos através da coluna capilar até que o equilíbrio de sorção do analito seja atingido entre a amostra aquosa e fase extratora. O fluxo da vazão e o número de ciclos aspirar/dispensar são controlados pelo injetor automático LC (32).

A segunda configuração é denominada modo de extração contínua (no inglês denominado como *flow-through mode*). Neste modo, a coluna capilar é instalada na válvula de seis pórticos do sistema analítico. Esta válvula controla o acoplamento ou desacoplamento entre a coluna capilar de extração e a coluna analítica de separação. Este sistema pode contar com o uso de 1 ou duas bombas para manter o fluxo constante de fase móvel pelo sistema analítico. A vantagem do uso de duas bombas é a possibilidade do uso de vazões independentes para extrair e separar os analitos. Durante a extração, a amostra passa continuamente pela coluna capilar até que a quantidade de analito extraída seja suficiente para atingir a detectabilidade desejada do método (32).

A capacidade e a eficiência de extração dos analitos na técnica IT-SPME depende do tipo de sorvente ou fase de extração utilizados. Diferentes grupos de pesquisa tem devotado a atenção para o desenvolvimento de diferentes materiais sorventes como por exemplo nanomateriais (34–36), fases monolíticas (37–39), materiais carbonáceos (40–42) e líquidos iônicos (43–45). O desenvolvimento e a introdução de novos sorventes tem gerado métodos IT-SPME com alta capacidade de sorção, boa eficiência de extração e seletividade diferenciada (46–48).

1.1.3 Cromatografia gasosa bidimensional

A cromatografia gasosa convencional (1D-GC) é uma ferramenta analítica indicada para a separação, identificação e quantificação de compostos voláteis em amostras complexas. Apesar de 1D-GC ser um sistema bastante robusto, apresenta limitações para amostras de elevada complexidade. Amostras petroquímicas e amostras contendo compostos organohalogenados, por exemplo, contêm um número muito grande de compostos com polaridade e pontos de ebulição muito próximos um do outro (49). Nesta situação, a utilização de apenas 1 coluna cromatográfica em 1D-GC não é capaz de oferecer uma separação adequada de todos

os analitos contidos na amostra. Como resultado, cromatogramas com picos mal resolvidos e coeluições são observados, Figura 1.3a.

A Cromatografia Gasosa Multidimensional (MDGC) foi introduzida nas décadas de 80 e 90 para superar as limitações das análises 1D-GC (50). MDGC combina pelo menos dois mecanismos de separação resultando em maior poder de separação, capacidade de pico e resolução cromatográfica em tempos de análises muito curtos. Dependendo do objetivo do estudo, MDGC pode ser operada em dois modos: cromatografia gasosa bidimensional de frações parciais (GC-GC) ou cromatografia gasosa bidimensional abrangente ($GC \times GC$) (22). Como resultado MDGC gera cromatogramas bidimensionais com picos separados em duas direções distintas, Figura 1.3b.

Figura 1.3 - Cromatogramas típicos obtidos de experimentos (a) cromatografia gasosa e (b) cromatografia gasosa bidimensional. Os pares de analitos 1 e 2, 3 e 4, 6 e 7 apresentam propriedades físico-químicas muito semelhantes entre si.

Fonte: Próprio autor.

Na sua forma mais básica, em GC-GC apenas regiões específicas do efluente da coluna 1D são transferidas para a coluna 2D . Comparativamente, em $GC \times GC$ todo o efluente da coluna 1D é transferido na sua totalidade para a coluna 2D . Neste caso, o modulador de $GC \times GC$ opera continuamente durante toda a corrida cromatográfica injetando o efluente de 1D em 2D .

Do ponto de vista instrumental, $GC \times GC$ trabalha com a hifenização de duas colunas capilares GC de diferentes seletividades conectadas por uma interface de modulação. A

eficiência do método depende principalmente do bom funcionamento de fatores como o modulador, seletividade das colunas cromatográficas e bom desempenho do detector.

O modulador é um dispositivo responsável por coletar, acumular e injetar o efluente da primeira coluna (1D) para a segunda coluna (2D) em intervalo de tempos denominado período de modulação (P_M), que varia de 1 a 10 s. O modulador é o componente principal do instrumento GC $\times$ GC, pois a transferência efetiva do eluato gera picos mais estreitos em 2D (51). Existem duas categorias de moduladores os pneumáticos e os térmicos.

Os moduladores pneumáticos são baseados em válvulas, que usam fluxo de gás para controlar e isolar porções do eluato 1D e redirecionar para separação em 2D (52,53). Nos últimos 30 anos, diferentes subcategorias de moduladores foram criadas para GC $\times$ GC.

No segundo grupo, os moduladores térmicos operam com alternância de temperaturas quente e fria na interface entre as duas colunas para condensar, focalizar e reinjetar as frações de amostra eluidas de 1D .

A modulação térmica, introduzida por Liu et al em 1991 (50), tem sido a técnica mais comumente empregada (54,55). Dentro desta categoria é possível encontrar moduladores em que a alternância de temperaturas é baseada em resistência de aquecimento e os moduladores criogênicos baseados na alternância de jatos de ar frio e quente (56). Os moduladores criogênicos a jato têm sido os mais populares devido a sua maior simplicidade, eficácia e reprodutibilidade na transferências dos analitos da dimensão 1D para a 2D (51). Na literatura podemos encontrar moduladores criogênicos que apresentam variantes no modo de operação como por exemplo os moduladores criogênicos de dois estágios em loop.

Os moduladores criogênicos em *loop* têm sido os preferíveis. Neste tipo de modulador, um segmento de capilar de sílica fundida de 1 a 1,5 m de comprimento (loop) é conecta na saída da coluna 1D e na entrada da coluna 2D , Figura 1.4. Este segmento de capilar é enovelado de forma que os dois pontos de junção fiquem pareados. Dois jatos de ar (quente e frio) são posicionados, externamente às colunas, nesta região de junção. Inicialmente, um jato de ar frio é direcionado nesta região por um breve período (300 a 375 ms). Nesta etapa o efluente da coluna 1D é condensado e aprisionado no *loop*. No momento seguinte o fluxo de ar frio é cessado e o fluxo de ar quente é ativado. Neste momento, a amostra coletada no *loop* é vaporizada e injetada na coluna 2D. O tempo de ativação do ar quente é controlado pelo P_M . Significante progresso tem sido feito pela empresa Zoex Corporation apresentando versões comerciais aprimoradas deste tipo de modulador (57).

Versões “*lab made*” desse tipo de modulador podem ser encontrados na literatura (58,59). Hantao et al (59,60) construiu um protótipo GC $\times$ GC-FID a partir da adaptação de um

GC convencional. Neste protótipo, a construção do modulador do tipo *loop* foi baseada no uso de uma válvula solenóide de três vias para controlar o fluxo contínuo de $N_2(g)$, Figura 1.4. O resfriamento do N_2 (fonte fria) foi obtido pela passagem do gás através de segmento da tubulação imerso em N_2 líquidos armazenado em um vaso *Dewer*. Este protótipo apresentou desempenho comparável com os equipamentos comerciais e foi utilizado com sucesso para a análise de combustíveis (59).

Figura 1.4 – Desenho esquemático do equipamento de cromatografia gasosa bidimensional equipado com modulador criogênico de dois estágios.

Fonte: Próprio autor.

A escolha da combinação das colunas $1^{\circ}D$ e $2^{\circ}D$ também é um fator importante nos experimentos $GC \times GC$. Tipicamente, utiliza-se colunas $1^{\circ}D$ de 15 a 30 m com diâmetro interno de 0,25 a 0,32 mm. As colunas $2^{\circ}D$ são mais curtas (0,5 a 2 m) e estreitas (0,1 a 0,20 mm). A separação cromatográfica em $2^{\circ}D$ deve ser rápida de modo que todo efluente injetado em $2^{\circ}D$ esteja completamente eluído antes que a fração seguinte coletada de $1^{\circ}D$ seja injetada em $2^{\circ}D$. Tanto as colunas $1^{\circ}D$ e $2^{\circ}D$ são protegidas dentro do forno do equipamento para controle de temperatura, igualmente nos sistemas convencionais 1D-GC. Alguns equipamentos mais modernos contam ainda com dois fornos individuais, um para cada coluna. Estes equipamentos oferecem vantagens adicionais como o controle individual da temperatura para cada dimensão.

Grande parte dos trabalhos publicados utilizam colunas ¹D contendo fases estacionárias mais apolares e colunas ²D mais polares. Nesta condição, uma separação ortogonal é obtida de modo que em ¹D a separação dos analitos ocorre baseada na volatilidade e em ²D na polaridade.

O conceito de ortogonalidade em GC × GC significa que os mecanismos envolvidos na separação dos analitos são individualmente confinados nas respectivas dimensões (61). Em termos práticos, quanto maior a ortogonalidade do método maior é o grau de estruturação nos cromatogramas. Contudo nem sempre a ortogonalidade gera as melhores resoluções cromatográfica. Trabalhos reportados na literatura tem provado que o ajuste da seletividade de ambas as dimensões é parte fundamental para resolver coeluições (62,63).

As fases estacionárias constituídas de 100%-polidimetilssiloxano e 5% fenil – 95% dimetilpolissiloxano são colunas ¹D (apolares) mais empregadas. Normalmente a seleção desta coluna é realizada com base na melhor separação dos analitos pelo método 1D-GC. Para a dimensão ²D, as colunas constituídas de contendo 35–50% fenileno associados com dimetilpolissiloxano, polietilenoglicol e cianopropil-fenil-dimetilpolissiloxano são as mais empregadas.

Os métodos GC × GC requerem o uso de detectores de alto desempenho. Os detectores devem apresentar alta taxa de aquisição de dados, alta sensibilidade e baixo volume interno (64).

O detector de ionização em chama (FID) é um dos detectores pioneiros mais utilizados nos métodos GC × GC (50). O FID é um detector que responde universalmente a uma grande faixa de moléculas orgânicas, apresenta frequência de aquisição de dados de até 200 Hz e resposta linear relativamente ampla (65). FID é um detector robusto com volume interno baixo o suficiente para minimizar a dispersão do sinal analítico e capaz de gerar picos extremamente finos com largura de base em torno de 50 ms (64).

A técnica GC × GC acoplada com a espectrometria de massas (MS) foi reportados mais tardiamente (66,67). Além da alta seletividade, os detectores MS podem gerar informações estruturais para a completa caracterização e identificação dos analitos. Nem todos os tipos de detectores MS são compatíveis com GC × GC em virtude da baixa frequência de aquisição de dados (68). Os analisadores do tipo tempo-de-voo (TOF-MS) mostrado bom desempenho e velocidade suficiente para a geração dos espectros para adequada reconstrução dos cromatogramas GC × GC.

1.2 Referências

- 1 Trujillo-Rodríguez, M.J.; Nan, H.; et al. Advances of Ionic Liquids in Analytical Chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 505–531, 2019.
- 2 Wilkes, J.S. A short history of ionic liquids—from molten salts to neoteric solvents. **Green Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 73–80, 2002.
- 3 Welton, T. Ionic liquids: a brief history. **Biophysical Reviews**, v. 10, n. 3, p. 691–706, 2018.
- 4 Anderson, J.L.; Armstrong, D.W.; et al. Ionic Liquids in Analytical Chemistry. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 9, p. 2892–2902, 2006.
- 5 Ho, T.D.; Zhang, C.; et al. Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Fundamentals, Advances, and Perspectives. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 262–285, 2014.
- 6 Abo-Hamad, A.; AlSaadi, M.A.; et al. Ionic Liquid-Carbon Nanomaterial Hybrids for Electrochemical Sensor Applications: a Review. **Electrochimica Acta**, v. 193, p. 321–343, 2016.
- 7 Mousavi, M.P.S.; Wilson, B.E.; et al. Ionic Liquids as Electrolytes for Electrochemical Double-Layer Capacitors: Structures that Optimize Specific Energy. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 5, p. 3396–3406, 2016.
- 8 Khoshroo, A Hosseinzadeh, L Sobhani-Nasab, A Rahimi-Nasrabadi, M Ahmadi, F. Silver nanofibers/ionic liquid nanocomposite based electrochemical sensor for detection of clonazepam via electrochemically amplified detection. **MICROCHEMICAL JOURNAL**, v. 118, p. 1185–1190, 2019.
- 9 Abdelhamid, H.N. Ionic liquids for mass spectrometry: Matrices, separation and microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 122–138, 2016.
- 10 Zhao, X.; Shen, S.; et al. Novel ionic liquid matrices for qualitative and quantitative detection of carbohydrates by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 985, p. 114–120, 2017.
- 11 García-Alvarez-Coque, M.C.; Ruiz-Angel, M.J.; et al. On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography. A review. **Analytica**

Chimica Acta, v. 883, p. 1–21, 2015.

12 Zhang, Y.; Yu, H.; et al. Imidazolium ionic liquids as mobile phase additives in reversed phase liquid chromatography for the determination of iodide and iodate. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 28, p. 7347–7355, 2018.

13 Flieger, J.; Feder-Kubis, J.; et al. Natural terpene derivatives as new structural task-specific ionic liquids to enhance the enantio recognition of acidic enantiomers on teicoplanin-based stationary phase by high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 11, p. 2374–2381, 2017.

14 Breitbach, Z.S.; Berthod, A.; et al. Mass spectrometric detection of trace anions: The evolution of paired-ion electrospray ionization (PIESI). **Mass Spectrometry Reviews**, v. 35, n. 2, p. 201–218, 2016.

15 Wang, Y.; Du, S.; et al. Sensitive analysis of N-blocked amino acids using high-performance liquid chromatography with paired ion electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 19, p. 4725–4735, 2018.

16 Nan, H.; Anderson, J.L. Ionic liquid stationary phases for multidimensional gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 367–379, 2018.

17 Shi, X.; Qiao, L.; et al. Recent development of ionic liquid stationary phases for liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1420, p. 1–15, 2015.

18 Nawala, J.; Dawidziuk, B.; et al. Applications of ionic liquids in analytical chemistry with a particular emphasis on their use in solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 18–36, 2018.

19 Berthod, A.; Ruiz-Ángel, M.J.; et al. Recent advances on ionic liquid uses in separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1559, p. 2–16, 2018.

20 Anderson, J.L.; Armstrong, D.W. High-Stability Ionic Liquids. A New Class of Stationary Phases for Gas Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 18, p. 4851–4858, 2003.

21 Weatherly, C.A.; Zhang, Y.; et al. Analysis of Long-Chain Unsaturated Fatty Acids by Ionic Liquid Gas Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 6, p. 1422–1432, 2016.

22 Hantao, L.W.; Toledo, B.R.; et al. Ionic Liquid Stationary Phases in Gas

Chromatography: Fundamentals, Recent Advances, and Perspectives. **Química Nova**, 2015.

23 Anderson, J.L.; Clark, K.D. Ionic liquids as tunable materials in (bio)analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 19, p. 4565–4566, 2018.

24 Zhang, Z.; Yang, M.J.; et al. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 17, p. 844A–853A, 1994.

25 Arthur, C.L.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990.

26 Piri-Moghadam, H.; Ahmadi, F.; et al. A critical review of solid phase microextraction for analysis of water samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 133–143, 2016.

27 Ulrich, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 167–194, 2000.

28 Kumar, A.; Gaurav; et al. A review on development of solid phase microextraction fibers by sol–gel methods and their applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 610, n. 1, p. 1–14, 2008.

29 Chen, J.; Pawliszyn, J.B. Solid Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 15, p. 2530–2533, 1995.

30 Eisert, R.; Pawliszyn, J. Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 16, p. 3140–3147, 1997.

31 Shamsayei, M.; Yamini, Y.; et al. Electrochemically controlled fiber-in-tube solid-phase microextraction method for the determination of trace amounts of antipsychotic drugs in biological samples. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 18, p. 3598–3606, 2018.

32 Costa Queiroz, M.E.; Donizeti de Souza, I.; et al. Current advances and applications of in-tube solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 111, p. 261–278, 2019.

33 Sajid, M.; Khaled Nazal, M.; et al. Solid Phase Microextraction: Apparatus, Sorbent Materials, and Application. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 271–

288, 2019.

34 Ying, L.-L.; Ma, Y.-C.; et al. Poly(glycidyl methacrylate) nanoparticle-coated capillary with oriented antibody immobilization for immunoaffinity in-tube solid phase microextraction: Preparation and characterization. **Journal of Chromatography A**, v. 1509, p. 1–8, 2017.

35 Moliner-Martínez, Y.; Prima-Garcia, H.; et al. Magnetic In-Tube Solid Phase Microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 16, p. 7233–7240, 2012.

36 Shamsayei, M.; Yamini, Y.; et al. On-line packed magnetic in-tube solid phase microextraction of acidic drugs such as naproxen and indomethacin by using Fe₃O₄@SiO₂@layered double hydroxide nanoparticles with high anion exchange capacity. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 3, p. 192, 2018.

37 Andrade, M.A.; Lanças, F.M. Determination of Ochratoxin A in wine by packed in-tube solid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1493, p. 41–48, 2017.

38 Chen, D.; Ding, J.; et al. A liquid chromatography–mass spectrometry method based on post column derivatization for automated analysis of urinary hexanal and heptanal. **Journal of Chromatography A**, v. 1493, p. 57–63, 2017.

39 Wu, F.; Wang, J.; et al. Detection of trans-fatty acids by high performance liquid chromatography coupled with in-tube solid-phase microextraction using hydrophobic polymeric monolith. **Journal of Chromatography B**, v. 1040, p. 214–221, 2017.

40 Wang, C.; Zhou, W.; et al. An etched polyether ether ketone tube covered with immobilized graphene oxide for online solid phase microextraction of quaternary alkaloids prior to their quantitation by HPLC-MS/MS. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 8, p. 2715–2721, 2017.

41 Wang, R.; Chen, Z. Boronate affinity monolithic column incorporated with graphene oxide for the in-tube solid-phase microextraction of glycoproteins. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 13, p. 2767–2773, 2018.

42 Toffoli, A.L. De; Fumes, B.H.; et al. Packed in-tube solid phase microextraction with graphene oxide supported on aminopropyl silica: Determination of target triazines in water samples. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 53, n. 7, p. 434–440, 2018.

43 Feng, J.; Wang, X.; et al. Poly(ionic liquids)-coated stainless-steel wires packed into a

polyether ether ketone tube for in-tube solid-phase microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 24, p. 4773–4779, 2017.

44 Shearrow, A.M.; Bhansali, S.; et al. Ionic liquid-mediated bis[(3-methyldimethoxysilyl)propyl] polypropylene oxide-based polar sol–gel coatings for capillary microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 36, p. 6349–6355, 2009.

45 Zhang, N.; Wan, X.; et al. Application of Octadecyl Ionic Liquid Hybrid Solid-phase Microextraction Monolithic Column in the Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Coffee. **CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES**, v. 38, n. 6, p. 1033–1039, 2017.

46 Inukai, T.; Kaji, S.; et al. Analysis of nicotine and cotinine in hair by on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as biomarkers of exposure to tobacco smoke. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 156, p. 272–277, 2018.

47 Prieto-Blanco, M.C.; Moliner-Martínez, Y.; et al. Ion-pair in-tube solid-phase microextraction and capillary liquid chromatography using a titania-based column: Application to the specific lauralkonium chloride determination in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1248, p. 55–59, 2012.

48 Campíns-Falcó, P.; Verdú-Andrés, J.; et al. In-tube solid-phase microextraction coupled by in valve mode to capillary LC-DAD: Improving detectability to multiresidue organic pollutants analysis in several whole waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2695–2702, 2010.

49 ADAHCHOUR, M.; BEENS, J.; et al. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC)☆III. Applications for petrochemicals and organohalogenes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 726–741, 2006.

50 Liu, Z.; Phillips, J.B. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography using an On-Column Thermal Modulator Interface. **Journal of Chromatographic Science**, v. 29, n. 6, p. 227–231, 1991.

51 Bahaghighat, H.D.; Freye, C.E.; et al. Recent advances in modulator technology for comprehensive two dimensional gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 379–391, 2019.

52 **Comprehensive Chromatography in Combination with Mass Spectrometry.** Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

- 53 Sharif, K.M.; Chin, S.-T.; et al. The microfluidic Deans switch: 50 years of progress, innovation and application. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 35–54, 2016.
- 54 Tranchida, P.Q.; Purcaro, G.; et al. Modulators for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 1437–1461, 2011.
- 55 Dymerski, T. Two-Dimensional Gas Chromatography Coupled With Mass Spectrometry in Food Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 252–278, 2018.
- 56 Edwards, M.; Mostafa, A.; et al. Modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography: 20 years of innovation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 8, p. 2335–2349, 2011.
- 57 Ledford, E.B., Termaat, J.R., & Billesbach, C.A. Zoex Technical Note KT030606-1.
- 58 Harynuk, J.; Górecki, T. New liquid nitrogen cryogenic modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1019, n. 1–2, p. 53–63, 2003.
- 59 Hantao, L.W.; Najafi, A.; et al. Tuning the Selectivity of Ionic Liquid Stationary Phases for Enhanced Separation of Nonpolar Analytes in Kerosene Using Multidimensional Gas Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 8, p. 3717–3721, 2014.
- 60 Hantao, L.W.; Toledo, B.R.; et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography combined to multivariate data analysis for detection of disease-resistant clones of Eucalyptus. **Talanta**, v. 116, p. 1079–1084, 2013.
- 61 Dallüge, J.; Beens, J.; et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 69–108, 2003.
- 62 Seeley, J. V.; Bates, C.T.; et al. Stationary phase selection and comprehensive two-dimensional gas chromatographic analysis of trace biodiesel in petroleum-based fuel. **Journal of Chromatography A**, v. 1226, p. 103–109, 2012.
- 63 Seeley, J. V.; Seeley, S.K. Multidimensional Gas Chromatography: Fundamental Advancements. Separation and Identification of Isomeric Hydrocarbons by Capillary Gas Chromatography and Hyphenated Spectrometric Techniques. *Pet. Coal* 2004, 46 (3), 1–

35. nces and New Applications. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 557–578, 2013.

64 Ong, R.C.Y.; Marriott, P.J. A Review of Basic Concepts in Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 40, n. 5, p. 276–291, 2002.

65 Mühlen, C. von; Khummueng, W.; et al. Detector technologies for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1909–1921, 2006.

66 Shellie, R.A.; Marriott, P.J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry analysis of *Pelargonium graveolens* essential oil using rapid scanning quadrupole mass spectrometry. **The Analyst**, v. 128, n. 7, p. 879, 2003.

Capítulo 2

Colunas capilares de tubo aberto contendo fase estacionária a base de
líquidos iônicos poliméricos para a determinação de
endocanabinóides em amostras de plasma de pacientes com Doença
de Parkinson

Capítulo 2

2.1 Introdução e justificativa

2.1.1 Doença de Parkinson e endocanabinóides

A Doença de Parkinson é considerada como uma complexa desordem neurológica bastante comum, que afeta cerca de dois por cento dos adultos com mais do que 65 anos de idade (69).

Esta doença é caracterizada por sintomas motores e não motores. Os sintomas motores incluem: tremor em repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural. Do ponto de vista biológico, esse grupo de sintomas é resultado da deficiência de dopamina no gânglio basal devido a morte de neurônios dopaminérgicos na substância *nigra pars compacta* (SNpc) (70). Já sintomas não motores incluem distúrbios do sono, alterações autonômicas, perda do olfato e alterações neuropsiquiátricas (71). Somado a estes sintomas, é bastante comum que pacientes que sofrem da doença de Parkinson apresentem anormalidades neuropsíquicas como perda cognitiva, delírios e alucinações (72).

Infelizmente, ainda não existe um tratamento específico para a cura definitiva da doença de Parkinson. Todavia, os pacientes fazem uso de fármacos dopaminérgicos, especialmente com a levodopa, para amenizar os sintomas motores. Estes fármacos não interrompem a progressão da doença e o uso prolongado deste fármaco está associado ao aparecimento das complicações motoras, que são as discinesias e as falhas no efeito sintomático motor (73).

A grande complexidade da doença de Parkinson está associada a dificuldade de fazer um diagnóstico definitivo nos estágios iniciais da doença. Este diagnóstico tem sido realizado pelo estudo do histórico médico do paciente e por exame físico, o qual busca detectar sinais e sintomas típicos desta doença (70).

Atualmente, vários estudos em andamento buscam detectar biomarcadores específicos para o diagnóstico precoce da doença de Parkinson (74). Entretanto, dada a complexidade da doença, estes estudos encontram-se em fases iniciais e sem a consolidação efetiva de um biomarcador específico suficiente capaz de detectar a doença com alto índice de exatidão.

Estudos promissores tem apontado os endocanabinóides como potenciais biomarcadores para a doença de Parkinson (75–79).

Os endocanabinóides são substâncias endógenas derivadas do ácido araquidônico. Essas moléculas se ligam aos receptores CB1 e CB2, agindo como agonistas. Os receptores CB1 são altamente abundantes no sistema nervoso central, nas terminações dos neurônios, participando da regulação da neurotransmissão (80). Os CB2 aparecem associados ao sistema imune periférico, aos neurônios do tronco cerebral e a micróglia (81). Os principais endocanabinóides são a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoglicerol (2-AG). Essas substâncias participam de diversas funções cerebrais, tais como memória, aprendizado e controle motor (82).

Estudos realizados em roedores e mamíferos mostraram que há um aumento do nível de endocanabinóides, principalmente AEA, em modelos de animais com parkinsonismo (75,76). No entanto, outros pesquisadores demonstraram o inverso, acreditando que a estimulação do sistema dopaminérgico causa diminuição nos níveis de endocanabinóides, contribuindo para o desenvolvimento de discinesias associadas ao tratamento medicamentoso da doença de Parkinson (77). Pisani et al. (78) comprovou que pacientes portadores da doença de Parkinson sem tratamento apresentaram aumento de AEA no líquido, contudo, quando em tratamento crônico com reposição de dopamina, os níveis voltaram ao normal.

Desta forma, a quantificação dessas moléculas no sistema biológico é importante para auxiliar estudos neste contexto.

Diferentes métodos analíticos tem sido reportados para a determinação de endocanabinóides em amostras de tecidos como cerebral, reprodutivo feminino (83) e principalmente nos fluidos biológicos incluindo plasma (84–90), fluido cefalorraquidiano (91,92), sangue (93,94), soro (86,95) e urina (86,96).

Os endocanabinóides não apresentam grupos cromóforos fluorescentes ou que absorvem na região do UV-vis (97). Por esta razão, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tem sido a metodologia de referência para a análise dessas substâncias nas matrizes biológicas (98,99).

Uma das grandes dificuldades associadas às determinações quantitativas advém da baixa concentração dos endocanabinóides em amostras biológicas bem como a complexidade dessas matrizes. Por esta razão, a etapa de preparo de amostras tem sido requerida no desenvolvimento dos métodos analíticos, para eliminar os interferentes e pré-concentrar os analitos, quase sempre presentes em níveis de traços.

Recentemente, Queiroz e colaboradores (80) publicaram um detalhado artigo de revisão reportando as diferentes técnicas de preparo de amostras utilizadas para determinação de endocanabinóides nas matrizes biológicas. Neste artigo de revisão, as vantagens e desvantagens de cada uma das técnicas apresentadas são discutidas em detalhes. Como conclusão, este artigo apontou as técnicas *online* de preparo de amostras como uma das tendências futuras para métodos cromatográficos.

As técnicas de preparo de amostra hifenadas em linha aos sistemas cromatográficos (89,90) tem demonstrado vantagens superiores quando comparado com as técnicas convencionais tais como a extração líquido-líquido (84), extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (85), extração em fase sólida (86–88). *Online*-SPME permite o completo acoplamento do preparo de amostra em linha com o HPLC, miniaturização e automatização da análise desde a extração à quantificação dos analitos. Desta forma, é possível reduzir significativamente o tempo de análise, aumentar a frequência analítica e obter resultados com maiores valores de exatidão, precisão, além de reduzir o consumo de amostra, solventes resíduos (32,100,101).

Fanelli et al (89) propôs um método *online*-SPME-HPLC-MS/MS para a determinação de endocanabinóides em amostras de plasma. Os autores utilizaram uma coluna comercial de extração empacotada com partículas de poliestireno divinilbenzeno para a extração e uma coluna C18 para a separação cromatográfica dos analitos. Para que o método *online*-SPME-HPLC-MS/MS atingisse os limites de quantificação desejado, as amostras de plasma passaram por um tratamento prévio. Este tratamento consistiu na precipitação das proteínas do plasma com acetonitrila seguido de ELL com uma solução ciclo-hexano:acetato de etila 1:1 (v/v).

Mais recentemente, Marchioni et al (90) propôs um outro método *online*-SPME-HPLC-MS/MS também para a análise de endocanabinóides em amostras de plasma. A inovação proposta neste trabalho foi a utilização de uma fase estacionária comercial híbrida RP-8 ADS (RAM, material de acesso restrito) para a extração dos analitos. Esta fase estacionária consiste em partículas de sílica gel esféricas (~25µm) com poros de aproximadamente 6 nm de diâmetro. A superfície interna dos poros é revestida com grupos hidrofóbicos (C8) e a superfície exterior das partículas é modificada com um recobrimento hidrofílico (grupos DIOL). Assim, os analitos são enriquecidos no interior dos poros ao passo que o recobrimento hidrofílico age como uma barreira de exclusão de macromoléculas da amostra. Devido a maior eficiência da extração dos analitos e exclusão dos compostos endógenos da matriz, o preparo prévio da amostra foi encurtado pela eliminação da etapa de ELL antes das análises *online*-SPME-HPLC-MS/MS.

Apesar de ambos os métodos *online*-SPME-HPLC-MS/MS discutidos anteriormente apresentarem exatidão, precisão e limites inferiores de quantificação adequados a necessidade de análise, uma limitação destes métodos é o uso de colunas empacotadas para a pré-concentração dos analitos, as quais requerem filtros para conter as partículas da fase estacionária. Estes filtros são meios propícios para a adsorção de macromoléculas da matriz, os quais aumentam a pressão do sistema analítico. Neste contexto, os métodos *online*-SPME, como por exemplo IT-SPME, podem ser alternativas interessantes.

2.1.2 Líquidos iônicos poliméricos como meios sorventes para as técnicas de microextração em fase sólida

Líquidos iônicos poliméricos (PIL) enquadram-se como uma subclasse dos líquidos iônicos que são obtidos pela polimerização de monômeros na presença de um agente iniciador adequado. Dependendo da aplicação, esta polimerização pode ser realizada com os monômeros “*in natura*” ou diluídos em solventes apropriados.

PIL também são classificados como polieletrólitos podendo ser subdivididos em policátions, poliânions ou polizwiteriônicos dependendo da unidade de repetição na estrutura do polímero (102). A Figura 2.5 ilustra alguns exemplos para cada uma dessas subclasses.

Figura 2.5 – Diferentes tipos de líquidos iônicos poliméricos.

Fonte: próprio autor.

Comparados com os IL, os PIL geralmente apresentam maior estabilidade química, física e térmica (1). Diante destas características, os PIL têm sido materiais atraentes para uso como sorventes nas microtécnicas de extração em fase sólida.

Os PIL têm exercido um papel importante no desenvolvimento de fases estacionárias extratoras para o preparo de amostra. Sem dúvida a técnica que sofreu impacto substancial com os benefícios dos PIL foi a SPME convencional. O desenvolvimento dos PIL representou um grande avanço e abriu uma nova era para esta técnica oferecendo sorventes estáveis capazes de suportar elevadas temperaturas, contato com solventes de diferente natureza e principalmente oferecendo uma nova gama de seletividade comparado aos sorventes comerciais tradicionais como polidimetilsiloxano (PDMS), carbowax® (CAR), divinilbenzeno (DVB) e poliacrilato (PA). Por esta razão, as inovações analíticas e o desenvolvimento de novos PIL tem se concentrado principalmente no preparo de fibras SPME.

