Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Desenvolvimento de métodos cromatográficos para análises de antimicrobianos em amostras complexas

Lidervan de Paula Melo

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2012

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Desenvolvimento de métodos cromatográficos para análises de antimicrobianos em amostras complexas

Lidervan de Paula Melo

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

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Melo, Lidervan de Paula

Desenvolvimento de métodos cromatográficos para análises de antimicrobianos em amostras complexas

Ribeirão Preto, 2012.

190 p. : il. ; 30cm

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

Orientadora: Nassur, Maria Eugênia Queiroz .

1. Cromatografia líquida. 2. Rifampicina. 3. Parabenos. 4. Polímeros molecularmente impressos.

Dedicatória

"Eu sou o caminho, a verdade e a vida.
Ninguém vai ao Pai se não por mim."

Jesus Cristo

Agradecimentos

A Profa Dra Maria Eugênia C. Queiroz pela orientação, por seus ensinamentos, amizade e pela grande contribuição na realização deste trabalho.

A Profa Dra Regina H. Queiroz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP pela doação das amostras de plasma.

As Profa (s): Dra. Juliana C.S. Monteiro e Dra. Ana Márcia S. Nakano da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP pela colaboração nas coletas das amostras de leite humano.

Aos meus queridos e estimados pais pelo apoio e paciência:
Lúcia de F. Melo e José do N. de Melo.

Aos amigos de laboratório pelas discussões em grupo e troca de conhecimentos:
Juciene Caris, Marcelo Cardoso, Mércia, Bruno José, Andréa Chaves, Mirian Pedrosa, Bruno Rafael, Fernanda Salamin, Flávia Tambolin, Fernanda Zampieri, Diego, Luana e Valéria.

Aos amigos das horas difíceis e de momentos inesquecíveis:
Aline Patrícia, Bruno Rafael, Luciana (Lú), Cristina Dias (Cris), Fernando Cunha, Gilberto, Juliana Villela, Liane Capucho, Jacqueline Souza, Janaina Godoy, Eliane Ribeiro, Felipe Godoy, Adriana Oliveira, Jeferson Luis, Alexandre (teacher), Paulin Badan, Danilo branco, Raphael Moura, Douglas Peiró, Vânia, Grace, Fabrício, Fernando e Gabriela.

A todos os meus familiares e amigos de Pratápolis (MG).

As agências de fomento pela bolsa concedida e uso de equipamentos:
CNPq e FAPESP

"Desenvolver força, coragem e paz interior demanda tempo. Não espere resultados rápidos e imediatos, sob o pretexto de que decidiu mudar. Cada ação que você executa permite que essa decisão se torne efetiva dentro de seu coração."

Dalai Lama

Resumo

Este trabalho descreve o desenvolvimento de novos métodos cromatográficos em conjunto com técnicas de microextração para determinação de parabenos em produtos cosméticos e leite humano e rifampicina em amostras de plasma. Destaca-se também o desenvolvimento da fase extratora molecularmente impressa para extração em fase sólida (SPE) de parabenos em amostras de leite humano.

O capítulo I descreve a avaliação da extração sortiva em barra de agitação (SBSE) em conjunto com a cromatografia líquida (LC) com detecção espectrofotométrica (LC-UV) para análises de parabenos em produtos cosméticos para fins de controle de qualidade.

As variáveis do processo de extração SBSE, tais como tempo e temperatura de extração, pH e força iônica da amostra e condições de dessorção foram otimizadas para aumentar a sensibilidade analítica do método e diminuir o tempo de análise. O método SBSE/LC-UV desenvolvido apresentou faixa linear correspondente ao limite de quantificação (LQ) a $2,50 \mu\text{g. mg}^{-1}$ e coeficientes de determinação maiores que 0,993. Os valores de coeficiente de variação resultantes das análises de precisão interensaios foram $\leq 5,0\%$ para todos os parabenos analisados e a exatidão variou de 90 a 100%. O método desenvolvido foi aplicado para análises de amostras de produtos cosméticos comerciais (cremes hidratantes, antitranspirantes em creme e filtros solares).

O método SBSE/LC-UV padronizado e validado resultou nas seguintes vantagens em relação aos métodos convencionais: simplicidade no preparo de amostra, redução do volume de solvente orgânico e da quantidade de amostra utilizada.

O capítulo II descreve o desenvolvimento da fase extratora molecularmente impressa para SPE de parabenos em amostras de leite humano e análises por cromatografia em fase líquida com detecção espectrofotométrica (SPE/LC-UV). Os polímeros de impressão molecular, materiais sintéticos baseados em sistemas biomiméticos, foram sintetizados através do processo sol-gel tendo como molde, o benzilparabeno. Após a remoção do molde, cavidades seletivas (sítios de

reconhecimento molecular) ao benzilparabeno e análogos estruturais foram reveladas.

O método SPE/LC desenvolvido apresentou faixa linear correspondente ao limite de quantificação a 150 ng. mL^{-1} e coeficientes de determinação $\geq 0,992$. Os valores de coeficiente de variação resultantes das análises de precisão interensaios foram $\leq 13\%$ e a exatidão variou de 86 a 117%. A aplicabilidade do método SPE/LC foi demonstrada através das análises de amostras de leite humano de lactantes. Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método padronizado SPE/LC-UV é adequado para análises de parabenos em amostras de leite humano.

O capítulo III descreve a avaliação da microextração em fase sólida no capilar (“in-tube” SPME) acoplada à cromatografia líquida (LC) com detecção espectrofotométrica (LC-UV) para análises de rifampicina em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica. As variáveis “in-tube” SPME, tais como fase estacionária da coluna capilar, volume de amostra, ciclos aspirar/dispensar e vazão foram otimizadas visando obter maior eficiência do processo.

O método “in-tube” SPME/LC desenvolvido apresentou faixa linear correspondente ao limite de quantificação ($0,1 \text{ } \mu\text{g. mL}^{-1}$) a $100 \text{ } \mu\text{g. mL}^{-1}$ e coeficientes de determinação igual a 0,998. Os valores de coeficiente de variação resultantes das análises de precisão interensaios foram $\leq 2\%$ e a exatidão variou de 83 a 92%. A aplicabilidade do método “in-tube” SPME/LC, padronizado e validado foi comprovada através das análises de amostras de plasma de pacientes em tratamento com rifampicina. O método “in-tube” SPME/LC resultou na automação do processo de análise, maior precisão analítica, menor tempo de análise, menor volume de solvente orgânico e de fluido biológico.

Abstract

This work describes the development of chromatographic methods in combination with microextraction techniques for the determination of parabens in cosmetic and human milk samples and of rifampicin in plasma samples. The design of a molecularly imprinted extraction phase for the solid-phase extraction (SPE) analysis of parabens in human milk samples is also reported.

Chapter I describes the evaluation of the stir bar sorptive extraction (SBSE) in combination with liquid chromatography (LC) with UV detection (LC-UV) for the analysis of parabens in cosmetics aiming at quality control.

The SBSE variables such as extraction time, temperature, pH of the matrix, ionic strength, and desorption conditions have been optimized, in order to establish the parabens partition equilibrium in a short analysis time.

The linear range of the SBSE/LC method lay from LOQ to $2.5 \mu\text{g. mg}^{-1}$, with a coefficient of determination higher than 0.993. The interday precision of the SBSE/LC method presented a coefficient of variation lower than 5%, and the accuracy ranged from 90 to 99%. The effectiveness of the proposed method for the analysis of commercial cosmetic products such as body creams, antiperspirant creams, and sunscreens has been proven. Therefore, the combination of SBSE with liquid desorption, followed by LC analysis, provides a simple, and selective tool for the analysis of parabens in cosmetic products using minimized volume of organic solvent as well as very small amount of the target sample.

Chapter II presents the development of a molecularly imprinted extraction phase for the SPE analysis of parabens in human milk samples. The molecularly imprinted polymers, which are synthetic materials based on biomimetic systems, were synthesized by the sol-gel technology in the presence of the template (benzilparaben). After template removal, selective cavities (benzilparaben) were revealed for parabens selective extraction.

The linear range of the SPE/LC method lay from LOQ to 150 ng. mL^{-1} , with a coefficient of determination higher than 0.992. The interday precision of the SPE/LC method presented a coefficient of variation lower than 13%, and the accuracy ranged from 86 to 117%. The effectiveness of the proposed method for the analysis of human milk samples has been demonstrated. According to the

evaluated analytical validation parameters, the SPE/LC-UV method is suitable for the analysis of parabens in human milk samples.

Chapter III depicts the evaluation of solid-phase microextraction in the capillary (in-tube SPME) in combination with liquid chromatography (LC) with UV detection (LC-UV) for the analysis of rifampicin in plasma samples for therapeutic drug monitoring. The in-tube SPME/LC method was linear over the LOQ (0.1) to 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ range, with a linear coefficient value (r^2) of 0.998. The inter-assay precision presented coefficient of variation $\leq 2\%$, and the accuracy ranged from 83 to 92%. The effectiveness and practicability of the proposed method have been by analysis of plasma samples from ageing patients undergoing therapy with rifampicin. The in-tube SPME/LC method allowed for automated continuous sample preparation (extraction, concentration, desorption, and injection of analytes) and minimized the analysis time as well as the volumes of organic solvent and biological fluid.

Lista de Figuras

Figura 1: Estruturas químicas dos parabenos	27
Figura 2: Esquema representando a barra SBSE.	32
Figura 3: Estrutura química do PDMS.	33
Figura 4: Processo de extração SBSE (a) extração direta na amostra e (b) extração no headspace da amostra.	34
Figura 5: (a) Sistema de dessorção térmica SBSE, (b) Esquema de dessorção líquida.	35
Figura 6: Taxa de recuperação dos analitos em função do coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) para as técnicas, SPME e SBSE	38
Figura 7: Cromatograma referente à análise LC-UV da solução padrão dos parabenos.	54
Figura 8: Cromatograma referente à análise LC-UV da solução padrão dos parabenos e padrão interno.	55
Figura 9: Otimização do pH da amostra.	57
Figura 10: Otimização da temperatura de extração SBSE.	58
Figura 11: Otimização do tempo de extração SBSE.	59
Figura 12: Avaliação da força iônica no processo SBSE.	60
Figura 13: Otimização do tempo de dessorção SBSE.	61
Figura 14: Comparação do processo de dessorção SBSE, agitação magnética e banho de ultrassom.	63
Figura 15: Cromatograma das análises SBSE/LC-UV. (a) amostra de creme base branco de referência, (b) amostra de creme branco de referência enriquecida com os parabenos.	65
Figura 16: Curvas analíticas obtidas das análises SBSE/LC-UV em amostras de creme base (branco de referência) enriquecidas com os parabenos.	68
Figura 17: Cromatogramas representativos das análises SBSE/LC-UV de amostras de cosméticos comerciais: (a) creme hidratante, (b) antitranspirante em creme e (c) filtro solar.	72
Figura 18: Esquema geral para síntese dos MIPs.	87
Figura 19: Estrutura química dos principais monômeros funcionais empregados no preparo de MIPs (a) ácido metacrílico, (b) ácido <i>p</i> -vinilbenzóico, (c) ácido acrílico, (d) acrilamida, (e) 4-vinilpiridina e (f) 2-vinilpiridina.	89