A potencialidade das fases extratoras PIL, assim como os IL convencionais, advém da possibilidade na combinação de diferentes ânions, cátions ou ainda pela modificação/inserção de substituintes na estrutura do polímero permitindo a obtenção de materiais de diferentes polaridades, hidrofobicidades e viscosidades (103). Por exemplo, a inserção de longas cadeias alquílicas na estrutura do PIL pode favorecer interações dispersivas com analitos mais apolares, ao passo que a inserção de grupamentos aromáticos favorece interações π - π com analitos aromáticos. Já presença de substituintes como álcoois, aminas, cetonas ou éter favorecem interações de hidrogênio (22). Esta liberdade de ajuste das características de solvatação do polímero permitiu a obtenção de sorventes altamente seletivos para sorção de classes específicas de analitos.

A síntese de sorventes PIL geralmente é realizada na presença de agentes reticulantes. O agente reticulante (ou *crosslinker*) promove ligações intercruzadas entre as cadeias poliméricas aumentando a estabilidade do polímero formado. Os agentes reticulantes mais utilizados são monômeros dicatiônicos PIL como por exemplo $[(\text{VIM})_2\text{C}_{12}]_2[\text{Br}]$ (104) ou moléculas convencionais como etilenoglicoldimetacrilato (EGDMA), etilenodimetacrilato (EDMA), divinilbenzeno (DVB) e estireno (105–110).

O uso dos PILs como sorventes nas microtécnicas de extração normalmente requer a imobilização do sorvente em um suporte, geralmente no formato de fibra, discos ou capilares dependendo da técnica de preparo de amostra utilizada. Os tipos de imobilização mais comuns são os métodos físicos e os químicos.

A imobilização física é realizada pela simples deposição do PIL no suporte desejado. Neste caso a fixação do polímero na superfície do suporte pode ser auxiliada pelo uso de colas adesivas de silicone (110) ou poliacrilonitrila (111), por exemplo.

Patinha et al (110) copolimerizou brometo de 1-vinil-3-benzilimidazólio ([VBzIM][Br]) com estireno para a obtenção de uma fase extratora seletiva para compostos polares. Após a maceração do polímero, fibras de aço inoxidável foram mergulhadas em uma solução de cola de silicone:tolueno 50:50 (m/v) e em seguida mergulhadas nas partículas PIL (2 a 10 μm de diâmetro) para a sua fixação no suporte. Estas fibras apresentaram rápido equilíbrio de sorção (10 – 15 min) para a extração álcoois e aminas aromáticas via SPME (*headspace*).

Outro exemplo de imobilização física foi reportado por Zhang et al (111). Neste trabalho, o polímero foi obtido pela polimerização do cloreto de 1-etoxietil-3-(4-vinil-fenil)imidazólio ([VPhEtOEtIM][Cl]). A etapa de imobilização foi semelhante ao do trabalho discutido no parágrafo anterior, salvo exceção que as partículas foram fixadas no suporte metálico com cola adesiva a base de poliacrilonitrila (111). Estas fibras também foram avaliadas para a extração de aminas aromáticas via SPME (*headspace*) e apresentaram tempo de vida útil de 150 extrações.

Os filmes de fases estacionárias fisicamente depositados em suporte podem sofrer solubilização quando em contato direto com solventes. Por este motivo, a imobilização física normalmente tem sido reportada para o preparo de suportes SPME que operam em extrações no modo *headspace*.

A imobilização química foi criada para proporcionar maior estabilidade para as fases estacionárias imobilizadas em suporte. Os polímeros imobilizados quimicamente apresentam maior robustez, maior tempo de vida útil e suportam condições mais adversas de extração como por exemplo o contato direto com solventes de diferentes naturezas. A imobilização química tem sido realizada por diferentes metodologias a depender da natureza do suporte. De modo geral ela envolve a modificação química da superfície do suporte para a inserção de substituintes polimerizáveis, os quais servirão de pontos de ligação para o filme polimérico.

No trabalho publicado por Ho et al (112), fibras superplásticas de nitinol (NiTi, 127 μm d.i) foram oxidadas com solução de H_2O_2 e, em seguida, derivatizadas com viniltrimetoxissilano para a incorporação de substituintes vinílicos à superfície modificada das fibras. Na etapa seguinte, bis(trifluorosulfonil)imidato de 1-vinilbenzil-3-hexadecilimidazólio ([(VBz)C₁₆IM][NTf₂]) e dibrometo de 1,12-Di(3-vinilimidazólio)dodecano ([(VIM)₂C₁₂][2Br]) foram polimerizados na superfície das fibras. Este procedimento aumentou

significativamente a robustez do sorvente para a extração SPME de ftalatos por imersão direta em amostras de vinho e análise por GC-MS.

Uma estratégia diferente de imobilização química foi reportado por Feng et al (113). Neste trabalho, fibras metálicas foram recobertas com um filme fino de prata metálica. Em seguida, grupos tióis foram inseridos na superfície de prata. Então, os grupamentos tióis foram utilizados para ligar quimicamente o monômero hexafluorofosfato de 1-vinylbenzil-3-octilimidazolio ([VBz)C₈IM][PF₆]). O filme de prata na superfície das fibras aumentou a área superficial do suporte além de contribuir com o aumento da capacidade de sorção das fibras. Fibras metálicas modificadas com filme de ouro e derivatizadas com 3-(mercaptopropil)triethoxissilano foram reportadas com sucesso para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em amostras aquosas (114).

Em alguns casos o uso de suportes é desvantajoso, pois eles podem ser meios propícios para a adsorção de interferentes reduzindo a seletividade do método de extração. Neste contexto, fibras monolíticas foram desenvolvidas para SPME (105–107,115). Estas fases dispensam o uso de suporte uma vez que a fase estacionária é sintetizada no formato de um bloco único assumindo o formato e tamanho do molde utilizado. Outra vantagem das fibras monolíticas é em relação a maior quantidade de fase extratora disponível para extração quando comparado com as fases extratoras imobilizadas em suporte (116).

Uma fibra monolítica PIL foi sintetizada e utilizada para a extração de nitrofenóis em amostras aquosas por HPLC-DAD (107). A fase extratora foi sintetizada *in-situ* pela copolimerização bis(trifluorosulfonil)imidato de 1-alil-3-metilimidazolio ([AIMIM][NTf₂]) com DVB/EDMA. Capilares de sílica (0,5 mm di × 10 cm) foram utilizados como molde para dar o formato às fibras. As fibras obtidas apresentaram excelente estabilidade, elasticidade e área superficial de 25,2 m²g⁻¹. Durante o procedimento de extração, os autores utilizaram um feixe dessas fibras ao invés de utilizar fibras individuais. Esta variante da técnica SPME em fibra foi denominada pelos autores como MMF-SPME (“*multiple monolithic fiber solid-phase microextraction*”). Outros métodos analíticos utilizando MMF-SPME a base de PIL também foram reportadas para análises traço de hormônios esteroides em amostras de urina (105) e disruptores endócrinos em amostras de leite (106), água (115,117) e urina (117).

O trabalho publicado recentemente por Pacheco-Fernández et al (118) exemplifica um exemplo bastante interessante de seletividade diferenciada obtida para a fase extratora PIL. Sorventes PIL zwitteriônicos foram sintetizados e avaliados para a extração de ácidos graxos de cadeia curta em amostras de vinho por SPME em fibra. Diferentes fases poliméricas foram

preparadas combinando o agente reticulante bis[(trifluorometil)sulfonil]imidato de 1,12-Di(3-vinilimidazólio)dodecano ($[(\text{VIM})_2\text{C}_{12}]_2[\text{Br}]$) com o monômero zwiterionico 1-vinil-3-(nonanocarboxilato)imidazolio ($[\text{VIM}^+\text{C}_9\text{COO}^-]$). Outros monômeros tais como $[\text{VIM}^+\text{C}_3\text{COO}^-]$ e $[\text{VIM}^+\text{C}_5\text{COO}^-]$ também foram avaliados. Dentre os polímeros avaliados, aquele obtido pela combinação de $[(\text{VIM})_2\text{C}_{12}]_2[\text{Br}]$ com $[\text{VIM}^+\text{C}_9\text{COO}^-]$ foi o mais seletivo para a classe de compostos avaliados. Além disso, as fibras PIL apresentaram eficiência de extração superior quando comparado com as fibras comerciais CAR/PDMS e PA.

Ferreira et al (119) descreveram o procedimento de síntese do sorvente PIL de troca iônica para análise de antibióticos em amostras de leite por SPME-eletroforese capilar. A fibra foi sintetizada a partir da eletropolimerização do cloreto de 1-alil-3-metilimidazolio ($[\text{AlMIM}][\text{Br}]$) com ácido metacrílico na superfície de fibras metálicas. Em pH alcalino o mecanismo de extração se deu principalmente por troca iônica. O método validado apresentou limite de detecção de 70 ng mL^{-1} .

Embora haja um maior aporte de trabalhos relatando o uso de PIL para SPME em fibra, fases extratoras PIL também foram empregadas em outras técnicas SPME como, por exemplo, a extração sortiva em disco de agitação (SCSE, “stir cake sorptive extraction”) (108,109,120,121), microextração em fase solida dispersiva (SPME-dispersiva) (122–127) e *online*-SPME (43,124,128–130).

Em SCSE a fase extratora é confeccionada no formato de um disco monolítico. Para o processo de extração, este disco monolítico é mantido imerso na solução contendo os analitos sob constante agitação. Após o processo de extração o disco é transferido para uma solução contendo um solvente adequado e mantido sob agitação para a dessorção dos analitos (131).

Chen et al (109) sintetizaram uma fase extratora mista para a coextração de poluentes de caracteres ácido, básico e neutro em amostras de água por SCSE-HPLC-DAD. O polímero foi obtido pela copolimerização de trafluoroborato de 1-vinil-3-octilimidazolio ($[\text{VC}_8\text{IM}][\text{BF}_4]$) com uma mistura dos agentes reticulantes DVB e N,N-metilenobisacrilamida. Um cartucho de seringa foi utilizado como molde para a obtenção dos discos de extração. O sorvente obtido demonstrou a capacidade de estabelecer diferentes tipos de interações (π - π , ligação de hidrogênio e dipolo-dipolo) com os analitos. O método desenvolvido apresentou intervalo linear que variou de 0,25 a 200 ng mL^{-1} . Outros trabalhos empregando discos de extração confeccionados com PIL também foram obtidos a partir das combinações monômero/agente reticulante/solvente porogênico: bis[(trifluorometil)sulfonil]imidato de 1-alil-3-methylimidazolium ($[\text{AlMIM}][\text{NTf}_2]$)

/DVB/dimetilformamida (120), cloreto de 1-vinilbenzil-3-metillimidazolio ([VBzMIM][Cl])/DVB/dimetilsulfoxido (108), ([VBzMIM][Cl])/EGDMA/propanol:DMF (121).

Em SPME-dispersiva, partículas revestidas com a fase extratora são dispersas em uma solução aquosa contendo os analitos. Esta dispersão sólido-líquido permite com que o equilíbrio de sorção seja atingido rapidamente. Após a sorção dos analitos, as partículas são coletadas e dispersas em um solvente adequado para o processo de dessorção dos analitos extraídos. Sorventes PIL para SPME-dispersiva têm sido combinados com diferentes materiais tais como curcumbiturilas (122,123), macromoléculas (124) e materiais carbonáceos (125–127).

Zhou et al (123) sintetizaram um material macro/meso poroso pela complexação *in-situ* de 1-Vinyl-3-(carboxilato)imidazolio ([VIM⁺COO⁻]) com cálix[4]areno na superfície de partículas de Fe₃O₄. A presença deste núcleo metálico conferiu propriedades magnéticas às partículas da fase extratora facilitando o processo separação, coleta e transferência das mesmas.

Zhang et al (122) reportaram o uso de curcumbiturilas combinado com bis(trifluorometil)sulfonilimidato de 1-vinil-3-cianometilimidazólio ([VCMIM][NTf₂]) para a obtenção fase extratora seletiva para n-alquildióis. Foram obtidas partículas poliméricas extremamente porosas com área superficial específica de 350 m² g⁻¹ e 80% dos poros acessíveis para interação com os analitos.

Proteínas são as macromoléculas mais abundantes nos seres vivos. Muitas delas participam e regulam importantes processos metabólicos. Desta forma o desenvolvimento de métodos para extração e quantificação dessas macromoléculas nas matrizes biológicas são de extrema importância. Os sorventes PIL apresentam alta biocompatibilidade e têm sido reportados com sucesso para a extração, isolamento e enriquecimento de diversos tipos de proteínas (125–127).

Liu et al (125) relataram a síntese de partículas de grafeno embebidas em PIL. Este polímero foi polimerizado na superfície de partículas de sílicas pela polimerização de hexafluorofosfato de 1-vinil-3-etilimidazólio ([VC₂IM][PF₆]). Estas partículas apresentaram adequada seletividade para o enriquecimento da soroalbumina humana na presença de hemoglobina e proteínas do citocromo c. Outras partículas contendo fase extratora PIL combinada com materiais a base de grafeno foram reportados para a extração de glicoproteínas em amostras de soro humano (127), ovoalbumina em amostras de ovo de galinha (126) e DNA plasmídico em células de *E. coli* (132).

As técnicas de microextração em fase sólida para o preparo de amostra têm se direcionado para o acoplamento *online* aos sistemas analíticos de separação e identificação. Neste contexto, os sorventes PIL têm demonstrado excelente compatibilidade com a técnica *online*-SPME.

Dai et al (124) reportaram um método *online*-SPME-HPLC-DAD empregando a fase sorvente PIL para a análise de ácidos hidrobenczóicos em extratos vegetais. O polímero foi sintetizado com o uso de cloreto de 1-vinil-3-metilimidazólio [VMIM][Cl] combinado com esferas MCM-48 e EGDMA como agente reticulante. Este método apresentou boa exatidão, precisão e limites de quantificação que variaram de 7 a 40 ng mL⁻¹.

No trabalho publicado por Ferreira et al (130), o monômero zwitterionico 1-vinil-3-butilsulfonatoimidazólio ([VIM⁺C₄SO³⁻]) foi polimerizado na superfície de partículas de sílica. Em seguida, essas partículas foram empacotadas em microcolunas de aço e utilizada para a determinação do antibiótico ceftiofur em amostras de leite. As colunas PIL apresentaram elevada robustez e o método *online*-SPE-HPLC-MS/MS apresentou valores de recuperação variando de 70 a 130%. Colunas monolíticas a base de brometo de 1-vinil-3-hexilimidazólio ([VC₆IM][Br]) (129) e cloreto de 1-vinil-3-butyylimidazolio ([VC₄IM][Cl]) (128) também foram reportadas para a análise de esteroides (129) e hipertensivos (128) em amostras de plasma.

A Tabela 2.1 resume os trabalhos discutidos nesta seção.

Tabela 2.1 – Líquidos iônicos poliméricos como sorventes nas técnicas de preparo de amostras: microextração em fase sólida (SPME), microextração em fase sólida com múltiplas fibras monolíticas (MMF-SPME), microextração em fase sólida dispersiva (SPME-dispersiva), microextração sortiva em disco de agitação (SCSE) e online-SPME.

Técnica	Analito	Matriz	Sorvente	Suporte	Referência
SPME em fibra	Ácidos graxos de cadeia curta	Vinho	$[(\text{VIM})_2\text{C}_{12}]2[\text{Br}]^{\text{a}}$ $[\text{VIM}^+\text{C}_9\text{COO}^-]^{\text{b}}$	Fibra de NiTi	2019 (118)
SPME em fibra	Álcoois e compostos aromáticos	-	$[\text{VBzMIM}][\text{Br}]^{\text{c}}$	Fibra de Aço	2019 (110)
SPME em fibra	Aminas aromáticas	-	$[(\text{VPhEOEIM})[\text{Cl}]]^{\text{d}}$	Fibra de Aço	2019 (111)
SPME em fibra	oxitetraciclina	leite	$[\text{AlMIM}][\text{Br}]^{\text{e}}$	Fibra de Aço	2019 (119)
SPME em fibra	Disruptores endócrinos	Água	$[\text{NH}_2\text{C}_3\text{VBzIM}][\text{Cl}]^{\text{f}}$	Próprio polímero	2015 (115)
SPME em fibra	Ftalatos	Vinho	$[(\text{VIM})_2\text{C}_{12}]2[\text{Br}]^{\text{a}}$ $[\text{VBzC}_{16}\text{IM}][\text{NTf}_2]^{\text{g}}$	Fibra de NiTi	2014 (112)
SPME em fibra	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Água	$[\text{V}(\text{Et})_3\text{SiC}_3((\text{OH})_2\text{IM})][\text{Cl}]^{\text{h}}$	Aço modificado com filme de ouro	2012 (114)
SPME em fibra	Hidrocarbonetos aromáticos	Solo	$[\text{VC8IM}][\text{PF}_6]^{\text{i}}$	Aço modificado com filme de prata	2011 (113)
MMF-SPME	Disruptores endócrinos	Água e urina	$[(\text{CH})_3(\text{VBz})\text{N}][\text{Cl}]^{\text{j}}$	Próprio polímero	2017 (117)
MMF-SPME	Hormônios esteroides	Urina	$[\text{AlMIM}][\text{NTf}_2]^{\text{k}}$	Próprio polímero	2015 (105)
MMF-SPME	Disruptor endócrino	Leite e água	$[\text{AlMIM}][\text{NTf}_2]^{\text{k}}$	Próprio polímero	2015(106)

Continua na próxima página.

Continuação da Tabela 2.1

Técnica	Analito	Matriz	Sorvente	Suporte	Referência
SPME-dispersiva	Glicoproteína	Sangue	[VC8IM][Cl] ⁱ + Grafeno	Monolito	2014 (127)
MMF-SPME	Nitrofenóis	Água	[AlMIM][NTf ₂] ^k	Próprio polímero	2015 (107)
SPME-dispersiva	Ftalatos	Água, bebidas e soro humano	[VIM ⁺ COO ⁻] ^l + CC[4] ^m	Partículas magnéticas	2018 (123)
SPME-dispersiva	HSA	Sangue	[VC ₂ IM][PF ₆] ⁿ + Grafeno	Partículas de SiO ₂	2018 (125)
SPME-dispersiva	Ovoalbumina	Ovo	[VC ₂ IM][Br] ⁿ + Grafeno	Partículas de SiO ₂	2014 (126)
SPME-dispersiva	DNA plasmídico	células de cultura de <i>E. coli</i>	[VMOEIM][PF ₆] ^o	-	2014 (132)
SCSE	Fenóis, aminas aromáticas e parabenos	Água	[VC ₈ IM][BF ₄] ^p	-	2018 (109)
SCSE	Anti-helmínticos benzimidazólicos	Água, mel e leite	[AlMIM][NTf ₂] ^k	-	2014 (120)
SCSE	Parabenos e ânions inorgânicos (F ⁻ , Br ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ e SO ₄ ²⁻)	Sucos industrializados	[VBzMIM][Cl] ^c	-	2013 (108)
SCSE	F ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ and NO ₂ ⁻	Água	[AlMIM][Cl] ^k	-	2012 (121)
Online-SPME	Cetiofur	Leite	[VIM ⁺ C ₄ SO ₃ ⁻] ^q	Partículas de sílica	2018 (130)
Online-SPME	Esteróides	Plasma	[VC ₆ IM][Br] ^r	Monolito	2018 (129)

Continua na próxima página.

Continuação da Tabela 2.1

Técnica	Analito	Matriz	Sorvente	Suporte	Referência
Online-SPME	Ácidos hidrobenzóicos	Extratos vegetais	[VMIM][Cl] ^s + MCM-48 ^t	-	2017 (124)
Online-SPME	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Água	[VC ₈ IM][Br] ^u [(VIM) ₂ C ₆] ₂ [Br] ^v	Fibras de aço empacotadas em tubo PEEK	2017 (43)
Online-SPME	Anti-hipertensivos	Plasma	[VC ₄ IM][Cl] ^w	Monolito	2016 (128)

a: Dibrometo de 1,12-Di(3-vinylimidazólio)dodecano, **b:** 1-Vinil-3-(nonanocarboxilato)imidazolio, **c:** Brometo de 1-vinil-3-benzylimidazólio, **d:** Cloreto de 1-etoxietil-3-(4-vinil-fenil)imidazolio, **e:** Cloreto de 1-alil-3-metilimidazolio, **f:** Cloreto de 1-(3-aminopropil)-3-(4-vinilbenzil)imidazolio, **g:** Bis[(trifluorometil)sulfonil]imidato de 1-vinilbenzil-3-hexadecilimidazólio, **h:** Cloreto de 1-vinil-3-(3-trietoxisililpropil)-4,5-di-hidroimidazolio, **i:** Hexafluorofosfato de 1-vinil-3-octilimidazolio, **j:** Cloreto de 1-trimetil-(4-vinilbenzil) aminio, **k:** Bis[(trifluorometil)sulfonil]imidato de 1-alil-3-metilimidazolio, **l:** 1-Vinil-3-(carboxilato)imidazolio, **m:** Cálix[4]areno, **n:** Pentafluorofosfato de 1-vinil-3-etilimidazólio, **o:** Hexafluorofosfato 1-vinil-3-(2-metoxietil)imidazolio, **p:** Tetrafluoroborato de 1-vinil-3-octilimidazólio, **q:** 1-vinil-3-butilsulfonatoimidazólio, **r:** Brometo de 1-vinil-3-hexilimidazólio, **s:** Cloreto de 1-vinil-3-metilimidazólio, **t:** sílica mesoestruturada, **u:** Brometo de 1-vinil-3-octilimidazolio, **v:** Dibrometo de 1,6-bis(3-vinylimidazolio)hexano, **w:** Cloreto de 1-vinil-3-butilimidazolio.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar o método online IT-SPME-UHPLC-MS/MS para a determinação dos endocanabinóides, AEA e 2-AG, em amostras de plasma de pacientes com a Doença de Parkinson.

2.2.2 Objetivos específicos

- (i) Sintetizar e caracterizar monômeros de líquidos iônicos polimerizáveis
- (ii) Realizar a polimerização in-situ destes monômeros para o recobrimento (formação de um filme fino de fase estacionária) na superfície interna de capilares de sílica fundida.
- (iii) Avaliar os capilares sintetizados como sorvente para o método IT-SPME-UHPLC-MS/MS.
- (iv) Otimizar e validar o método IT-SPME-UHPLC-MS/MS para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de plasma de pacientes com Doença de Parkinson. Para o desenvolvimento deste método, PIL será avaliado como fase estacionária para a primeira dimensão do sistema e fase reversa na segunda dimensão.
- (v) Aplicar o método IT-SPME-UHPLC-MS/MS em amostras reais de plasma de pacientes com Doença de Parkinson.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Materiais

Os padrões analíticos AEA, AEA-d4, 2-AG e 2-AG-d5 foram adquiridos da Cayman Chemical (Michigan, USA), os quais foram comercializados em ampolas contendo 1 mL de solução na concentração de 1 mg mL^{-1} para os padrões convencionais e $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ para os padrões deuterados. A partir das soluções comerciais foram diluídas com acetonitrila para a obtenção de soluções estoques na concentração de 1000 ng mL^{-1} para cada analito. As soluções estoques permaneceram acetonitrila e armazenadas a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em frascos âmbar. Acetonitrila (ACN), diclorometano, clorofórmio, isopropanol, tolueno, hexano e ácido fórmico, todos grau HPLC, foram obtidos do fornecedor JT Baker (Phillipsburg, EUA). Hidróxido de sódio (NaOH, 98%), ácido clorídrico (HCl, 36,5-38%), viniltrimetoxissilano (VTMS, 98%), 1-vinilimidazol (98%), 1-bromo-hexadecano (98%), 1-cloro-hexano e 1,10-dibromodecane (97%), 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN, solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em tolueno) foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Capilares de sílica fundida ($530 \text{ } \mu\text{m}$ DI, $700 \text{ } \mu\text{m}$ DE) foram adquiridos da ISB (Rio Grande do Sul, Brasil). A água utilizada para preparar a fase móvel foi purificada em um sistema Milli-Q ($18\text{M}\Omega$) (Millipore, São Paulo, Brasil).

2.3.2 Síntese dos monômeros de líquidos iônicos polimerizáveis

a) Brometo de 1-hexadecil-3-vinilimidazólio

A síntese do brometo de 1-hexadecil-3-vinilimidazólio, $[\text{C}_{16}\text{VIM}][\text{Br}]$, foi realizada com base no trabalho descrito por Zhao et al.(133). Para a síntese deste monômero, $0,038 \text{ mols}$ ($3,566 \text{ g}$) de 1-bromo-hexadecano, $0,043 \text{ mols}$ ($13,511 \text{ g}$) de 1-vinilimidazol foram solubilizados em 30 mL de tolueno. Esta mistura foi transferida para um balão de fundo redondo e mantida por 36 h a $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação magnética constante. Decorrido o tempo de reação, o solvente de síntese foi evaporado e o resíduo remanescente foi solubilizado em 20

mL de água ultrapura. Cinco porções de 20 mL de diclorometano, triclorometano e hexano foram utilizadas para a purificação do produto. Posteriormente, a fase aquosa foi evaporada a 60 °C a 55 mBar em um rotoevaporador Buchi V-855 (Switzerland). O produto final, $[C_{16}VIM][Br]$, foi armazenado em dessecador sob abrigo de luz.

b) Cloreto de 1-hexil-3-vinilimidazólio

A síntese do cloreto de 1-hexadecil-3-vinilimidazólio, $[VC_6IM][Cl]$, foi realizada com o procedimento análogo ao $[VC_{16}IM][Br]$. Entretanto, neste caso, o solvente de síntese, a temperatura e tempo de reação foram 2-propanol, 60 °C e 16 h, respectivamente.

c) Dibrometo de 1,10-di(3-vinilimidazólio)decano

A síntese do monômero dicatiônico (agente reticulante) dibrometo de 1,10-di(3-vinilimidazólio)decano, $[(VIM)_2C_{10}]2[Br]$, foi realizada com base nos trabalhos descritos na literatura (104,134). Em um frasco de fundo redondo, foram misturados 0,010 mols (3,090 g) de 1,10-dibromodecano e 0,020 mols (1,880 g) de 1-vinilimidazol em 30 mL de 2-propanol. Esta mistura foi mantida, sob agitação constante, a 45 °C por 36 h. Após este período, os passos seguintes de purificação e isolamento do produto foram realizados de forma análoga aos procedimentos adotados para o $[VC_{16}IM][Br]$ (2.3.2a).

2.3.3 Preparo dos capilares

Antes da polimerização *in-situ*, os capilares de sílica fundida (11 cm x 530 µm D.I.) foram ativados, respectivamente, com NaOH 1 mol.L⁻¹, água, HCl 1 mol.L⁻¹ e água. Em seguida os capilares foram secos a 160 °C, sob fluxo de nitrogênio.

Posteriormente, os capilares foram preenchidos com uma solução de viniltrimetoxissilano. Ambas as extremidades foram seladas com septo de silicone e os

capilares foram mantidos a 70 °C por 5 horas para funcionalização da superfície interna. Este procedimento visou adicionar grupos polimerizáveis na superfície interna do capilar a fim de que se tornem pontos para a ligação covalente dos monômeros sintetizados.

2.3.4 Polimerização *in-situ*

A ancoragem covalente dos líquidos iônicos à superfície interna do capilar, previamente tratado, foi realizada com uma mistura reacional composta pelos monômeros monocatiônicos, dicatiônico (agente reticulante), AIBN (iniciador radical) e clorofórmio como solvente. Diferentes capilares foram sintetizados variando a proporções dos monômeros monocatiônicos e dicatiônico, Tabela 2.2. As misturas reacionais, Tabela 2.2, foram mantidas em banho de ultrassom por 10 minutos e degaseificadas em fluxo de nitrogênio por 3 minutos. Em seguida, os capilares foram preenchidos com estas misturas, vedados com septo de silicone e mantidos a 50° C por 24 h para a polimerização *in-situ*. Ao final da reação, os capilares foram lavados com etanol e água para limpeza e eliminação dos monômeros não polimerizados. Posteriormente, 0,5 cm de cada uma das extremidades do capilar foram cortados e descartados. O comprimento efetivo de cada capilar foi de 10 cm e os mesmos foram avaliados na eficiência da pré-concentração da AEA e 2-AG.

Tabela 2.2 - Composição da mistura reacional dos diferentes capilares sintetizados

Capilar	[C ₆ VIM][Cl] (g; mmol)	[C ₁₆ VIM][Br] (g; mmol)	[(VIM) ₂ C ₁₀] ₂ [Br] (g; mmol)	AIBN * (μL; mmol)	Clorofórmio (mL)
C6	0,300; 1,16	0; 0	0,150; 0,307	90; 0,018	4,00
C6C16	0,150; 0,579	0,150; 0,376	0,150; 0,307	80; 0,016	4,00
C16	0; 0	0,300; 0,751	0,150; 0,307	70; 0,014	4,00

* solução comercial a 0,2 mol L⁻¹.

2.3.5 Caracterização morfológica e estrutural das fases poliméricas

a) Caracterização dos monômeros

(I) Infusão direta ESI/MS

Um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo Xevo® TQ-D (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado com fonte Z-spray foi utilizado para a aquisição dos espectros de massas de cada um dos produtos sintetizados. Após a etapa de purificação, os produtos obtidos foram solubilizados, individualmente, numa solução metanol:água (7:3, v/v) resultando em concentração final de 50 ng mL⁻¹. Estas soluções foram infundidas no espectrofotômetro a um fluxo de 10 µL min⁻¹ para aquisição dos espectros. Os parâmetros de operação da fonte de ionização foram: voltagem do capilar, 2,50 kV; voltagem do cone, 40 V; temperatura de dessolvatação, 200 °C, fluxo do gás de dessolvatação, 700 L hr⁻¹ (N₂, 99,9% de pureza); fluxo do gás do cone, 150 L hr⁻¹ (N₂, 99,9% de pureza). Os espectros de massas em modo positivo foram adquiridos varrendo a região compreendida entre 100 e 500 *m/z*. Os dados dos espectros foram salvos no formato “*continuum*”.

(II) Ressonância magnética nuclear de hidrogênio RMN ¹H

Os espectros RMN de ¹H foram adquiridos num equipamento BrukerAvance DRX-500 operado a 500,13 MHz. Clorofórmio deuterado (CDCl₃) e dimetilssufóxido (DMSO) foram utilizados como solventes para solubilização dos monômeros obtidos e aquisição dos dados.

b) Caracterização dos capilares

(I) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O aspecto morfológico do recobrimento polimérico da superfície interna dos capilares foi examinado por MEV. Para estas análises, os capilares foram cortados, perpendicularmente

ao eixo do seu comprimento. O corte transversal nos capilares foi realizado com o auxílio de um cortador de coluna cromatográfica capilar. Os segmentos de capilares foram dispostos na posição vertical e recobertos com ouro por 180 s em equipamento Bal-Tec SCD050 Sputter (Fürstentum Liechtenstein). Posteriormente os segmentos de capilar metalizados foram analisados em um microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO 50 (Cambridge UK). As micrografias foram adquiridas a uma voltagem de 20,00 kV e resolução nominal de 30 nm.

2.3.6 Amostras biológicas

As amostras de plasma utilizadas na validação analítica do método em estudo, com sorologia negativa para hepatite B e C, HIV, chagas, HTLV I/II, TGP e sífilis, foram cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP – USP). Estas amostras de plasma enriquecidas com os analitos foram utilizadas para otimização e validação do método IT-SPME-LC-MS/MS.

Para avaliar a aplicabilidade do método, amostras de plasma foram coletadas de pacientes com doença de Parkinson acompanhados no Ambulatório de Doenças Extrapiramidais e Neurologia Comportamental do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto sob responsabilidade do Prof. Dr. Vitor Tumas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Seis amostras foram analisadas pelo método desenvolvido neste projeto. Estas amostras foram obtidas a partir de sangue coletado por punção venosa, em tubos contendo anticoagulantes, EDTA ou fluoreto, centrifugado até 2 horas após a coleta e armazenadas a -80 °C. A coleta destas amostras biológicas foi aprovada pelo Comitê e Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, com concordância do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (ver ANEXO B).