Figura 20: Estrutura química dos monômeros (a) divinibenzeno e (b) etileno glicol dimetacrilato.	90
Figura 21: Estrutura química dos iniciadores radicalares, (a) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila e (b) peróxido de benzoíla.	92
Figura 22: Reações de hidrólise e condensação durante o processo sol-gel.	97
Figura 23: Processo de impressão molecular sol-gel não covalente.	99
Figura 24: Impressão molecular sol-gel não covalente híbrido orgânico-inorgânico.	100
Figura 25: Processo de impressão molecular sol-gel através de ligações covalentes.	101
Figura 26: Cromatograma referente à análise LC-UV da solução padrão de parabenos.	111
Figura 27: Esquema da síntese dos MIPs, (a) formação do complexo molde: monômero funcional, (b) etapa de polimerização sol-gel e (c) remoção do molde das cavidades do MIP.	113
Figura 28: Otimização da quantidade de benzilparabeno utilizada na síntese do MIP.	115
Figura 29: Avaliação da repetibilidade da síntese do MIP.	116
Figura 30: Espectro de absorção vibracional na região do Infravermelho de 4000 a 400 cm^{-1} , (A) MIP e (B) NIP.	117
Figura 31: Espectro de RMN de ^{29}Si : (a) MIP e (b) NIP.	120
Figura 32: Espectro de RMN de ^{13}C : (a) MIP e (b) NIP.	121
Figura 33: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura: (a) MIP e (b) NIP.	122
Figura 34: Avaliação do pH da amostra no processo de extração SPE.	124
Figura 35: Avaliação do solvente de dessorção no processo SPE.	126
Figura 36: Avaliação do volume de solvente de dessorção no processo SPE.	127
Figura 37: Cromatogramas das análises SPE/LC-UV obtidos após extração de parabenos em amostras de leite branco de referência enriquecida.	129
Figura 38: Cromatograma das análises SPE/LC-UV. (a) amostra de leite branco de referência sem adição de parabenos (b) amostra de leite branco de referência enriquecida com os parabenos.	130
Figura 39: Curvas analíticas obtida das análises SPE/LC-UV para as determinações de (a) metilparabeno, (b) etilparabeno e (c) propilparabeno, realizadas com amostras de leite branco de referência enriquecida.	133
Figura 40: Cromatograma representativo das análises SPE/LC-UV de amostra de leite humano de uma voluntária lactante.	136

Figura 41: Estrutura química da rifampicina.	149
Figura 42: Dispositivo geral para “in-tube” SPME utilizando capilares abertos.	152
Figura 43: Esquema do processo “in-tube” SPME/LC (a) processo de extração (b) processo de dessorção.	154
Figura 44: Cromatograma referente à análise LC-UV da solução padrão de rifampicina e padrão interno utilizando a fase móvel: solução tampão fosfato (0,05 mol. L ⁻¹ , pH 5,0):acetonitrila (60:40 v/v).	167
Figura 45: Avaliação de diferentes fases extratoras utilizadas nas análises “in-tube” SPME/LC.	170
Figura 46: Otimização do pH da amostra para as análises “in-tube” SPME.	172
Figura 47: Otimização do volume de amostra aspirado/dispensado para as análises “in-tube” SPME.	173
Figura 48: Otimização do número de ciclos aspirar/dispensar para as análises “in-tube” SPME.	174
Figura 49: Otimização da vazão para as análises “in-tube” SPME.	175
Figura 50: Cromatograma “in-tube” SPME/LC-UV. (a) amostra de plasma branco de referência, (b) amostra de plasma branco enriquecida com (1) rifampicina na concentração de 10,0 µg. mL ⁻¹ e (2) padrão interno (3,0 µg. mL ⁻¹).	178
Figura 51: Curva analítica contemplando o intervalo linear para as análises “in-tube” SPME/LC-UV realizadas com amostras de plasma branco de referência enriquecidas com padrões analíticos de rifampicina e padrão interno.	179
Figura 52: Cromatograma representativo das análises “in-tube” SPME/LC-UV de amostra de plasma de paciente em terapia com rifampicina (1) (7,0 µg. mL ⁻¹), (2 = padrão interno).	183

Lista de Tabelas

Tabela 1: Concentrações de parabenos determinados em diferentes matrizes biológicas humanas.	29
Tabela 2: Aplicação da técnica SBSE em análises cromatográficas de amostras biológicas, ambientais e alimentícias.	41
Tabela 3: Regressão linear, LQ e recuperação do método SBSE/LC.	67
Tabela 4: Precisão interensaios e exatidão do método SBSE/LC-UV.	69
Tabela 5: Comparação dos valores de precisão interensaios, exatidão analítica e volume de amostra entre o método SBSE/LC-UV desenvolvido e os métodos cromatográficos descritos na literatura para análises de parabenos em produtos cosméticos.	70
Tabela 6: Análises SBSE/LC-UV de amostras de produtos cosméticos comerciais.	71
Tabela 7: Aplicações dos materiais impressos de sílica como sorvente seletivos.	102
Tabela 8: Regressão linear, LQ e recuperação do método SPE/LC-UV.	132
Tabela 9: Valores de precisão interensaios e exatidão obtida para o método SPE/LC-UV em amostras de leite branco de referência.	135
Tabela 10: Aplicações da técnica “in-tube” SPME.	159
Tabela 11: Programa utilizado nas extrações “in-tube” SPME.	164
Tabela 12: Valores de precisão interensaios e exatidão analítica para o método “in-tube” SPME/LC-UV (n = 5).	181
Tabela 13: Comparação dos parâmetros: linearidade, limite de quantificação, precisão interensaios e volume de amostra entre o método “in-tube” SPME desenvolvido e métodos convencionais descritos na literatura para análises de rifampicina em amostras de plasma.	182

Siglas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APTMS - 3-aminopropiltrimetóxisilano
APTES - 3-aminopropiltrietóxisilano
CP/MAS - polarização cruzada com rotação do ângulo mágico
CE - eletroforese capilar
CV - coeficiente de variação
LLE - extração líquido-líquido
FD - detector de fluorescência,
GC-MS - cromatografia gasosa com detecção de massas
“in-tube” SPME - microextração em fase sólida no capilar
LQ - limite de quantificação
LC-MS - cromatografia líquida com detecção de massas
LC-UV - cromatografia líquida com detector de ultravioleta
LC-FD - cromatografia líquida com detector de fluorescência
MAAM – metacrilamida
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
MIPs - polímeros de impressão molecular
NaCl - Cloreto de sódio
NIP - polímero não impresso
SPME - microextração em fase sólida
OMS - Organização Mundial da Saúde
PDMS – polidimetilsiloxano
PPY - polipirrol
PTMS - feniltrimetóxisilano
PEG – polietilenoglicol
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
SBSE - extração sortiva em barra de agitação
SPE - extração em fase sólida
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TEOS – tetraetilortosilicato
VTMOS – viniltrimetóxisilano

Sumário

1. Introdução geral	22
Capítulo I	24
1.1 Introdução	25
1.1.1 Parabenos	25
1.1.2 Preparo de amostras de produtos cosméticos para as análises de parabenos	30
1.1.3 Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)	31
1.1.3.1 Princípios teóricos	35
1.1.3.2 Otimização das variáveis SBSE	38
<u>1.1.3.2.1 pH da amostra</u>	<u>38</u>
<u>1.1.3.2.2 Tempo e temperatura de extração</u>	<u>39</u>
<u>1.1.3.2.3 Efeito da força iônica</u>	<u>40</u>
<u>1.1.3.2.4 Velocidade de agitação</u>	<u>40</u>
<u>1.1.3.2.5 Otimização do processo de dessorção SBSE</u>	<u>41</u>
1.1.4 Aplicações da técnica SBSE	41
1.1.5 Validação analítica	44
1.1.5.1 Especificidade/Seletividade	44
1.1.5.2 Linearidade	44
1.1.5.3 Precisão	45
1.1.5.4 Exatidão	46
1.1.5.5 Limite de quantificação (LQ)	46
1.1.5.6 Recuperação	46
2. Objetivos	48
2.1 Objetivos específicos	48
3 Materiais e métodos	49
3.1 Padrões analíticos e reagentes	49
3.2 Otimização das condições cromatográficas LC-UV para análises de parabenos em produtos cosméticos	49
3.3 Amostras de creme de referência e produtos cosméticos comerciais	50

3.4 Otimização das variáveis SBSE	51
4. Resultados e discussão	53
4.1 Análise cromatográfica LC-UV	53
4.1.1 Otimização da fase móvel, identificação e quantificação dos parabenos em cosméticos	53
4.2 Padronização do método SBSE/LC-UV para análise de parabenos em produtos cosméticos	56
4.2.1 Otimização das variáveis SBSE	56
4.3 Validação analítica do método SBSE/LC-UV	64
4.3.1 Seletividade analítica	64
4.3.2 Linearidade, LQ e recuperação	65
4.3.3 Precisão inter ensaios e exatidão	68
4.4 Análises de amostras de produtos cosméticos comerciais	70
5. Conclusão	73
6. Referências Bibliográficas	74
 Capítulo II	 82
 1.2 Introdução	 83
1.2.1 Leite humano	83
1.2.2 Preparo de amostras de leite humano para análises de parabenos	84
1.2.3 Polímeros molecularmente impressos	85
1.2.3.1 Reagentes de síntese para desenvolvimento de MIPs	88
<u>1.2.3.1.1 Monômeros funcionais</u>	88
<u>1.2.3.1.2 Reagente reticulante</u>	90
<u>1.2.3.1.3 Solvente porogênico</u>	91
<u>1.2.3.1.4 Iniciador radicalar</u>	91
1.2.3.2 Método de preparo dos MIPs	92
<u>1.2.3.2.1 Polimerização em massa</u>	93
<u>1.2.3.2.2 Polimerização por precipitação</u>	93
<u>1.2.3.2.3 Polimerização em multi-etapas</u>	94
<u>1.2.3.2.4 Polimerização por suspensão</u>	94
1.2.3.3 Limitação da polimerização via radicalar	95

1.2.3.4 <i>Processo sol-gel</i>	95
1.2.3.4.1 <i>Materiais híbridos orgânico-inorgânico impressos</i>	98
1.2.3.4.2 <i>Aplicações de materiais baseados em sílica molecularmente impressa</i>	101
2. Objetivo Geral	103
2.1 Objetivos específicos	103
3. Materiais e métodos	104
3.1 Padrões analíticos e reagentes	104
3.2 Otimização das condições cromatográficas LC-UV	104
3.3 Síntese do polímeros molecularmente impresso	105
3.4 Caracterização estrutural e morfológica dos polímeros sintetizados	106
3.5 Amostras de leite	107
3.6 Precipitação das proteínas do leite	108
3.7 Procedimento SPE e otimização das variáveis	108
4. Resultados e discussões	111
4.1 Análise cromatográfica LC-UV	111
4.1.1 <i>Otimização das condições de análises LC-UV</i>	111
4.2 Síntese do polímero molecularmente impresso	112
4.3 Caracterização estrutural e morfológica dos materiais MIP e NIP	116
4.3.1 <i>Espectroscopia de absorção vibraconal na região do Infravermelho</i>	117
4.3.2 <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de silício ^{29}Si e ^{13}C no estado sólido</i>	118
4.3.3 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	122
4.4 Otimização do processo SPE miniaturizado	123
4.5 Desempenho analítico do MIP	128
4.6 Validação analítica do método SPE/LC-UV	129
4.6.1 <i>Seletividade analítica</i>	129
4.6.2 <i>Linearidade, LQ e recuperação</i>	131
4.6.3 <i>Precisão interensaios e exatidão</i>	134
4.7 Análises das amostras de leite humano de voluntárias lactantes	135
5. Conclusões	137
6. Anexos	139
6.1 Parecer emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da EERP/USP	139
6.2 Instrumento de coleta de dados	140

7. Referências Bibliográficas	142
 Capítulo III	 146
 1.3 Introdução	 147
1.3.1 Tuberculose	147
1.3.2 Rifampicina	148
1.3.3 Monitorização terapêutica	150
1.3.4 Preparo de amostras de plasma para análises de rifampicina	151
1.3.5 “in tube” SPME	151
1.3.5.1 Otimização das variáveis do processo “in tube” SPME	155
<u>1.3.5.1.1 Seleção da coluna capilar</u>	<u>155</u>
<u>1.3.5.1.2 Efeito das modificações da amostra</u>	<u>156</u>
<u>1.3.5.1.3 Efeito do volume de amostra, número de ciclos aspirar/dispensar e vazão</u>	<u>157</u>
<u>1.3.5.1.4 Dessorção dos analitos da fase estacionária</u>	<u>158</u>
2. Objetivo Geral	161
2.1 Objetivos específicos	161
3. Materiais e métodos	162
3.1 Padrões analíticos e reagentes	162
3.2 Otimização das condições cromatográficas LC-UV	162
3.3 Amostras de plasma	163
3.4 Desenvolvimento do programa do injetor automático (LC) para as análises “in tube” SPME.	164
3.5 Precipitação das proteínas do plasma	164
3.6 Acoplamento “in tube” SPME/LC e otimização das variáveis	165
4. Resultados e discussões	167
4.1 Análise cromatográfica LC-UV	167
4.1.1 Otimização da fase móvel	167
4.1.2 Identificação e quantificação de rifampicina em amostras de plasma	167
4.2 Otimização das variáveis do processo “in tube” SPME	169
4.3 Validação analítica do método “in tube” SPME/LC-UV	176
4.3.1 Estabilidade e seletividade analítica	176

4.3.2 Linearidade e LQ	178
4.3.3 Recuperação, precisão inter ensaios e exatidão	179
4.4 Comparação do método “in tube” SPME/LC-UV com os métodos convencionais descritos na literatura.	181
4.5 Análises de amostras de plasma de pacientes	182
5. Conclusões	184
6. Referências Bibliográficas	185

1. Introdução geral

Em razão da complexidade da maioria das amostras, estas não podem ser introduzidas em sistemas cromatográficos em sua forma bruta, pois apresentam compostos interferentes que podem coeluir com os analitos de interesse, durante a separação cromatográfica, ou adsorverem de forma irreversível junto à coluna analítica, diminuindo o seu tempo de vida útil e modificando a retenção dos compostos.

O preparo de amostra é uma etapa importante requerida no desenvolvimento de métodos cromatográficos, para aumentar a seletividade e sensibilidade analítica do método, através da remoção dos interferentes da amostra e pré-concentração dos analitos, quase sempre presentes em níveis de traços.

Uma tendência predominante na área de química analítica tem sido as técnicas miniaturizadas de preparo de amostra, destacando-se a microextração em fase-sólida (“solid-phase microextraction” - SPME), microextração em fase-sólida no capilar (“in-tube” SPME), extração sortiva em barra de agitação (“stir bar sorptive extraction” - SBSE) e microextração por sorvente empacotado (“microextraction by packed sorbent”- MEPS). Estas técnicas quando acopladas à sistemas analíticos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (LC), reduzem ou mesmo eliminam o uso de solvente orgânico, resultam em rápidos processos operacionais, permitem a reutilização das fases extratoras e automação das análises (extração, concentração e introdução dos analitos no sistema cromatográfico).

Esta tese descreve o desenvolvimento de novos métodos cromatográficos em conjunto com técnicas de microextração para determinação de parabenos em produtos cosméticos e leite humano e de rifampicina em amostras de plasma. Destaca-se também o desenvolvimento da fase extratora molecularmente impressa para análises de parabenos em amostras de leite humano.

A fim de facilitar a compreensão do “estudo da arte” e das metodologias padronizadas, a tese apresentada foi dividida em três capítulos: os capítulos foram divididos em introdução contendo a relevância do tema, objetivo geral e objetivos específicos, materiais e métodos, resultados e discussões e conclusão.

Capítulo I: Avaliação da extração sortiva em barra de agitação (SBSE) em conjunto com a cromatografia líquida (LC) com detecção espectrofotométrica (LC-UV) para análises de parabenos em produtos cosméticos.

Capítulo II: Desenvolvimento da fase extratora molecularmente impressa para SPE de parabenos em amostras de leite humano e análises por cromatografia em fase líquida com detecção espectrofotométrica (SPE/LC-UV).

Capítulo III: Avaliação da microextração em fase sólida no capilar (“in-tube” SPME) acoplada à cromatografia líquida (LC) com detecção espectrofotométrica (LC-UV) para análises de rifampicina em amostras de plasma.

CAPÍTULO I

**Avaliação da extração sortiva em barra de agitação (SBSE)
em conjunto com a cromatografia líquida (LC) com
detecção espectrofotométrica (LC-UV) para análises de
parabenos em produtos cosméticos**

1.1 Introdução

1.1.1 *Parabenos*

Uma gama de novos produtos cosméticos tem sido lançada diariamente no mercado, em razão do grande desenvolvimento da cosmetologia e do crescente uso de produtos naturais. Os cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumes, são produtos constituídos por substâncias naturais ou sintéticas. Os produtos cosméticos, geralmente de uso externo, são aplicados em diferentes partes do corpo humano, tais como a pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral [1-3].

A base dos produtos cosméticos representa, muitas vezes, um meio propício para o desenvolvimento ou proliferação de microorganismos. Desta forma, torna-se necessário tanto a adição de conservantes nestes produtos, quanto à realização de controle microbiológico adequado. O “Food and Drug Administration” (FDA), organização responsável pela avaliação de produtos comercializados nos Estados Unidos, afirma que produto cosmético adulterado é aquele que contém substâncias que causam danos ao consumidor sob condições normais de uso. Esta definição engloba, claramente, a contaminação microbiana [1 -3].

Quando o cosmético está contaminado com microorganismos, vários problemas são observados, como a separação de fases, instabilidade dos ingredientes ativos, alteração de cor, odores desagradáveis e reações adversas em indivíduos sensíveis, devido à presença de substâncias geradas pelo metabolismo microbiano. O problema mais grave é a ocorrência de certos

patógenos específicos, podendo assim, gerar sérios riscos à saúde do consumidor, causando doenças graves, desde lesões na pele até cegueira. Portanto, há uma grande preocupação em produzir produtos cosméticos com qualidade [1- 3].

Os conservantes químicos são usados em diversos produtos cosméticos, visando aumentar o tempo de vida útil destes produtos, impedindo o desenvolvimento de bactérias, fungos, leveduras e mofo que podem causar doenças ou, simplesmente, prejudicar o bom aspecto do produto final [4].

Os parabenos (Figura 1), ésteres neutros derivados do ácido *p*-hidroxibenzóico, quando utilizados em baixas concentrações (0,016 a 0,4%), inibem o desenvolvimento de bactérias e fungos. Os parabenos apresentam baixa reatividade, resistência a hidrólises sob aquecimento ou resfriamento, baixa absorção em embalagens, custo reduzido, são não-voláteis e não descolorem nem endurecem formulações. Além disso, são incolores, inodoros e biodegradáveis [4-6].

A atividade antimicrobiana dos parabenos é proporcional ao comprimento da cadeia do grupo alquil, característica esta indesejável do ponto de vista de solubilidade em água. Por esta razão, os ésteres de ácido *p*-hidroxibenzóico de menor massa molar são os mais utilizados (metil, etil, propil e butil parabenos). Esses são indicados para a preservação de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. Quando utilizados com outros conservantes proporcionam excelente efeito sinérgico [5,6].

Os parabenos possuem maior atividade antimicrobiana na forma não ionizada. Portanto, a redução de pH de um produto cosmético deverá resultar em aumento na proporção de moléculas de parabenos não ionizadas e

consequentemente no aumento da ação antimicrobiana. A não ionização destas moléculas facilita a penetração nas membranas celulares dos microorganismos, sobre os quais será exercida a ação inibitória do agente conservante. Atribui-se que os parabenos inibam ou levam a morte os microorganismos, tanto pela alteração da permeabilidade das membranas celulares, quanto pela interferência em reações metabólicas fundamentais para o crescimento e atividade celular [6].

Figura 1: Estruturas químicas dos parabenos: (a) metilparabeno, (b) etilparabeno, (c) propilparabeno e (d) butilparabeno.

Os parabenos são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal, hidrolisados a ácido *p*-hidróxibenzóico, conjugados, e, finalmente excretados pela urina [5-7]. Os parabenos presentes em cosméticos de uso utópico sofrem hidrólise na própria derme devido à presença da enzima esterase [5]. No entanto, quando estes compostos estão presentes em altas concentrações na derme, a hidrólise poderá ser incompleta e os parabenos podem acumular nos tecidos do corpo humano de maneira similar a outros compostos lipofílicos que são bioacumulativos ou ainda induzir dermatites alérgicas em indivíduos sensíveis [5,8].

As pesquisas realizadas *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os parabenos podem mimetizar a ação do hormônio feminino, estrogênio, sendo que o estrogênio está relacionado com o desenvolvimento de câncer de mama [6,8]. Em 2004, pesquisadores britânicos identificaram e quantificaram traços de parabenos na forma não hidrolisada em amostras de tecidos coletados de tumores de câncer de mama [8]. O metilparabeno, identificado em 62% das amostras, foi o mais abundante dos parabenos avaliados. Os parabenos também têm sido determinados em outras matrizes biológicas humanas em concentrações significativas, conforme descrito na Tabela 1.

Os desreguladores endócrinos podem atingir o meio ambiente e entrar na cadeia alimentar e chegar até o homem causando sérios danos a sua saúde. Análises realizadas em amostras de águas residuais revelaram a presença de parabenos em concentrações médias variando de 15 a 400 ng. L⁻¹ (dependendo do tipo de parabeno), enquanto que em águas de efluentes as concentrações determinadas variam de 50 a 85 ng. L⁻¹[9,10].

Tabela 1: Concentrações de parabenos determinados em diferentes matrizes biológicas humanas.

Matriz biológica humana	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno	Concentração total	Ref.
(ng. mL ⁻¹)						
Urina	6,58 - 64,6	0,49 - 5,35	0,85 - 14,0	0,09 - 1,01	0,09 - 64,6	11
Plasma	0,99 - 2,31	0,14 - 0,33	0,39 - 1,45	0,06 - 0,22	0,06 - 2,31	12
Soro	0,89 - 3,64	0,44	0,23 - 0,63	< LD	0,23 - 3,64	13
Leite	0,32 - 3,04	-	0,33	-	0,32 - 3,04	14
Saliva	-	-	-	-	0,2 - 0,3	15
(ng. g ⁻¹)						
Tecidos de placenta	0,2 - 10,0	0,2 - 5,3	0,2 - 2,2	0,2 - 0,6	0,2 - 10,0	16
Tecidos de câncer de mama	-	-	-	-	1,05 - 3,75	8

LD = limite de detecção.

Para garantir a segurança dos consumidores, níveis de tolerância têm sido estabelecidos, quanto à presença de parabenos em cosméticos. O uso de parabenos como conservantes em produtos cosméticos é regulamentado por órgãos governamentais como o FDA e a União Europeia (EU). No Brasil, os conservantes permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e

perfumes, são regulados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução RDC nº 162, de 11 de setembro de 2001, republicada no D.O. de 02/10/2001, que estabelece as concentrações máximas permitidas para o ácido 4-hidroxibenzóico, seus sais e ésteres (parabenos) de 0,4 % (expresso como ácido) individual e 0,8 % (expresso como ácido) para misturas dos sais ou ésteres. Essa resolução é baseada na legislação 76/768/EEC, anexo VI, parte 1, referência 12 da Comunidade Européia (European Communitities, 1976) [6].

1.1.2 Preparo de amostras de produtos cosméticos para as análises de parabenos

As análises cromatográficas de parabenos em produtos cosméticos requerem primeiramente uma etapa de preparo de amostras para eliminar os interferentes da matriz e pré-concentrar os analitos. Os métodos convencionais empregados no preparo de amostras para análises cromatográficas de parabenos em cosméticos têm sido a extração líquido-líquido (LLE) [17, 18], SPE [19] e microextração em fase sólida [20]. No entanto, as técnicas, LLE e SPE, apresentam algumas desvantagens, tais como o uso de solventes orgânicos, exposição do analista a compostos tóxicos, várias etapas para a execução, acarretando em longo tempo de análise e perda do analito.