2.3.7 Tratamento prévio da amostra

As proteínas do plasma foram precipitadas com acetonitrila na proporção plasma:acetonitrila (1:2, v/v). Após a adição do agente precipitante, a mistura (plasma+acetonitrila) foi agitada em vortex (3000 rpm, 1 min) e centrifugadas a 9000 rpm por

10 min a 15 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de polietileno do tipo eppendorf® e evaporado em dessecador a vácuo. O extrato seco foi ressuscitado em 100 µL de solução acetato de amônio pH 7,0 (5×10^{-3} mol L⁻¹):acetonitrila (9:1, v/v) e 80 µL desta solução foram injetados no sistema cromatográfico. Diferentes volumes de plasma (100, 200, 300 e 400) µL foram avaliados durante o processo de precipitação de proteínas.

2.3.8 Condições espectrométricas

As condições espectrométricas utilizadas foram baseadas em trabalhos já publicados (90) por nosso grupo de pesquisa. As análises foram realizadas num cromatógrafo em fase líquida Waters ACQUITY UPLC H-Class acoplado a espectrometria de massas em sequencial Xevo® TQ-D tandem quadrupole (Waters Corporation, Milford, 122 MA, USA) equipado com a fonte Z-spray. A separação cromatográfica dos analitos foi realizada em uma coluna core-shell Kinetex C18 column (Phenomenex®, USA, 100 mm x 2.1 mm x 1.7 µm), a 40 °C, modo de eluição isocrático e fluxo de 0,3 mL min⁻¹. A fase móvel da separação cromatográfica consistiu em uma mistura de (A) solução aquosa água contendo 0,5% de ácido fórmico e (B) acetonitrila contendo 0,5% de ácido fórmico; sendo a proporção A:B de (30:70, v/v). As análises foram realizadas no Modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) com a fonte operando em modo positivo (ESI⁺). Os demais parâmetros de operação da fonte foram: voltagem do capilar, 3,20 kV; temperatura da fonte, 150 °C; temperatura de dessolvatação, 350 °C e fluxo do gás de dessolvatação de 700 L h⁻¹ (N₂, com pureza de 99.9%). Argônio (pureza de 99.9999%) foi utilizado como gás de colisão. O dwell time foi estabelecido automaticamente para cada transição. Os íons produto de quantificação e confirmação, a energia do cone e energia de colisão foram otimizadas no modo automático do equipamento via IntelliStart software. Os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 2.3. Todos os dados foram adquiridos utilizando o software MassLynxV4.1.

Tabela 2.3 - Transições MS/MS (SRM), voltagem do cone (DP), energia de colisão (CE) e tempo de retenção (t_R) dos endocanabinóides estudados

Analito	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	DP (V)	CE (eV)	Íon de confirmação (m/z)	t_R (min)
AEA	348,35	61,82	14	18	90,81	7,94
2-AG	379,29	286,99	24	14	90,82	8,65
AEA-d4	352,41	65,91	26	18	47,84	7,94
2-AG-d5	384,35	286,99	28	16	90,81	8,65

2.3.9 Configuração do sistema para otimização do método IT-SPME-LC-MS/MS

A coluna capilar contendo a fase estacionária a base de líquidos iônicos polimerizáveis foi instalada na dimensão 1D (com a bomba quaternária responsável por manter a vazão da fase móvel nesta dimensão) e a coluna analítica na 2D (com a bomba binária responsável por manter a vazão da fase móvel nesta dimensão). Ambas as dimensões foram conectadas na válvula de injeção de 6 pórticos do sistema UHPLC-MS/MS, Figura 2.6.

A otimização dos parâmetros do método IT-SPME-LC-MS/MS foi realizada em etapas conforme descrito no Quadro 2.1. Esta otimização iniciou-se com a montagem simples da coluna capilar na dimensão 1D e prosseguiu até a obtenção da configuração completa descrita no parágrafo anterior e ilustrada na Figura 2.6.

Figura 2.6 - Configuração do sistema IT-SPME-LC-MS/MS

Fonte: Próprio autor.

Quadro 2.1 - Etapas contendo a sequência dos parâmetros na otimização do método IT-SPME-LC-MS/MS

Etapa	Parâmetros avaliados	Arranjo instrumental	Amostra injetada
1	(i) pH da amostra (4,0; 7,0; e 9,0); (ii) Composição (20 a 100 % de acetonitrila) da fase móvel para a sorção e dessorção dos analitos foram avaliados; (iii) Vazão da fase móvel (0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 $\mu\text{L min}^{-1}$);		Amostra aquosa enriquecida com AEA e 2-AG (100 ng mL ⁻¹)
2	(iv) Tempo de exclusão das macromoléculas da amostra do plasma;		Amostra de plasma
3	(v) Tempo de acoplamento e desacoplamento das dimensões 1D e 2D;		Amostra de plasma enriquecida com AEA e 2-AG (100 ng mL ⁻¹)
4	(vi) Separação cromatográfica (2D, bomba binária); (vii) Volume de amostra ressuspensa e injetada no sistema cromatográfico (10 a 90 μL); (viii) Regeneração da coluna (1D, bomba quaternária).		Amostra de plasma enriquecida com AEA e 2-AG (100 ng mL ⁻¹)

a) Etapa 1 (variáveis avaliadas: pH da amostra, composição da solução de dessorção e fluxo de preconcentração dos analitos)

A sorção e dessorção dos analitos junto à coluna capilar foram avaliados utilizando o seguinte arranjo instrumental: bomba quaternária e entrada da coluna capilar conectados nas saídas 1 e 2, respectivamente, da válvula de 6 pórticos e a saída da coluna capilar foi direcionada para o espectrômetro de massas. Com este arranjo instrumental, o pH da amostra, composição e vazão da fase móvel para a sorção e dessorção dos analitos foram avaliados. Para os ensaios desta etapa 1 foi utilizada uma solução de trabalho contendo AEA e 2-AG na concentração de 100 ng mL^{-1} (em acetonitrila).

Quanto aos ensaios para avaliar o melhor pH de sorção dos analitos, $100 \mu\text{L}$ da solução de trabalho foram evaporados e, o extrato seco, reconstituído com soluções apresentando diferentes valores de pH. Soluções de acetato de amônio pH 4,0 (ajustada com ácido fórmico), acetato de amônio pH 7,0 e 9,0 (ajustadas com hidróxido de amônio), todas preparadas na concentração de $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foram avaliadas. Após reconstituição do extrato seco, $10 \mu\text{L}$ das soluções foram injetados individualmente na coluna capilar via UHPLC-MS/MS. Posteriormente, a fase móvel constituída de 100% de água percolou pela coluna capilar durante 6 min a uma vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. Após decorrido este período, a composição da fase móvel foi alterada para 100% de acetonitrila (contendo 0,5% de ácido fórmico) promovendo a dessorção dos analitos retidos no capilar e o direcionamento dos mesmos para o espectrômetro de massas.

Os ensaios que objetivavam avaliar a melhor composição da fase móvel para dessorção dos analitos foram realizados em seguida. Neste experimento, $100 \mu\text{L}$ da solução de trabalho foram evaporados e, o extrato seco, reconstituído com uma solução acetato de amônio pH 7, 0:acetonitrila (90:10, v/v). Dez microlitros desta solução reconstituída foram injetados no sistema cromatográfico. Após injeção, a bomba quaternária manteve uma vazão de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ de água na coluna capilar durante 6 min para a preconcentração dos analitos. Transcorrido este período, a fase móvel constituída de A (água) e B (acetonitrila com 0,5% de ácido fórmico) promoveu a dessorção dos compostos retidos no capilar e direcionou-os para o espectrômetro de massas. Diferentes proporções de A:B (variando de 20 a 100% a proporção de B) foram avaliadas para a dessorção da AEA e 2-AG.

Após os testes de otimização da composição da fase móvel para a sorção dos analitos na coluna capilar descritos no parágrafo anterior, diferentes vazões (na faixa de 0,1 a 0,4 mL

min^{-1}) na dimensão 1D foram avaliadas para a preconcentração efetiva da AEA e 2-AG. A fase móvel constituída de 100% de A foi utilizada durante o estágio preconcentração e A:B (30:70, v/v) durante o estágio de eluição.

b) Etapa 2 (Tempo de exclusão das macromoléculas da amostra do plasma)

Na etapa 2, a capacidade de exclusão das macromoléculas da amostra de plasma foi avaliada. O arranjo instrumental utilizado foi idêntico ao da etapa 1, com exceção do fato de que a saída da coluna capilar foi direcionada para detector de arranjo de diodos (DAD) ao invés do espectrômetro de massas. Para estes ensaios, foram utilizados 200 μL de plasma enriquecidos com AEA e 2-AG na concentração de 100 ng mL^{-1} .

Dez microlitros da solução resultante do tratamento prévio do plasma (consultar item 2.3.7) foram injetados no sistema cromatográfico. Imediatamente após injeção, a bomba quaternária manteve uma vazão de 0,3 mL min^{-1} de água na coluna capilar durante 6 min. Decorrido este período, a composição da fase móvel mudou para água:acetonitrila acidificada com 0,5% de ácido fórmico (30:70, v/v) para verificar alguma possível retenção de macromoléculas junto a coluna capilar. Todo efluente do capilar foi analisado pelo DAD no comprimento de onda de 280 nm.

c) Etapa 3 (tempo de acoplamento e desacoplamento das dimensões 1D e 2D)

Na etapa 3, o tempo de acoplamento e desacoplamento das dimensões 1D e 2D foi avaliado. O seguinte arranjo instrumental foi utilizado: bomba quaternária conectada na saída 1 da válvula de 6 pórticos, bomba binária na saída 3, coluna capilar nas saídas 2 e 5 e uma conexão de volume morto (em substituição à coluna cromatográfica) em 2D na saída 4. Todo efluente da dimensão 2D foi analisado pelo espectrômetro de massas. Para estes ensaios, foram utilizados 200 μL de plasma enriquecidos com AEA e 2-AG na concentração de 100 ng mL^{-1} .

Dez microlitros da solução resultante do tratamento prévio do plasma (consultar item 2.3.7) foram injetados no sistema cromatográfico. A corrida cromatográfica deu início ($t = 0$ min) imediatamente após a injeção da amostra, a qual foi realizada com as duas colunas

desacopladas (válvula de seis pórticos na Posição 1). Nesta posição, a bomba quaternária manteve a vazão de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ da fase móvel (constituída de 100% água) na dimensão 1D. Já a bomba binária manteve esta mesma vazão na dimensão 2D, porém fazendo uso da fase móvel constituída de água:acetonitrila acidificada com 0,5% de ácido fórmico (30:70, v/v). Após o estágio de preconcentração dos analitos e exclusão das macromoléculas, as duas dimensões foram acopladas (válvula de seis pórticos na Posição 2). Nesta posição, a fase móvel da dimensão 2D foi direcionada primeiramente para a coluna capilar promovendo dessorção dos analitos e transferindo-os para dimensão 2D. Na Posição 2, o fluxo emergente da bomba quaternária foi direcionado para o descarte. Diferentes tempos de acoplamento e desacoplamento foram avaliados.

d) Etapa 4 (volume de amostra reconstituída injetada no sistema cromatográfico, separação cromatográfica e regeneração do capilar)

Na etapa 4 foram avaliados: a separação cromatográfica, o volume de amostra reconstituída e injetada no sistema cromatográfico e a regeneração da coluna capilar. O arranjo instrumental utilizado foi idêntico ao da etapa 1, com exceção do fato de que a conexão de volume morto instalada na dimensão 2D foi substituída pela coluna analítica core-shell Kinetex C18 column (Phenomenex®, USA, 100 mm x 2.1 mm x 1.7 μm).

Dez microlitros da solução resultante do tratamento prévio do plasma (consultar item 2.3.7) foram injetados no sistema cromatográfico. A preconcentração dos analitos e exclusão das macromoléculas foram realizados entre os tempos $t = 0$ a 4 min, dessorção dos analitos de $t = 4$ a 6 min e separação cromatográfica de $t = 6$ a 9 min.

Prosseguindo a otimização do método, múltiplos ciclos (variando de 1 a 8) de injeção da solução resultante do tratamento prévio do plasma (consultar item 2.3.7) foram avaliados para injeção no sistema cromatográfico. Uma vez que cada ciclo de injeção corresponde a um volume de 10 μL , o volume total de amostra injetada foi avaliado no intervalo de 10 a 80 μL .

A otimização da regeneração da coluna capilar em 1D foi realizada concomitantemente à separação cromatográfica dos analitos em 2D. Para a limpeza intercorrida, diferentes proporções da fase móvel água:acetonitrila foram avaliadas.

2.3.10 Capacidade de sorção (Q) dos capilares

A saturação do capilar foi avaliada utilizando soluções dos analitos (AEA e 2-AG) em diferentes concentrações (10, 40, 70, 100, 130, 160, 190 e 220 ng mL⁻¹). Dessas soluções, 8 ciclos de 10 µL foram injetadas no sistema cromatográfico. Todas as injeções foram realizadas utilizando o mesmo capilar na dimensão 1D e os resultados obtidos foram plotados num gráfico *Concentração x Área do pico cromatográfico*. Neste gráfico foram traçadas retas de regressão da faixa linear (0-100 ng mL⁻¹ para AEA e 0-130 ng mL⁻¹ para 2-AG) e também do platô de saturação, para cada analito. A capacidade sortiva (Q) do capilar foi calculada individualmente para cada analito utilizando a equação 2.1. Esta equação foi obtida igualando os valores de y em ambas as equações de reta, chegando então a concentração de saturação (C_s) do capilar, Anexo A. No gráfico, o valor de C* (2,16x10⁻⁴ cm³) foi estimado com base na espessura (1,3 µm) do filme de IL formado, diâmetro interno (530 µm) e comprimento do segmento do capilar (5 cm) do capilar de sílica.

$$Q = \left(\frac{a_2}{b_1 - b_2} \right) \frac{V}{C} \quad \text{equação 2.1}$$

b₁: inclinação da reta de regressão entre a faixa de resposta linear do capilar para a sorção dos analitos;

b₂ e a₂ a inclinação e o intercepto, respectivamente, da reta de regressão entre os pontos observados fora do intervalo de resposta linear;

V: volume de injeção no sistema cromatográfico;

C: quantidade (volume) de fase sortiva imobilizada no capilar

2.3.11 Fator de enriquecimento

O fator de enriquecimento (FE) foi calculado pela razão entre a quantidade de analitos extraídos no capilar (C_{ext}) e a quantidade total de analitos (C_i) injetado no sistema

* Para a estimativa da espessura do filme assumiu-se a formação de um filme de espessura homogênea por toda a extensão do capilar. Este cálculo foi realizado fazendo a diferença entre o volume do capilar vazio e o volume do cilindro oco formado após a polimerização da fase sorvente. A espessura média do filme polimérico foi determinado com base nas imagens MEV (Figura 2.11)

cromatográfico. C_i foi determinado utilizando o método UHPLC-MS/MS e C_{ext} foi determinado utilizando o método IT-SPME-UHPLC-MS/MS.

2.3.12 Validação analítica do método IT-SPME-LC-MS/MS

A validação analítica do método LC-MS/MS *column switching* foi realizada segundo normas preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - RESOLUÇÃO RDC Nº 27, DE 17 de maio de 2012 e RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 (135,136). Os parâmetros de validação analítica (linearidade, limites de quantificação, precisão intra e interensaio, exatidão intra e interensaio, seletividade, efeito residual e efeito de matriz) foram avaliados com amostras de plasma enriquecidas com os padrões internos deuterados e analitos em diferentes concentrações.

2-AG foi quantificado em todos os ensaios analíticos desta tese como concentração total de 2-AG pela soma dos picos cromatográficos do 2-AG e 1-AG. Esta metodologia foi adotada com base em trabalhos prévios já publicados na literatura (137–140), os quais reportam a isomerização de 2-AG para 1-AG como um fenômeno espontâneo que ocorre durante o processamento e análise das amostras biológicas.

a) Curvas de calibração

As curvas de calibração, sendo uma para cada analito, foram plotadas no intervalo de 0,10-1,00 ng mL⁻¹ (para AEA) e 0,05-1,00 ng mL⁻¹ (para 2-AG). Tais curvas foram geradas em quintuplicata, em seis concentrações diferentes e plotando a razão entre as áreas (analito/Padrão interno) em função da concentração plasmática de cada fármaco. Uma vez que os analitos são compostos endógenos da matriz, 10 amostras branco foram analisadas e o valor médio da concentração de AEA e 2-AG foi subtraído das curvas de calibração (87,89,90).

As curvas de calibração foram aprovadas para as análises quantitativas, quando os valores de erro padrão relativo (EPR, equação 2.2) e coeficiente de variação (CV, equação 2.3), do calibrador correspondente à concentração nominal do limite inferior de quantificação (LIQ) apresentou valor menor ou igual a 20% e quando o DPR foi menor do que 15% em relação à

concentração nominal para os outros calibradores, incluindo o limite superior de quantificação (LSQ).

b) Precisão

A precisão foi determinada em ensaios conduzidos no mesmo dia (precisão intradia) e em ensaios conduzidos em três dias consecutivos (precisão interdia). Cada experimento foi realizado em quintuplicata em cinco concentrações diferentes: limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM), controle de qualidade alto (CQA) e limite superior de quantificação (LSQ). Segundo preconização pelas normas da ANVISA (135), os valores de CV não devem exceder em 15% para os controles de qualidade, exceto para o LIQ que não deve exceder em 20%.

$$CV = [(\text{Desvio padrão})/(\text{Conc. média experimental})] \times 100 \quad \text{equação 2.3}$$

c) Exatidão

A exatidão foi determinada em ensaios conduzidos no mesmo dia (exatidão intraensaio) e em ensaios conduzidos em três dias consecutivos (exatidão interensaio). A exatidão, expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), equação 2.4, foi avaliada em quintuplicata para o CQB, CQM e CQA; sendo que não foram admitidos valores fora da faixa de $-15\% \leq \text{EPR} \leq +15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitiu valores fora da faixa de $-20\% \leq \text{EPR} \leq +20\%$ do valor nominal.

$$\text{EPR} = [(\text{Conc. média experimental} - \text{Valor nominal})/(\text{Valor nominal})] \times 100 \quad \text{equação 2.4}$$

d) Efeito residual

A avaliação do efeito residual foi realizada com três injeções de uma amostra aquosa, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra processada no LSQ. Segundo normas da ANVISA, os picos interferentes, nos tempos de retenção dos analitos, devem possuir valores de área inferiores a 20% (vinte por cento) das áreas correspondentes ao LIQ e inferior a 5% das áreas apresentadas pelos PI.

e) Efeito matriz

O efeito matriz foi determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares de seis curvas calibração, construídas em plasma enriquecido com os analitos, e em três curvas analíticas construídas em solução aquosa. As curvas foram construídas utilizando a mesma faixa linear adotada para os ensaios de linearidade. O paralelismo das retas foi avaliado empregando o Teste-t, a nível de significância de 0,05.

f) Seletividade

Foi avaliada a seletividade do método frente aos compostos endógenos da matriz. Estes ensaios foram conduzidos com os padrões internos deuterados visto que os analitos são compostos endógenos da matriz e não sendo possível obter uma matriz branco. Os cromatogramas das amostras enriquecidas foram comparados com os cromatogramas obtidos das amostras plasma branco para PI.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Síntese e caracterização dos monômeros de líquido iônico polimerizáveis

Os líquidos iônicos foram preparados a partir dos precursores: 1-vinilimidazol e o haleto de alquila correspondente: 1-bromo-hexadecano, 1-cloro-hexano e 1,10-dibromodecano. A rota sintética utilizada para preparar os monômeros de líquido iônico polimerizáveis está ilustrada na Figura 2.7. Em todos os casos a reação se processa via mecanismo S_N2 . Nesta reação, o anel imidazólico comporta-se como nucleófilo e ataca o centro eletrofílico da cadeia carbônica promovendo a saída do halogênio, neste caso o bromo ou cloro.

Figura 2.7 – Síntese dos monômeros dos líquidos iônicos polimerizáveis a) cloreto de 1-hexadecil-3-vinilimidazólio, b) brometo de 1-hexadecil-3-vinilimidazólio e c) dibrometo de 1,10-di(3-vinilimidazolio)decano

Fonte: Próprio autor.

O grupo vinílico dos monômeros são bastante sensíveis tanto a luz quanto à exposição a calor excessivo, e por isso, sua síntese requer uma série de cuidados. Assim, a otimização de parâmetros tais como (b) solvente de solubilização dos reagentes, (c) temperatura de síntese e (d) tempo de reação foi importante para evitar a polimerização precoce dos monômeros.

Na síntese do $[\text{C}_{16}\text{VIM}][\text{Br}]$ e $[\text{C}_6\text{VIM}][\text{Cl}]$, os reagentes de partida 1-vinilimidazol:haleto de alquila foram utilizados na proporção molar de 1:1,13. Um leve excesso

do haleto de alquila foi adotado como estratégia afim de facilitar a etapa de purificação dos produtos obtidos. Já na síntese do $[(\text{VIM})_2\text{C}_{10}]2[\text{Br}]$, a proporção molar foi de 2:1 visto que 2 moléculas de 1-vinilimidazol são necessárias para a substituição do bromo em ambas as extremidades da cadeia alifática do 1,10-dibromodecano.

Durante os procedimentos de otimização das sínteses, dois solventes foram avaliados: tolueno e 2-propanol. Quando comparado com tolueno, o uso do 2-propanol resultou na formação de produtos com maior grau de pureza. Além disso, a maior volatilidade deste solvente facilitou sua completa eliminação evaporação do meio reacional ao final das reações. Desta forma, este solvente foi selecionado para a síntese do $[\text{C}_6\text{VIM}][\text{Cl}]$ e $[(\text{VIM})_2\text{C}_{10}]2[\text{Br}]$. Já para $[\text{C}_{16}\text{VIM}][\text{Br}]$, tolueno foi selecionado como solvente de síntese por solubilizar melhor dos reagentes de partida.

A etapa seguinte consistiu na otimização da temperatura e tempo de reação. Estes dois parâmetros foram avaliados concomitantemente. Com o uso de temperaturas mais elevadas (110 °C, 16 h) observou-se a formação de um precipitado de coloração escura, indicando a polimerização precoce dos monômeros. De modo geral, menor temperatura e tempo de reação mais longo garantiu melhores resultados de síntese quando comparado com o uso de temperaturas mais elevadas e tempos de reação curtos. Para o monômero $[\text{C}_6\text{VIM}][\text{Br}]$ a temperatura e tempo de reação ótimos foram 60 °C e 16 h. Já os monômeros $[\text{C}_6\text{VIM}][\text{Cl}]$ e $[(\text{VIM})_2\text{C}_{10}]2[\text{Br}]$, a condição ótima de síntese foi obtida a 45 °C e 36 h. Nas reações processadas acima das temperaturas dos valores ótimos selecionados, foi observado a degradação térmica e/ou polimerização precoce dos produtos, Figura 2.8. Em contrapartida, nas reações realizadas abaixo desses valores, a síntese foi incompleta.

Figura 2.8 – Produtos brutos de síntese, $[C_{16}VIM][Br]$, obtidos em diferentes temperaturas de síntese: (a) 110 °C e (b) 45 °C. Solvente utilizado: tolueno, tempo de reação: 12 (a) e 36 h (b), as imagens foram obtidas após etapa de evaporação (rotoevaporador) do solvente

Fonte: Próprio autor.

Após purificação, os monômeros foram caracterizados por ESI-MS e RMN 1H .

As Figura 2.9 ilustram os espectros ESI-MS, no modo positivo, dos produtos obtidos a partir da rota sintética descrita no item 2.3.2. Nestes espectros é possível observar os picos dos íons precursores referentes aos cátions não fragmentados. Os picos intensos em m/z 179 (Figura 2.9^a), m/z 320 (Figura 2.9B) e m/z 407/409 (Figura 2.9C) referem-se, respectivamente, aos sinais dos cátions monocarregados $[C_6VIM]^+$, $[C_{16}VIM]^+$ e $[(VIM)_2C_{10}]Br^+$. Na Figura 2.9C observa-se ainda a presença um sinal intensos em m/z 164, o qual refere-se ao cátion duplamente carregado, $[(VIM)_2C_{10}]^{2+}$.

Figura 2.9 – Espectros ESI-MS (modo positivo) do (A) cloreto de 1-hexil-3-vinylimidazólio, (B) brometo de 1-hexadecil-3-vinylimidazólio e (C) dibrometo de 1,10-di(3-vinylimidazolio)decano em metanol

Fonte: Próprio autor.

Posteriormente os monômeros foram caracterizados por RMN ^1H . A caracterização estrutural de cada monômero está descrita na Tabela 2.4, a qual contém os sinais apresentados nos espectros RMN ^1H do $[\text{C}_6\text{VIM}][\text{Cl}]$ (Anexo D), $[\text{C}_{16}\text{VIM}][\text{Br}]$ (Anexo E) e $[(\text{VIM})_2\text{C}_{10}]_2[\text{Br}]$ (Anexo F). Estes espectros apontam elevado grau de pureza dos monômeros sintetizados.

Desta forma, os resultados obtidos nas análises RMN ^1H corroboram com os resultados das infusões ESI- MS^+ e, juntas, essas análises confirmam o sucesso na síntese e purificação dos monômeros de líquidos iônicos polimerizáveis.

Tabela 2.4 – Atribuições dos sinais de RMN ^1H dos monômeros sintetizados

Monômeros	Atribuição dos sinais
$[\text{C}_6\text{VIM}][\text{Cl}]$	(500 MHz, CDCl_3) $\delta\text{H}(\text{ppm})$: 11,32 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,55 (m, 2H), 5,98 (s, 1H), 5,38 (s, 1H), 4,40 (t, 2H), 1,96 (m, 2H), 1,34 (m, 7H), 0,87 (t, 3H)
$[(\text{VIM})_2\text{C}_{10}]_2[\text{Br}]$,	(500 MHz, DMSO) $\delta\text{H}(\text{ppm})$: 9,59 (s, 2H), 8,23 (t, 2H), 7,93 (t, 2H), 7,30 (dd, 2H), 5,96 (dd, 2H), 5,44 (dd, 2H), 4,20 (t, 4H), 1,85-1,80 (quintet, 4H), 1,26 (s, 12H)
$[\text{C}_{16}\text{VIM}][\text{Br}]$	(500 MHz, DMSO) $\delta(\text{ppm})$: 9,54 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,30 (m, 1H), 5,95 (dd, 1H), 5,42 (dd, 1H), 4,20 (t, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,35 (m, 26H), 0,88 (t, 3H)

2.4.2 Síntese e caracterização dos capilares contendo fase estacionária líquido iônico polimerizado

Previamente a etapa de polimerização *in-situ* dos monômeros para a formação da fase estacionária, as paredes internas do capilar de sílica fundida foram ativadas com uma solução alcalina de NaOH e derivatizadas com VTMS. O processo de ativação visou aumentar a densidade de grupos silanóis na superfície interna do capilar para tornar mais efetivo o recobrimento com VTMS (141). Na derivatização, moléculas do precursor VTMS reage com os grupos silanóis da superfície da sílica, via reação de condensação, formando uma ligação

siloxano (142). Desta forma, o grupo vinílico do VTMS permanece livre na superfície do capilar servindo como ponto de ancoragem para posterior reação de polimerização junto aos monômeros de líquido iônico polimerizáveis, Figura 2.10. Assim, o processo de polimerização resulta na formação de um filme de fase estacionaria quimicamente ligada à superfície derivatizada do capilar. Os capilares assim sintetizados apresentam filmes poliméricos com maior estabilidade física na presença de solventes orgânicos e aquosos, evitando a sangria da fase estacionaria durante o processo de extração. A estabilidade química do filme polimérico é extremamente importante para garantir maior durabilidade da fase estacionária. Ho et al. (143) também utilizaram o procedimento de derivatização com VTMS para a confecção de fibras SPME. Estas fibras SPME foram utilizadas para a extração de álcoois, aldeídos e ésteres no modo de imersão direta em soluções aquosas e solventes orgânicos, sendo reutilizadas em mais de 90 extrações.

Figura 2.10 – Processo de derivatização com viniltrimetoxissilano (VTMS) para inserção de grupos vinílicos na superfície interna dos capilares de sílica.

Fonte: Próprio autor.

Outra característica que aumenta a estabilidade física da rede polimérica na fase estacionaria é a polimerização realizada na presença de agente reticulante, também denominado de agente de ligação cruzada ou *crosslinker*. Neste projeto o agente reticulante utilizado foi o [(VIM)₂C₁₀]₂[Br], o qual possui dois anéis imidazólicos, um em cada extremidade da cadeia alquílica composta de dez carbonos. Cada anel imidazólico possui um grupo vinílico que participa da reação de polimerização entrecruzando as cadeias poliméricas lineares adjacentes.

A razão monômero:agente reticulante é extremamente importante e define as características finais da fase estacionária. Baseado em estudos já publicados (143), as fases estacionárias deste capítulo foram sintetizadas utilizando a razão monômeros:agente reticulante 2:1 *m/m*. Diferentes capilares foram sintetizados (Tabela 2.2) variando a proporção dos monômeros monocatiônicos ([C₆VIM][Cl] e [C₁₆VIM][Br]), mas mantendo constante em 2:1 *m/m* a proporção do agente reticulante [(VIM)₂C₁₀]2[Br]. Foram sintetizados os seguintes capilares (a) C6 ([C₆VIM][Cl]:[C₁₆VIM][Br]:[(VIM)₂C₁₀]2[Br], 2:0:1 *m/m*), (b) C6C16 (1:1:1 *m/m*) e (c) C16 (0:2:1 *m/m*).

Após a polimerização, a morfologia dos capilares foi analisada por MEV, Figura 2.11. Cada capilar foi analisado com diferentes ampliações sendo que as Figura 2.11a-d foram imagens obtidas de um capilar vazio, Figura 2.11e-h foi do capilar C6, Figura 2.11i-l do capilar C6C16 e Figura 2.11m-p do capilar C16. Ao comparar as imagens, com ampliação de 10000x, do capilar vazio (Figura 2.11d) com os demais capilares (Figura 2.11h, l e p) é possível observar a presença da fase estacionária formada na superfície dos capilares. Baseado apenas na inspeção visual dessas imagens conclui-se que a fase estacionaria em C6 apresentara uma superfície mais suavizada, enquanto as fases C6C16 e C16 apresentaram uma superfície mais rugosa com a presença de pequenos aglomerados depositados sobre o filme polimérico. Embora as condições experimentais, exceto a proporção dos monômeros, foram idênticas nos três procedimentos de síntese, a espessura do filme de fase estacionaria apresentou uma leve variação entre os três tipos de capilares sintetizados. A média de espessura dos filmes obtida em cada caso foi de 1,9; 1,7; 1,3 μm para os capilares C6, C6C16 e C16, respectivamente.

Figura 2.11 – Imagens MEV com ampliações de 200, 1000, 5000 e 10000x dos capilares vazio (a-d), C6 (e-h), C6C16 (i-m) e C16 (n-p)

Fonte: Próprio autor.

2.4.3 Tratamento prévio da amostra

Baseado em trabalhos prévios publicados na literatura (144), a precipitação das proteínas do plasma foi realizada com a mistura acetonitrila:plasma (2:1, v/v). Após a adição deste solvente orgânico à amostra de plasma, a mistura foi agitada em vortex (3000 rpm, 1 min) e centrifugada (9000 rpm, 15 minutos). Em seguida, a fase orgânica foi transferida para um tubo eppendorf®, evaporada e, o extrato seco, reconstituído com 100 μ L de solução de acetato de amônio pH 7,0:acetonitrila 90:10 (v/v). No que se refere a solução de reconstituição, acetonitrila foi utilizada objetivo de melhorar a solubilização do extrato seco (90).