A SPME, sistema miniaturizado de preparo de amostras, foi introduzida por Arthur e Pawlizyn em 1990. A SPME baseia-se no equilíbrio de partição do analito entre as fases: aquosa (amostra homogênea), polimérica extratora (fibra) e gasosa. Durante a extração em um sistema trifásico considerado ideal, os analitos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição seja atingido. Desta

forma, a massa extraída do analito pela fibra está relacionada ao equilíbrio de massas nas fases do sistema [21, 22]. Porém, em razão do pequeno volume das fases extratoras utilizado em SPME, os métodos analíticos padronizados para as análises de parabenos em produtos cosméticos podem resultar em baixas taxas de recuperação analítica, tornando necessária a utilização de sistema de detecção de alta sensibilidade.

1.1.3 Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)

A SBSE, introduzida no final dos anos 90 por Baltussen *et al.*, destaca-se como uma versátil técnica de preparo de amostra para a pré-concentração de compostos orgânicos de matrizes aquosas [23-25]. As barras de SBSE de polidimetilsiloxano (PDMS) são as primeiras barras desenvolvidas pela Gerstel. Recentemente, uma nova fase mista SBSE de PDMS/etilenoglicol foi disponibilizada comercialmente. Porém, durante o desenvolvimento deste trabalho as fases de PDMS eram as únicas comercialmente disponíveis.

A barra SBSE de PDMS é constituída por uma haste magnética, necessária para agitar a solução da amostra, a qual é inserida no interior de um tubo de vidro de pequeno diâmetro (10 a 20 mm de comprimento) e recoberta pela fase polimérica (25 a 125 µL de PDMS e 0,3 a 1,0 mm de espessura), para sorção dos analitos (Figura 2). Para evitar o contato direto da fase polimérica com a haste metálica esta é encapsulada com vidro, previnindo desta forma, a oxidação do PDMS. As extremidades da barra não são revestidas com o polímero.

Figura 2: Esquema representando a barra de SBSE.

O uso de polidimetilsiloxano (Figura 3) como fase extratora para SBSE se deve em razão de suas características específicas, tais como boa estabilidade térmica, baixo ruído instrumental, não promove a decomposição dos analitos presentes na análise e o mecanismo de extração é baseado na absorção (processo de partição), ou seja, os analitos são solubilizados na fase polimérica [26].

O equilíbrio de partição ou capacidade de retenção de um determinado analito com a fase de PDMS não é influenciado pela presença de outros analitos, ou interferentes da matriz. Os analitos apresentam diferentes equilíbrios de partição (constante de partição) com a fase de PDMS, não havendo competição ou deslocamento dos mesmos (que apresentam menor constante de partição) com a fase extratora resultando desta forma, em métodos analíticos com ampla faixa de linearidade.

Figura 3: Estrutura química do PDMS.

O processo de extração SBSE é realizado diretamente através da inserção da barra em frasco de vidro (com tampa rosca) ou em tubo de extração contendo a amostra aquosa (Figura 4a) a qual é agitada durante um determinado intervalo de tempo. Após os analitos atingirem o equilíbrio de partição com a fase de PDMS, a barra de SBSE é removida da amostra aquosa e seca em papel limpo, para remover as gotas de água. Para as análises de compostos voláteis de amostras sólidas ou líquidas, o processo de extração pode ser realizado no *headspace* da amostra (Figura 4b) [23-25].

Após o procedimento de extração dos analitos pela barra de SBSE, os analitos devem ser dessorvidos para posterior análise cromatográfica. Para dessorção de compostos voláteis ou semivoláteis, a barra de SBSE é inserida em um tubo capilar de vidro (4 mm de d.i. e 187 mm de comprimento) para dessorção térmica no injetor do cromatógrafo a gás (Figura 5a). Desta forma, os analitos são termicamente dessorvidos, sendo posteriormente concentrados a baixas temperaturas e transportados para a coluna analítica com aumento gradual da temperatura do injetor do cromatógrafo a gás. Já a dessorção de compostos não voláteis, a barra de SBSE é inserida em frasco contendo pequeno volume de

solvente orgânico (μL) compatível com o PDMS ou em fase móvel [23-25] (Figura 5b).

(a)

(b)

Figura 4: Processo de extração SBSE [26] (a) extração direta na amostra e (b) extração no headspace da amostra.

(a)

(b)

Figura 5: (a) Sistema de dessorção térmica SBSE [26], (b) Esquema de dessorção líquida.

1.1.3.1 Princípios teóricos

A extração sortiva em barra de agitação é uma técnica de preparo de amostra a qual se baseia no equilíbrio de partição dos analitos entre a fase extratora (PDMS) e amostra aquosa ($K_{PDMS/W}$). O equilíbrio de partição tem sido correlacionado com o coeficiente de distribuição octanol-água ($K_{O/W}$), o qual dá

uma estimativa da polaridade de compostos orgânicos e fornece uma boa indicação da eficiência de extração para cada analito [23,24,27].

O coeficiente de partição ($K_{PDMS/w}$) do analito entre as fases, PDMS e amostra, é definido como sendo a razão entre a concentração do analito na fase de PDMS (C_{PDMS}) e a concentração do analito na amostra aquosa (C_w), no equilíbrio. Esta razão é igual ao produto entre razão das massas do analito na fase PDMS (m_{PDMS}) e na fase aquosa (m_w) e β , onde β é igual à razão entre o volume de amostra e de fase extratora ($\beta = V_w / V_{PDMS}$), equação 1.

A taxa de recuperação do processo SBSE (equação 2) é expresso pela razão entre a quantidade de analito extraído (m_{PDMS}) e a quantidade inicial de analito na amostra aquosa ($m_o = m_{PDMS} + m_w$) que corresponde às correlações entre $K_{PDMS/w}$ e β , como ilustra a equação 2:

Equação 1:

$$K_{o/w} \approx K_{PDMS/w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \cdot \frac{V_w}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \cdot \beta$$

Equação 2:

$$\frac{m_{PDMS}}{m_o} = \frac{K_{PDMS/w} / \beta}{1 + (K_{PDMS/w} / \beta)}$$

De acordo com a equação 2, quanto maior a quantidade de PDMS e menor o β , maior serão as taxas de recuperação SBSE. Uma vez que o valor de $K_{PDMS/w}$ é similar ao valor de $K_{o/w}$, a eficiência da extração na fase de PDMS, em geral diminui com o aumento da polaridade do analito.

A fase extratora de PDMS é a mesma fase usada nas fibras de SPME convencional, no entanto, a quantidade de revestimento utilizada em SBSE é 50 a 250 vezes maior, resultando em maiores taxas de recuperação e maior capacidade de amostra [24,27].

Em SPME, o volume do PDMS é de aproximadamente 0,5 μL . Isso resulta em recuperações não eficientes para analitos com baixos valores de coeficiente de distribuição $K_{o/w}$. Já para SBSE, são usados volumes de 25 a 125 μL de PDMS. A taxa de recuperação teórica alcança 100% para analitos com valores de $K_{o/w}$ maiores que 500 [24,27].

Segundo a Figura 6, a taxa de recuperação SBSE aproxima-se a 100% para analitos com valores de $K_{o/w}$ maiores que 500, enquanto que a SPME apresenta satisfatória taxa de recuperação para analitos com valores de $K_{o/w}$ maior que 10^5 .

Figura 6: Taxa de recuperação dos analitos em função do coeficiente de partição octanol-água ($K_{o/w}$) para as técnicas, SPME (10 mL amostra, fibra PDMS, 100 μ m de espessura) e SBSE (10 mL amostra, camada de PDMS 10 mm x 0,5 mm) [23].

1.1.3.2 Otimização das variáveis SBSE

As variáveis do processo de extração SBSE, tais como tempo e temperatura de extração, pH e força iônica da amostra e processo de dessorção devem ser otimizadas para aumentar a sensibilidade analítica do método e diminuir o tempo de análise.

1.1.3.2.1 pH da amostra

A fase extratora de PDMS extrai os analitos principalmente na sua forma não ionizada. Consequentemente, o pH da amostra influencia as taxas de recuperação para compostos que apresentam grupos ionizáveis, dependentes do pH do meio. O pH da amostra tem sido ajustado com solução tampão, onde a

maioria dos compostos ionizáveis, segundo seus valores de pK_a , passarão à forma não ionizada favorecendo o processo de extração SBSE.

Utilizando soluções tamponadas, o processo SBSE apresenta maiores taxas de eficiência de extração e de faixa linear, quando comparada a soluções ácidas ou alcalinas, pois a razão entre as formas não ionizadas e ionizadas permanecem constantes [27,28].

1.1.3.2.2 Tempo e temperatura de extração

A variação de temperatura influencia no processo de extração SBSE. Com o aumento da temperatura, o coeficiente de difusão aumenta e o coeficiente de partição do analito entre as fases, aquosa e extratora, diminui. Desta forma, os coeficientes de difusão e de partição terão influências opostas sobre a eficiência de extração SBSE. O aumento do coeficiente de difusão diminui o tempo requerido para que o analito atinja o equilíbrio de partição. Por outro lado, devido à diminuição do coeficiente de partição, a quantidade de massa extraída no equilíbrio será menor, acarretando em perda da eficiência do processo.

O tempo de extração é otimizado considerando o equilíbrio de partição. O equilíbrio de partição será atingido quando não houver aumento na quantidade de massa extraída, com o aumento do tempo de extração. Este é dependente do processo de agitação, assim como da constante de distribuição do analito entre a fase extratora de PDMS e a amostra [27,28].

1.1.3.2.3 Efeito da força iônica

Os sais inertes, como cloreto de sódio, têm sido adicionados durante o processo de extração SBSE para modificar a força iônica da solução da amostra. Para analitos hidrofóbicos ($\log K_{ow} > 4$) a adição de um sal poderá resultar em menor eficiência da extração. Por outro lado, para analitos polares a resposta analítica aumenta com a adição de NaCl.

Para explicar a diminuição da eficiência de extração obtida para compostos apolares após a adição de sal, várias hipóteses são dadas. Segundo alguns autores a adição de sal na amostra promove a migração de compostos apolares à superfície da água, minimizando a interação com o revestimento de PDMS. No caso de analitos polares, o adição de sal diminui a solubilidade dos analitos na amostra aquosa, aumentando o coeficiente de partição destes analitos com a fase de PDMS, acarretando em maior eficiência de extração [27,28].

1.1.3.2.4 Velocidade de agitação

A velocidade de agitação da barra de SBSE também poderá influenciar no processo de extração uma vez que pode aumentar as taxas de transferência de massa. No entanto, têm-se observado que aumentando a velocidade de agitação magnética pode resultar em danos físicos a fase extratora, devido ao contato direto da barra com a parede de vidro do frasco contendo a amostra. A velocidade de agitação empregada em SBSE tem sido entre 500 a 750 rpm, valores de agitação magnética superiores resultam em um aumento pouco significativo das taxas de recuperação [27].

1.1.3.2.5 Otimização do processo de dessorção SBSE

Durante o processo de dessorção SBSE, os analitos migram da fase de PDMS para a solução de dessorção. As variáveis de dessorção SBSE: tempo e temperatura de dessorção, natureza e volume de solvente de dessorção e o processo de dessorção (agitação magnética ou banho de ultrassom) deverão ser otimizadas principalmente para dessorção quantitativa dos analitos sem efeito de memória [27].

1.1.4 Aplicações da técnica SBSE

A extração sortiva em barra de agitação tem sido aplicada com êxito na análise de diferentes compostos em amostras biológicas, ambientais e alimentícias (Tabela 2).

Tabela 2: Aplicação da técnica SBSE em análises cromatográficas de amostras biológicas, ambientais e alimentícias.

Analito	Amostra	Processo de extração	Sistema de detecção	Limite de detecção	Ref.
Fungicidas	Vinhos	40 min, 1440 rpm	¹ GC-MS	0,2 e 2,0 mg. L ⁻¹	DAVID <i>et al</i> (2001) – 29
² PHAs	Água	80 min, 1000 rpm	³ LC-FD	0,2 – 2,0 ng. L ⁻¹	WENNRICH <i>et al</i> (2001) – 30
Pesticidas	Água de rio	60min, 100 rpm	GC-MS	0,2 – 2,5 ng. L ⁻¹	PICO <i>et al</i> (2002) – 31
⁴ COVs	Bebidas	30 ou 60 min, 800 rpm	GC-MS	-	DE KIMPE <i>et al</i> (2003) – 32

Tabela 2 continua ...