Mantendo a proporção acetonitrila:plasma sempre constante, diferentes volumes de plasma (100 a 400 μ L) foram avaliados. Os resultados descritos na Figura 2.12 ilustram que a quantidade de analito extraído aumenta com o aumento do volume de amostra. Volumes acima de 400 μ L também foram avaliados, entretanto resultaram em tempos longos para a evaporação da fase orgânica. Desta forma, o volume de 400 μ L foi selecionado como ideal e foi utilizado nos procedimentos posteriores.

Figura 2.12 – Avaliação do volume de plasma para a determinação de AEA e 2-AG. As proteínas do plasma foram precipitadas utilizando acetonitrila:plasma 2:1 (v/v). Após coleta e evaporação da fase orgânica, o extrato seco foi reconstituído com 100 μ L com solução de acetato de amônio pH 7,0:acetonitrila 90:10 (v/v) e 80 μ L foram injetados no sistema cromatográfico.

Fonte: Próprio autor.

2.4.4 Otimização do método IT-SPME-LC-MS/MS

As colunas capilares contendo as fases estacionárias de líquidos iônicos polimerizáveis foram avaliadas quanto ao seu desempenho na sorção de AEA e 2-AG. Para estes testes, 10 cm de cada capilar foi conectado na dimensão 1D e a sorção dos analitos foi avaliada com uma solução aquosa de AEA e 2-AG (100 ng mL^{-1}). De acordo com a Figura 2.13, os capilares C6 e C16 apresentaram a menor e maior eficiência de extração, respectivamente. A retenção dos analitos no capilar acontece em virtude da sua afinidade com a fase estacionária, a qual é fruto das interações químicas entre os grupamentos químicos tanto dos analitos quanto do polímero a base de líquidos iônicos poliméricos. Considerando a estrutura química dos compostos abordados neste trabalho (Figura 2.14), essas interações são principalmente (i) interações dispersivas, que ocorrem entre as cadeias alquílicas tanto dos analitos quanto do polímero formado e também por (ii) ligações de hidrogênio entre grupo polar dos analitos e os anéis imidazólicos do polímero (134,145). A presença de monômeros de maior cadeia alquílica favoreceu as interações dispersivas aumentando a eficiência de extração da fase estacionária. Desta forma, o capilar C16 foi selecionado para os ensaios subsequentes.

Figura 2.13 – Otimização da proporção dos monômeros na síntese do capilar e influência na pré-concentração de AEA e 2-AG. Os capilares foram sintetizados nas seguintes proporções: C6 = $[\text{VC}_6\text{IM}][\text{Cl}]:[(\text{VIM})_2\text{C}_{10}]_2[\text{Br}]$ 2:1; C16 = $[\text{VC}_{16}\text{IM}][\text{Br}]:[(\text{VIM})_2\text{C}_{10}]_2[\text{Br}]$ 2:1 e C6/C16 $[\text{VC}_6\text{IM}][\text{Cl}]:[\text{VC}_{16}\text{IM}][\text{Br}]:[(\text{VIM})_2\text{C}_{10}]_2[\text{Br}]$ 1:1:1

Fonte: Próprio autor.

Figura 2.14 – Estrutura química dos monômeros de líquidos iônicos polimerizáveis (a, b, c) e dos analitos abordados neste estudo (d, e)

a) 1-hexadecil-3-vinylimidazólio, $[\text{VC}_6\text{IM}][\text{Cl}]$

b) 1-hexadecil-3-vinylimidazólio, $[\text{C}_{16}\text{VIM}][\text{Br}]$

c) Dibrometo de 1,10-di(3-vinylimidazólio)decano, $[(\text{VIM})_2\text{C}_{10}][2[\text{Br}]]$

d) Anandamida, AEA

e) 2-araquidonoglicerol, 2AG

Fonte: Próprio autor.

As etapas subsequentes consistiram na otimização das variáveis do método IT-SPME-LC-MS/MS. Esta otimização foi realizada em etapas como descrito no Quadro 2.1 (pág. 62).

a) Etapa 1

(I) pH da amostra

O pH da amostra foi o primeiro parâmetro a ser otimizado para a extração dos analitos. Dentre os valores avaliados, a maior eficiência de extração foi obtida com os analitos reconstituídos em solução de acetato de amônio pH 7,0:acetonitrila (9:1, v/v), Figura 2.15a. Em pH 7 tanto a AEA e quanto 2-AG encontram-se predominantemente na sua forma neutra (84). Esta neutralidade de carga na estrutura dessas moléculas aumenta sua retenção junto a fase estacionária devido a prevalência de interações dispersivas. Um fenômeno que vale a pena ressaltar neste ponto da discussão é a isomerização espontânea de 2-AG para 1-AG, que pode ocorrer em circunstâncias específicas durante o preparo de amostra. Por exemplo, é relatado na literatura que soluções de pH alcalino ou solventes polares próticos podem acelerar esta conversão (140,146). Possivelmente, este fenômeno pode explicar a baixa reprodutibilidade dos resultados observados para 2-AG quando extraído à pH 9,0, Figura 2.15a. Com base nos resultados obtidos nestes ensaios, a solução de acetato de amônio pH 7,0:acetonitrila (9:1, v/v) foi selecionada para os próximos ensaios.

(II) Composição da solução de dessorção

Após a otimização do pH da amostra que resultou na maior retenção dos analitos junto a fase estacionária, fases móveis constituídas de água:acetonitrila acidificada com 0,5% de ácido fórmico, em diferentes proporções, foram avaliadas para a dessorção desses analitos. Analisando a Figura 2.15b, observa-se que fases móveis contendo proporções água acima de 90% não apresentaram força suficiente para a dessorção dos analitos. Por outro lado, resultados positivos foram obtidos com a percolação, na coluna capilar, de fases móveis contendo proporções de 20 a 70% de acetonitrila. Dentro deste intervalo, a eficiência na dessorção dos

analitos aumentou expressivamente com o aumento do conteúdo de acetonitrila na fase móvel. Proporções de acetonitrila acima de 70% não apresentaram aumento significativo na quantidade de analitos eluídos da fase estacionária. Desta forma, a fase móvel constituída de água:acetonitrila acidificada com 0,5% de ácido fórmico (7:3, v/v) foi selecionada como condição ótima para a eluição quantitativa dos analitos.

(III) Vazão utilizada na preconcentração e dessorção dos analitos

O passo seguinte da otimização, foi avaliar qual seria a melhor vazão na dimensão 1D (bomba quaternária) para a preconcentração e dessorção dos analitos. Os dados obtidos para este ensaio estão ilustrados na Figura 2.15c. Observa-se que a eficiência de extração aumentou com a diminuição da vazão. Desta forma, a vazão de 0,1 mL min⁻¹ foi selecionada para etapas posteriores da otimização.

Figura 2.15 – Otimização dos parâmetros IT-SPME: (a) pH da amostra, (b) proporção de acetonitrila na dessorção dos analitos, e (c) fluxo da fase móvel na bomba quaternária. Condições experimentais: 3 replicatas (n=3), capilar C16 (10,0 cm × 0,53 mm DI), UHPLC-MS/MS (condições descritas no item 2.3.8, pag. 60)

Fonte: Próprio autor.

b) Etapa 2

(IV) Tempo de exclusão das macromoléculas da amostra do plasma

Para estes testes a coluna capilar foi conectada em 1D e todo efluente desta dimensão foi monitorado no DAD (no comprimento de onda 280 nm). A amostra de plasma previamente tratada foi injetada no capilar pela bomba quaternária. A fase móvel utilizada para este ensaio consistiu em 100% de água de 0 a 6 min e água:acetonitrila acidificada com 0,5% de ácido fórmico (3:7, v/v) de 6 a 15 min da corrida cromatográfica. O objetivo deste ensaio foi determinar o tempo total para a exclusão das macromoléculas do plasma. A partir da análise dos dados contidos no cromatograma da Figura 2.16, conclui-se que a eluição quantitativa das macromoléculas do plasma ocorreu entre os tempos 0,25-1,50 min., sendo que o pico atinge seu máximo em 0,44 min. Desta forma, $t = 2$ min foi selecionado como tempo suficiente para a exclusão das macromoléculas do plasma.

Figura 2.16 - Otimização do tempo de exclusão das macromoléculas do plasma da amostra de plasma injetada na coluna capilar; condições da corrida cromatográfica: 0-6 min., 100% de água; 6-10 min água/acetonitrila acidificada com 0,5% de ácido fórmico (3:7, v/v); comprimento de onda monitorado: 280 nm.

Fonte: Próprio autor.

c) Etapa 3

(V) Tempo de acoplamento das dimensões 1D e 2D (Posição 1 e Posição 2 da válvula de 6 pórticos)

Para estes testes a coluna capilar foi conectada em 1D, uma conexão de volume morto zero foi instalada na dimensão 2D e a saída desta conexão foi conectada ao espectrômetro de massas. Os tempos de acoplamento e desacoplamento foram otimizados com base (I) no tempo de exclusão das macromoléculas do plasma e (II) na eluição e transferência dos analitos da dimensão 1D para 2D, Figura 2.17. A parte majoritária dos interferentes da matriz foram excluídos nos dois primeiros dois minutos ($t = 0$ min a $t = 2$ min) do tempo de preconcentração. Após esses dois minutos iniciais, a fase móvel (100% de água) permaneceu percolando pela coluna capilar para a eliminação dos compostos mais polares que possivelmente tenham ficado retidos no capilar juntamente com os analitos. Este período ($t = 2$ min a $t = 4$ min) foi denominado como tempo de limpeza intra-corrida. Em seguida, no $t = 4$ min, as duas dimensões foram acopladas pela mudança da válvula de 6 pórtico da Posição 1 para a Posição 2. Com este acoplamento, a fase móvel que antes percolava pela dimensão 2D, foi direcionada para a dimensão 1D promovendo a eluição dos analitos da coluna capilar e transferindo-os para a dimensão 2D. Dois minutos ($t = 4$ min a $t = 6$ min) foram suficientes para a completa eluição e transferência. Assim, $t = 4$ min e $t = 6$ min foram definidos, respectivamente, como tempo de acoplamento e desacoplamento das duas dimensões.

Figura 2.17 – Cromatogramas mostrando o desacoplamento (Posição 1 da válvula de 6 pórticos) e acoplamento (Posição 2 da válvula de 6 pórticos) das dimensões 1D e 2D do método IT-SPME-LC-MS/MS. Dimensão 1D: coluna capilar, detector DAD; dimensão 2D: conexão de volume morto (substituindo a coluna analítica), detector MS/MS

Fonte: Próprio autor.

d) Etapa 4

(VI) Separação cromatográfica

Para a otimização da corrida cromatográfica, a conexão de volume morto foi substituída pela coluna cromatográfica C18. A vazão ($0,1 \text{ mL min}^{-1}$) utilizada na dimensão 1D tornou-se inviável de ser utilizada na dimensão 2D, pois resultou em longos tempos de análise. Diante desta limitação, a estratégia descrita a seguir foi adotada. Com a válvula na Posição 2, a eluição dos analitos foi realizada pela bomba binária a uma vazão de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$. Em $t = 4$, a válvula de 6 pórticos retornou à Posição 1 e o fluxo da bomba binária aumentou para $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ para

a separação cromatográfica dos endocanabinóides. Nestas condições, os tempos de retenção dos analitos foram 7,9 e 8,6 min para a AEA e 2-AG, respectivamente.

(VII) Volume de amostra (extrato seco ressuspendido e injetado)

Após o tratamento prévio da amostra de plasma, o qual envolveu a precipitação de proteínas e reconstituição do extrato seco em solução de acetato de amônio pH 7,0:acetonitrila (9:1, v/v), múltiplos ciclos de injeção da amostra foram avaliados. Dez microlitros de amostra eram injetados na coluna capilar a cada ciclo. Com relação aos resultados obtidos para estes testes, a área do pico cromatográfico para ambos os analitos aumentou com o aumento do número de ciclos. Levando em consideração o tempo gasto para cada ciclo de injeção e o valor de área do pico cromatográfico, o valor de 80 μ L (8 ciclos) foi selecionado como melhor volume de injeção.

(VIII) Regeneração da coluna capilar

A regeneração da coluna capilar em 1D ocorreu simultaneamente com a separação cromatográfica dos analitos em 2D. A limpeza da coluna capilar foi realizada entre os tempos $t = 6$ e $t = 10$ min com fase móvel constituída de 100% de acetonitrila. Em seguida, entre $t = 10$ e $t = 13$ a fase móvel constituída de 100% de água foi percolada pelo capilar para acondicionamento da fase estacionária para a próxima análise. Este procedimento foi suficiente para eliminar qualquer efeito memória no método cromatográfico desenvolvido.

O Quadro 2.2 resume os parâmetros finais obtidos para do método IT-SPME-LC-MS/MS.

Quadro 2.2 - Condições IT-SPME-LC-MS/MS utilizando a coluna capilar contendo fase estacionaria a base de líquidos iônicos polimerizáveis (1D) e coluna analítica C18 (2D) para a determinação de endocanabinóides em amostras de plasma

Etapas	Intervalo de tempo (min)	Válvula	Estado	QSM	BSM	Comentários
Sorção dos analitos	0 - 2	Posição 1	Desacoplado	FM: 100% A 0,1 mL min ⁻¹	FM: 30:70 (A/B) 0,1 mL min ⁻¹	QSM: sorção dos analitos em 1D. BSM: condicionamento da coluna cromatográfica em 2D.
Limpeza intraensaio	2 - 4	Posição 1	Desacoplado	FM: 100% A 0,1 mL min ⁻¹	FM: 30:70 (A/B) 0,1 mL min ⁻¹	QSM: remoção dos compostos endógenos fracamente sorvidos no capilar. BSM: condicionamento da coluna cromatográfica em 2D.
Sorção dos analitos	4 - 6	Posição 2	Acoplado	FM: 100% A 0,1 mL min ⁻¹	FM: 30:70 (A/B) 0,1 mL min ⁻¹	QSM: FM é direcionada para o descarte. BSM: FM passa pelo capilar, desorve os analitos e direciona para coluna cromatográfica em 2D.
Separação cromatográfica	6 - 10	Posição 1	Desacoplado	FM: 100% B 0,1 mL min ⁻¹	FM: 30:70 (A/B) 0,3 mL min ⁻¹	QSM: limpeza do capilar. BSM: separação cromatográfica dos analitos
Recondicionamento do sistema	10 - 13	Posição 1	Desacoplado	FM: 100% A 0,1 mL min ⁻¹	FM: 30:70 (A/B) 0,1 mL min ⁻¹	QSM: reequilíbrio do sistema quanto a composição da FM. BSM: reequilíbrio do sistema quanto ao fluxo.

Fonte: Próprio autor.

2.4.5 Capacidade de sorção

A capacidade de sorção da fase estacionária sintetizada a partir de líquidos iônicos polimerizáveis foi calculada com a metodologia elaborada com base nos experimentos convencionais descrito na literatura (147,148). Os detalhes experimentais foram descritos no item 2.3.10 (pag. 66) e no Anexo A. De forma resumida, soluções de diferentes concentrações dos analitos foram injetadas na coluna capilar. Em seguida, as áreas dos picos cromatográficos de cada um dos cromatogramas obtidos foram plotadas no gráfico *Concentração x Área do pico cromatográfico*, Figura 2.18. Nesta é possível perceber que inicialmente a área do pico cromatográfico aumenta de forma linear com o aumento da concentração da solução injetada. A concentração de saturação (C_s) é o ponto no eixo x que marca a região não linear do gráfico. Este ponto indica a saturação da fase estacionária e a injeção de soluções com valor de concentração maiores que C_s não aumenta de forma significativa a quantidade de analitos sorvidos (determinado indiretamente pela área do pico cromatográfico). Com o valor de C_s , capacidade máxima de sorção (Q) do capilar foi calculada. Para a AEA os valores de C_s e Q foram de 101 ng mL^{-1} e 37311 ng cm^3 , respectivamente. Já para 2-AG esses valores foram de 130 ng mL^{-1} e 48307 ng cm^3 , respectivamente.

Figura 2.18. Teste de capacidade de sorção do capilar (volume de injeção de $80 \mu\text{L}$)

Fonte: Próprio autor.

2.4.6 Fator de enriquecimento

Nas condições otimizadas de extração, os fatores de enriquecimento foram calculados para eCBs. Para tal, foi realizada uma comparação com a injeção direta das soluções padrão no sistema UHPLC. Os resultados de FE calculados foram de 2,3 e 2,0 para AEA e 2-AG, respectivamente.

2.4.7 Validação analítica do método

a) Linearidade

A linearidade foi avaliada individualmente para ambos os analitos a partir de amostras de plasma enriquecidas com os padrões analíticos e dos PI. Este parâmetro foi avaliado com base na capacidade de obter respostas analíticas proporcionais às concentrações de AEA e 2-AG dentro da faixa dinâmica de trabalho. O método em estudo apresentou ampla faixa linear englobando valores desde o LIQ de cada analito até a concentração de 100 ng mL⁻¹. Entretanto, como preconizado pela legislação da ANVISA, a faixa de trabalho foi estabelecida entre o LIQ e 1,00 ng mL⁻¹. O LSQ foi estabelecido em 1,00 ng mL⁻¹ para melhor adequação aos valores de concentração dos analitos estimados nas amostras dos pacientes. O coeficiente de determinação (r^2) ficou acima do valor estabelecido pela ANVISA (>0,99) e o valor p para o Teste de Falta de Ajuste ficou acima de 0,05, verificando a adequabilidade do modelo. A Tabela 2.5 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** expressa os resultados obtidos para a linearidade (estabelecida pelo método dos mínimos quadrados), o LIQ, equação da reta, coeficiente de determinação e valor p para o teste de Falta de Ajuste.

Tabela 2.5 - Principais resultados da validação analítica do método IT-SPME-UHPLC-MS/MS para análise de anandamida (AEA) e 2- araquidonoglicerol (2-AG) em amostras de plasma

Analito	Intervalo linear (ng mL ⁻¹)	LIQ ¹ (ng mL ⁻¹)	Equação linear	r ²	Teste de falta de ajuste ²	Exatidão (EPR ⁴ , %)			Precisão (CV ⁵ , %)		
						CQ ³ (ng mL ⁻¹)	Intra- ensaio	Inter- ensaio	CQ ³ (ng mL ⁻¹)	Intraens aio	Interensa io
AEA	0,10-1,00	0,10	y = 0,1762x + 0,0523	0,9959	0,2440	0,1	-10,1	-19,6	0,10	5,4	14,0
						0,3	9,6	11,6	1,5	9,1	12,7
						0,5	0,8	2,7	0,5	8,1	1,6
						0,8	-5,9	-8,9	0,8	3,3	5,3
						1,0	2,3	1,9	1,0	4,7	6,6
2-AG	0,05-1,00	0,05	y = 0,1577x + 0,0346	0,9975	0,7118	0,05	-10,4	7,1	0,05	13,3	6,5
						0,15	11,9	-14,0	1,5	9,2	12,1
						0,5	-3,3	-2,2	0,5	6,6	5,2
						0,8	-3,5	-4,8	0,8	3,1	2,4
						1,0	1,6	13,2	1,0	4,1	8,1

¹Limite interior de quantificação; ²Valores p com nível de significância de 0,05; ³Controle de qualidade; ⁴Erro padrão relativo; ⁵Coefficiente de variação.

Além do teste de Falta de Ajuste, a normalidade dos resíduos também foi avaliada. A Figura 2.19 apresenta o histograma de resíduos, o gráfico resíduos x valores ajustados e o gráfico resposta padronizadas x ordem de coleta. O histograma de resíduos e o gráfico resíduos x valores ajustados mostram uma distribuição normal dos mesmos e o gráfico res. padronizados x ordem de coleta mostrou não haver nenhum padrão de distribuição dos resíduos, concluindo que os mesmos são independentes.

Desta forma, a análise estatística mostra que a curva analítica está bem ajustada e a mesma pode ser utilizada para determinações quantitativas.

Figura 2.19 - Análise dos resíduos do modelo linear para as curvas analíticas

Fonte: Próprio autor.

b) Precisão e exatidão

A precisão avaliou a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no item 2.3.12 (pág. 67). A precisão foi avaliada pela comparação do CV de 5 curvas analíticas analisadas no mesmo dia (intraensaio) e 3 curvas analisadas em dias distintos (interensaio). A precisão foi analisada nos níveis LIQ, CQB, CQM, CQA e LSQ. O método apresentou valores de CV que variaram de 1,6% a 14,0% para AEA e 2,4% a 13,3% para 2-AG (Tabela 2.5).

A exatidão avaliou o grau de concordância entre os resultados individuais do método e os valores reais da amostra enriquecida. Os experimentos foram realizados de forma idêntica aos de precisão, exceto que neste caso a resposta avaliada foram os valores de EPR. A exatidão do método apresentou valores EPR que variaram de -19,6% a 11,6% para AEA e -14,0% a 13,2% para 2-AG (Tabela 2.5).

Tanto os valores de precisão e exatidão ficaram dentro do limite estabelecido pela legislação da ANVISA.

d) Efeito residual

Por não encontrar uma matriz isenta dos analitos, o teste de efeito memória foi realizado utilizando os PIs, uma vez que estes tratam-se dos analitos deuterados, apresentando assim propriedades físico-químicas muito similares aos analitos. Foram injetadas soluções na seguinte ordem: branco, amostra enriquecida no LSQ e dois brancos consecutivos. Nos cromatogramas da Figura 2.20 é possível perceber que não houve a presença de picos dos analitos nas corridas das amostras branco após a injeção das amostras no LSQ. Estes resultados ilustram boa eficiência de limpeza, intercorridas, dos capilares.

Figura 2.20. Cromatogramas obtidos na respectiva sequência: solução aquosa não enriquecida (sobreposição a esquerda), solução aquosa no LSQ e 2 injeções consecutivas de solução aquosa não enriquecida (sobreposição a direita).

Fonte: Próprio autor.

e) Efeito Matriz

O efeito matriz relativo foi avaliado comparando os coeficientes angulares de nove curvas de calibração. Do total das nove curvas, seis foram plotadas utilizando plasma de diferentes pacientes e três foram plotadas utilizando solução aquosa. A Tabela 2.6 mostra os valores obtidos para coeficientes angulares bem como o valor p obtido para a comparação das médias desses valores via Teste t . De acordo com o resultado deste teste estatístico, não há evidências (nível de significância de 0,05) de que os coeficientes angulares são diferentes. Sendo assim, o paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz.

Tabela 2.6 - Teste T para a comparação da inclinação das retas obtidas em diferentes matrizes

	Em plasma			Água		
Coef Angular	0,1618	0,1651	0,1718	0,1727	0,1709	0,1677
	0,1606	0,1604	0,1726			
Média	0,1654			0,1704		
DesvP	0,0056			0,0025		
Valor p*	0,1035					

*Nível de significância de 0,05.

f) Seletividade

Para estudo da seletividade do método, foram obtidos cromatogramas das amostras de plasma enriquecidas com os analitos na concentração do LIQ, Figura 2.21. Nestes cromatogramas não foram observadas a presença de picos interferentes próximos ao tempo de retenção dos analitos.

Figura 2.21. Cromatogramas das amostras de plasma enriquecidas com AEA-d4 e 2-AG-d5 na concentração do LIQ e cromatograma obtido da amostra sem adição dos padrões (sobrescrito a esquerda).

Fonte: próprio autor.

2.4.8 Aplicabilidade do método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS para análise de amostras de plasma de pacientes com DP

Para demonstrar a aplicabilidade do método desenvolvido, 6 amostras de plasma de pacientes com doença de Parkinson foram analisadas. A Tabela 2.7 ilustra os resultados para as concentrações plasmáticas de AEA e 2-AG em pacientes com DP.

Para a AEA as concentrações plasmáticas variaram de 0,14 a 0,46 ng mL⁻¹, com média aritmética de 0,22 ng mL⁻¹. Já para o 2-AG a média foi de 0,29 ng mL⁻¹ com variação de valores que ocorreram de 0,09 a 0,42 ng mL⁻¹. A Figura 2.22 ilustra os cromatogramas obtidos para a amostra número 2. Neste cromatograma é possível visualizar o pico dos analitos sem a presença de quaisquer picos interferentes.

Tabela 2.7. Concentração plasmática de anandamida (AEA) e 2-araquidonoglicerol (2-AG) em pacientes com DP

Amostras	AEA		2-AG	
	Conc. (ng mL ⁻¹)	DPR (%)	Conc. (ng mL ⁻¹)	DPR
1	0,14	9	0,42	9
2	0,28	6	0,09	3
3	0,15	11	0,15	12
4	0,14	9	0,51	9
5	0,17	1	0,26	11
6	0,46	5	<LIQ	-

Figura 2.22. Cromatogramas obtidos da amostra de plasma de paciente, as concentrações de AEA e 2-AG determinadas foram 0,28 e 0,09 ng mL⁻¹, respectivamente.

Fonte: próprio autor.

2.4.9 Comparação do método IT-SPME-UHPLC-MS/MS proposto com métodos descritos na literatura

Após a validação analítica, o método *in-tube* SPME/UHPLC-MS/MS foi comparado com outros métodos descritos na literatura para a determinação de AEA e 2-AG em amostras de plasma. Esta comparação, apresentada na Tabela 2.8, levou em consideração os principais parâmetros desses métodos tais como técnica de preparo de amostra, volume de amostra, intervalo linear, LIQ, tempo de corrida cromatográfica e concentração de endocanabinóides nas amostras.

O método *in-tube* SPME quando comparado com ELL (84), SALLE (85) e EFS (86–88) destaca-se por apresentar simples pré-tratamento de amostra e hifenação do preparo de amostra com a análise cromatográfica. Estas características contribuem para redução do tempo de análise, aumento da frequência analítica, aumento da seletividade, redução no consumo de solventes e amostra. Entretanto a técnica *in-tube* SPME necessita de um aporte instrumental mais elevado com a aquisição de válvulas e sistema de bombas para bombeamento de fase móvel.

Quando comparado com os métodos que utilizam a técnica *column switching* com colunas 1D empacotadas (89,90), os capilares 1D de extremidades aberta apresentam menor pressão no sistema cromatográfico e maior tempo de vida útil para a coluna capilar

Tabela 2.8 - Determinação de anandamida (AEA) e 2-araquidonoglicerol (2-AG) em amostras de plasma

Analitos	Preparo de amostra	Volume de amostra (μL)	Intervalo linear (ng mL ⁻¹)	LIQ (ng mL ⁻¹)	Tempo da corrida cromatográfica (min)	Concentração plasmática (ng mL ⁻¹)	Referência
AEA and 2-AG	<i>In-tube</i> SPME (capilar de extremidade aberta)	400	0,10-100 (AEA) 0,05-100 (2-AG)	0,1 0,05	15	0,22 0,29	Este trabalho
AEA and 2-AG	ELL (tolueno)	250	0,17-0,70 (AEA) 0,19-0,75 (2-AG)	0,17 0,19	6,5	0,38 0,81	Zoerner et al (84)
AEA e outros compostos	EFS (cartuchos Waters Oasis HLB®)	500	0,08-6,60	0,08	4	0,25	Lam et al (86)
AEA e outros compostos	SPE (C18 cartuchos)	500	0,04-50 (AEA) 0,08-100 (2-AG)	0,04 0,08	13	0,59 6,24	Gachet et al (88)
AEA e 2-AG	μ-EFS (C18 ponteiras)	100	0,1-10 (AEA) 1-200 (2-AG)	0,1 1	9	-	Sergi et al (87)
AEA	SALLE	100	0,1-10	0,1	4	0,27	Xiong et al (85)
AEA, 2-AG, e outros compostos	Column switching (partículas de poliestireno divinilbenzeno)	500	0,007–3,48 (AEA) 0,03–7,57 (2-AG)	0,007 0,03	22	0,34 0,54-0,65	Fanelli et al (89)
AEA e 2-AG	Column switching (partículas RAM-C8)	250	0,10-6,00 (AEA) 0,04-10,00 (2-AG)	0,1 0,04	15	0,297–0,421 0,077–0,130	Queiroz et al (90)

AEA: anandamida, 2-AG: 2-Aracnodonoil glicerol, ELL: extração líquido-líquido, EFS: extração em fase sólida, PIL: líquido iônico polimerizável

2.5 Conclusão

O sucesso da síntese e purificação dos monômeros de líquidos iônicos polymerizáveis [brometo de 1-hexadecil-3-vinilimidazólio, cloreto de 1-hexil-3-vinilimidazólio, dibrometo de 1,10-di (3-vinilimidazólio) decano] confirmados pelas análises de RMN ^1H e ESI-MS $^+$ favoreceram o posterior procedimento de polimerização *in-situ* em capilares de sílica fundida para a obtenção de três diferentes fases seletivas (C6, C6C16 e C16).

Considerando a estrutura química dos endocanabinóides, a presença de monômeros de maior cadeia alquílica no capilar PIL (C16) favoreceu as interações hidrofóbicas dispersivas e consequentemente a capacidade de sorção do capilar. Já a basicidade dos ânions permitiu interações do tipo ligação de hidrogênio com estes analitos.

Além da seletividade do capilar de tubo aberto PIL (C16), podemos também destacar: (a) a adequada estabilidade mecânica e química que possibilitou o reuso deste capilar em mais de noventa análises sem mudanças significativas na integridade estrutural da fase extratora ou reprodutibilidade dos resultados, (b) a exclusão das macromoléculas do plasma e (c) a baixa pressão do sistema analítico (*in-tube* SPME-UHPLC).

Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS é adequado para a determinação de anandamida e 2-AG em amostras de plasma de pacientes com doença de Parkinson.

O método *in-tube* SPME-UHPLC-MS/MS quando comparado aos clássicos, ELL, SALLE e EFS destaca-se pela hifenação da etapa do preparo de amostra com a análise cromatográfica. Estas características contribuem para redução do tempo de análise, aumento da frequência analítica, redução no consumo de solventes orgânicos e amostra biológica.

2.6 Referências[†]

- 67 Adahchour, M.; Beens, J.; et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography of complex samples by using a ‘reversed-type’ column combination: application to food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 47–55, 2004.
- 68 Adahchour, M.; Beens, J.; et al. Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, n. 1–2, p. 67–108, 2008.
- 69 Schneider, R.B.; Iourinets, J.; et al. Parkinson’s disease psychosis: presentation, diagnosis and management. **Neurodegenerative Disease Management**, v. 7, n. 6, p. 365–376, 2017.
- 70 Kalia, L. V; Lang, A.E. Parkinson’s disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, 2015.
- 71 Sveinbjornsdottir, S. The clinical symptoms of Parkinson’s disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 318–324, 2016.
- 72 O’Callaghan, C., Lewis, S.J.G. Cognition in Parkinson’s Disease. In: 2017, p. 557–583.
- 73 Fahn, S. The 200-year journey of Parkinson disease: Reflecting on the past and looking towards the future. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 46, p. S1–S5, 2018.
- 74 He, R.; Yan, X.; et al. Recent Advances in Biomarkers for Parkinson’s Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, 2018.
- 75 Giuffrida, A.; McMahon, L.R. In vivo pharmacology of endocannabinoids and their metabolic inhibitors: Therapeutic implications in Parkinson’s disease and abuse liability. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 91, n. 3–4, p. 90–103, 2010.
- 76 MARZO, V. DI Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson’s disease. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 10, p. 1432–1438, 2000.

[†] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

-
- 77 Obeso, J.A.; Rodriguez-Oroz, M.; et al. The origin of motor fluctuations in Parkinson's disease: Importance of dopaminergic innervation and basal ganglia circuits. **Neurology**, v. 62, n. Issue 1, Supplement 1, p. S17–S30, 2004.
- 78 Pisani, V.; Moschella, V.; et al. Dynamic changes of anandamide in the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients. **Movement Disorders**, v. 25, n. 7, p. 920–924, 2010.
- 79 Fernández-Ruiz, J., Romero, J., et al. Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea, Alzheimer's Disease, and Others. In: 2015, p. 233–259.
- 80 Marchioni, C.; Souza, I.D. de; et al. Recent advances in LC-MS/MS methods to determine endocannabinoids in biological samples: Application in neurodegenerative diseases. **Analytica Chimica Acta**, v. 1044, p. 12–28, 2018.
- 81 Fagan, S.G.; Campbell, V.A. The influence of cannabinoids on generic traits of neurodegeneration. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 6, p. 1347–1360, 2014.
- 82 Fernández-Ruiz, J.; Berrendero, F.; et al. The endogenous cannabinoid system and brain development. **Trends in Neurosciences**, v. 23, n. 1, p. 14–20, 2000.
- 83 Marczylo, T.H.; Lam, P.M.W.; et al. Anandamide levels in human female reproductive tissues: Solid-phase extraction and measurement by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 400, n. 2, p. 155–162, 2010.
- 84 Zoerner, A.A.; Batkai, S.; et al. Simultaneous UPLC–MS/MS quantification of the endocannabinoids 2-arachidonoyl glycerol (2AG), 1-arachidonoyl glycerol (1AG), and anandamide in human plasma: Minimization of matrix-effects, 2AG/1AG isomerization and degradation by toluene solvent extractio. **Journal of Chromatography B**, v. 883–884, p. 161–171, 2012.
- 85 Xiong, X.; Zhang, L.; et al. High-throughput salting-out assisted liquid-liquid extraction with acetonitrile for the determination of anandamide in plasma of hemodialysis patients with liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 9, p. 1317–1324, 2015.
- 86 Lam, P.M.W.; Marczylo, T.H.; et al. Simultaneous measurement of three N-acylethanolamides in human bio-matrices using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 5, p. 2089–2097, 2010.

-
- 87 Sergi, M.; Battista, N.; et al. Determination of the two major endocannabinoids in human plasma by μ -SPE followed by HPLC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 2–3, p. 785–793, 2013.
- 88 Gachet, M.S.; Rhyn, P.; et al. A quantitative LC-MS/MS method for the measurement of arachidonic acid, prostanoids, endocannabinoids, N-acylethanolamines and steroids in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 976–977, p. 6–18, 2015.
- 89 Fanelli, F.; Lallo, V.D. Di; et al. Estimation of reference intervals of five endocannabinoids and endocannabinoid related compounds in human plasma by two dimensional-LC/MS/MS. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 3, p. 481–493, 2012.
- 90 Marchioni, C.; Souza, I.D. de; et al. A column switching ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to determine anandamide and 2-arachidonoylglycerol in plasma samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 14, p. 3587–3596, 2017.
- 91 Kantae, V.; Ogino, S.; et al. Quantitative profiling of endocannabinoids and related N - acylethanolamines in human CSF using nano LC-MS/MS. **Journal of Lipid Research**, v. 58, n. 3, p. 615–624, 2017.
- 92 Leweke, F.M.; Giuffrida, A.; et al. Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: Impact of cannabis use. **Schizophrenia Research**, v. 94, n. 1–3, p. 29–36, 2007.
- 93 Lin, L.; Yang, H.; et al. Quantitative analysis of multiple fatty acid ethanolamides using ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 87, n. 6, p. 189–195, 2012.
- 94 Bilgin, M.; Bindila, L.; et al. Quantitative profiling of endocannabinoids in lipoproteins by LC–MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 17, p. 5125–5131, 2015.
- 95 Kirkwood, J.S.; Broeckling, C.D.; et al. A novel microflow LC-MS method for the quantitation of endocannabinoids in serum. **Journal of Chromatography B**, v. 1033–1034, p. 271–277, 2016.
- 96 Ottria, R.; Ravelli, A.; et al. Simultaneous ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry quantification of endogenous anandamide and related N-acylethanolamides in bio-matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 958, p. 83–89, 2014.

-
- 97 Buczynski, M.W.; Parsons, L.H. Quantification of brain endocannabinoid levels: methods, interpretations and pitfalls. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 3, p. 423–442, 2010.
- 98 Bilgin, M., Shevchenko, A. Quantification of Endogenous Endocannabinoids by LC-MS/MS. In: 2017, p. 99–107.
- 99 Bindila, L., Lutz, B. Extraction and Simultaneous Quantification of Endocannabinoids and Endocannabinoid-Like Lipids in Biological Tissues. In: 2016, p. 9–18.
- 100 Kataoka, H.; Ishizaki, A.; et al. Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 655, n. 1–2, p. 8–29, 2009.
- 101 Kataoka, H.; Saito, K. Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 4, n. 7, p. 809–832, 2012.
- 102 Mecerreyes, D. Polymeric ionic liquids: Broadening the properties and applications of polyelectrolytes. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 12, p. 1629–1648, 2011.
- 103 Yu, H.; Ho, T.D.; et al. Ionic liquid and polymeric ionic liquid coatings in solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 219–232, 2013.
- 104 Anderson, J.L.; Ding, R.; et al. Structure and Properties of High Stability Geminal Dicationic Ionic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 2, p. 593–604, 2005.
- 105 Liao, K.; Mei, M.; et al. Multiple monolithic fiber solid-phase microextraction based on a polymeric ionic liquid with high-performance liquid chromatography for the determination of steroid sex hormones in water and urine. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 3, p. 566–575, 2016.
- 106 Mei, M.; Yu, J.; et al. Monitoring of selected estrogen mimics in complicated samples using polymeric ionic liquid-based multiple monolithic fiber solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1385, p. 12–19, 2015.
- 107 Mei, M.; Huang, X.; et al. Sensitive monitoring of trace nitrophenols in water samples using multiple monolithic fiber solid phase microextraction and liquid chromatographic analysis. **Talanta**, v. 134, p. 89–97, 2015.

- 108 Huang, X.; Wang, Y.; et al. Preparation a new sorbent based on polymeric ionic liquid for stir cake sorptive extraction of organic compounds and inorganic anions. **Journal of Chromatography A**, v. 1314, p. 7–14, 2013.
- 109 Chen, L.; Huang, X. Preparation of an adsorbent based on polymeric ionic liquid for the simultaneous extraction of acidic, basic and neutral pollutants. **Journal of Chromatography A**, v. 1466, p. 42–49, 2016.
- 110 Patinha, D.J.S.; Nallepalli, P.; et al. Poly(ionic liquid) embedded particles as efficient solid phase microextraction phases of polar and aromatic analytes. **Talanta**, v. 198, p. 193–199, 2019.
- 111 Zhang, Y.; Duan, Y. A double-functionalized polymeric ionic liquid used as solid-phase microextraction coating for efficient aromatic amine extraction and detection with gas chromatography–mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 10, p. 2209–2221, 2019.
- 112 Ho, T.D.; Toledo, B.R.; et al. Chemical immobilization of crosslinked polymeric ionic liquids on nitinol wires produces highly robust sorbent coatings for solid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 843, p. 18–26, 2014.
- 113 Feng, J.; Sun, M.; et al. Preparation of a polymeric ionic liquid-coated solid-phase microextraction fiber by surface radical chain-transfer polymerization with stainless steel wire as support. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 43, p. 7758–7764, 2011.
- 114 Pang, L.; Liu, J.-F. Development of a solid-phase microextraction fiber by chemical binding of polymeric ionic liquid on a silica coated stainless steel wire. **Journal of Chromatography A**, v. 1230, p. 8–14, 2012.
- 115 Feng, J.; Sun, M.; et al. Development of a functionalized polymeric ionic liquid monolith for solid-phase microextraction of polar endocrine disrupting chemicals in aqueous samples coupled to high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 23, p. 7025–7035, 2015.
- 116 Mei, M.; Huang, X.; et al. Multiple monolithic fiber solid-phase microextraction: A new extraction approach for aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1345, p. 29–36, 2014.
- 117 Pei, M.; Zhang, Z.; et al. Fabrication of a polymeric ionic liquid-based adsorbent for multiple monolithic fiber solid-phase microextraction of endocrine disrupting chemicals in complicated samples. **Talanta**, v. 165, p. 152–160, 2017.

- 118 Pacheco-Fernández, I.; Trujillo-Rodríguez, M.J.; et al. Zwitterionic polymeric ionic liquid-based sorbent coatings in solid phase microextraction for the determination of short chain free fatty acids. **Talanta**, v. 200, p. 415–423, 2019.
- 119 Ferreira, T.A.; Flores-Aguilar, J.F.; et al. New Poly(Ionic Liquid) Based Fiber for Determination of Oxytetracycline in Milk Samples by Application of SPME-CE Technique. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 430, 2019.
- 120 Wang, Y.; Zhang, J.; et al. Preparation of stir cake sorptive extraction based on polymeric ionic liquid for the enrichment of benzimidazole anthelmintics in water, honey and milk samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 840, p. 33–41, 2014.
- 121 Huang, X.; Chen, L.; et al. Preparation of a new polymeric ionic liquid-based monolith for stir cake sorptive extraction and its application in the extraction of inorganic anions. **Journal of Chromatography A**, v. 1248, p. 67–73, 2012.
- 122 Zhang, Z.; Zhao, Q.; et al. A hybrid porous material from a pillar[5]arene and a poly(ionic liquid): selective adsorption of n-alkylene diols. **Chemical Communications**, v. 50, n. 20, p. 2595, 2014.
- 123 Zhou, S.; Song, N.; et al. Preparation of carboxylatocalix[4]arene functionalized magnetic polyionic liquid hybrid material for the pre-concentration of phthalate esters. **Journal of Chromatography A**, v. 1565, p. 19–28, 2018.
- 124 Dai, X.; Wang, D.; et al. Hollow porous ionic liquids composite polymers based solid phase extraction coupled online with high performance liquid chromatography for selective analysis of hydrophilic hydroxybenzoic acids from complex samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1484, p. 7–13, 2017.
- 125 Liu, J.; Liang, Y.; et al. Polymeric ionic liquid-assembled graphene-immobilized silica composite for selective isolation of human serum albumin from human whole blood. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 2, p. 573–584, 2018.
- 126 Liu, J.-W.; Wang, M.-M.; et al. Polymeric ionic liquid modified reduced graphene oxide as adsorbent for highly selective isolation of acidic protein. **RSC Adv.**, v. 4, n. 106, p. 61936–61943, 2014.
- 127 Liu, C.; Deng, Q.; et al. Facile synthesis of graphene doped poly(ionic liquid) boronate affinity material for specific capture of glycoproteins. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 32, p. 5229, 2014.

- 128 Liu, S.; Wang, C.; et al. On-line SPE Using Ionic Liquid-Based Monolithic Column for the Determination of Antihypertensives in Human Plasma. **Chromatographia**, v. 79, n. 7–8, p. 441–449, 2016.
- 129 Pang, X.; Bai, L.; et al. Development of an SPE Method Using Ionic Liquid-Based Monolithic Column for On-Line Cleanup of Human Plasma and Simultaneous Determination of Five Steroid Drugs. **Chromatographia**, v. 81, n. 10, p. 1391–1400, 2018.
- 130 Ferreira, D.C.; Toffoli, A.L. de; et al. Online fully automated SPE-HPLC-MS/MS determination of ceftiofur in bovine milk samples employing a silica-anchored ionic liquid as sorbent. **ELECTROPHORESIS**, v. 39, n. 17, p. 2210–2217, 2018.
- 131 Huang, X.; Chen, L.; et al. Novel extraction approach for liquid samples: Stir cake sorptive extraction using monolith. **Journal of Separation Science**, p. n/a-n/a, 2011.
- 132 Wang, X.; Xing, L.; et al. Novel polymeric ionic liquid microspheres with high exchange capacity for fast extraction of plasmid DNA. **Analytica Chimica Acta**, v. 837, p. 64–69, 2014.
- 133 Zhao, F.; Meng, Y.; et al. Polymeric ionic liquids as selective coatings for the extraction of esters using solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1–2, p. 1–9, 2008.
- 134 Anderson, J.L.; Armstrong, D.W. Immobilized Ionic Liquids as High-Selectivity/High-Temperature/High-Stability Gas Chromatography Stationary Phases. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 19, p. 6453–6462, 2005.
- 135 AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) (2012). RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA –RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012.
- 136 (ANVISA), A.N.D.V.S. (2017). RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHODE 2017.
- 137 Thieme, U.; Schelling, G.; et al. Quantification of anandamide and 2-arachidonoylglycerol plasma levels to examine potential influences of tetrahydrocannabinol application on the endocannabinoid system in humans. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 1–2, p. 17–23, 2014.
- 138 Fanelli, F.; Mezzullo, M.; et al. Plasma 2-arachidonoylglycerol is a biomarker of age and menopause related insulin resistance and dyslipidemia in lean but not in obese men and

women. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 5, p. 406–415, 2017.

139 Dócs, K.; Mészár, Z.; et al. The Ratio of 2-AG to Its Isomer 1-AG as an Intrinsic Fine Tuning Mechanism of CB1 Receptor Activation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, 2017.

140 Zoerner, A.A.; Gutzki, F.-M.; et al. Quantification of endocannabinoids in biological systems by chromatography and mass spectrometry: A comprehensive review from an analytical and biological perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 11, p. 706–723, 2011.

141 Voort, P. Van Der; Vansant, E.F. Silylation of the Silica Surface A Review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 19, n. 17–18, p. 2723–2752, 1996.

142 Yoshida, W.; Castro, R.P.; et al. Multilayer Alkoxysilane Silylation of Oxide Surfaces. **Langmuir**, v. 17, n. 19, p. 5882–5888, 2001.

143 Ho, T.D.; Yu, H.; et al. Ultraviolet Photoinitiated On-Fiber Copolymerization of Ionic Liquid Sorbent Coatings for Headspace and Direct Immersion Solid-Phase Microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 21, p. 9520–9528, 2012.

144 Domingues, D.S.; Souza, I.D. de; et al. Analysis of drugs in plasma samples from schizophrenic patients by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry with organic–inorganic hybrid cyanopropyl monolithic column. **Journal of Chromatography B**, v. 993–994, p. 26–35, 2015.

145 Graham, C.M.; Meng, Y.; et al. Sorbent coatings for solid-phase microextraction based on mixtures of polymeric ionic liquids. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 3, p. 340–346, 2011.

146 Marzo, V. Di Endocannabinoids: synthesis and degradation. In: 2006, p. 1–24.

147 Gisi, S. De; Lofrano, G.; et al. Characteristics and adsorption capacities of low-cost sorbents for wastewater treatment: A review. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 9, p. 10–40, 2016.

148 Lian, Z.; He, X.; et al. Determination of sulfadiazine in Jiaozhou Bay using molecularly imprinted solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography with a diode-array detector. **Journal of Chromatography B**, v. 957, p. 53–59, 2014.

Capítulo 3

Síntese de fase estacionária a base de líquidos iônicos
contendo Ag^+ para cromatografia gasosa bidimensional
abrangente

Capítulo 3

3.1 Introdução e justificativa

3.1.1 Importância da determinação de hidrocarbonetos e compostos oxigenados de baixa massa molecular

A separação e purificação hidrocarbonetos e compostos oxigenados (como por exemplo ésteres, aldeídos, cetonas e terpenos) de baixa massa molecular é importante para a indústria química. Por exemplo, muitos hidrocarbonetos insaturados são matérias-primas essenciais utilizadas na obtenção de produtos químicos industriais incluindo polietileno, etilenoglicol, óxido de propileno e etilbenzeno (149). Já os ésteres, aldeídos, cetonas e terpenos são amplamente empregados na indústria farmacêutica, cosmética, agronômica e alimentícia como agentes antimicrobianos, fragrâncias, fungicidas e aromatizantes (150).

A cromatografia gasosa convencional é um dos métodos mais utilizados para a separação de compostos voláteis. Entretanto, em alguns casos, as fases estacionárias convencionais, como PDMS e PEG apresentam desempenho insuficiente para a separação desses multianalitos (amostras complexas) desafiadores (151).

A cromatografia gasosa bidimensional abrangente ($GC \times GC$) é uma técnica analítica de alta eficiência para a separação de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis em matrizes complexas. A maior capacidade de pico oferecida pela técnica $GC \times GC$ permite obter separações multianalitos em curto intervalos de tempo.

Em $GC \times GC$, a escolha de colunas com seletividade adequada pode ajudar a separar analitos de propriedades físico-químicas similares. Por exemplo, as colunas PLOT de alumina tem oferecido bons resultados na separação de hidrocarbonetos (C_4 - C_{12}) incluindo alcanos, alcenos e seus isômeros (152). Contudo, estas colunas não são capazes de resolver 100% de todas as amostras requeridas (153). Sendo assim, o desenvolvimento de novas fases estacionárias são atividades essenciais. Além disso, a coluna de PLOT de alumina mais amplamente utilizada possui um diâmetro interno de 0,53 mm, que é maior do que a maioria das colunas 1D utilizadas em $GC \times GC$. Como relatado por Cordero et al (154), o uso de colunas

^2D com diâmetro maior do que a ^1D causa o alargamento dos picos e reduz a resolução cromatográfica da análise.

Desta forma, o desenvolvimento de colunas compatíveis com GC $\times$ GC e com seletividade específica para a separação de hidrocarbonetos e compostos oxigenados de baixa massa molecular é uma necessidade notória.

3.1.2 Desenvolvimento de fases estacionárias seletivas para cromatografia gasosa bidimensional

A escolha adequada da combinação de colunas utilizadas nos métodos GC $\times$ GC é fundamental para alcançar boa eficiência de separação de misturas complexas. A boa estruturação dos cromatogramas 2D depende em grande parte da combinação de diferentes seletividades aplicadas em cada uma das dimensões.

Por muito tempo, as fases estacionárias disponíveis para estes experimentos se limitavam basicamente a mecanismos de separação baseadas no ponto de ebulição (colunas apolares) e na polaridade dos analitos (colunas de média a alta polaridade). Durante o período inicial de desenvolvimento da cromatografia gasosa bidimensional, muitos trabalhos publicados propunham melhorias nas separações cromatográficas 2D pela otimização da diferença de polaridade entre as duas dimensões. As colunas mais reportadas eram aquelas contendo as fases estacionárias a base de polidimetilssiloxano (apolar), polietilenoglicol (polar) e as de polaridade intermediária obtidas pela modificação do polidimetilssiloxano. Ainda hoje estas colunas, comercializadas sob diferentes nomes, são protagonistas de um número expressivo de trabalhos (155,156).

Aparte da combinação mais convencional apolar $\times$ polar, outros tipos de combinação como polar $\times$ apolar (157,158) e apolar $\times$ média polaridade (159)(160) também foram reportados para a separação de diferentes amostras complexas. Essas novas combinações foram importantes provando que o ajuste da seletividade em combinações não ortogonais também podem resultar em cromatogramas com picos completamente resolvidos (63).

Com a sua popularização, as fases comerciais a base de polidimetilssiloxano e polietilenoglicol passaram a apresentar limitações quanto a capacidade de pico e separação de amostras de elevada complexidade contendo compostos com propriedades físico-químicas bastante similares.

Logo, prospecção de novas fases estacionárias com seletividade diferenciadas passaram a ser o tema central de muitos trabalhos publicados na literatura. Fases estacionárias modernas com seletividade baseada em fatores estruturais, quiralidade ou presença de grupos específicos na estrutura química dos analitos, por exemplo, foram empregadas em métodos GC $\times$ GC superando a limitação das colunas tradicionais.

A escolha de colunas secundárias é tarefa que exige bastante cautela. Colunas 2D devem apresentar rápidos equilíbrios de sorção, baixa dispersão dos analitos e alta seletividade para gerar picos estreitos, separação cromatográfica satisfatória e elevada capacidade de pico.

De modo geral, nem todas as colunas primárias são compatíveis para serem usadas como colunas secundárias. Por este motivo, os trabalhos dedicados a síntese de novas fases estacionárias 2D são importantes para o desenvolvimento GC $\times$ GC, pois propiciam a expansão no campo de aplicação em amostras analiticamente desafiadoras.

A determinação de moléculas quirais em diferentes tipos de amostras é uma atividade complexa bastante requerida em diversos campos. O desenvolvimento fases estacionárias a base de ciclodextrina para a cromatografia gasosa convencional (161) e posteriormente sua adequação para cromatografia gasosa bidimensional tem somado um grande avanço no campo das separações enantioméricas (162). Por exemplo, a combinação das fases estacionárias Ciclodextrina $\times$ polietilenoglicol permitiu a separação de misturas enantioméricas de terpenos (163), açúcares (164) e alcaloides (165) em extratos vegetais.

Fases estacionárias a base de ciclodextrina, na maioria das vezes, não são compatíveis com a dimensão 2D visto que baixas temperaturas e longo comprimento de coluna são necessários para que as separações quirais apresentem resolução cromatográfica satisfatórias (61). Desta forma, muitas vezes modificações na composição da fase estacionária ou modificações instrumentais são necessárias para tornar estas colunas compatíveis com a dimensão 2D . Por exemplo, a combinação de colunas ciclodextrina $\times$ BP-20 (polietilenoglicol) foi reportada para a determinação de monoterpênos (162). Contudo, cromatogramas pouco estruturados foram obtidos nestes experimentos enantio-GC $\times$ GC. Mais tarde, Shellie e Marriott apresentaram uma solução para esta limitação desenvolvendo um arranjo instrumental no qual pressão negativa foi aplicada no final da coluna 2D para acelerar a eluição dos analitos (166). Com esta ideia, os autores desenvolveram um método GC $\times$ enantio-GC empregando a combinação de colunas DB-5 (5%-fenil-dimetilpolissiloxano) $\times$ ciclodextrina, a qual melhorou significativamente estruturação no cromatograma da separação dos monoterpênos.

Separções cromatográficas baseadas em substituintes específicos na estrutura dos analitos são interessantes para a identificação de classes específicas de moléculas. O método

GC×GC-μECD (μECD, microdetector por captura de elétron) foi proposto por Korytár et al (167) para a determinação de compostos bifenílicos policlorados em amostras de fígado de peixe. Neste trabalho, a combinação de colunas HP-1 (dimetilpolissiloxano) × HT-8 (8% fenil (equiv.) policarborano-siloxano) apresentou cromatogramas bidimensionais estruturalmente ordenados com base no número de grupos cloro substituídos em posição orto na estrutura da molécula dos analitos. Esta mesma combinação de colunas foi avaliada pelos mesmo grupo de pesquisa para a separação de toxafeno por GC×GC- TOF-MS (168). Este método foi aplicado para a separação de uma amostra de taxofeno constituída por mais de 1000 compostos orgânicos policlorados e a mesma tendência na estruturação nos cromatogramas foi observada.

Fases estacionárias a base de cristais líquidos exibem interação baseada na geometria espacial dos analitos (169,170).

Haglund et al (171) propuseram a combinação de colunas LC-50 (50%-cristal líquido/50% polidimetilssiloxano) × BPX-5 (5%-fenil-metilsilfenileno-polissiloxano) para análise de compostos planares bifenílicos policlorados (PCBs). Como resultados, os PCBs não clorados nas posições orto do anel aromático apresentaram maior retenção na coluna LC-50 seguido pelos PCBs monoclorados e multiclorados. Os compostos não clorados em posição orto apresentam geometria plana. Em conclusão, a retenção em ¹D foi relacionada com a planaridade da molécula dos analitos, ou seja, quanto maior o grau de planaridade da molécula maior foi o tempo de retenção nesta dimensão. Posteriormente uma nova combinação de colunas foi proposto por estes autores para a separação de uma amostra maior de PCBs contendo 144 compostos incluindo algumas formas enantioméricas (172). Neste trabalho, os autores fizeram uso de uma coluna ¹D quiral para promover a separação enantio-seletiva dos isômeros e a coluna LC-50 em 2D para a separação baseada na geometria espacial dos analitos.

Fases estacionárias a base de líquidos iônicos têm sido exploradas com sucesso em GC × GC. O primeiro uso de fase estacionária baseada em líquidos iônicos para cromatografia gasosa multidimensional foi reportado em 2006 (173). Neste trabalho, os autores utilizaram uma coluna primária Rtx-1 (polidimetilssiloxano) e uma coluna secundária preparada com bis[(trifluorometil)sulfonil]imidato de 1,9-di(3-vinylimidazolio)nonano [(VIM)₂C₉][NTf₂⁻]. Então, uma mistura contendo 20 componentes foi utilizada para avaliar o desempenho da coluna secundária [(VIM)₂C₉][NTf₂⁻]. Esta coluna foi capaz de separar com sucesso os analitos 2-*n*-pentilfurano e 1,3-Diclorobenzeno, os quais coeluíram empregando uma coluna comercial.

Atualmente é possível encontrar no mercado alguns tipos de colunas a base de líquido iônicos. Geralmente estas colunas apresentam polaridade elevada como as colunas SBL-IL59 (bis[(trifluorometil)sulfonil]imidato de 1,12-Di(tripropilfosfônio)dodecano, [(C₃P)₂C₁₀][NTf₂⁻]

)), SBL-IL100 (bis[(trifluorometil)sulfonil]imidato de 1,9-di(3-vinylimidazolio)nonano, [(VIM)₂C₉][NTf₂⁻]), SBL-IL100 (bis[(trifluorometil)sulfonil]imidato de 1,5-di(2,3-dimetilimidazolio)pentano, [(MIM)₂C₅][NTf₂⁻]), etc.

Zeng et al (174) compararam o desempenho de diferentes colunas comerciais a base de líquidos iônicos para a separação de ésteres metílicos de ácidos graxos de cadeia longa. A combinação de colunas DB-5ms ((5%-Fenil)-metilpolissiloxano) × SBL-IL100 apresentou capacidade de pico 4 vezes maior comparado com a combinação de colunas convencionais DB-5ms × DB-FFAP (polietilenoglicol modificado).

Mahé et al (175) avaliaram a coluna SLB-IL59 combinada com diferentes colunas comerciais de polaridade variada para a separação de compostos aromáticos policíclicos a base de enxofre. Neste trabalho, a melhor capacidade de pico e poder de separação foram obtidos empregando a combinação de colunas SLB-IL59 × DB5-HT ((5%-fenil)-metilpolissiloxano). Além disso, coluna SLB-IL59 apresentou um padrão inovativo de separação baseado nos substituintes sulfurados dos analitos.

Hantao et al (59) introduziram um novo tipo de colunas capilares a base de líquidos iônicos contendo íons metálicos, tetracloroferrato de tri-hexil(tetradecil)fosfônio ([P₆₆₆₁₄][FeCl₄]). Este estudo demonstrou que a fase estacionária ²D ([P₆₆₆₁₄][FeCl₄]) acoplada a coluna Rtx-5 (difenildimetilpolissiloxano) em ¹D, foi capaz de estabelecer interações dispersivas e dipolo-dipolo melhorando a resolução cromatográfica de analitos apolares em amostras de querosene. Em adição, a coluna [P₆₆₆₁₄][FeCl₄] apresentou temperatura máxima de operação de 320 ° C, cujo valor é significativamente maior do as fases estacionárias comerciais a base de polietilenoglicol.

3.1.3 Interação entre Ag⁺ e compostos insaturados

Ag⁺ possui orbitais capazes de estabelecer interações reversíveis com compostos insaturados (176–179). Esta habilidade foi explorada em diferentes técnicas de separação. Na literatura é possível encontrar diferentes trabalhos reportando o uso de Ag⁺ para a separação de lipídios e ácidos graxos insaturados por cromatografia em camada delgada (180) e HPLC (181).

O trabalho pioneiro na síntese de fase estacionária GC contendo Ag⁺ foi proposto em 1958 por Gil-Av et al (182). Neste trabalho as fases estacionárias foram sintetizadas pela dissolução de nitrato de prata em cianeto de benzila e trietilenoglicol. Estas colunas foram

avaliadas para a separação de uma mistura contendo metilenociclo-hexano e isômeros geométricos da metilenociclo-hexeno. Apesar de resultados promissores terem sido observados na separação destes compostos, as colunas sintetizadas apresentaram baixa estabilidade térmica (65 °C) (183,184). Desta forma, a ideia do uso de fases estacionárias a base de Ag^+ para GC permaneceu adormecida durante algumas décadas.

Em 2012 Binnemans e coautores (182) reportaram a síntese de uma nova classe de líquidos iônicos contendo Ag^+ (IL- Ag^+). Neste trabalho, os autores não tinham um propósito de aplicação analítica para compostos, os quais foram avaliados como precursores para processos de eletrodeposição de prata. O cátion deste líquido iônico foi formado pela complexação do íon Ag^+ com dois ligantes N-alquilimidazol.

Inspirado pelos trabalhos de Binnemans, em 2017 Nan et al (179) retomaram a proposta do uso de Ag^+ em colunas de CG. Neste caso, foram sintetizadas fases estacionárias com estabilidade térmica superior (125 – 150 °C) a obtida pelas colunas preparadas por Gil-Av et al (182) (65 °C). Diferentes fases estacionárias foram preparadas utilizando diferentes proporções de $[\text{Ag}^+(\text{MIM})(\text{BIM})][\text{NTf}_2^-]$ IL e $[\text{Ag}^+][\text{NTf}_2^-]$. Os autores demonstraram que com sucesso a separação do hexano e 1-hexeno. Além disto, foi observada que esta seletividade pode ser aumentada com o aumento da quantidade de Ag^+ na fase estacionária, Figura 3.23.

Baseado nos resultados obtidos por Nan et al (179), este capítulo relataram a síntese de nova fase estacionária contendo IL- Ag^+ para aplicação em experimentos GC $\times$ GC.

Figura 3.23 - Cromatogramas 1D-GC-FID da separação de hexano e 1-hexeno empregando fases estacionárias (a) [BMIM⁺][NTf₂⁻] (b) [Ag⁺(MIM)(BIM)][NTf₂⁻] e (c) [Ag⁺(MIM)(BIM)][NTf₂⁻].

Fonte: Figura traduzida da referência (179).

3.1.4 Objetivo geral

Prospecção de uma nova classe de fase estacionária obtida a partir de líquidos iônicos contendo Ag^+ (IL- Ag^+) para GC $\times$ GC. Espera-se que a combinação de colunas apolar $\times$ IL- Ag^+ apresente alta estabilidade térmica e alto poder de separação para hidrocarbonetos insaturados e compostos insaturados de baixa massa molecular.

3.1.5 Objetivos específicos

- (i) Sintetizar e caracterizar os compostos IL- Ag^+ ;
- (ii) Otimizar a síntese da fase estacionária contendo IL- Ag^+ ;
- (iii) Avaliar a combinação das colunas apolar $\times$ IL- Ag^+ para a separação misturas contendo aldeídos, cetonas, ésteres, alcanos, alcenos, alquinos, dienos e terpenos;
- (iv) Aplicar o método GC $\times$ GC para a análise de uma amostra comercial contendo ácidos graxos insaturados.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Materiais

Bis[(trifluorometil)sulfonyl]amina (HNTf₂, 99%), óxido de prata (I) (99%), diclorometano (99.8%), acetonitrila (99.9%), 1-butilimidazol (C4IM, 98%), 1-decil-2-metillimidazol (C₁₀MIM, 97%), 1-clorobutano (99%) e os padrões utilizados para caracterizar as colunas capilares (Quadro 3.3) incluindo a mistura de ácidos graxos insaturados (comercialmente disponíveis como ácidos graxos polinsaturados – PUFA N° 2) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).. 1-Bromooctano (98%) foi obtido de Acros Organics (Morris Plains, NJ). 1-Metilimidazol (MIM, 99.0%) foi comprado de Fluka (Stainheim, Germany). A coluna SUPELCOWAX10 (30 m, 0,20 mm i.d., 0,20 µm PEG), SUPELCOWAX10 (30 m, 0,25 mm i.d., 0,25 µm PEG) e os capilares de sílica fundida (0,25 mm i.d.) foram comprados de Supelco (Bellefonte, PA). A coluna Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm i.d., 0,25 µm 5% difenil/ 95% dimetilpolissiloxano) foi comprada de Restek (Bellefonte, PA). Tubos de politetrafluoretileno (PTFE, 0,012 mm d.i, 0,009 espessura as paredes, PN 72154) foram comprados de Zeus Industrial Products, Inc (Orangeburg, SC).