Continuação da **Tabela 2** ...

Analito	Amostra	Processo de extração	Sistema de detecção	Limite de detecção	Ref.
Metabólitos voláteis de fungos	Fungos	30 min	GC-MS	-	SANDRA <i>et al</i> (2004) - 33
Compostos fenólicos	Água	180 min	GC-MS	0,5 – 2,0 pg. mL ⁻¹	NAKAZAWA <i>et al</i> (2004) - 34
Fenóis	Vinho	60 min, 900 rpm	GC-MS	0,006 – 0,159 mg. L ⁻¹	BARROSO <i>et al</i> (2004) - 35
Pesticidas	Água de rio	60min, 750 rpm	GC-MS	1,0 – 2,5 1,0 ng. L ⁻¹	NOGUEIRA <i>et al</i> (2005) - 36
Fenóis	Água	120 min, 60 min	GC-MS	0,1 – 0,4 ng. mL ⁻¹	POPP <i>et al</i> (2005) - 37
Clorofenóis	Água	120 min	GC-MS	1,0 – 2,0 ng. L ⁻¹	NAKAZAWA <i>et al</i> (2005) 38
Aldeídos	Vinho	90 min, 700 rpm	GC-MS	0,61 e 0,69 ng. L ⁻¹	SALINAS <i>et al</i> (2005) - 39
Agrotóxicos	Água	30 min, 600 rpm	GC-MS	≤ 0.15 ng. g ⁻¹	GUAN <i>et al</i> (2005) - 40
Estradiol	Água	120 min	GC-MS	0,5 ng. L ⁻¹	NAKAZAWA <i>et al</i> (2006) 41
Ftalatos	Água	60 min, 750 rpm	GC-MS	3,0- 40,0 ng. L ⁻¹	NOGUEIRA <i>et al</i> (2006) - 42
Pesticidas	Solo	180 min	GC-MS	0,002- 5,0 ng. g ⁻¹	POPP <i>et al</i> (2006) - 43
Agrotóxicos	Laranja	30 min, 1250 rpm,	⁵ GC- FID	0,17 – 0,05 µg. mL ⁻¹	GUAN <i>et al</i> (2006) - 44
COVs	Vinagre	120 min, 1250 rpm	GC-MS	0,03 – 8,60 µg. L ⁻¹	BARROSO <i>et al</i> (2006) - 45
Difeniléteres	Água	240min, 1250 rpm	GC-MS	0,3 – 203,4 ng. L ⁻¹	NOGUEIRA <i>et al</i> (2007) - 46
Antidepressivos	Plasma	40 min, 1200 rpm	LC-UV	-	QUEIROZ <i>et al</i> (2007) - 47
Parabenos	Cosméticos	30 min, 1200 rpm	LC-UV	-	QUEIROZ <i>et al</i> (2010) - 48
Triclocarban	Água	22h, 800 rpm	⁶ LC-MS/MS	1,0 ng. L ⁻¹	SCHULTZ <i>et al</i> (2010) - 49

Tabela 2 continua ...

Continuação da Tabela 2 ...

Analito	Amostra	Processo de extração	Sistema de detecção	Limite de detecção	Ref.
Rifampicina	Plasma	50 min, 1200 rpm	LC-UV	0,09 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$	QUEIROZ <i>et al</i> (2010) - 50
PAHs	Amostras sólidas	4h, 4000 rpm	GC-MS	1,7 – 32 $\text{ng}.\text{L}^{-1}$	YEE LEE <i>et al</i> (2010) - 51
Organoclorados	Água	3h, 1500 rpm	GC-MS	10 – 44 $\text{pg}.\text{L}^{-1}$	AHUMADA <i>et al</i> (2011) - 52
Filtros UV	Água do mar	30 min, 800 rpm	LC-MS/MS	8 – 31 $\text{ng}.\text{L}^{-1}$	MAGI <i>et al</i> (2011) - 53
Diclofenaco	Urina	600rpm, 120 min	LC-UV	12,03 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$	MCELNAY <i>et al</i> (2011) - 54
Parabenos	Poeira doméstica	4h, 900 rpm	GC-MS	1,0 – 2,1 $\text{ng}.\text{g}^{-1}$	BORRULL <i>et al</i> (2011) - 55
Desreguladores endócrinos	Água de esgoto	15h, 600 rpm	GC-MS	0,8 – 84 $\text{ng}.\text{L}^{-1}$	NAVARRO <i>et al</i> (2011) - 56
Parabenos, triclosan e	Solos, sedimentos e lodos	60min, 1000 rpm	GC-MS	80 $\text{ng}.\text{kg}^{-1}$ e 1,06 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$	LAESPADA <i>et al</i> (2011) - 57

¹GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, ²PHAs: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, ³LC-FD: cromatografia líquida com detector de fluorescência, ⁴COVs: compostos orgânicos voláteis, ⁵GC-FID: cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama, ⁶LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Na literatura, a grande maioria das aplicações emprega a técnica SBSE hifenada à comatografia gasosa (dessorção térmica). O processo de dessorção líquida e análise por LC, ainda requer maior investigação.

Neste capítulo o método SBSE/LC-UV com dessorção à líquido foi padronizado e validado para análises de parabenos em produtos cosméticos, amostra ainda não analisada por SBSE.

1.1.5 Validação analítica [58, 59]

Segundo as normas da ANVISA [59], a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, exatidão, linearidade, precisão, limite de quantificação, recuperação adequadas à análise.

1.1.5.1 Especificidade/Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes endógenos da amostra. Em geral uma forma simples de verificar a seletividade de um método é observar a presença de picos na região do tempo de retenção de interesse injetando-se um branco obtido com a mesma matriz a ser analisada.

1.1.5.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes.

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada deve ser determinada empiricamente,

a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Segundo as normas da ANVISA o coeficiente de determinação (r^2) ou regressão (r) deve ser maior ou igual a 0,99.

1.1.5.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão pode, também, ser expressa como precisão intraensaios, quando medida em um mesmo dia e interensaios quando medida ao longo de vários dias. Esse parâmetro deve ser avaliado em três níveis de concentração (baixo, médio e alto), realizando-se no mínimo 5 (cinco) determinações em cada concentração. A precisão é avaliada pelo cálculo do desvio padrão (RSD) ou coeficiente de variação (CV%), e segundo a ANVISA em se tratando de amostras biológicas deve apresentar coeficientes de variação inferiores a 15%, exceto no limite de quantificação, para o qual se admite valores até 20%.

1.1.5.4 Exatidão

A exatidão do método deve ser determinada utilizando-se, no mínimo, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por concentração. Sendo expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, e de acordo com a ANVISA deve apresentar valores entre 80 a 120 % (oitenta a cento e vinte por cento), através da análise de, no mínimo, 5 (cinco) amostras de padrões.

1.1.5.5 Limite de quantificação (LQ)

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído igual ou superior a 10:1 com coeficiente de variação inferior a 20%.

1.1.5.6 Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximo a 100% são desejáveis, porém, admitem-

se valores menores, desde que os valores de recuperação sejam precisos e exatos.

A recuperação absoluta é uma relação entre a resposta do analito extraído da matriz fortificada e a resposta do padrão analítico puro que não tenha sido submetido ao processo de extração.

2. Objetivos

Avaliação da extração sortiva em barra de agitação em conjunto com a cromatografia líquida com detecção UV (SBSE/LC-UV) para análises de parabenos em produtos cosméticos para fins de controle de qualidade.

2.1 Objetivos específicos

- ❖ Desenvolvimento do método SBSE/LC-UV para análises de parabenos em produtos cosméticos;
 - Otimização das condições cromatográficas LC-UV para análise simultânea dos parabenos;
 - Otimização das variáveis do processo SBSE;
- ❖ Validação analítica do método SBSE/LC-UV desenvolvido;
- ❖ Análises das amostras de produtos cosméticos comerciais para fins de controle de qualidade.

3 Materiais e métodos

3.1 Padrões analíticos e reagentes

Os padrões primários dos parabenos: metil, etil, propil e butil- parabenos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil) e diazepam (padrão interno) da Pfizer (São Paulo, SP, Brasil).

As soluções padrão diluídas dos parabenos foram preparadas em metanol, a partir da diluição de suas respectivas soluções estoques de 10,0 mg. mL⁻¹. Estas soluções apresentaram-se estáveis nas condições de armazenamento a - 4°C. O metanol, grau cromatográfico foi adquirido do fornecedor J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA); ácido clorídrico, fosfato de potássico monobásico e dibásico da Mallinckrodt Baker (Xalostoc, México). A água ultrapura utilizada nos ensaios foi purificada pelo sistema Milli-Q, (Millipore, São Paulo - SP, Brasil).

A barra de SBSE de 126 µL de PDMS (20,0 mm de comprimento e 1,0 mm de espessura) foi obtida da (Gerstel GmbH, Müllheim Ruhr, Germany).

3.2 Otimização das condições cromatográficas LC-UV para análises de parabenos em produtos cosméticos

As análises dos parabenos foram realizadas por cromatografia líquida em fase reversa. Após a otimização da composição da fase móvel, as análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido da *Varian*, modelo Prostar 230, equipado com detector Ultravioleta (*Varian*, modelo Prostar 310) e

detector de arranjo de diodo (*Varian*, modelo Prostar 330), comprimento de onda selecionado em 250 nm.

Os parabenos foram separados em coluna C18 Lichrospher®60 RP-Select B (5 μm , 250 x 4 mm) (Merk - Darmstadt, Alemanha), e pré-coluna C18 RP-Select B (Merk - Darmstadt, Alemanha), LiChroCART®4-4. A fase móvel selecionada para análise dos parabenos foi metanol/água (70:30 v/v), com vazão de 1 mL. min⁻¹, no modo isocrático. O volume de amostra injetado foi de 50 μL .

3.3 Amostras de creme de referência e produtos cosméticos comerciais

As amostras de creme base de referência foram adquiridas em farmácia de manipulação local. A composição das amostras de creme base de referência descrita pelo fornecedor foi a seguinte: álcool cetoestearílico, óleo mineral, álcool de lanolina e cetearéth 10. As características e a natureza diversificada destes componentes resultam em produtos cosméticos com propriedades emolientes, umectantes e hidratantes.

Os componentes destas amostras de creme base de referência têm sido utilizados em vários produtos cosméticos para fins de cuidado da pele, cabelos, produtos infantis e produtos farmacêuticos. Para desenvolvimento do método SBSE/LC-UV, estas amostras foram utilizadas na otimização das variáveis SBSE e na etapa de validação analítica. Para isso, as amostras creme base de referência foram enriquecidas com solução do padrão interno (diazepam, 25 μL , 1000 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) e soluções padrão dos parabenos em diferentes concentrações,

segundo os valores estabelecidos pela ANVISA para uso de conservantes em produtos cosméticos (Resolução RDC nº 162, de 11 de setembro de 2001).

As amostras dos produtos cosméticos comerciais analisadas foram adquiridas em supermercados da cidade de Ribeirão Preto - SP. 3 (três) tipos de produtos cosméticos foram avaliados, tais como cremes hidratantes corporais, antitranspirantes em creme e filtros solares. Para cada produto, 5 (cinco) marcas diferentes foram analisadas em triplicata ($n = 3$). Todas as marcas avaliadas continham em sua formulação os componentes do creme base de referência. A data de validade dos produtos cosméticos foi considerada na seleção das amostras.

3.4 Otimização das variáveis SBSE

As variáveis do processo de extração SBSE, tais como: tempo e temperatura de extração, pH e força iônica da amostra e processo de dessorção foram otimizadas. Para o desenvolvimento do método SBSE/LC-UV, uma barra de SBSE de 126 μL de PDMS (20 mm de comprimento e 1,0 mm de espessura) foi selecionada para as análises de parabenos em produtos cosméticos.