3.2.2 Instrumentação

As separações cromatográficas bidimensionais foram realizadas num equipamento GC × GC-FID, construído pelo próprio grupo de pesquisa, a partir da adaptação de um cromatógrafo em fase gasosa Agilent 6890 GC-FID. Este instrumento foi equipado com um injetor de divisor de fluxo (split/splitless) e um modulador *loop* criogênico de dois estágios. A modulação do sistema foi realizada por pulsos alternados (quente ou frio) de N₂ (g). Uma válvula solenóide de três vias Asco (Florham Park, NJ, EUA) foi empregada para alternar o fluxo contínuo de N₂ (g), o qual foi continuamente e periodicamente direcionado ora para o sistema de aquecimento (300 °C) ora para o sistema de resfriamento. Um segmento de capilar de sílica fundida (1,0 m, 0,25 mm i.d.) foi utilizado como *loop* coletor. A interface gráfica para controle do modulador, foi criada com o *software* Microsoft Visual Basic. Já a

aquisição/processamento e visualização dos dados foram realizados com os *softwares* Agilent ChemStation e GC Image 2.04 (Zoex Corporation, Houston, TX, EUA), respectivamente. Uma descrição mais detalhada do equipamento pode ser encontrada na referência (59).

3.2.3 Síntese dos compostos da fase estacionária (IL e IL-Ag⁺)

a) Líquidos iônicos contendo Ag⁺ (IL-Ag⁺)

A síntese dos IL-Ag⁺ foi realizada com base em procedimentos descritos na literatura (179,182,185). Inicialmente, 0,05 mols de óxido de prata (I) e 0,1 mol de HNTf₂ foram dissolvidos em acetonitrila. Esta mistura foi mantida sob agitação magnética constante a temperatura ambiente por 2 h. Em seguida, esta solução foi filtrada em papel de filtro e o filtrado foi recolhido em um frasco de 20 mL. Então, a acetonitrila foi evaporada com o auxílio de um rotoevaporador. O líquido viscoso remanescente, composto por [Ag⁺(ACN)][NTf₂⁻], foi mantido em estufa a vácuo à temperatura ambiente por 12 horas.

Na segunda etapa, utilizando diclorometano como solvente, [Ag⁺(ACN)][NTf₂⁻] foi misturado com a combinação dos ligantes MIM:C₄IM, C₁₀MIM:MIM e C₁₀MIM:C₄IM na proporção molar [Ag⁺(ACN)][NTf₂⁻]:ligante:ligante de 1:1:1. Esta mistura foi mantida sob agitação magnética constante a temperatura ambiente por 2 h. Após a evaporação do solvente, foram gerados os seguintes IL-Ag⁺: [(MIM)(C₄IM)Ag⁺][NTf₂⁻], [(C₁₀MIM)(MIM)Ag⁺][NTf₂⁻] e [(C₁₀MIM)(C₄IM)Ag⁺][NTf₂⁻], Figura 3.24a. Todos os IL-Ag⁺ foram mantidos em estufa a vácuo à temperatura ambiente por 12 horas.

b) Líquidos iônicos convencionais (IL)

Bis(trifluorometil)sulfonilimidato de 1-butil-3-metilimidazolio [C₄MIM⁺][NTf₂⁻], bis(trifluorometil)sulfonilimidato de 1-octil-3-metilimidazolio [C₈MIM⁺][NTf₂⁻] e bis(trifluorometil)sulfonilimidato de 1-decil-3-metilimidazolio [C₁₀MIM⁺][NTf₂⁻] foram preparados pela reação de 1 molar equivalente de 1-clorobutano, 1-bromooctano e 1-

bromodecano, respectivamente, com 1 molar equivalente MIM em 15 mL de isopropanol a 70 °C por 24 h. Após a síntese, o produto obtido foi dissolvido em 10 ml de água e lavado três vezes consecutivas com 5 ml de diclorometano e três vezes com 5 ml de acetato de etilo. Em seguida, a água foi evaporada a 50 °C em um rotoevaporador e os produtos remanescentes foram secos sob vácuo a 80 °C por 48 h. Após secagem, 1 molar equivalente de cada produto foi dissolvido em água juntamente com 1 molar equivalente de bis(trifluorometil)sulfonil]imidato de lítio [Li⁺] [NTf₂⁻] e mantido sob agitação por 18 h para a troca do ânion halogeneto por [NTf₂⁻]. Após procedimento de purificação, a água foi evaporada a 50 °C em um rotoevaporador e os produtos remanescentes foram secos sob vácuo a 80 °C por 48 h. Todos os produtos (Figura 3.24b) foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de ¹H (ver espectros RMN ¹H em Anexos G-I).

Figura 3.24 - Estrutura dos líquidos iônicos sintetizados

a) Líquidos iônicos contendo Ag⁺

b) Líquidos iônicos convencionais (LI)

Fonte: Próprio autor.

3.2.4 Recobrimento dos capilares com filme fino de fase estacionária

O recobrimento dos capilares de sílica foi realizado pelo método estático a 40 °C e pressão negativa de 60 psi, Figura 3.25. A solução de recobrimento foi preparada pela

dissolução dos IL e IL-Ag⁺ em diclorometano. As colunas capilares com filmes de fase estacionária 0,28 µm e 0,15 µm de espessura foram obtidas com o uso de soluções de recobrimento de concentração 0,45 e 0,24% (*m/v*), respectivamente.

Para o recobrimento, segmentos de 3 metros de capilar de sílica fundida (0,25 mm d.i.) foram preenchidos com as soluções de recobrimento citadas no parágrafo anterior. Em seguida, uma das extremidades do capilar foi vedada com tubos de PTFE e a outra foi conectada à bomba a vácuo para evaporação do solvente e formação do filme de fase estacionária. Após o recobrimento completo das colunas, elas foram condicionadas utilizando o seguinte programa de temperatura: aumento de 40 °C a 110 °C a 1 °C min⁻¹, isoterma de 110 °C por 1 h. O hélio a um fluxo constante de 1 mL min⁻¹ foi utilizado como gás de arraste.

Figura 3.25 – Esquema do aparato instrumental para deposição do filme de fase estacionária nos capilares de sílica pelo método estático.

Fonte: próprio autor.

3.2.5 Otimização da composição da fase estacionária ²D

Colunas capilares recobertas com diferentes fases estacionárias (0,28 µm de espessura de filme) foram preparadas neste estudo. Foram preparadas colunas contendo apenas IL, IL-Ag⁺ ou uma mistura de IL, IL-Ag⁺ (Tabela 3.9)

Tabela 3.9 – Composição (m/m) das fases estacionárias utilizadas para o recobrimento de capilares de sílica fundida (0,25 mm d.i.). Todos os compostos apresentados nesta tabela foram combinados com o ânion NTf₂⁻

Coluna	Composição da fase estacionária (m/m)					
	C ₄ MIM ⁺	C ₈ MIM ⁺	C ₁₀ MIM ⁺	(MIM)(C ₄ IM)Ag ⁺	(C ₁₀ MIM)(MIM)Ag ⁺	(C ₁₀ MIM)(C ₄ IM)Ag ⁺
11IL-Ag⁺	0	0	0	1	0	0
310IL11IL-Ag⁺	0	0	10	1	0	0
320IL11IL-Ag⁺	0	0	20	1	0	0
330IL11IL-Ag⁺	0	0	30	1	0	0
340IL11IL-Ag⁺	0	0	40	1	0	0
350IL11IL-Ag⁺	0	0	50	1	0	0
31IL	0	0	1	0	0	0
250IL11IL-Ag⁺	0	50	0	1	0	0
150IL11IL-Ag⁺	50	0	0	1	0	0
330IL21IL-Ag⁺	0	0	30	0	1	0
350IL31IL-Ag⁺	0	0	50	0	0	1
320IL21IL-Ag⁺	0	0	20		1	

3.2.6 Caracterização das colunas capilares 2D

a) Termoestabilidade

Um segmento de 120 cm de comprimento da coluna capilar 350IL21IL-Ag⁺ foi utilizada para determinar a temperatura máxima de trabalho da permitida (MAOT, do inglês *maximum allowable operating temperature*). Este segmento foi instalado no GC-FID e submetido ao seguinte programa de temperatura: aumento de 40 °C a 250 °C a 10 °C.min⁻¹.

Paralelamente, um outro segmento de 120 cm do mesmo capilar foi condicionado em diferentes temperaturas 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 e 210 °C (1 h de duração para cada temperatura). Após cada ciclo de aquecimento na respectiva temperatura, uma mistura contendo 2,4-pentadienoato de metila e 3-pentenoato de metilo foi injetada no sistema GC × GC-FID e a resolução cromatográfica ²D foi calculada.

b) Durabilidade e reprodutibilidade da coluna capilar

Para calcular a durabilidade e a reprodutibilidade das fases estacionárias sintetizadas, um segmento de 120 cm de comprimento da coluna capilar 350IL21IL-Ag⁺ foi instalada em ²D no sistema GC × GC-FID. Em seguida, uma amostra contendo 2,4-pentadienoato de metila e 3-pentenoato de metilo foi injetada múltiplas vezes e os tempos de retenção (²t_R) bem como a largura dos picos cromatográficos na segunda dimensão foram determinados após cada injeção.

3.2.7 Avaliação das colunas capilares 2D

Duas misturas contendo diferentes grupos de compostos foram utilizadas para avaliar o poder de separação das colunas preparadas. Todos os ensaios foram realizados empregando a

combinação de colunas Rtx-5MS $\times$ 350IL21IL-Ag⁺. Para fins comparativos, as mesmas amostras foram injetadas utilizando a combinação de colunas Rtx-5MS $\times$ SUPELCOWAX10.

a) Mistura 1: análise de aldeídos, cetonas e ésteres

A mistura 1 foi preparada selando 3 μ L de cada um dos padrões (1 a 33, Quadro 3.3) em um frasco de 20 mL. Um microlitro do headspace foi injetado no sistema GC $\times$ GC-FID empregando razão split de 5:1 e pressão no inlet de 9,32 psi. A separação cromatográfica foi realizada utilizando o seguinte programa de temperatura: aumento de 40 °C até 44 °C a 2 °C min⁻¹; aumento para 100 °C a 5 °C min⁻¹ e 100 °C por 3 min. Tempo de modulação: 10 s. O tempo de modulação foi de 10 s.

b) Mistura 2: Análise de alcanos, alcenos, alcinos, dienos, cicloalcanos e terpenos

A mistura 2 foi preparada selando 3 μ L de cada um dos padrões (34 a 57, Quadro 3.3) em um frasco de 20 mL. Um microlitro do *headspace* foi injetado no sistema GC $\times$ GC-FID empregando razão split de 5:1 e pressão no inlet de 9,32 psi. A separação cromatográfica foi realizada utilizando o seguinte programa de temperatura: 25 °C por 3 min, aumento para 44 °C a 2 °C min⁻¹; aumento para 90 °C a 5 °C min⁻¹, 90 °C por 2,3 min. O tempo de modulação foi de 10 s.

Quadro 3.3 – Compostos utilizados para o preparo da Mistura 1 (1 ao 33) e Mistura 2 (34 ao 57) utilizadas para avalia as colunas 2D

Número	Nome	Estrutura química	Número	Nome	Estrutura química
ALDEÍDOS			ESTERES		
1	Propanal		14	Acetato de etila
2	Butanal		15	Acetato de metila
3	Pentanal		16	Butanoato de metila
4	Hexanal		17	Butanoato de etila
5	Heptanal		18	2-metil-2-butenato de 2-propenila
6	Octanal		19	2-metil-butanoato de etila
7	Benzaldeído		20	Butanoato de isopropila
CETONAS			21	4-pentenoato de metila
8	Propanona		22	Pentanoato de metila
9	2-Butanona		23	2,4-pentadienoato de metila
10	2-Pentanona		24	3-pentenoato de metila
11	3-Pentanona		25	2-metil-2-butenato de metila

Continua na próxima página.

Continuação do Quadro 3.3.

Número	Nome	Estrutura química	Número	Nome	Estrutura química
12	2-Hexanona		26	Pentanoato de etila
13	Ciclo-hexanona		27	Acetado de 3-metil-butila
28	2-metil-2-butenato de etila		45	2-Hexino
29	Hexanoato de etila		46	1-Hexino
30	2-metil-2-butenato de propila		47	3-Hexino
31	2-metil-2-butenato de isopropila		48	Tolueno
32	Heptanoato de etila		49	n-Octano
33	Acetato de heptila		50	<i>m</i> -Xileno
ALCANOS			51	<i>o</i> -Xileno
34	n-Pentano		52	<i>p</i> -Xileno
35	2,4-Hexadieno		53	1,8-Nonadieno
36	3-Metil-1,4-pentadieno		54	1-Noneno
37	1,5-Hexadieno		55	n-Nonano
38	1,3-Hexadieno		TERPENOS		
39	1-Hexeno		56	Mirceno
40	Cis 2-hexeno		57	α -Terpinene
41	3-Hexeno		58	γ -Terpinene
42	n-Hexano		59	Terpinolene
43	2,3-Dimetill-1,3-butadieno		57	α -Terpinene
44	Benzeno

3.2.8 Aplicação do método GC × GC-FID

A mistura comercial de PUFA foi diluída em diclorometano na concentração de 10 µg mL⁻¹. Em seguida, 1 µL desta solução foi injetada GC × GC-FID utilizando a combinação de coluna Rtx-5MS × 350IL21IL-Ag⁺ e Rtx-5MS × SUPELCOWAX10 com razão split de 100:1 e pressão no inlet de 9,32 psi. A separação cromatográfica foi realizada em modo isotérmico a 180 °C por 47 min. O tempo de modulação foi de 10 s.

Figura 3.26 - Estrutura química dos ácidos graxos insaturados presentes na amostra comercial (PUFA N° 2)

Fonte: Próprio autor.

3.3 Resultados e discussão

O desenvolvimento deste projeto ocorreu em quatro etapas incluindo a otimização da síntese dos compostos da fase estacionária (IL e IL- Ag^+), otimização da composição da fase estacionária 2D, caracterização e avaliação do poder de separação das colunas capilares 2D e aplicação do método GC $\times$ GC-FID.

3.3.1 Síntese dos compostos da fase estacionária (IL e IL- Ag^+)

A síntese dos líquidos iônicos contendo Ag^+ foi realizada em duas etapas, Figura 3.27. Na etapa I o óxido de prata foi solubilizado em acetonitrila em presença do ácido HNTf_2 para gerar o composto intermediário $\text{Ag}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{NTf}_2$. Na etapa II, o composto intermediário foi solubilizado em acetonitrila e misturado com os ligantes imidazólicos, os quais atuaram como agente quelante para o íon Ag^+ . Após a eliminação do solvente de síntese, foi possível observar a formação do $[(\text{C}_{10}\text{MIM})(\text{MIM})\text{Ag}^+][\text{NTf}_2]$, cujos cristais apresentam o formato de “agulhas”.

Já os líquidos iônicos convencionais foram sintetizados por reações do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ entre o nucleófilo MIM e os haletos de alquila correspondentes.

Figura 3.27 - Síntese do líquido iônico contendo íons Ag^+ .

Etapa I

Etapa II

Fonte: próprio autor.

Os procedimentos de síntese e purificação tanto dos IL quanto dos IL- Ag^+ são processos bastante importantes para o preparo das fases estacionárias. A presença de impurezas pode alterar significativamente a seletividade da fase estacionária e na heterogeneidade no recobrimento dos capilares. Desta forma, a etapa de secagem e remoção do solvente de síntese foram cuidados essenciais tomados neste trabalho. A Figura 3.28a é um contra exemplo, no qual foi utilizada uma solução impura de IL- Ag^+ . Nesta imagem é possível observar que não houve um recobrimento efetivo e “gotas” da fase estacionária foram formadas na superfície do capilar. Já a Figura 3.28b, trata de um exemplo de capilar obtido com solução de recobrimento purificada. Nesta imagem houve o recobrimento efetivo dos capilares formando um filme fino de fase estacionária homogêneo.

Figura 3.28 – Imagens de microscopia ótica de capilares recobertos com fase estacionária $[(\text{C}_4\text{IM})(\text{MIM})\text{Ag}^+][\text{NTf}_2^-]:([\text{C}_{10}\text{MIM}^+][\text{NTf}_2^-] \text{ 1:30 (m/m)})$. Em a) é representado um capilar obtido com solução de recobrimento contendo traços de impurezas e em b) com solução de recobrimento após remoção completa das impurezas. A seta em vermelho destaca as “gotas” de fase estacionária formadas na superfície do capilar devido ao recobrimento não homogêneo.

Fonte: Próprio autor.

3.3.2 Otimização do preparo da coluna 2D contendo fase estacionária constituída de IL- Ag^+

a) Concentração de IL- Ag^+

Embora a fase estacionária contendo íons Ag^+ foi reportada para a separação de hidrocarbonetos insaturados por experimentos 1D GC-FID convencionais (179), o uso dessas colunas na segunda dimensão em experimentos $\text{GC} \times \text{GC}$ enfrentou inúmeros desafios. Ao tentar utilizar em 2D a coluna cromatográfica contendo a fase estacionária constituída apenas de $(\text{C}_4\text{IM})(\text{MIM})\text{Ag}^+[\text{NTf}_2^-]$, picos assimétricos e excessiva retenção dos analitos foram observados, Figura 3.29.

Figura 3.29 - Cromatogramas $\text{GC} \times \text{GC}$ -FID da separação de uma mistura contendo (1) n-hexano, (2) 2-hexeno, (3) 4-pentenoato de metila, (4) pentanoato de metila, (5) 3-pentenoato de metila e (6) 2,4-pentadienoato de metila utilizando a combinação de colunas Rtx-5MS (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm) $\times$ $[(\text{C}_4\text{IM})(\text{MIM})\text{Ag}^+][\text{NTf}_2^-]$ (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm). Temperatura programada: 35 $^\circ\text{C}$ a 54 $^\circ\text{C}$ a 2 $^\circ\text{C min}^{-1}$; aumento para 90 $^\circ\text{C}$ a 5 $^\circ\text{C min}^{-1}$.

Fonte: Próprio autor.

Para contornar esta limitação, a natureza retensiva da fase estacionária em 2D foi reduzida pela dissolução do $[(\text{C}_4\text{IM})(\text{MIM})\text{Ag}^+][\text{NTf}_2^-]$ em $[\text{C}_{10}\text{MIM}^+][\text{NTf}_2^-]$. Cinco novas colunas foram preparadas utilizando uma mistura de $[(\text{C}_4\text{IM})(\text{MIM})\text{Ag}^+][\text{NTf}_2^-]$: $[\text{C}_{10}\text{MIM}^+][\text{NTf}_2^-]$ em proporções que variaram de 1:10 a 1:50 (m/m). Além disso, uma coluna contendo apenas $[\text{C}_{10}\text{MIM}^+][\text{NTf}_2^-]$ também foi preparada para fins comparativos. A Figura 3.30 ilustra os cromatogramas obtidos utilizando estas diferentes colunas. Como pode ser observado, a capacidade retensiva na segunda dimensão diminui com a redução da

proporção de $[(C_4IM)(MIM)Ag^+][NTf_2^-]$. Contudo, a seletividade na segunda dimensão foi completamente perdida para a fase estacionária constituída de $[(C_4IM)(MIM)Ag^+][NTf_2^-]/[C_{10}MIM^+][NTf_2^-]$ 1:50 (m/m) indicando uma diluição excessiva.

Comparando os valores de resolução cromatográfica (R) dos analitos selecionados, os maiores valores de 2R para a separação de n-hexano (1) e 1-hexeno (2) ($R_{1,2} = 0,49$) foram obtidos com a coluna $[(C_4IM)(MIM)Ag^+][NTf_2^-]/[C_{10}MIM^+][NTf_2^-]$ 1:20 (m/m). Já para os ésteres, os maiores valores de 2R para 4-pentenoato de metila, pentanoato de metila (4), 3-pentenoato de metila (5) e 2,4-pentadienoato de metila ($R_{3,4} = 1,18$, $R_{5,6} = 3,27$) foram obtidos para a coluna $[(C_4IM)(MIM)Ag^+][NTf_2^-]/[C_{10}MIM^+][NTf_2^-]$ 1:30 (m/m).

Desta forma, as colunas 330IL11IL- Ag^+ e 320IL11IL- Ag^+ foram selecionadas para a separação dos hidrocarbonetos e ésteres, respectivamente. Ambas as colunas foram utilizadas nos experimentos seguintes para otimização dos demais parâmetros no preparo da fase estacionária 2D.

Figura 3.30 - Cromatogramas GC×GC-FID da separação de uma mistura contendo (1) n-hexano, (2) 2-hexeno, (3) 4-pentenoato de metila, (4) pentanoato de metila, (5) 3-pentenoato de metila e (6) 2,4-pentadienoato de metila utilizando a combinação de colunas Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m) × IL- Ag^+ :IL (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m). As fases estacionárias da segunda dimensão foram preparadas utilizando as seguintes proporções de $[(C_4IM)(MIM)Ag^+][NTf_2^-]/[C_{10}MIM^+][NTf_2^-]$ a) 1:10, b) 1:20, c) 1:30, d) 1:40, e) 1:50 e f) 0:1 (m/m). Temperatura programada: 35 °C a 54 °C a 2 °C min⁻¹; aumento para 90 °C a 5 °C min⁻¹.

Fonte: próprio autor.

b) Espessura do filme de fase estacionaria e comprimento da coluna

A espessura do filme de fase estacionaria e o comprimento do capilar em 2D foram avaliados no sistema GC $\times$ GC-FID. As separações cromatográficas realizadas utilizando a coluna com filme de fase estacionaria de 0,15 μm apresentou cromatogramas com picos mais estreitos e maior resolução cromatográfica (2D) comparado aos cromatogramas obtidos com a coluna de 0,28 μm , Figura 3.31a. Com relação ao comprimento da coluna na segunda dimensão, a coluna de 1,2 m apresentou a melhor resolução cromatográfica (2D) para a separação dos ésteres 3-pentenoato de metila e 2,4-pentadienoato de metila, Figura 3.31b.

Figura 3.31 – Avaliação da espessura do filme de fase estacionaria (a) e comprimento da coluna 2D (b) para a separação dos ésteres 3-pentenoato de metila e 2,4-pentadienoato de metila. Na segunda dimensão foi utilizada a fase estacionária $[(\text{C}_{10}\text{IM})(\text{MIM})\text{Ag}^+][\text{NTf}_2^-]/[\text{C}_{10}\text{MIM}^+][\text{NTf}_2^-]$ 1:30 (m/m).

Fonte: próprio autor.

c) Termoeestabilidade

A estabilidade térmica da coluna capilar 350IL21IL- Ag^+ foi examinada. A Figura 3.32a apresenta o diagrama de sangria da coluna cromatografica. Neste gráfico é possível perceber um significativo aumento da linha de base do cromatograma para temperaturas superiores a 180 $^{\circ}\text{C}$ sugerindo a degradação/volatilização dos compostos constituintes da fase estacionaria. Estes dados corroboram com os dados obtidos pela avaliação do poder de separação desta coluna

após ser submetida a ciclos de recondicionamento a diferentes temperaturas, Figura 3.32b. Este gráfico mostra que a resolução cromatográfica da separação de 2,4-pentadienoato de metila e 3-pentenoato de metila diminui drasticamente após a coluna ser condicionada em 180 °C.

Desta forma, baseado nos resultados destes dois experimentos a MAOT da coluna 350IL21IL-Ag⁺ foi definida como 180 °C. Este valor de MAOT foi superior ao valor reportado no trabalho de Gil-Av et al (MAOT 65 °C) (186) e de Nan et al (MAOT entre 125 e 150 °C) (179) coluna capilar GC.

Figura 3.32 – a) Diagrama de sangria da coluna capilar cromatográfica ilustrando a termoestabilidade da fase estacionária 350IL21IL-Ag⁺; b) Avaliação da resolução cromatográfica da separação do 2,4-pentadienoato de metila e 3-pentenoato de metila após ciclos de condicionamento isotérmico em diferentes temperaturas por 1 h.

Fonte: próprio autor.

d) Robustez

A robustez da coluna ²D contendo a fase estacionária 350IL21IL-Ag⁺ foi avaliada frente a injeções consecutivas de uma mistura contendo 2,4-pentadienoato de metila e 3-pentenoato de metila. Quando operada em temperaturas inferiores a 180 °C, as colunas puderam ser reutilizadas por mais de 700 injeções sem mudanças significativas na reprodutibilidade dos valores de tempo de retenção, largura da base dos picos cromatográficos e resolução cromatográfica dos analitos.

3.3.3 Mecanismo de retenção nas colunas contendo fase estacionária a base de íons Ag^+

Os íons Ag^+ interage com moléculas insaturadas via interações reversíveis de complexação (187). Baseado nos trabalhos reportados por Dewar et al (188,189), a Figura 3.33 foi proposta para ilustrar a interação entre o $[(\text{C}_{10}\text{MIM})(\text{MIM})\text{Ag}^+][\text{NTf}_2^-]$, presente na fase estacionária, e os compostos insaturados. A interação de complexação baseia-se na soma de dois tipos de interação: uma com caráter mais σ e outra com caráter mais π . A interação σ ocorre entre os orbitais ocupado $2p\pi$ da insaturação da olefina e os orbitais livres $5s$ e $5p$ da Ag^+ . A interação π ocorre via retrodoação dos elétrons do orbital ocupada $4d$ da Ag^+ e os orbitais livres antiligantes $2p\pi^*$ da olefina (186,190).

A presença do ânion NTf_2^- pode influenciar diretamente na interação de complexação entre o cátion $[(\text{C}_{10}\text{MIM})(\text{MIM})\text{Ag}^+]$ e a olefina. Considerando a estrutura deste ânion, a carga do nitrogênio esta deslocalizada sobre os átomos de S e, em menor proporção, sobre os dois átomos de O. Esta deslocalização de cargas diminui a força da interação iônica entre os ânions e os cátions. Desta forma os cátions (contendo os íons Ag^+) estarão mais disponíveis para estabelecer interações com a olefina.

Figura 3.33 – Representação esquemática da interação entre $[(\text{C}_{10}\text{MIM})(\text{MIM})\text{Ag}^+][\text{NTf}_2^-]$ e 1-hexeno.

Fonte: Próprio autor.

3.3.4 Avaliação das colunas capilares 2D

A MISTURA 1 [(1) propanal, (2) butanal, (3) pentanal, (4) hexanal, (5) heptanal, (6) octanal, (7) benzaldeído, (8) propanona, (9) 2-butanona, (10) 2-pentanona, (11) 3-pentanona, (12) 2-hexanona, (13) ciclo-hexanona, (14) acetato de etila, (15) acetato de metila, (16) butanoato de metila, (17) butanoato de etila, (18) 2-metil-2-butenato de 2-propenila, (19) 2-metil-butanoato de etila, (20) butanoato de isopropila, (21) 4-pentenoato de metila, (22) pentanoato de metila, (23) 2,4-pentadienoato de metila, (24) 3-pentenoato de metila, (25) 2-metil-2-butenato de metila, (26) pentanoato de etila, (27) Acetado de 3-metil-butila, (28) 2-metil-2-butenato de etila, (29) hexanoato de etila, (30) 2-metil-2-butenato de propila, (31) 2-metil-2-butenato de isopropila, (32) heptanoato de etila e (33) acetato de heptila] foi separada utilizando a combinação de colunas Rtx-5MS $\times$ 330IL21IL-Ag⁺, Figura 3.34a. Para fins comparativos, esta mesma mistura foi separada por uma combinação de colunas comerciais Rtx-5MS $\times$ SUPELCOWAX10, Figura 3.34b. Ao comparar os cromatogramas das Figura 3.34a e Figura 3.34b, observa-se que o melhor poder de separação foi obtido com a combinação de colunas Rtx-5MS $\times$ 330IL21IL-Ag⁺. Esta melhor performance pode ser observada principalmente para os compostos com menor ponto de ebulição e polaridade semelhante, por exemplo, butanal (2), 2-butanona (9), 2-pentanona (10), 3-pentanona (11), acetato de etila (14) e acetato de metila (15). Outras regiões do cromatograma também evidenciaram melhor performance das colunas preparadas frente a combinação comercial. A resolução ²D entre butanal (2) e 2-butanona (9), entre pentanal (3) e butanoato de metila (16) e entre hexanal (4) e 2-hexanona (12) foi de 2,2, 3,8, e 6,3, respectivamente, para a coluna ²D 330IL21IL-Ag⁺ e 0,9, 1,6 e 4,9 para a coluna ²D SUPELCOWAX10. Com a combinação de colunas Rtx-5MS $\times$ SUPELCOWAX10, a ordem de eluição dos analitos em ¹D foi governada principalmente pela diferença dos pontos de ebulição, e em ²D a retenção dos analitos ocorreu principalmente por interações polares do tipo dipolo-dipolo (191)(192). Em comparação com a combinação de colunas Rtx-5MS $\times$ 350IL21IL-Ag⁺, o mecanismo de separação em 2D é fortemente influenciado pela complexação π entre Ag⁺ e as ligações insaturadas presentes na estrutura dos analitos. Para confirmar que a retenção dos analitos na coluna 350IL21IL-Ag⁺ ocorreu principalmente pela presença dos íons Ag⁺, a combinação de colunas Rtx-5MS $\times$ 31IL também foi avaliada. Como pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 3.34, a seletividade na segunda dimensão foi significativamente comprometida pela ausência dos íons Ag⁺ na fase estacionária.

Figura 3.34 - Cromatogramas GC $\times$ GC-FID da separação de aldeídos, cetonas e ésteres empregando a combinação de colunas a) Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m) $\times$ 350IL21IL-Ag⁺ (1,2 m, 0.25 mm ID, 0.15 μ m), b) Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m) $\times$ SUPELCOWAX10 (1,2 m, 0,2 mm ID, 0,2 μ m) e c) Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m) $\times$ 31IL (1,2 m, 0.25 mm ID, 0.15 μ m). Temperatura programada: aumento de 40 °C até 44 °C a 2 °C min⁻¹; aumento para 100 °C a 5 °C min⁻¹ e 100 °C por 3 min. Tempo de modulação: 10 s. Consultar o Quadro 3.3 para identificação dos picos.

Fonte: próprio autor.

Os mesmos experimentos descritos no parágrafo anterior foram repetidos para a MISTURA 2, constituída de (34) *n*-pentano, (35) 2,4-hexadieno, (36) 3-metil-1,4-pentadieno, (37) 1,5-hexadieno, (38) 1,3-hexadieno, (39) 1-hexeno, (40) *cis*-2-hexeno, (41) 3-hexeno, (42) *n*-hexano, (43) 2,3-dimetil-1,3-butadieno, (44) benzeno, (45) 2-hexino, (46) 1-hexino, (47) 3-hexino, (48) tolueno, (49) *n*-octano, (50) *m*-xileno, (51) *o*-xileno, (52) *p*-xileno, (53) 1,8-nonadieno, (54) 1-noneno, (55) *n*-nonano, (56) mirceno, (57) α -terpineno, (58) γ -terpineno e (59) terpinoleno. Seguindo a mesma tendência dos resultados obtidos para a Figura 3.34, a MISTURA 2 foi melhor resolvida utilizando a combinação Rtx-5MS $\times$ 320IL21IL-Ag⁺c (Figura 3.35a) do que na combinação Rtx-5MS $\times$ SUPELCOWAX10 (Figura 3.35b). Considerando o grupo dos hidrocarbonetos insaturados e a coluna 320IL21IL-Ag⁺, foi observada uma forte tendência entre o número de insaturações na molécula e o seu tempo de retenção em ²D. Por exemplo, nonano (nenhuma insaturação, 55), 1-noneno (1 insaturação, 54) e 1,8-nonadieno (2 insaturações, 53) apresentaram ²t_R de 1,56, 2,25 e 3,03 s, respectivamente. Ainda sobre a Figura 3.35, a coluna contendo Ag⁺ apresentou melhor poder de separação para o cluster contendo os analitos 34–48. Por exemplo, os analitos 2,3-dimetil-1,3-butadieno (43) e benzeno (44), os quais coeluem com a combinação Rtx-5MS $\times$ SUPELCOWAX10, foram bem separados com a combinação de colunas Rtx-5MS $\times$ 320IL21IL-Ag⁺ (*R*_{43,44} = 6,5). Outro destaque da coluna ²D 320IL21IL-Ag⁺ foi a eluição quantitativa e estruturada dos alcinos 2-hexino (45), 1-hexino (46) e 3-hexino (47). No trabalho reportado por Nan et al (179), 1-hexino adsorveu de forma irreversível na coluna [(C₁₀MIM)(MIM)Ag⁺][NTf₂⁻]. Os autores relataram que presença de Ag⁺ em concentrações elevadas resultou na separação cromatográfica de hexano e 1-hexeno, porém houve sorção irreversível do 1-hexino junto a fase estacionária.

Para as colunas 320IL21IL-Ag⁺, preparadas nesta tese, a estratégia de diluir o IL-Ag⁺, [(C₁₀MIM)(MIM)Ag⁺][NTf₂⁻], com o IL convencional, [C₁₀MIM⁺][NTf₂⁻], permitiu o controle mais acurado das interações entre os alcinos junto a fase estacionária. Assim, a fase estacionária 320IL21IL-Ag⁺ permitiu não só a eluição quantitativa dos alcinos avaliados, mas também permitiu uma excelente separação cromatográfica.

Para a MISTURA 2 também foi observado perda da seletividade da coluna na ausência de Ag⁺, Figura 3.35c.

^c 320IL21IL-Ag⁺: [(C₁₀MIM)(MIM)Ag⁺][NTf₂⁻]/[C₁₀MIM⁺][NTf₂⁻] 1:20 (m/m) (0,9 m, 0,25 mm DI, 0,15 μ m)

Figura 3.35 - Cromatogramas GC $\times$ GC-FID da separação de alcanos, alcenos, cicloalcanos, dienos e terpenos empregando a combinação de colunas a) Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m) $\times$ 320IL21IL-Ag⁺ (0,9 m, 0,25 mm ID, 0,15 μ m), b) Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m) $\times$ SUPELCOWAX10 (0,9 m, 0,2 mm ID, 0,2 μ m) e c) Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m) $\times$ 31IL (0,9 m, 0,25 mm ID, 0,15 μ m). Temperatura programada: 25 °C por 3 min, aumento para 44 °C a 2 °C min⁻¹; aumento para 90 °C a 5 °C min⁻¹, 90 °C por 2,3 min. Tempo de modulação: 10 s. Consultar o Quadro 3.3 para identificação dos picos

Fonte: próprio autor.

Como conclusão desta etapa de avaliação das colunas preparadas, a Tabela 3.10 valores de resoluções cromatográficas ² comparando as colunas contendo fase estacionária IL-Ag⁺ e PEG (SUPELCOWAX10) para a separação das MISTURAS 1 e 2. Estes resultados confirmam a seletividade unica obtida para as colunas preparadas neste trabalho frente a coluna comercial SUPELCOWAX10.

Tabela 3.10 – Desempenho das colunas IL-Ag⁺:IL^a e SUPELCOWAX10, usadas em ²D, para a separação de diferentes pares de analitos por GC × GC-FID

Analitos	² D Resolução cromatográfica	
	IL-Ag ⁺ :IL ^a	SUPELCOWAX10
2 e 9	2,2	0,9
3 e 16	3,8	1,6
4 e 12	6,3	4,7
7 e 28	10,2	1,6
21 e 22	2,1	1,0
34 e 36	4,1	0,7
37 e 40	3,6	1,0
46 e 47	16,5	1,7
53 e 54	2,6	1,0
54 e 55	2,6	0,8

^aIL-Ag⁺:IL foi preparada utilizando [(C₁₀MIM)(MIM)Ag⁺][NTf₂⁻] dissolvido em [C₁₀MIM⁺][NTf₂⁻] na proporção de 1:30 (m/m) para os analitos de 2-22 e 1:20 (m/m) para os analitos 34-55.

Nota: Para identificação dos analitos: butanal (2), pentanal (3), hexanal (4), benzaldeído (7), 2-butanona (9), 2-hexanona (12), butirato de metila (16), 4-pentanoato de metila (21), Pentanoato de metila (22), 2-metil-2-butenato de etila (28), n-pentano (34), 1,4-pentadienoato de metila (36), 1,5-hexadieno (37), cis 2-hexeno (40), 1-hexino (46), 3-hexino (47), 1,8-nonadieno (53), 1-noneno (54) e n-nonano (55).

3.3.5 Aplicação do método GC × GC-FID

Para verificar a aplicabilidade do método desenvolvido, uma amostra de PUFA, por ácidos graxos de cadeia longa (de 14 a 22 carbonos) contendo de 0 a 6 unidades de insaturação, foi analisada usando a combinação de colunas o SUPELCOWAX10 (30 m, 0,2 mm ID, 0,2 μm) × 350IL21IL-Ag⁺ (0,40 m, 0,25 mm ID, 0,15 μm).

Anteriormente aos experimentos GC × GC, a amostra PUFA foi analisada em 1D-GC a coluna SUPELCOWAX10. Este experimento objetivou determinar a ordem de eluição dos analitos na dimensão 1D. De acordo com a Figura 3.36a, a ordem de eluição iniciou com a os compostos de menor cadeia carbônica C14:0 (¹t_R = 17,5 min) e finalizou com a eluição do C22:6n3 (¹t_R = 58,3 min).

Após a identificação do ¹t_R de todos os compostos, a fração correspondente entre ¹t_R = 0 a ¹t_R = 47 min foi injetada no sistema GC × GC-FID empregando a combinação de colunas SUPELCOWAX10 × 350IL21IL-Ag⁺, Figura 3.36b. A separação cromatográfica de PUFA's com cadeia maior do que 20 carbonos (¹t_R = 47 a ¹t_R = 58,3) não foi possível de ser realizada empregando esta combinação de colunas visto que a temperatura necessária para a eluição desta fração é superior a MAOT (180 ° C) da coluna ²D.

No geral, a coluna contendo fase estacionária IL-Ag⁺ apresentou desempenho excepcional para separação cromatográfica da maioria dos compostos presentes na amostra comercial (PUFA's de C14: 0 a C18: 3). Considerando a fração analisada da amostra, conclui-se que o tempo de retenção na dimensão ²D variou de acordo com o número de insaturações na cadeia alquílica dos ácidos graxos insaturados. Quanto maior o número de insaturações maior foi o tempo de retenção do analito. Este padrão de eluição pode ser observado, por exemplo, quando comparamos compostos com o cadeia alquílica de mesmo tamanho porém contendo número deferente de insaturações: C18: 0, C18: 1n7, C18: 2n6 e C18: 3n3, Figura 3.36b.

Figura 3.36 – Cromatogramas a) GC-FID e b) GC × GC-FID da amostra de ácidos graxos poli-insaturados obtidos empregando a combinação de colunas SUPELCOWAX10 (30 m, 0,2 mm ID, 0,2 μm) $\times$ 350IL21IL- Ag^+ (0,40 m, 0,25 mm ID, 0,15 μm). Os picos marcados com (*) referem-se a impurezas presente na amostra comercial

Fonte: Próprio autor.

3.4 Conclusão

Neste trabalho, colunas capilares de alta estabilidade térmica com fase estacionária constituída de íons Ag^+ complexados com ligantes imidazólicos e associados a ânions NTf_2^- foram desenvolvidas com sucesso e aplicadas na segunda dimensão do sistema $\text{GC} \times \text{GC}$ para a separação multianalitos de diferentes classes incluindo alcanos, alcenos, alquinos, dienos, ésteres, cetonas, aldeídos, terpenos e graxos poliinsaturados.

Tanto a seleção adequada dos ligantes quanto a otimização da proporção $\text{IL-Ag}^+:\text{IL} \{[(\text{C}_{10}\text{MIM})(\text{MIM})\text{Ag}^+][\text{NTf}_2^-]/[\text{C}_{10}\text{MIM}^+][\text{NTf}_2^-]\}$, da espessura do filme e do comprimento das colunas capilares favoreceram a seletividade das fases estacionárias e a resolução (picos estreitos e simétricos) dos multianalitos. Empregando a coluna apolar Rtx-5MS (5% difenil/95% dimetilpolissiloxano) na primeira dimensão do sistema analítico, as coeluições observadas em 1D foram satisfatoriamente resolvidas na segunda dimensão utilizando as colunas IL-Ag^+ . Os mecanismos de separação da coluna 1D (Rtx-5MS) foi baseada no ponto de ebulição dos analitos e na coluna 2D (IL-Ag^+) em interações reversíveis de complexação entre os íons Ag^+ e as insaturações dos analitos. A seletividade específica das colunas ILs-Ag^+ favoreceu a resolução cromatográfica para a separação dos analitos 1-hexino e 3-hexino, *n*-pentano e 3-metil-1,4-pentadieno e butanal e 2-butanona, os quais coeluíram na coluna comercial SUPELCOWAX10 (2D). Além disso, foi visto que os tempos de retenção dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs de C14: 0 a C18: 3) foram proporcionais às insaturações dos analitos avaliados.

Os resultados obtidos neste estudo foram relevantes, pois promissora geração de colunas capilares ($\text{GC} \times \text{GC}$) à base de IL-Ag^+ foram desenvolvidas para a separação de diferentes classes de compostos insaturados incluindo hidrocarbonetos, compostos oxigenados de baixa massa molecular e ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa.

3.5 Referências[§]

- 149 Xiang, Y.; Zhou, J.; et al. Exergetic evaluation of renewable light olefins production from biomass via synthetic methanol. **Applied Energy**, v. 157, p. 499–507, 2015.
- 150 Bakkali, F.; Averbeck, S.; et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- 151 L., S. Separation and identification of isomeric hydrocarbons by capillary gas chromatography and hyphenated spectrometric techniques. **Petroleum & Coal**, v. 46, n. 3, p. 1–35, 2004.
- 152 Jemma CA, Shore PR, W.K. Analysis of C1-C16 hydrocarbons using dual-column capillary gc: application to exhaust emissions from passenger car and motorcycle engines. **Journal of Chromatographic Science.**, v. 33, n. 1, p. 34–48, 1995.
- 153 Chopra, A.; Singh, D.; et al. Estimation of Olefin Dimerisation Products by GC/GC–MS and IR Techniques. **Chromatographia**, v. 77, n. 11–12, p. 845–851, 2014.
- 154 Cordero, C.; Bicchi, C.; et al. Evaluation of different internal-diameter column combinations in comprehensive two-dimensional gas chromatography in flavour and fragrance analysis. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 19, p. 3437–3450, 2008.
- 155 Machado, M.E. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the analysis of nitrogen-containing compounds in fossil fuels: A review. **Talanta**, v. 198, p. 263–276, 2019.
- 156 Higgins Keppler, E.A.; Jenkins, C.L.; et al. Advances in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 109, p. 275–286, 2018.
- 157 Omais, B.; Courtiade, M.; et al. Investigating comprehensive two-dimensional gas chromatography conditions to optimize the separation of oxygenated compounds in a direct coal liquefaction middle distillate. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 21, p. 3233–3240, 2011.
- 158 Omais, B.; Courtiade, M.; et al. Using gas chromatography to characterize a direct coal liquefaction naphtha. **Journal of Chromatography A**, v. 1226, p. 61–70, 2012.

[§] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- 159 Boursier, L.; Souchon, V.; et al. Complete elution of vacuum gas oil resins by comprehensive high-temperature two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1280, p. 98–103, 2013.
- 160 Omais, B.; Courtiade, M.; et al. Reversal of elution order in a single second dimension by changing the first column nature in comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1255, p. 196–201, 2012.
- 161 Bicchi, C.; D'Amato, A.; et al. Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavour fields. **Journal of Chromatography A**, v. 843, n. 1–2, p. 99–121, 1999.
- 162 Shellie, R.; Marriott, P.; et al. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) to the enantioselective analysis of essential oils. **Journal of Separation Science**, v. 24, n. 10–11, p. 823–830, 2001.
- 163 Krupčík, J.; Gorovenko, R.; et al. Enantioselective comprehensive two-dimensional gas chromatography. A route to elucidate the authenticity and origin of *Rosa damascena* Miller essential oils. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 19, p. 3397–3403, 2015.
- 164 Myrgorodska, I.; Javelle, T.; et al. Enantioresolution and quantification of monosaccharides by comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1487, p. 248–253, 2017.
- 165 Wang, M.; Marriott, P.J.; et al. Enantiomeric separation and quantification of ephedrine-type alkaloids in herbal materials by comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1–2, p. 361–368, 2006.
- 166 Shellie, R.; Marriott, P.J. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography with Fast Enantioseparation. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 20, p. 5426–5430, 2002.
- 167 Korytár, P.; Leonards, P.E.; et al. High-resolution separation of polychlorinated biphenyls by comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 958, n. 1–2, p. 203–218, 2002.
- 168 Korytár, P.; Stee, L.L.P. van; et al. Attempt to unravel the composition of toxaphene by comprehensive two-dimensional gas chromatography with selective detection. **Journal of Chromatography A**, v. 994, n. 1–2, p. 179–189, 2003.

- 169 Gritti, F.; Félix, G.; et al. Investigation of the nematic–isotropic transition of a liquid crystalline polymer and determination of molecular diffusion coefficients using gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 893, n. 2, p. 359–366, 2000.
- 170 Witkiewicz, Z.; Oszczudłowski, J.; et al. Liquid-crystalline stationary phases for gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1062, n. 2, p. 155–174, 2005.
- 171 Haglund, P.; Harju, M.; et al. Shape selectivity: A key factor in comprehensive two-dimensional gas chromatographic analysis of toxic PCBs. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 13, n. 7, p. 306–311, 2001.
- 172 Harju, M.; Haglund, P. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography GC x GC of Atropisomeric PCBs, Combining a Narrow Bore beta-cyclodextrin Column and a Liquid Crystal Column. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 13, n. 7, p. 300–305, 2001.
- 173 Lambertus, G.R.; Crank, J.A.; et al. Rapid determination of complex mixtures by dual-column gas chromatography with a novel stationary phase combination and spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, n. 2, p. 230–240, 2006.
- 174 Zeng, A.X.; Chin, S.-T.; et al. Integrated multidimensional and comprehensive 2D GC analysis of fatty acid methyl esters. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 5, p. 878–885, 2013.
- 175 Mahé, L.; Dutriez, T.; et al. Global approach for the selection of high temperature comprehensive two-dimensional gas chromatography experimental conditions and quantitative analysis in regards to sulfur-containing compounds in heavy petroleum cuts. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 3, p. 534–544, 2011.
- 176 Souza, S.M.; Nicholas, K.M. (Trifluoroacetylcamphorato(silver(I) and derived olefin complexes). **Inorganica Chimica Acta**, v. 33, p. 77–80, 1979.
- 177 Ferraz, H.C.; Duarte, L.T.; et al. Recent achievements in facilitated transport membranes for separation processes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 24, n. 1, p. 101–118, 2007.
- 178 LJ, F.M. Separations of lipids by silver ion chromatography. **Journal of Lipid Research**, v. 7, n. 6, p. 717–32, 1966.
- 179 Nan, H.; Zhang, C.; et al. Argentation gas chromatography revisited: Separation of

light olefin/paraffin mixtures using silver-based ionic liquid stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1523, p. 316–320, 2017.

180 Dillon, J.T.; Aponte, J.C.; et al. Thin layer chromatography in the separation of unsaturated organic compounds using silver-thiolate chromatographic material. **Journal of Chromatography A**, v. 1251, p. 240–243, 2012.

181 Vrkoslav, V.; Urbanová, K.; et al. Analysis of wax esters by silver-ion high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1302, p. 105–110, 2013.

182 Brooks, N.R.; Schaltin, S.; et al. Heteroleptic silver-containing ionic liquids. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 23, p. 6902, 2012.

183 Dautzenberg, D.; Knözinger, H. Gas chromatographic separation of olefins on silver nitrate-containing stationary phases. **Analytica Chimica Acta**, v. 90, p. 311–314, 1977.

184 Shabtai, J. Gas chromatography with stationary phases containing silver nitrate. **Journal of Chromatography A**, v. 18, p. 302–307, 1965.

185 Schaltin, S.; Brooks, N.R.; et al. High current density electrodeposition from silver complex ionic liquids. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 14, n. 5, p. 1706–1715, 2012.

186 Gil-Av, E.; Herling, J.; et al. Gas liquid partition chromatography of mixtures of methylenecyclohexane and the isomeric methylcyclohexenes. **Journal of Chromatography A**, v. 1, p. 508–512, 1958.

187 Souza SM, N.K. (Trifluoroacetylcamphorato)silver(I) and derived olefin complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 33, p. 77–88, 1979.

188 Dewar, M.J.S. A review of π Complex Theory. **Bull. Soc. Chim. Fr.**, p. C71-79, 1951.

189 Dewar, M.J.S. A Molecular Orbital Theory of Organic Chemistry. I. General Principles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 13, p. 3341–3345, 1952.

190 Frenking, G.; Fröhlich, N. The Nature of the Bonding in Transition-Metal Compounds. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 2, p. 717–774, 2000.

191 Sharif, K.M.; Kulsing, C.; et al. Second dimension column ensemble pressure tuning in comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1536, p. 39–49, 2018.

192 Poole, C.F.; Poole, S.K. Separation characteristics of wall-coated open-tubular columns

for gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1–2, p. 254–280, 2008.

ANEXOS

ANEXO A – Dedução da equação para cálculo da capacidade de sorção (Q) dos capilares

D: diâmetro interno do capilar ($530 \mu\text{m} = 530 \times 10^{-4} \text{ cm}$)

e: espessura da fase estacionária ($1,3 \mu\text{m} = 1,7 \times 10^{-4} \text{ cm}$)

d: diâmetro do volume morto do capilar ($d = D - e = 529 \times 10^{-4}$)

L: comprimento do capilar (5 cm)

V_D : volume do capilar sem fase estacionária ($V_D = \pi \cdot D^2 \cdot L$)

V_d : volume morto do capilar com fase estacionária ($V_d = \pi \cdot d^2 \cdot L$)

C: volume da fase estacionária

$$C = V_D - V_d = \pi \cdot L \cdot (D^2 - d^2) = \pi \cdot 5 \cdot (530 \times 10^{-8} - 529 \times 10^{-8}) = 2,16 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$$

x: concentração da solução na saturação da fase estacionária

v: volume de solução injetada (80 μL)

Q: capacidade de sorção da fase estacionária

$$y_1 = y_2$$

$$b_2x + a_2 = b_1x \quad x = \frac{a_2}{(b_1 - b_2)}$$

$$Q = x \cdot \frac{v}{C} = \left(\frac{a_2}{b_1 - b_2} \right) \cdot \frac{v}{C}$$

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética para coleta das amostras biológicas.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 11 de outubro de 2011

Ofício nº 3616/2011
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CANABIDIOL NOS METABÓLITOS CEREBRAIS MEDIDOS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EM PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 334ª Reunião Ordinária realizada em 10/10/2011, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 8990/2011.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
MARCOS HORTES NISIHARA CHAGAS
PROF. DR. JOSÉ ALEXANDRE DE SOUZA CRIPPA
Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento

ANEXO D – Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) dos monômeros do cloreto de 1-hexadecil-3-vinylimidazólio, $[\text{C}_6\text{VIM}][\text{Cl}]$

ANEXO E – Espectro RMN ^1H (500 MHz, DMSO) dos monômeros do brometo de 1-hexadecil-3-vinylimidazólio, $[\text{C}_{16}\text{VIM}][\text{Br}]$

ANEXO F – Espectro RMN ^1H (500 MHz, DMSO) dos monômeros do dibrometo de 1,10-di(3-vinylimidazolio)decano, $[(\text{VIM})_2\text{C}_{10}]2[\text{Br}]$

ANEXO G – Espectro RMN ^1H (500 MHz, DMSO) do $[\text{C}_4\text{MIM}^+][\text{NTf}_2^-]$: δ 9.10 (s, 1H), 7.76 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.69 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.15 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.84 (d, $J = 1.8$ Hz, 3H), 1.77 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.30 – 1.24 (m, 2H), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

ANEXO H – Espectro RMN ^1H (500 MHz, DMSO) do $[\text{C}_8\text{MIM}^+][\text{NTf}_2^-]$: δ 9.09 (s, 1H), 7.76 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.69 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.14 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 1.78 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.25 (s, 10H), 0.89 – 0.81 (m, 3H)

ANEXO I – Espectro RMN ^1H (500 MHz, DMSO) do $[\text{C}_{10}\text{MIM}^+][\text{NTf}_2^-]$: δ 9.09 (s, 1H), 7.76 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 4.14 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 1.77 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.24 (s, 14H), 0.85 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H)

ANEXO J – Principais publicações 2016 – 2019 (Artigo destaque de capa da edição da revista)

Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples

Israel D. Souza^a, Lidervan P. Melo^a, Isabel C.S.F. Jardim^b, Juliana C.S. Monteiro^c, Ana Marcia S. Nakano^c, Maria Eugênia C. Queiroz^{a,*}

^a Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

^c Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- Molecularly imprinted polymer modified with a hydrophilic external layer (RAM-MIP) was synthesized in a silica capillary.
- RAM-MIP capillary, used as sorbent for in-tube SPME, established specific interaction with parabens present in milk samples.
- The matrix components that interacted only with the hydrophilic external layer (non-adsorptive network) were excluded.
- The analytical validation attested that in-tube SPME/UHPLC-MS/MS is an appropriate method to determine parabens in breast milk.
- The in-tube SPME/UHPLC-MS/MS method successfully determined parabens in milk samples from 16 lactating women.

GRAPHICAL ABSTRACT

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 February 2016
Received in revised form 6 May 2016
Accepted 20 May 2016
Available online 26 May 2016

Keywords:
Parabens
Molecularly imprinted polymer
Restricted access material

ABSTRACT

A new molecularly imprinted polymer modified with restricted access material (a hydrophilic external layer), (MIP-RAM) was synthesized via polymerization in situ in an open fused silica capillary. This stationary phase was used as sorbent for in-tube solid phase microextraction (in-tube SPME) to determine parabens in breast milk samples by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Scanning electron micrographs (SEM) illustrate MIP surface modification after glycerol dimethacrylate (hydrophilic monomer) incorporation. The interaction between parabens and MIP-RAM was investigated by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. The Scatchard plot for MIP-RAM presented two linear parts with different slopes, illustrating binding sites with high- and low-affinity. Endogenous compounds exclusion from the MIP-RAM capillary was demonstrated by in-tube SPME/LC-UV assays carried out with blank milk samples. The in-tube SPME/UHPLC-MS/MS method

* Corresponding author. Av. Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail address: mariaeqn@fclrp.usp.br (M.E.C. Queiroz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.027>
0003-2670/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO K – Principais publicações 2016 – 2019

Analytica Chimica Acta 1045 (2019) 108–116

Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Polymeric ionic liquid open tubular capillary column for on-line in-tube SPME coupled with UHPLC-MS/MS to determine endocannabinoids in plasma samples

Israel D. Souza^a, Leandro W. Hantao^b, Maria Eugênia C. Queiroz^{a,*}^a Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil^b Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- Polymeric ionic liquid monomers (PIL) and PIL cross-linker was synthesized.
- Selective PIL-based wall-coated open tubular capillary columns were synthesized.
- PIL-based wall-coated open tubular capillary was used as a sorbent phase.
- PIL capillary was used in on-line in-tube SPME/UHPLC-MS/MS method.
- The method was applied to determine endocannabinoids in plasma samples.

GRAPHICAL ABSTRACT

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2018

Received in revised form

27 August 2018

Accepted 30 August 2018

Available online 5 September 2018

Keywords:

Polymeric ionic liquid

In-tube SPME

Endocannabinoids

Plasma samples

Parkinson's disease

Sample preparation

ABSTRACT

This manuscript describes the development of wall-coated open tubular capillary column with polymeric ionic liquids (PILs) for on-line in-tube solid phase microextraction coupled with ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (in-tube SPME/UHPLC-MS/MS) to determine anandamide (AEA) and 2-arachidonoyl glycerol (2AG) in plasma samples. Selective PILs were synthesized from the $[\text{VC}_6\text{IM}][\text{Cl}]$, $[\text{VC}_6\text{IM}][\text{Br}]$, and $[(\text{VIM})_2\text{C}_{10}][\text{Br}]$ - ionic liquids - by in-situ thermal-initiated polymerization in a fused silica capillary column for in-tube SPME. The synthesis procedure was optimized, and the capillary columns were characterized using spectroscopic and chromatography techniques. The chemically bonded and cross-linked PIL-based sorbent phase (thickness coating: $1.7\ \mu\text{m}$) presented high chemical and mechanical stability. Among the sorbents evaluated, the PIL-based capillary, $[\text{VC}_6\text{IM}][\text{Br}]/[(\text{VIM})_2\text{C}_{10}][\text{Br}]$ presented the best performance with a sorption capacity of $37,311\ \text{ng cm}^{-3}$ and $48,307\ \text{ng cm}^{-3}$ for AEA and 2AG, respectively. This capillary was reused more than ninety times without significant changes in extraction efficiency. The in-tube SPME-UHPLC-MS/MS method presented a linear range from $0.1\ \text{ng mL}^{-1}$ to $100\ \text{ng mL}^{-1}$ for AEA, and from $0.05\ \text{ng mL}^{-1}$ to $100\ \text{ng mL}^{-1}$ for 2AG, with coefficients of determination higher than 0.99, *p*-value for Lack-of-fit test higher than 0.05 (α of 0.05), precision with coefficient of variation (CV) values ranging from 1.6 to 14.0% and accuracy with relative standard deviation (RSD) values from -19.6% to 13.2%. This method was successfully applied to determine AEA and 2AG in plasma patients with Parkinson's disease. The

* Corresponding author. Av. Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail address: mariaeqn@ffclrp.usp.br (M.E.C. Queiroz).

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.062>

0003-2670/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO L – Principais publicações 2016 – 2019

Tunable Silver-Containing Stationary Phases for Multidimensional Gas Chromatography

Israel D. Souza,[†] He Nan,[‡] Maria Eugênia C. Queiroz,[†] and Jared L. Anderson^{*,‡}[†]Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14040-901, Brazil[‡]Department of Chemistry, Iowa State University, Ames, Iowa 50011, United States

Supporting Information

ABSTRACT: To achieve high separation power of complex samples using multidimensional gas chromatography (MDGC), the selectivity of the employed stationary phases is crucial. The nonpolar $\times$ polar column combination remains the most popular column set used in MDGC. However, resolution of mixtures containing light analytes possessing very similar properties remains a formidable challenge. The development of stationary phases that offer unique separation mechanisms have the potential to significantly improve MDGC separations, particularly in resolving coeluting peaks in complex samples. For the first time, a stationary phase containing silver(I) ions was successfully designed and employed as a second-dimension column using comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC $\times$ GC) for the separation of mixtures containing alkynes, dienes, terpenes, esters, aldehydes, and ketones. Compared with a widely used nonpolar and polar column set, the silver-based column exhibited superior performance by providing better chromatographic resolution of coeluting compounds. A mixture of unsaturated fatty acids was successfully separated using a GC $\times$ GC method in which the elution order in the second dimension was highly dependent on the number of double bonds within the analytes.

Multidimensional gas chromatography, including comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC $\times$ GC), offers high peak capacity in the analysis of complex samples that are often poorly separated in conventional one-dimensional (1D) GC.^{1–5} The selection of column sets that maximize peak capacity is a major task in optimizing GC $\times$ GC methods. The nonpolar $\times$ polar column set constitutes the majority of published GC $\times$ GC methods.^{6,7} However, this popular column combination does not always provide the best selectivity in the separation of structurally similar compounds that exhibit nearly identical chromatographic behavior. For example, the separation of complex samples containing paraffins, olefins, and aromatics remains a challenge using the commercially available column sets.⁸

Since the first introduction of GC $\times$ GC by Liu and Philips using the polyethylene glycol (PEG) $\times$ methyl silicone (polar $\times$ nonpolar) column combination, significant progress has been made in the development of GC stationary phases that provide specific molecular interactions and unique selectivity to separate extremely challenging samples.^{9,10} For example, the dimethylpolysiloxane (HP-1) $\times$ 8% phenyl (equiv) polycarborane-siloxane (HT-8) column set was used to separate polychlorinated biphenyls and toxaphene components into groups according to the number of chlorine substituents.^{11,12} Stationary phases containing liquid crystals have been shown to separate compounds according to the planarity of target

analytes.^{13,14} The development of cyclodextrin-based stationary phases¹⁵ and their adaptation to 2D separations¹⁶ have facilitated improved enantiomeric separation to determine the chiral composition of monoterpenes in Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*). However, choosing the appropriate second-dimension column is a challenge because it must enable fast separation and high selectivity to produce sharp peaks, satisfactory separation power, and high peak capacity.¹⁷

Instrumental or stationary-phase modifications are sometimes required in order to make primary columns compatible with secondary columns. For example, a column set composed of cyclodextrin $\times$ BP-20 (PEG) was reported for the enantiomeric separation of monoterpene hydrocarbons and oxygenated monoterpenes.¹⁶ It was shown that the cyclodextrin chiral stationary phase was not suitable in the second dimension because high plate numbers and long run times are needed to obtain sufficient enantioresolution.¹⁷ Shellie and Marriott circumvented this limitation by applying subambient-pressure (vacuum outlet) conditions at the end of the secondary column to speed up the separation.¹⁸ Using this approach, a GC $\times$ enantio-GC method was developed using a 5% diphenyl-dimethylpolysiloxane (DB-5) $\times$ cyclodextrin

Received: January 26, 2019

Accepted: March 22, 2019

Published: March 22, 2019

ANEXO M – Principais publicações 2016 – 2019

Trends in Analytical Chemistry 111 (2019) 261–278

Contents lists available at ScienceDirect

Trends in Analytical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/trac

Current advances and applications of in-tube solid-phase microextraction

Maria Eugênia Costa Queiroz ^{a, b, *}, Israel Donizeti de Souza ^a, Camila Marchioni ^b^a Universidade de São Paulo (USP), Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Avenida Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Brazil^b Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Avenida Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 2 January 2019Keywords:
In-tube SPME
Capillary coatings
Direct coupling to HPLC systems
Microextraction in capillary
On-line systems

ABSTRACT

In-tube solid-phase microextraction (in-tube SPME) with capillary column as extraction device allows direct coupling to high performance liquid chromatography (HPLC) systems. This technique associates the advantages of on-line systems with the advantages of miniaturized systems. Since its development, in-tube SPME has been continuously improved. New couplings have also been evaluated on the basis of state-of-the-art HPLC instruments. Major achievements include the development of new capillary coatings to enhance the in-tube SPME performance (sorption capacity and selectivity). Innovative SPME fibers (fiber in-tube SPME) and capillary coatings based mainly on monolithic, nanoparticles, ionic liquids, carbon, and hybrid materials have been evaluated. This review provides an overview of the fundamental theory and current advances concerning in-tube SPME systems and highlights their main applications in environmental, clinical, and food analyses.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sample preparation is a significant step in any analytical chromatographic procedure even when powerful analytical instruments are employed. The analytical method capability to isolate desired compounds from complex matrixes with data quality cannot be achieved without appropriate sample preparation.

Complex matrixes contain nonvolatile endogenous compounds that can (a) irreversibly adsorb onto the stationary phase column, thereby shortening the column lifespan or (b) suppress ion formation during ionization mass spectrometry, diminishing method sensitivity. Hence, direct injection of complex samples into conventional chromatographic systems is not convenient. A sample preparation step is usually necessary to eliminate most endogenous compounds and to concentrate analytes, which often exist at low concentrations in these samples [1]. Therefore, the sample preparation step increases analytical method selectivity and sensitivity [2].

Conventional offline sample preparation techniques generally require laborious procedures, which make them time-consuming.

In addition, a multiple-step procedure is susceptible to analyte loss and to problems related to automation.

Recent developments in sample preparation techniques have focused on miniaturization of extracting phase size and sample volume and on direct on-line coupling to analytical instruments [2,3]. A miniaturized system requires a smaller amount of sample and organic solvent, and an on-line system condenses the sample preparation steps (to reduce manual error and to improve accuracy for repeated trials), analysis time, and costs. In this context, online capillary solid-phase microextraction (in-tube SPME) coupled to high performance liquid chromatography (HPLC) is worthy of mention.