O processo de extração SBSE foi realizado em frasco de vidro de 150 mL com tampa de rosca. Para a otimização das variáveis SBSE, a amostra creme base de referência (50 mg) foi enriquecida com as soluções padrão de parabenos (100 μL , 1000 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) e de padrão interno (25 μL , 1000 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) e em seguida diluída com 100 mL de solução tampão fosfato. Em seguida, a barra de SBSE foi inserida no frasco e o processo de extração foi realizado sob aquecimento e agitação magnética constante.

Após o processo de extração, a barra de SBSE foi retirada do frasco de extração, lavada com água ultrapura e seca com papel limpo. O processo de dessorção SBSE dos parabenos foi realizado em banho de ultrassom com a inserção da barra de SBSE em um tubo de vidro cônico com tampa de rosca, contendo 1 mL de fase móvel (MeOH/água, 70:30 v/v), para assegurar completa imersão da barra na solução de dessorção. Diferentes tempos de dessorção foram avaliados (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 min) a 25°C.

A eficiência do processo de dessorção SBSE foi também avaliada sob agitação magnética constante a 25°C, nas condições de dessorção em banho de ultrassom selecionadas (maiores taxas de extração). Após o processo de dessorção SBSE, uma alíquota de 50 µL da solução foi injetada no cromatógrafo a líquido.

Entre as extrações, a barra de SBSE foi submetida a um procedimento de limpeza, com água ultra pura e metanol (50:50 v/v) por 10 min, à temperatura de 25°C, sob agitação magnética constante, para remover possíveis contaminantes da amostra sorvidos na barra.

4. Resultados e discussão

4.1 Análise cromatográfica LC-UV

4.1.1 Otimização da fase móvel, identificação e quantificação dos parabenos em produtos cosméticos

Para a determinação simultânea dos conservantes metil, etil, propil e butilparabenos, a otimização da fase móvel foi uma etapa importante para se obter boa resolução cromatográfica em menor tempo de análise. A fase móvel otimizada para separação cromatográfica dos parabenos consistiu da mistura dos constituintes metanol/água (70:30 v/v, respectivamente), com eluição no modo isocrático. Nesta condição, os parabenos apresentaram uma adequada resolução cromatográfica e tempo de análise de aproximadamente 5,5 min (Figura 7).

As análises quantitativas dos parabenos foram realizadas utilizando-se o método do padrão interno. Este método é extremamente vantajoso, pois minimiza erros que possam ser gerados por variações das barras de PDMS, nas variáveis experimentais e na composição dos produtos cosméticos.

O benzilparabeno, conservante não utilizado em formulações de cosméticos, foi primeiramente avaliado como padrão interno. No entanto, nas condições otimizadas para análises cromatográfica dos parabenos, o benzilparabeno coeluiu com o composto butilparabeno. Visando obter melhor separação cromatográfica dos analitos coeluidos, a eluição por gradiente variando as concentrações de metanol/água foi avaliada.

Figura 7: Cromatograma referente à análise LC-UV da solução padrão dos parabenos ($1,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$), fase móvel (metanol/água, 70:30 v/v), 1- metilparabeno, 2 - etilparabeno, 3 - propilparabeno e 4 - butilparabeno.

Devido às semelhanças químicas entre butil e benzil- parabeno ($\log K_{o/w} = 3,4$ e $3,5$, respectivamente) não foi possível obter adequada resolução dos parabenos.

Outros padrões cromatográficos foram testados como padrão interno para as análises dos parabenos nas amostras de produtos cosméticos. Dentre os avaliados, o 7-cloro-1,3-diidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona (diazepam) foi selecionado como padrão interno, pois apresentou-se estável na fase móvel utilizada, nas amostras de creme base e produtos cosméticos comerciais, podendo ser adicionado em concentrações similares às dos parabenos. O diazepam não coeluiu com os analitos na condição cromatográfica selecionada e não é encontrado em amostras de produtos cosméticos. Adicionalmente é descrito na literatura [17], que quando um dos parabenos sob análise estiver ausente no produto cosmético, este poderá ser utilizado como padrão interno alternativo.

A Figura 8 ilustra a fase móvel selecionada (metanol/água, 70:30 v/v) para as análises dos parabenos em produtos cosméticos com tempo total de análise de aproximadamente 6 minutos.

Figura 8: Cromatograma referente à análise LC-UV da solução padrão dos parabenos ($1,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$) e padrão interno (250 ng. mL^{-1}). Compostos: 1- metilparabeno, 2 - etilparabeno, 3 - propilárabeno, 4 - butilparabeno e 5 - padrão interno.

Para as análises qualitativas dos parabenos, o tempo de retenção dos compostos e os espectros na região do ultravioleta (absorbância versus comprimento de onda) foram considerados. O comprimento de onda selecionado ($\lambda = 250 \text{ nm}$) corresponde à absorção máxima para as moléculas de parabenos analisadas e o padrão interno. Outros compostos presentes em amostras de cosméticos também apresentam absorção (UV) no λ selecionado. No entanto, no tempo de retenção dos analitos não foram observados a presença de picos interferentes.

4.2 Padronização do método SBSE/LC-UV para análise de parabenos em produtos cosméticos

4.2.1 Otimização das variáveis SBSE

As variáveis SBSE otimizadas neste trabalho, foram: pH e força iônica da amostra, tempo e temperatura de extração e condições de dessorção SBSE. Estas análises foram realizadas em triplicata utilizando amostras de creme base enriquecidas com os parabenos na concentração $2,0 \mu\text{g. mg}^{-1}$. Os valores apresentados nos gráficos são os valores médios com seus respectivos desvios padrão.

A velocidade de agitação da barra magnética SBSE influencia no processo de difusão dos analitos da amostra para a fase de PDMS [27], portanto, esta foi mantida constante (750 rpm) durante todo o procedimento de extração.

Quando se trabalha com compostos que apresentam grupos ionizáveis, o pH da amostra deverá ser avaliado na otimização do processo SBSE. O revestimento de polidimetilsioxano (PDMS) extrai os compostos principalmente na sua forma não ionizada [24,27,28]. O ajuste do pH da amostra em valores, nos quais, os analitos encontram-se, na sua maior parte na forma não ionizada deverá resultar no aumento da eficiência de extração pelo revestimento de PDMS. Desta forma, diferentes valores de pH da amostra foram avaliados, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 9.

Segundo a literatura [6, 60], os parabenos ($pK_a = 8,0$) encontram-se não ionizados no intervalo de pH de 3 a 6. Para valores de $pH > 6$, os parabenos encontram-se negativamente carregados devido a desprotonação do grupo

hidroxila e em valores de pH < 3 pode ocorrer a protonação do oxigênio do grupo éster (C=O) [60]. De acordo com os resultados obtidos na Figura 9, observou-se um ligeiro aumento na eficiência do processo SBSE em valores de pH 5,0, em razão da maior estabilidade destes compostos neste pH. Consequentemente, as extrações posteriores foram realizadas com a diluição da amostra de creme de base com solução tampão fosfato pH 5,0. Valores de pH acima de 6,0 não foram avaliados, pois é reportado na literatura [6, 60] que para valores de pH $\geq 7,0$, os parabenos podem sofrer hidrólise alcalina resultando em seu correspondente ácido *p*-hidroxibenzóico e álcool.

Figura 9: Otimização do pH da amostra. Condições SBSE: amostra de creme base enriquecida com os parabenos ($2,0 \mu\text{g. mg}^{-1}$) e diluída com 100 mL de solução tampão fosfato, tempo de extração de 30 min a 40°C , sem adição de sal. Processo de dessorção: 1,0 mL de fase móvel, tempo: 20 min (25°C), sob banho de ultrassom.

A influência dos parâmetros, temperatura e do tempo de extração, foram avaliados no processo de extração SBSE. Segundo a Figura 10, o aumento da temperatura de 25°C para 30°C resultou em maiores taxas de recuperação. Entretanto, acima desta temperatura observou-se uma redução da eficiência do processo, devido à diminuição do coeficiente de partição dos parabenos com a fase de PDMS.

Figura 10: Otimização da temperatura de extração SBSE. Condições SBSE: amostra de creme base enriquecida com os parabenos ($2,0 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) e diluída com 100 mL de solução tampão fosfato pH 5,0, tempo de extração 30 min, sem adição de sal. Processo de dessorção: 1,0 mL de fase móvel, tempo: 20 min (25°C), sob banho de ultrassom.

O tempo de extração é otimizado considerando o equilíbrio de partição do analito entre a amostra e a fase de PDMS [27,28]. O efeito do tempo na eficiência de extração SBSE foi avaliado no intervalo de 10 a 50 min a 30°C. De acordo com o gráfico (Figura 11), metil e etil- parabenos atingiram o equilíbrio de partição com a fase de PDMS em 40 min. No entanto, propil- e butil parabenos não atingiram o equilíbrio de partição no intervalo de tempo avaliado, em razão do maior coeficiente de partição destes analitos com a fase extratora. Porém, visando diminuir o tempo total de análise, as extrações subsequentes foram realizadas a 30°C durante 30 min.

Figura 11: Otimização do tempo de extração SBSE. Condições SBSE: amostra de creme base enriquecida com os parabenos ($2,0 \mu\text{g. mg}^{-1}$) e diluída com 100 mL de solução tampão fosfato pH 5,0, temperatura de extração (30 °C), sem adição de sal. Processo de dessorção: 1,0 mL de fase móvel, tempo: 20 min (25°C), sob banho de ultrassom.

Para avaliar a força iônica no processo SBSE, foram adicionados concentrações de 0 a 15% de NaCl (m/v). De acordo com a Figura 12, a adição de NaCl à amostra resultou no aumento da força iônica do meio, efeito “salting out”, acarretando em maior quantidade de analito extraído. Consequentemente, as análises SBSE/LC-UV posteriores foram realizadas com a adição de 10% de NaCl à amostra, pois acima deste valor ocorreu a saturação da solução com o NaCl. A deposição de NaCl na fase polimérica deve ser evitada, pois pode reduzir a eficiência de extração SBSE ou mesmo levar a degradação da fase polimérica.

Figura 12: Avaliação da força iônica no processo SBSE. Condições SBSE: amostra de creme base enriquecida com os parabenos ($2,0 \mu\text{g. mg}^{-1}$) e diluída com 100 mL de solução tampão fosfato pH 5,0, tempo de extração de 30 min e temperatura a 30°C . Processo de dessorção: 1,0 mL de fase móvel, tempo: 20 min (25°C), sob banho de ultrassom.

O processo de dessorção SBSE dos parabenos da fase extratora de PDMS deve ser criteriosamente avaliado para favorecer a dessorção quantitativa dos analitos e eliminar o efeito memória. Neste trabalho avaliou-se primeiramente o processo de dessorção utilizando banho de ultrassom à temperatura de 25°C, empregando um frasco cônico contendo 1,0 mL de fase móvel garantindo desta forma, a completa imersão da barra de SBSE na solução de dessorção.

Embora o tempo de equilíbrio de dessorção tenha sido alcançado em 30 min (Figura 13), com intuito de diminuir o tempo de análise, foi selecionado o tempo de dessorção em 20 min, pois nesta condição, foi obtida sensibilidade analítica adequada para quantificação dos parabenos nas amostras de produtos cosméticos.

Figura 13: Otimização do tempo de dessorção SBSE. Condições SBSE: amostra de creme enriquecida com os parabenos ($2,0 \mu\text{g. mg}^{-1}$) e diluída com solução tampão fosfato pH 5,0, tempo 40 min e temperatura a 30°C, adição de 10% de NaCl (m/m). Processo de dessorção: 1,0 mL de fase móvel a 25 °C, sob banho de ultrassom.

A dessorção dos analitos da barra de SBSE também foi verificada sob agitação magnética constante (750 rpm) a 25°C através da imersão da barra em um frasco de vidro contendo 1,0 mL de fase móvel. Os valores médios das áreas obtidas após as análises SBSE foram comparados com os resultados obtidos das análises em banho de ultrassom (20 min de dessorção). De acordo com a Figura 14, a dessorção com agitação magnética foi mais eficiente e apresentou menores coeficientes de variação. Segundo Quintana *et al* [61], a dessorção SBSE através do processo de sonificação pode acarretar em evaporação do solvente, caso o frasco de dessorção não esteja completamente vedado, resultando em menor precisão analítica.

Um procedimento de limpeza da barra entre as análises SBSE, foi inserido com metanol e água (50:50 v/v) sob agitação magnética constante durante 10 min a 25°C, visando limpar a barra da sorção de interferentes da matriz, tais como proteínas, vitaminas, gorduras, sais, entre outros compostos, presentes nas formulações de produtos cosméticos. Após esta etapa não foi observado a presença de analitos ou interferentes na barra, durante as análises das amostras de creme base.

O número de vezes que a barra de SBSE é reutilizada está relacionado com a sorção de compostos interferentes da amostra e pelos critérios ou cuidados do analista. Por exemplo: evitar o uso de solventes orgânicos altamente apolares que possam solubilizar a fase de PDMS, o uso de valores extremos de pH e a limpeza da barra entre as extrações. Neste trabalho, todas as precauções foram consideradas para total conservação da barra de SBSE. Desta maneira, a barra de SBSE foi reutilizada mais de 100 vezes, sem perda significativa da eficiência

de extração. Demonstrando assim a robustez da mesma para as análises de produtos cosméticos.

Figura 14: Comparação do processo de dessorção SBSE, agitação magnética e banho de ultrassom. Condições SBSE: amostra de creme enriquecida com os parabenos ($2,0 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) e diluída com solução tampão fosfato pH 5,0, tempo de extração 30 min e temperatura a 30°C , adição de 10% de NaCl (m/m). Processo de dessorção sob agitação magnética: 1,0 mL de fase móvel, tempo: 20 min a 25°C .

As melhores condições de SBSE, entre as avaliadas foram às seguintes: Amostra de creme base (50 mg) diluída com 100 mL de solução tampão fosfato pH 5,0, adição de 10% de NaCl (m/v), tempo de extração de 40 min a 30°C , sob agitação magnética. O processo de dessorção foi realizado com a imersão da barra em um frasco cônico contendo 1,0 mL de fase móvel a 25°C durante 20 min, sob agitação magnética.

4.3 Validação analítica do método SBSE/LC-UV

Para a validação analítica do método SBSE/LC-UV padronizado, amostras de creme base branco de referência foram enriquecidas com solução de padrão interno (diazepam, 25,0 μL , 1000 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) e soluções padrão dos parabenos (LQ a 2,5 $\mu\text{g. mg}^{-1}$). Segundo as normas da ANVISA [59], os seguintes parâmetros de validação analítica foram avaliados: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e recuperação.

4.3.1 Seletividade analítica

Baseado nas referências [5, 18], os parabenos foram estáveis nas amostras de creme base, nas condições de bancada (temperatura ambiente controlada) e de armazenagem por 45 dias a - 4°C.

Neste trabalho, a seletividade analítica do método SBSE/LC-UV foi avaliada pelos cromatogramas das análises das amostras de creme base sem adição de parabenos (Figura 15a), e amostras de creme base enriquecida com os analitos, na concentração de 2,0 $\mu\text{g. mg}^{-1}$ (Figura 15b). Pela comparação de ambos os cromatogramas não se observou a presença de picos interferentes da amostra ou impurezas nos tempos de retenção dos compostos avaliados.

Figura 15: Cromatogramas das análises SBSE/LC-UV. (a) amostra de creme base branco de referência, (b) amostra de creme branco de referência enriquecida com os parabenos, 1- metilparabeno, 2 - etilparabeno, 3 - propilparabeno 4 - butilparabeno ($2,0 \mu\text{g. mg}^{-1}$) e pi = padrão interno ($0,5 \mu\text{g. mg}^{-1}$).

4.3.2 Linearidade, LQ e recuperação

A linearidade do método SBSE/LC-UV foi avaliada com amostras de creme base enriquecidas com soluções de padrões analíticos de parabenos e padrão interno. O método SBSE/LC-UV apresentou faixa linear correspondente ao LQ a $2,50 \mu\text{g. mg}^{-1}$ e coeficientes de determinação maiores que 0,993 (Tabela 3).

Os intervalos de concentrações avaliados (0,026 a 2,50 $\mu\text{g. mg}^{-1}$ para o butilparabeno, 0,050 a 2,50 $\mu\text{g. mg}^{-1}$ para propilparabeno, 0,150 a 2,50 $\mu\text{g. mg}^{-1}$ para etilparabeno e 0,200 a 2,50 $\mu\text{g. mg}^{-1}$ o metilparabeno) foram adequados para as análises de parabenos em amostras de produtos cosméticos. Os valores de limites de quantificação foram determinados como a menor concentração da curva analítica com a razão sinal/ruído ≥ 10 e o coeficiente de variação $\leq 5\%$.

A recuperação do método SBSE/LC-UV foi avaliada com amostras de creme base enriquecidas com padrões analíticos de parabenos em concentrações de 2,0 $\mu\text{g. mg}^{-1}$ ($n = 3$) (Tabela 3). Os valores de recuperação obtidos variaram de 17 a 99 %, no entanto, segundo a ANVISA [59], taxas de recuperação do analito próximo a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que o método padronizado seja preciso e exato.

A diferença nos valores de recuperação obtidos para os parabenos avaliados pode ser explicada em função de seus valores de $K_{o/w}$. De acordo com a literatura, para analitos com valores de $\log K_{o/w} \geq 3$ (três), ou seja mais apolares, são normalmente esperadas taxas de recuperação próximas a 100% [27,28]. Conforme observado na Tabela 3, o butilparabeno apresentou maior taxa de recuperação em relação aos demais parabenos devido ao seu maior coeficiente de partição com a fase de PDMS ($\log K_{o/w} = 3,46$).

Tabela 3: Regressão linear, LQ e recuperação do método SBSE/LC-UV.

Parabenos	Regressão linear ($y = a + bx$) LQ a 2,50 $\mu\text{g. mg}^{-1}$	r^2	LQ (ng. mg^{-1})	Recuperação (%) ($n = 3$) (2,0 $\mu\text{g. mg}^{-1}$)	$\log K_{o/w}$ [62]
Metilparabeno	$y = 0,1705 + 0,0715 x$	0,993	200	17	1,8
Etilparabeno	$y = 0,2045 + 0,1597 x$	0,997	150	28	2,4
Propilparabeno	$y = 0,1137 + 0,5026 x$	0,997	50	44	2,9
Butilparabeno	$y = 0,2208 + 1,2738 x$	0,999	30	99	3,4

A Figura 16 ilustra as curvas analíticas, utilizadas nas análises quantitativas dos parabenos nas concentrações (LQ, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 e 2,50 $\mu\text{g. mg}^{-1}$) com seus respectivos desvios padrão.

Figura 16 continua...

Figura 16: Curvas analíticas obtidas das análises SBSE/LC-UV em amostras de creme base (branco de referência) enriquecidas com os parabenos (a) metilparabeno, (b) etilparabeno, (c) propilparabeno e (d) butilparabeno.

4.3.3 Precisão interensaios e exatidão

A precisão interensaios do método SBSE/LC-UV foi realizada utilizando-se amostras de creme base enriquecidas com soluções de padrões analíticos de parabenos e padrão interno em três níveis de concentração (baixa, média e alta). A precisão foi avaliada em dias diferentes (2 dias) em quintuplicatas. A avaliação da precisão interensaios expressa melhor às variações decorrentes no procedimento experimental (variações na temperatura do laboratório, na fase móvel, na coluna de analítica, no preparo de amostra, no HPLC, etc.).

Os valores de coeficiente de variação resultantes das análises de precisão interensaios (Tabela 4), foram $\leq 5,0\%$ para todos os parabenos analisados. Quanto a exatidão do método desenvolvido, esta foi determinada utilizando-se, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), as quais contemplaram o intervalo

linear, sendo realizadas 5 (cinco) determinações por concentração. Os valores de exatidão do método SBSE/LC-UV variaram de 90 a 100% (Tabela 4).

Os valores de precisão e exatidão analítica do método SBSE/LC-UV foram similares aos valores obtidos por outros métodos descritos na literatura para as análises de parabenos em produtos cosméticos (Tabela 5). Além disso, o método SBSE/LC-UV resultou em menor volume de amostra e minimizou o consumo de solvente orgânico.

Tabela 4: Precisão interensaios e exatidão do método SBSE/LC-UV.

Parabenos	Concentração adicionada ($\mu\text{g. mg}^{-1}$)	Concentração determinada ($\mu\text{g. mg}^{-1}$) $\bar{x} \pm S$	Precisão interensaios CV (%) (n = 5)	Exatidão (%) (n = 5)
Metilparabeno	0,2 (LQ)	0.19 ± 0.01	5.3	95
	0,5	0.49 ± 0.012	2.4	98
	1,5	1.49 ± 0.036	2.4	99
	2,0	1.99 ± 0.052	2.6	99
Etilparabeno	0,15 (LQ)	0.14 ± 0.071	5.0	93
	0,5	0.49 ± 0.007	1.4	99
	1,5	1.49 ± 0.026	1.7	99
	2,0	1.98 ± 0.026	1.3	99
Propilparabeno	0,05 (LQ)	0.04 ± 0.002	4.4	98
	0,5	0.49 ± 0.007	1.6	99
	1,5	1.49 ± 0.045	3.0	99
	2,0	1.99 ± 0.029	1.5	99
Butilparabeno	0,03 (LQ)	0.03 ± 0.001	4.4	90
	0,5	0.49 ± 0.024	4.9	98
	1,5	1.49 ± 0.069	4.6	99
	2,0	1.97 ± 0.078	3.9	98

Tabela 5: Comparação dos valores de precisão interensaios, exatidão analítica e volume de amostra entre o método SBSE/LC-UV desenvolvido e os métodos cromatográficos descritos na literatura para análises de parabenos em produtos cosméticos.

Técnica de extração	Sistema de detecção	Exatidão (%)	Precisão interensaios (CV%)	Volume de amostra (mg)	Ref.
LLE	LC-UV	-	0,3 - 3,9	500 - 1000	17
LLE	LC-UV	97 -100	1,3 -2,0	1000	18
SPE	LC-DAD e GC-MS	-	< 10	1000	19
SPME	GC-MS	83 - 98	8,2 – 10,3	100	20
SBSE	LC-UV	90 - 99	1,3 - 5,3	50	48

4.4 Análises de amostras de produtos cosméticos comerciais

Para aplicação do método SBSE/LC-UV, padronizado e validado de acordo com as normas da ANVISA [59], para fins de controle de qualidade, foram utilizadas amostras de cremes comerciais, tais como cremes hidratantes corporais, antitranspirantes em creme e filtros solares, as quais foram adquiridas em supermercados da cidade de Ribeirão Preto, SP. Foram analisadas 5 (cinco) marcas diferentes em triplicata para cada produto cosmético (Tabela 6).

As concentrações dos parabenos determinadas nas amostras de produtos cosméticos comerciais (Tabela 6) estão de acordo com a Resolução RDC nº 162, de 11 de setembro de 2001, ANVISA. No entanto, cabe salientar que alguns fabricantes não descreveram em seus rótulos a presença dos conservantes, butil

e propil-parabenos, os quais foram determinados em quantidades significativas. Ressalta-se também que metil- e propil parabenos foram os conservantes mais utilizados pelos fabricantes nos produtos cosméticos, pois foram determinados na maioria das amostras analisadas.

Tabela 6: Análises SBSE/LC-UV de amostras de produtos cosméticos comerciais.