Kataoka *et al.* published various review articles on microextraction techniques and highlighted in-tube SPME developments and applications [2–4]. In 2014, Queiroz and Melo [5] described selective capillary coatings for bioanalysis, with emphasis on monolithic and bi-functional capillaries. In 2015, Campíns-Falcó *et al.* [6] described coupled in-tube SPME with new chromatographic modalities and new capillary coatings. In 2016, Prieto-Blanco *et al.* [7] discussed the strengths and weaknesses of this microextraction technique.

This review focuses on the in-tube SPME principle, extraction configurations, experimental parameters, new selective capillary coatings and their applications (2017–2018), and current and future challenges.

* Corresponding author. Universidade de São Paulo (USP-RP), Departamento de Química, Avenida Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, Brazil.
E-mail address: mariaeqn@fclrp.usp.br (M.E. Costa Queiroz).

ANEXO N – Principais publicações 2016 – 2019

Analytica Chimica Acta 1044 (2018) 12–28

Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Review

Recent advances in LC-MS/MS methods to determine endocannabinoids in biological samples: Application in neurodegenerative diseases

Camila Marchioni^a, Israel Donizeti de Souza^b, Vinicius Ricardo Acquaro Junior^b, José Alexandre de Souza Crippa^c, Vitor Tumas^c, Maria Eugênia Costa Queiroz^{a, b, *}^a Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Avenida Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil^b Universidade de São Paulo (USP), Departamento de Química, Avenida Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil^c Department of Neuroscience and Behavior, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

HIGHLIGHTS

- Recent advances in LC-MS/MS methods designed to determine ECs, AEA and 2-AG, in complex matrixes.
- Sample preparation techniques (conventional, microextraction, and online systems).
- ECs levels correlated with neurodegenerative diseases.

GRAPHICAL ABSTRACT

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 February 2018

Received in revised form

6 June 2018

Accepted 7 June 2018

Available online 9 June 2018

Keywords:

Endocannabinoids

Neurodegenerative diseases

Quantification methods

Sample preparation techniques

ABSTRACT

Endocannabinoids (ECs) are endogenous lipid-based retrograde neurotransmitters that bind to cannabinoid receptors [cannabinoid receptor 1 (CB1) and cannabinoid receptor 2 (CB2)]. Many ECs have been characterized; anandamide (AEA) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) are still considered the primary ECs signaling mediators. Dysregulation of ECs has been implicated in a wide range of pathologies, including neurodegenerative diseases. Understanding how ECs participate in neurological diseases is important to describe the pathology and to establish new treatments. Considering the physicochemical properties of ECs, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry has become the reference method to determine these endogenous substances, in trace levels, in different biological samples. This review describes the recent advances in LC-MS/MS methods designed to determine ECs in complex biological matrixes. The advantages, limitations, selectivity, matrix effect, and sensitivity associated with each approach are emphasized. This article comprises three sections: (I) sample preparation techniques (conventional, microextraction, and online systems), (II) chromatographic methods (especially LC-MS/MS), and (III) relationship between ECs levels and neurodegenerative diseases.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Universidade de São Paulo (USP-RP), Departamento de Química, Avenida Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
E-mail addresses: mariaeqn@fclrp.usp.br, warpa@usp.br (M.E.C. Queiroz).

ANEXO O – Principais publicações 2016 – 2019

Advances of Ionic Liquids in Analytical Chemistry

María J. Trujillo-Rodríguez, He Nan, Marcelino Varona, Miranda N. Emaus, Israel D. Souza, and Jared L. Anderson*

Department of Chemistry, Iowa State University, 1605 Gilman Hall, Ames, Iowa 50011, United States

CONTENTS

Sample Preparation	506	Corresponding Author	527
Solid-Phase (Micro)Extraction	506	ORCID	527
Ionic Liquids and Polymeric Ionic Liquids in Solid-Phase Extraction	506	Notes	527
Ionic Liquids and Polymeric Ionic Liquids in Solid-Phase Microextraction	507	Biographies	528
Liquid-Phase (Micro)Extraction	509	References	528
Ionic Liquids and Magnetic Ionic Liquids in Dispersive Liquid–Liquid Microextraction	509		
Ionic Liquids and Magnetic Ionic Liquids in Single-Drop Microextraction	512		
Ionic Liquids in Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction	512		
Ionic Liquids and Magnetic Ionic Liquids in Aqueous Biphasic Systems	513		
Chromatographic and Electrophoretic Separations	514		
Gas Chromatography	514		
Monocationic Ionic Liquid-Based Stationary Phases	515		
Di- and Polycationic Ionic Liquid-Based Stationary Phases	515		
Polymeric Ionic Liquid-Based Stationary Phases	516		
Metal-Containing Ionic Liquid-Based Stationary Phases	516		
Commercial Ionic Liquid-Based Stationary Phases	516		
High Performance Liquid Chromatography	519		
Ionic Liquids as Mobile Phase Additives	519		
Ionic Liquids as Components of the Stationary Phase	520		
Counter-Current Chromatography	520		
Capillary Electrophoresis	521		
Mass Spectrometry	522		
Ionic Liquids as Matrices in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization	522		
Ionic Liquids as Additives in Electrospray Ionization Mass Spectrometry	523		
Electrochemical Sensing Systems	524		
Ionic Liquids as Electrolyte Media	524		
Ionic Liquid/Carbon-Based Composite Electrochemical Sensing Systems	525		
Ionic Liquid/Metal-Based Composite Electrochemical Sensing Systems	525		
Ionic Liquid/Hybrid Carbonaceous-Metal-Based Composite Electrochemical Sensing Systems	525		
Biosensors Based on Ionic Liquids	525		
Conclusions and Perspective	527		
Author Information	527		

Ionic liquids (ILs) are a highly unique class of nonmolecular solvents that possess melting points below 100 °C.¹ ILs that have melting points below room temperature are often referred to as room temperature ionic liquids (RTILs). ILs possess a wide variety of unique physicochemical properties, including low or negligible vapor pressure at room temperature, high thermal and electrochemical stability, and high conductivity.²

ILs are composed completely of ions and are typically asymmetric organic cations containing nitrogen or phosphorus heteroatoms as well as both inorganic and organic anions. Figure 1 shows a representative series of typical IL cations and anions. Due to the large diversity of cations and anions, it has been estimated that more than 10¹⁸ possible combinations of cations and anions can be created.³ It is often the case that small modifications to the cation/anion chemical structure or cation/anion combination are accompanied by dramatic modifications to their physical properties, including viscosity and water solubility. At the same time, the incorporation of polar or nonpolar moieties to the IL structure can promote different interactions with solutes and impressive solvation capabilities for different classes of compounds. For all of these reasons, ILs are often referred to as designer solvents.

Since the introduction of ILs, several subclasses of ILs have been popularized and studied within the analytical sciences, including task-specific ILs (TSILs), chiral ILs, polymeric ionic liquids (PILs), and magnetic ionic liquids (MILs). TSILs are ILs with functional groups that impart specific properties or reactivity to the IL.⁴ PILs are polymeric materials generated through the polymerization of IL monomers.^{4,5} In comparison to ILs, PILs generally possess higher thermal and mechanical stability, and their viscosities are not significantly reduced under high temperature conditions, making them interesting materials for high temperature applications. MILs have been more recently introduced and contain a paramagnetic component in either the cation or the anion of the IL.⁶ Therefore, they can be manipulated using external magnetic fields, making them particularly interesting in magnet-assisted separation systems where the movement or flow of the MIL

Special Issue: Fundamental and Applied Reviews in Analytical Chemistry 2019

Published: October 17, 2018

ANEXO P – Principais publicações 2016 – 2019

Article

Determination of Parabens in Breast Milk Samples by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Caroline F. Grecco,^a Israel D. Souza,^a Vinicius R. Acquaro Junior^a and
 Maria E. C. Queiroz^{*a}

^aDepartamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-900 Ribeirão Preto-SP, Brazil

A reliable method was developed and validated based on dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) to determine simultaneously methylparaben (MePB), ethylparaben (EtPB), propylparaben (PrPB), and butylparaben (BuPB) in breast milk samples. A central composite design ²⁴ with four independent variables and five levels of variance was used to optimize the DLLME conditions. The DLLME/UHPLC-MS/MS method was linear from 5 (lower limit of quantification, LLOQ) to 100 ng mL⁻¹ (upper limit of quantification, ULOQ). The inter-assay and intra-assay precision values presented coefficients of variation (CVs) lower than 15%, and the relative standard error of the inter- and intra-assay accuracy values was lower than 10.4%. The DLLME/UHPLC-MS/MS method was successfully applied to determine parabens in human milk samples obtained from sixteen volunteer lactating mothers.

Keywords: parabens, breast milk sample, dispersive liquid-liquid microextraction, ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Introduction

The alkyl esters of *p*-hydroxybenzoic acid known as parabens are widely used as antimicrobial preservatives, especially to prevent mold and yeast growth in cosmetic products and pharmaceuticals; they are also employed in food and beverage processing. Concerning their chemical structure, parabens contain different alkyl groups, including methylparaben (MePB), ethylparaben (EtPB), propylparaben (PrPB), isopropylparaben (iPrPB), butylparaben (BuPB), isobutylparaben (iBuPB), and benzylparaben (BePB).¹

Given the large use of parabens as preservatives, human exposure to these compounds is widespread. Once in contact with humans, parabens are absorbed through the skin or via the gastrointestinal tract after oral intake. Oral and dermal administration of these compounds leads to their hydrolysis into the harmless *p*-hydroxybenzoic acid and the respective glucuronic and sulfuric acid conjugates.² Although parabens are still considered safe, the potential endocrine disrupting effects of the exposure

to high levels of these compounds have raised health concerns.³ High concentrations of parabens in the breast tissue might be associated with breast cancer. Parabens can mimic estrogen action stimulating the growth of MCF7 cells, which are related to the development of breast cancer.^{4,5}

Parabens at trace levels have been determined in several biological matrices, such as urine,^{2,6} breast milk,⁷⁻¹¹ plasma,¹² serum,¹³ amniotic fluid,¹⁴ and placental tissue.^{15,16} As known, lipophilic substances are mainly excreted in breast milk, and consequently, that breast milk is the major way through which breastfed infants are exposed to environmental chemicals. Breastfeeding women may be exposing their children to harmful levels of parabens in the early stages of their life when the babies are particularly vulnerable. Therefore, analysis of parabens in breast milk samples has become a topic of great scientific interest.

Pretreatment of biological samples is an important step of bioanalysis, but it is also the most difficult aspect prior the liquid chromatography (LC) separation and tandem mass spectrometry (MS/MS) detection for the target analytes. Indeed, macromolecules present in the biological samples could co-elute with the target analytes,

*e-mail: mariaeqn@ffclrp.usp.br

ANEXO Q – Principais publicações 2016 – 2019

Journal of Chromatography B 1093–1094 (2018) 82–90

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchromb

Review

Recent development of chromatographic methods to determine parabens in breast milk samples: A review

Caroline Fernandes Grecco, Israel D. Souza, Maria Eugênia Costa Queiroz*

Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Parabens
Human breast milk sample
Sample preparation techniques
Chromatographic methods

ABSTRACT

Parabens have been widely used as antimicrobial preservatives in food, drugs, and cosmetics for over 60 years. These endocrine disruptors can alter both the wildlife and the human hormone function. Determining these compounds in human milk is important because breast milk plays an important role in infant growth and in neurocognitive development. This article summarizes the current state-of-the-art of chromatographic methods to determine parabens in breast milk samples. Apart from the conventional and modern microextraction sample preparation techniques described herein, the authors discuss the chromatographic systems, primarily LC-MS/MS, and the concentration ranges at which parabens have been detected in milk samples obtained from lactating women over the past few years.

1. Introduction

Parabens, alkyl esters of *p*-hydroxybenzoic acid, are often employed as antimicrobial preservatives to prevent mold and yeast growth in cosmetics, food, and drugs. Parabens contain different alkyl groups; for example, methylparaben (MePB), ethylparaben (EtPB), propylparaben (PrPB), isopropylparaben (iPrPB), butylparaben (BuPB), isobutylparaben (iBuPB), and benzylparaben (BePB) [1]. The longer the alkyl chain length, the higher the antimicrobial and antibacterial activities and the lower the water solubility of parabens [1].

The widespread use of parabens and their potential risk to the human health have attracted researchers' interest in assessing human exposure to these compounds [2]. Parabens exhibit estrogenic action which, allied with their antibacterial activity, may alter the endocrine system in either a beneficial or harmful manner [3].

Upon contact with humans, parabens are absorbed through the skin or via the gastrointestinal tract after oral intake. Oral and dermal administration of these compounds leads to their hydrolysis into the harmless (negligible estrogenic activity) *p*-hydroxybenzoic acid and the respective glucuronic and sulfuric acid conjugates [4,5].

Parabens have been extensively discussed since Darbre and Janjua documented that these compounds can enter the human body as intact esters and penetrate into the human circulatory system after a single topical application of a cosmetic product [6,7]. Following skin application of cosmetic products containing parabens, the latter compounds are excreted in the urine as the parabens themselves; i.e., in their free (unconjugated) form, or as the respective glucuronic or sulfated

conjugates. Some authors have cautioned that measuring metabolites may not be the best approach to assess human exposure to parabens, because such measurements are not specific, and different parabens can display quite distinct estrogenic bioactivities. Therefore, measuring the unchanged parabens might be a better alternative [4,5].

Even though parabens are still considered safe, the potential endocrine-disrupting effects of the exposure to high levels of these compounds have raised health concerns [8]. According to Byford et al. [9], these compounds mimic estrogen, and large concentrations of parabens in the breast tissue could stimulate MCF7 cell growth, which is related to breast cancer development [10].

Several analytical methods have been reported to measure parabens in different biological fluids, including breast milk. Breastfeeding is a major pathway for neonatal exposure to parabens, and efforts to develop a reliable method to determine parabens in this challenging matrix are being made.

This article summarizes the current state-of-the-art of chromatographic methods to determine parabens in human milk samples and emphasizes the advantages, limitations, selectivity, matrix effect, and sensitivity associated with each approach. The authors also discuss the concentration ranges at which parabens have been detected in milk samples obtained from lactating women.

1.1. Breast milk

Human breast milk is a complex matrix that contains 3%–5% fat, 0.8%–0.9% protein, 6.9%–7.2% carbohydrate calculated as lactose, and

* Corresponding author.

E-mail address: mariaeqn@ffclrp.usp.br (M.E.C. Queiroz).<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.059>Received 30 November 2017; Received in revised form 10 April 2018; Accepted 30 June 2018
Available online 03 July 2018

1570-0232/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO R – Principais publicações 2016 – 2019

Pipette tip dummy molecularly imprinted solid-phase extraction of Bisphenol A from urine samples and analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry

Tamires Amabile Valim Brigante^a, Luis Felipe Cabral Miranda^b, Israel Donizeti de Souza^b, Vinicius Ricardo Acquaro Junior^b, Maria Eugênia Costa Queiroz^{b,*}

^a School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto, Brazil

^b Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Bisphenol-A
Dummy molecularly imprinted polymer
Pipette tip solid-phase extractions
Gas chromatography-mass spectrometry

ABSTRACT

Molecularly imprinted polymers (MIPs) were synthesized and used as sorbent for Bisphenol A (BPA) pipette tip solid-phase microextraction from urine samples and BPA analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The MIPs were synthesized by the sol-gel methodology. Aminopropyltriethoxysilane (APTES) and tetraethyl orthosilicate (TEOS) were used as functional monomer and cross-linking reagent, respectively. BPA and tetrabromobisphenol A (TBBPA) were evaluated as template during MIP synthesis. The BPA-based MIP displayed slightly higher extraction efficiency than the TBBPA-based dummy molecularly imprinted polymer (DMIP), but the TBBPA-based DMIP was selected as sorbent to minimize interference from leaked template. Comparison of the TBBPA-based DMIP, BPA-based MIP, and non-imprinted polymer (NIP) extraction efficiencies attested that the TBBPA-based DMIP was selective. The synthesized polymers were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR). The TBBPA-based DMIP was reused for over 100 times, which confirmed its robustness. The developed method was linear from 50 to 500 ng mL⁻¹. Precision values had coefficient of variation (CV) ranging from 4 to 14%. The accuracy relative standard deviation values (RSD) varied from – 13.6 to 12.3%.

1. Introduction

Bisphenol A (BPA), a monomeric synthetic chemical, is widely used to produce polycarbonate plastics and epoxy resins. BPA is a component of baby bottles, returnable mineral water bottles, canned food packaging coatings, and other food packaging materials [1]. Temperature and pH alterations promote BPA hydrolysis, BPA release from products, and BPA diffusion [2]. BPA is also a precursor and degradation product of bisphenol glycidyl methacrylate (Bis-GMA) and dimethacrylate bisphenol A (Bis-DMA), which are employed during dental sealant production [3]. Therefore, humans are constantly being exposed to BPA throughout their daily routine. Unfortunately, BPA can be harmful to the human health: it mimics endogenous hormones and disrupts the endocrine system, and exposure to BPA has been associated with several chronic diseases [2,4–6]. Numerous *in vitro* and *in vivo* studies on rodents have suggested that BPA presents genotoxic and epigenetic potential to damage DNA [2,5,7]. Fetal and locational exposure to BPA raises breast cancer incidence in rats and mice [8].

The urinary system eliminates BPA and its conjugated forms BPA-glucuronide and BPA sulfate [2,9]. Like endogenous hormones, even low doses of these endocrine disruptors can be toxic to humans [5]. In 2015, the European Food Safety Authority (EFSA) established a temporary TDI (Tolerable Daily Intake) of 4 µg of BPA/kg of body weight (bw)/day instead of the previously established TDI of 50 µg of BPA/kg of bw/day to prevent toxicity in populations like unborn children, infants, and adolescents [10]. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) analysis has been used to determine BPA in biological samples. Given the complexity of biological samples, sample preparation is the most important step during the development of a GC-MS method [11–15].

Sample preparation eliminates most endogenous compounds and concentrates the analytes. Pipette tip solid-phase extraction (PT-SPE) is a modified solid-phase extraction (SPE) method that uses a dispersive sorbent enclosed by two frits in the pipette tip. The first frit is located at the lower part of the pipette tip and avoids stationary phase loss; the second frit is located at the top of the pipette tip and prevents

* Corresponding author.

E-mail address: mariaeqn@ffclrp.usp.br (M.E.C. Queiroz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.09.038>

Available online 27 September 2017
1570-0232/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO O – Principais publicações 2016 – 2019

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 139 (2017) 116–124

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba

Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-BSA phase and liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Mônia Ap. Lemos Pinto^a, Israel D. de Souza^b, Maria Eugênia C. Queiroz^{a,b,*}^a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Café Avenue S/N, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil^b Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Bandeirantes Avenue 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 November 2016

Received in revised form 24 February 2017

Accepted 28 February 2017

Available online 1 March 2017

Keywords:

Restricted access material
Disposable pipette extraction
Drugs
Plasma samples
Schizophrenia

ABSTRACT

This work describes restricted access material (RAM) constituted of porous octadecylsilane particles with the outer surface covered with bovine serum albumin (C18-BSA) as a stationary phase to extract drugs from plasma samples by disposable pipette extraction (DPX) for further analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). The C18-BSA phase simultaneously excluded macromolecules by chemical diffusion barrier (BSA network) and enrichment of the interior phase (C18) with drug traces by sorption. The hydrophilic barrier of the C18-BSA allows small molecules (drugs) to permeate through the hydrophobic part (C18), while at the same time it excludes the macromolecules by chemical diffusion barrier (BSA network). Optimization of the DPX variables (sorption equilibration time, exclusion of endogenous compounds, and elution step) improved the sensitivity and selectivity of the method, which presented a linear range from the lower limit of quantification ($0.5\text{--}20.0\text{ ng mL}^{-1}$) to the upper limit of quantification ($32.5\text{--}10,500\text{ ng mL}^{-1}$), inter- and intra-assay precision with coefficients of variation (CV) lower than 15%, and relative standard error (RSE) of the accuracy ranging from -12% to 11% . The developed method was successfully used to determine five antipsychotics (olanzapine, quetiapine, clozapine, haloperidol, and chlorpromazine) in combination with seven antidepressants (mirtazapine, paroxetine, citalopram, sertraline, imipramine, clomipramine, and fluoxetine), two anticonvulsants (carbamazepine and lamotrigine), and two anxiolytics (diazepam and clonazepam) in plasma samples from schizophrenic patients for therapeutic drug monitoring.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia is one of the most serious psychiatric disorders. Neuropathology studies involving this neurological disorder have been one of the greatest challenges in psychiatry [1]. The pharmacological therapy of schizophrenia relies mainly on antipsychotics, which can effectively control the positive symptoms (delusions and hallucinations, cognitive dysfunction) of the disease by blocking the dopaminergic neurotransmission [2,3].

Atypical antipsychotics present lower frequency of extrapyramidal side effects and have a different spectrum of receptor effects [4]. Clozapine (CLZ) is the most effective atypical antipsychotic in the treatment of schizophrenia. However, one of its side effects

is weight gain, so it is commonly prescribed to patients that do not respond to conventional antipsychotics. To minimize the symptoms of schizophrenia, most patients use other classes of drugs such as antidepressants, anxiolytics, and anticonvulsants in association with antipsychotics [5,6]. The combination of two or more drugs has long been known to increase the likelihood of side effects and pharmacokinetic interactions, thus therapeutic drug monitoring (TDM) is essential to enhance the therapeutic response, to design optimal dosing regimens, to avoid the build-up of excessively high and potentially toxic drug concentrations, and to monitor patient's adherence to treatment [5].

Apart from the target drugs, plasma samples contain numerous endogenous compounds (proteins, acids, bases, and salts). Therefore, preparation of the plasma sample prior to analysis is essential to concentrate the drugs (at the trace level) and to remove the proteins and other macromolecules from the matrix. These endogenous compounds could impair the performance of the analytical column increase the column backpressure, and suppress or inten-

* Corresponding author at: Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Bandeirantes Avenue 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil.

E-mail address: mariaeqn@fclrp.usp.br (M.E.C. Queiroz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.052>

0731-7085/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO P – Principais publicações 2016 – 2019

Anal Bioanal Chem (2017) 409:3587–3596
DOI 10.1007/s00216-017-0300-3

RESEARCH PAPER

A column switching ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to determine anandamide and 2-arachidonoylglycerol in plasma samples

Camila Marchioni¹ · Israel Donizeti de Souza² · Caroline Fernandes Grecco² · José Alexandre Crippa³ · Vitor Tumas³ · Maria Eugênia Costa Queiroz^{1,2}

Received: 20 December 2016 / Revised: 17 February 2017 / Accepted: 3 March 2017 / Published online: 23 March 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract This study reports a fast, sensitive, and selective column switching ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method to determine the endocannabinoids (eCBs), anandamide (AEA), and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in plasma samples. This bidimensional system used a restricted access media column (RP-8 ADS, 25 mm × 4 mm × 25 μm) in the first dimension and a core-shell Kinetex C18 (100 mm × 2, 1.7 mm × 1 μm) column in the second dimension, followed by detection in a mass spectrometer triple quadrupole (multiple reactions monitoring mode) operating in the positive mode. RP-8 ADS was used for trace enrichment of eCBs (reverse phase partitioning) and macromolecular matrix size exclusion; the core-shell column was used for the chromatographic separation. The column switching UHPLC-MS/MS method presented a linear range spanning from 0.1 ng mL⁻¹ (LOQ) to 6 ng mL⁻¹ for AEA and from 0.04 ng mL⁻¹ (LOQ) to 10 ng mL⁻¹ for 2-AG. Excluding the LLOQ values, the precision assays provided coefficients of variation lower than 8% and accuracy with relative standard error values lower than 14%. Neither carryover nor matrix effects were detected. This high-throughput column switching method compared to conventional methods is time saving as it involves fewer

steps, consumes less solvent, and presents lower LLOQ. The column switching UHPLC-MS/MS method was successfully applied to determine AEA and 2-AG in plasma samples obtained from Alzheimer's disease patients.

Keywords Column switching · Liquid chromatography-tandem mass spectrometry · Endocannabinoids · Plasma samples

Introduction

Receptors, metabolic enzymes, and endocannabinoids (eCBs) compose the endocannabinoid system. The eCBs are neurotransmitters derived from the arachidonic acid that bind to the cannabinoid receptors CB1 and CB2 where they act as agonists. CB1 receptors are highly abundant in the central nervous system and are especially located at the pre-synaptic level, where they participate in the regulation of the neurotransmission. CB2 seems to be associated with the peripheral immune system, brain stem neurons, and microglia [1]. The main eCBs are *N*-arachidonylethanolamine, also known as anandamide (AEA), and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (Fig. 1). These compounds take part in many biochemical processes and participate in the regulation of some brain functions such as memory, learning, and motor control. 1-Arachidonoylglycerol (1-AG) (Fig. 1), the isomer of 2-AG, occurs physiologically but is inactive on CB receptors [2].

The complexity of the eCB system suggests that eCBs potentially mediates a broad spectrum of biological functions and pathological situations that are still not completely understood. The concentrations of eCBs in biological samples are related to several physiological, pharmacological, and pathological processes [3, 4]. Over the past decade, eCBs have been determined in biological samples obtained from patients with

✉ Maria Eugênia Costa Queiroz
mariaeqn@ffclrp.usp.br

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Avenida Bandeirantes, 3900, São Paulo, Ribeirão Preto CEP 14040-901, Brazil

² Departamento de Química, Universidade de São Paulo (USP), Avenida Bandeirantes, 3900, São Paulo, Ribeirão Preto CEP 14040-901, Brazil

³ Department of Neuroscience and Behavior, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ANEXO Q – Principais publicações 2016 – 2019

ORIGINAL ARTICLE

AJO-DO

Bisphenol A release from orthodontic adhesives measured in vitro and in vivo with gas chromatography

Marília Rodrigues Moreira,^a Leonardo Gontijo Matos,^a Israel Donizeti de Souza,^b Tamires Amabile Valim Brigante,^b Maria Eugênia Costa Queiroz,^b Fábio Lourenço Romano,^c Paulo Nelson-Filho,^a and Mirian Aiko Nakane Matsumoto^c
Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Introduction: The objectives of this study were to quantify in vitro the Bisphenol A (BPA) release from 5 orthodontic composites and to assess in vivo the BPA level in patients' saliva and urine after bracket bonding with an orthodontic adhesive system. **Methods:** For the in-vitro portion of this study, 5 orthodontic composites were evaluated: Eagle Spectrum (American Orthodontics, Sheboygan, Wis), Enlight (Ormco, Orange, Calif), Light Bond (Reliance Orthodontic Products, Itasca, Ill), Mono Lok II (Rocky Mountain Orthodontics, Denver, Colo), and Transbond XT (3M Unitek, Monrovia, Calif). Simulating intraoral conditions, the specimens were immersed in a water/ethanol solution, and the BPA (ng.g^{-1}) liberation was measured after 30 minutes, 24 hours, 1 day, 1 week, and 1 month by the gas chromatography system coupled with mass spectrometry. Twenty patients indicated for fixed orthodontic treatment participated in the in-vivo study. Saliva samples were collected before bracket bonding and then 30 minutes, 24 hours, 1 day, 1 week, and 1 month after bonding the brackets. Urine samples were collected before bonding and then at 1 day, 1 week, and 1 month after bonding. The results were analyzed statistically using analysis of variance and Tukey posttest, with a significance level of 5%. **Results:** All composites evaluated in vitro released small amounts of BPA. Enlight composite showed the greatest release, at 1 month. Regarding the in-vivo study, the mean BPA level in saliva increased significantly only at 30 minutes after bonding in comparison with measurements recorded before bonding. **Conclusions:** All orthodontic composites released BPA in vitro. Enlight and Light Bond had, respectively, the highest and lowest BPA releases in vitro. The in-vivo experiment showed that bracket bonding with the Transbond XT orthodontic adhesive system resulted in increased BPA levels in saliva and urine. The levels were significant but still lower than the reference dose for daily ingestion. (Am J Orthod Dentofacial Orthop 2017;151:477-83)

During orthodontic treatment with fixed appliances, bracket bonding with composite materials based on bisphenol A glycidyl methacrylate is of great importance for treatment outcome.^{1,2} It is the main monomer used in resins and orthodontic

adhesives,³ and bisphenol A (2,2'-bis [4-hydroxyphenyl] propane; BPA) is the main component of this monomer.⁴

BPA is a synthetic chemical substance widely used for production of epoxy resin and polycarbonate plastic used to manufacture various products, including bottles, food packaging, baby bottles, toys, detergents, pesticides, cars, and dental resinous materials, such as composites and pit-and-fissure sealants.^{5,6} Due to the increase in the number of products based on epoxy resins and polycarbonate plastics, human exposure to BPA has increased rapidly.^{7,8}

BPA has been extensively studied as one of the most common environmental endocrine disruptors, having an estrogenic action from competitive binding of estrogen-like polymer molecules to natural hormone receptors.⁹ The environment—water, air, and soil—can be a route of exposure to BPA, but foods are the primary source

From the University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

^aDepartment of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto.

^bDepartment of Chemistry, College of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto.

^cDepartment of Orthodontics, Dental School of Ribeirão Preto.

All authors have completed and submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest, and none were reported.

Address correspondence to: Marília Rodrigues Moreira, Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Av. do Café, s/n, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP 14040-904, Brazil; e-mail, marilia.moreira@ig.com.br.

Submitted, March 2016; revised and accepted, July 2016.

0889-5406/\$36.00

© 2016 by the American Association of Orthodontists. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2016.07.019>

ANEXO R – Principais publicações 2016 – 2019

Horta et al. *Progress in Orthodontics* (2018) 19:19
<https://doi.org/10.1186/s40510-018-0219-z>

Progress in Orthodontics

RESEARCH

Open Access

Association between polymorphisms in genes encoding estrogen receptors (ESR1 and ESR2) and excreted bisphenol A levels after orthodontic bracket bonding: a preliminary study

Karla C. Horta¹, Guido A. Marañón-Vásquez¹, Mírian A. N. Matsumoto¹, Marília R. Moreira², Fábio L. Romano¹, Alberto Consolaro³, Israel D. de Souza⁴, Tamires A. V. Brigante⁴, Maria E. C. Queiroz⁴, Paulo Nelson-Filho² and Erika C. Küchler^{2*}

Abstract

Background: Bisphenol A (BPA) is released from orthodontic composites used for bracket bonding. Genetic variations could modify the metabolism of this chemical within the organism. Considering that free BPA binds to estrogen receptors causing harmful effects to health, the present in vivo study aimed to evaluate the association between genetic polymorphisms in genes encoding estrogen receptors (*ESR1* and *ESR2*) and excreted BPA levels in orthodontic patients.

Methods: Quantification of BPA levels in the urine of 16 patients was performed in a gas chromatograph mass spectrometer before (T0), at 24 h (T1), and 1 week (T2) after bracket bonding. DNA was extracted from saliva, and one genetic polymorphism in *ESR1* (rs2234693) and two in *ESR2* (rs4986938 and rs1256049) were analyzed by real-time PCR. Increases in BPA levels in the urine at T1 and T2 were grouped according to the genotype, and mean differences were compared by unpaired *T* test or Mann-Whitney test according to the normality of the data. The established alpha was 5%.

Results: BPA levels increased significantly at T1 and T2. There were no statistically significant differences in the increases in BPA levels according to the genotype for any genetic polymorphism ($P > 0.05$), at neither 24 h nor 1 week after bracket bonding.

Conclusions: The results suggested that there are no association between excreted BPA levels after bracket bonding and the evaluated genetic polymorphisms in *ESR1* and *ESR2*. Further research should be performed in order to confirm these results.

Keywords: Polymorphism, Bisphenol A, Orthodontics

* Correspondence: erikacalvano@gmail.com

²Department of Pediatric Dentistry, Ribeirão Preto Dental School, University of São Paulo, Av. Do Café s/n, Monte Alegre, Ribeirão Preto, São Paulo 14040-904, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.