Parabenos Concentração ($\mu\text{g. mg}^{-1}$) (n = 3)				
Marcas	metilparabeno	etilparabeno	propilparabeno	butilparabeno
Cremes hidratantes				
A	1,49	0,16	1,16	0,62 ¹
B	nda*	nda	0,14	0,72
C	0,65	0,31	1,22	0,65
D	1,10	0,41	0,80	nda
E	0,35	nda	0,53	0,24
Antitranspirantes em creme				
A	0,86	nda	0,36	nda
B	1,14	nda	0,98	nda
C	0,42	nda	1,25	nda
D	0,22	nda	1,47	nda
E	0,43	nda	0,96	nda
Filtros solares				
A	0,76	nda	1,02	nda
B	1,12	nda	1,15 ²	nda
C	nda	nda	Nda	nda
D	0,36	nda	0,47	nda
E	1,02	nda	1,09	0,08

*nda = valor não determinado, 1 e 2 - não descrito na formulação dos produtos cosméticos.

De acordo com a Figura 17, observou-se nos cromatogramas obtidos das análises de amostras reais, similaridade entre os perfis dos picos cromatográficos

dos analitos e suas resoluções com aqueles obtidos em amostras de creme base enriquecidas com os padrões analíticos de parabenos (Figura 15b).

Figura 17: Cromatogramas representativos das análises SBSE/LC-UV de amostras de cosméticos comerciais: (a) creme hidratante, (b) antitranspirante em creme e (c) filtro solar. 1- metilparabeno, 2 etilparabeno, 3- propilparabeno and pi = padrão interno ($0,5 \mu\text{g. mg}^{-1}$).

5. Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvido um método preciso e exato para as análises de parabenos em produtos cosméticos, utilizando a técnica miniaturizada de preparo de amostra, extração sortiva em barra de agitação em conjunto com a cromatografia líquida com detecção UV, ampliando, desta maneira, o campo de aplicação da técnica de SBSE. O processo de dessorção líquida com a fase móvel mostrou-se simples e eficiente para dessorção dos parabenos da barra de PDMS.

As modificações da amostra, tais como a diluição com solução tampão fosfato diminuiu a viscosidade da amostra favorecendo a transferência de massa dos parabenos para a fase de PDMS. O ajuste do pH da amostra e adição de sal (aumento da força iônica) também favoreceram o processo de extração SBSE.

Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método SBSE/LC-UV apresentou linearidade, seletividade, precisão e exatidão adequado para análises de parabenos em amostras de produtos cosméticos. Todas as amostras de cosméticos comerciais avaliadas apresentaram concentrações dentro dos valores estabelecidos pela ANVISA.

O método SBSE/LC-UV, quando comparado com os métodos descritos na literatura, usando detector UV, apresentou as vantagens: simplicidade no preparo de amostra, redução do volume de solvente orgânico e da quantidade de amostra utilizada. Desta forma, o método SBSE/LC-UV proposto para análises de parabenos em produtos cosméticos pode ser empregado para fins de controle de qualidade.

6. Referências bibliográficas

1. M., NICOLETT, E.M.A. ORSINE, N. CHACRA BOU, **Cosmetics & Toiletries** – Revista de Cosméticos & Tecnologia, 91 (1997) 28.
2. T. REBELLO, **Cosmetics & Toiletries** – Revista de Cosméticos & Tecnologia, São Paulo, 2 (1990) 52.
3. D.S. GELLI, T. REBELLO, **Cosmetics & Toiletries** – Revista de Cosméticos & Tecnologia, 2 (1990) 56.
4. O. HANDA, S. KOKURA, S. ADACHI, *et al*, **Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes**, Toxicol., 227 (2006) 62.
5. MAW-RONG LEE, CHUEH-YU LIN, ZU-GUANG LI, TZU-FENG TSAI, **Simultaneous analysis of antioxidants and preservatives in cosmetics by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry**, J. Chromatogr. A, 1120 (2006) 244.
6. M.G. SONI, I.G. CARABIN, G.A. BURDOCK, **Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)**, Food Chem. Toxicol., 43 (2005) 985.
7. P. D. DARBRE, P. W. HARVEY, **Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks**, J. Appl. Toxicol. 28 (2008) 561.
8. P.D. DARBRE, A. ALJARRAH, W.R. MILLER, *et al*, **Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours**, J. Appl. Toxicol., 24 (2004) 5.
9. D. M. BILA, M. DEZOTTI, **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências**, Quim. Nova, 30 (2007) 651.

10. A. M. PECK, **Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices**, Anal. Bioanal. Chem., 386 (2006) 907.
11. J. D. MEEKER, T. YANG, X. YE, et al, **Urinary Concentrations of Parabens and Serum Hormone Levels, Semen Quality Parameters, and Sperm DNA Damage**, Environ. Health. Persp., 119 (2011) 252.
12. H. FREDERIKSEN, N. JØRGENSEN, A. ANDERSSON, **Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS)**, J. Expo. Anal. Env. Epid., (2010) 1.
13. YE XIAOYUN, J. T. LILY, L. LARRY, et al, **Automated on-line column-switching HPLC–MS/MS method for measuring environmental phenols and parabens in serum**, Talanta, 76 (2008) 865.
14. YE XIAOYUN, M. B. AMBER, L. LARRY, et al, **Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk**, Anal. Chim. Acta, 622 (2008) 150.
15. A. ZOTOU, I. SAKLA, P. D. TZANAVARAS, **LC-determination of five paraben preservatives in saliva and toothpaste samples using UV detection and a short monolithic column**, J. Pharm. Biomed. Anal., 53 (2010) 785.
16. I. JIMÉNEZ-DÍAZ, F. VELA-SORIA, A. ZAFRA-GÓMEZ, et al, **A new liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of parabens in human placental tissue samples**, Talanta, 84 (2011) 702.
17. M.BORREMANS, J.VAN LOCO, P. ROOS, L. GOEYENS, **Validation of HPLC Analysis of 2-Phenoxyethanol, 1-Phenoxypropan-2-ol, Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl and Benzyl 4-Hydroxybenzoate (Parabens) in Cosmetic**

Products, with Emphasis on Decision Limit and Detection Capability, Chromatographia, 59 (2004) 47.

18. E. SOTTOFATTORI, M. ANZALDI, A. BALBI, G. TONELLO, **Simultaneous HPLC determination of multiple components in a commercial cosmetic cream,** J. Pharm. and Biomed. Anal., 18 (1998) 213.

19. H. SHEN, H. JIANG, H. MAO, *et al*, **Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods,** J. Sep. Sci., 30 (2007) 48.

20. T. FENG TSAI, M. LEE, **Determination of antioxidants and preservatives in cosmetics by SPME combined with GC-MS,** Chromatographia, 67 (2008) 425.

21. J. PAWLISZYN, **Theory of solid phase microextraction,** J. Chromatogr. Sci., 38 (2000) 270.

22. C. L. ARTHUR, J. PAWLISZYN, **Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers,** Anal. Chem., 62 (1990) 2145.

23. E. BALTUSSEN, P. SANDRA, F. DAVID, C. CRAMERS, **Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles,** J. Microcolumn Sep., 11 (1999) 737.

24. F. DAVID, P. SANDRA, **Stir bar sorptive extraction for trace analysis,** J. Chromatogr. A., 1152 (2007) 54.

25. B. TIENPONT, F. DAVID, K. DESMET, P. SANDRA, **Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS applied to biological fluids,** Anal. Bioanal. Chem., 373 (2002) 46.

26. Gerstel TDS: Disponível em:

<http://www.instrument.com.cn/netshow/C12034.htm>, Acesso em: 6 de fevereiro de 2012.

27. A. PRIETO, O. BASAURI, R. RODIL, *et al*, **Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions** J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 2642.
28. F. M. LANÇAS, M. E. C. QUEIROZ, P. GROSSI, I. R. B. OLIVARES, **Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction**, J. Sep. Sci. 32 (2009) 813.
29. P. SANDRA, B. TIENPONT, J. VERCAMMEN, *et al*, **Stir bar sorptive extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine**. J. Chromatogr. A., 928 (2001) 117.
30. P. POPP, C. BAUER, L. WENNRICH, **Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples**. Anal. Chim. Acta., 436 (2001) 1.
31. C. BLASCO, G. FONT, Y. PICO, **Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography–mass spectrometry**. J. Chromatogr. A., 970 (2002) 201.
32. J.C.R. DEMYTTENAERE, J.I.S. MARTINEZ, R. VERHE, *et al*, **Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction**. J. Chromatogr. A., 985 (2003) 221.
33. J.C.R. DEMYTTENAERE, R.M. MORINA, N.D. KIMPE, P. SANDRA, **Use of headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction for the detection of the volatile metabolites produced by toxigenic *fusarium* species**. J. Chromatogr. A., 1027 (2004) 147.
34. M. KAWAGUCHI, K. INOUE, M. YOSHIMURA, *et al*, **Trace analysis of phenolic xenoestrogens in water samples by stir bar sorptive extraction with**

in situ derivatization and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. J. Chromatogr. A., 1041 (2004) 19.

35. J. DÍEZ, C. DOMINGUEZ, D.A. GUILLÉN, R. VEAS, C.G. BARROSO, **Optimisation of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines.** J. Chromatogr. A., 1025 (2004) 263.

36. P. SERÓDIO, J.F.M. NOGUEIRA, **Development of a stir bar sorptive extraction liquid desorption large volume injection capillary gas chromatographic–mass spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples.** Anal. Bioanal. Chem., 382 (2005) 1141.

37. L. MONTERO, S. CONRADI, H. WEISS, P. POPP, **Determination of phenols in lake and ground water samples by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry.** J. Chromatogr. A., 1071 (2005) 163.

38. M.KAWAGUCHI, Y.ISHII, N. SAKUI, *et al*, **Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for determination of chlorophenols in water and body fluid samples.** Anal. Chim. Acta., 533 (2005) 57.

39. J. MARÍN, A. ZALACAIN, C.D. MIGUEL, G.L. ALONSO, M.R. SALINAS, **Stir bar sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines.** J. Chromatogr. A., 1098 (2005) 1.

40. W. LIU, Y. HU, J. ZHAO, Y. XU, Y. GUAN, **Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction.** J. Chromatogr. A., 1095 (2005) 1.

41. M. KAWAGUCHI, R. ITO, N. SAKUI, N. OKANOUCHI, *et al*, **Dual derivatization stir bar sorptive extraction thermal desorption gas**

chromatography–mass spectrometry for determination of 17-estradiol in water sample. J. Chromatogr. A., 1105 (2006) 140.

42. P. SERÓDIO, J.M.F. NOGUEIRA, **Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water.** Water Research., 40 (2006) 2572.

43. R. RODIL, P. POPP, **Development of pressurized subcritical water extraction combined with stir bar sorptive extraction for the analysis of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in soils.** J. Chromatogr. A., 1124 (2006) 82.

44. W. LIU Y. HU, J. ZHAO, Y. XU, Y. GUAN, Y. **Physically incorporated extraction phase of solid-phase microextraction by sol-gel technology.** J. Chromatogr. A., 1102 (2006) 37.

45. E.D.GUERRERO, R.N. MARIN, R.C. MEJIAS, C.G. BARROSO, **Optimisation of stir bar sorptive extraction applied to the determination of volatile compounds in vinegars.** J. Chromatogr. A., 1104 (2006) 47.

46. P.SERÓDIO, M.S. CABRAL, J.M.F. NOGUEIRA, **Use of experimental design in the optimization of stir bar sorptive extraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers in environmental matrices.** J. Chromatogr. A., 1141 (2007) 259.

47. A.R. CHAVES, S.M. SILVA, R.H. QUEIROZ, F.M. LANÇAS, M.E.C. QUEIROZ, **Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples,** J. Chromatogr. B., 850 (2007) 295.

48. L. P. MELO, M.E.C. QUEIROZ, **Simultaneous analysis of parabens in cosmetic products by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography,** J. Sep. Sci. 33 (2010) 1849.

49. D. R. KLEIN, D. F. FLANNELLY, M. M. SCHULTZ, **Quantitative determination of triclocarban in wastewater effluent by stir bar sorptive extraction and liquid desorption–liquid chromatography–tandem mass spectrometry**, J. Chromatogr. A., 1217 (2010) 1742.
50. M. S. BALBÃO, C. BERTUCCI, M. M. BERGAMASCHI, R. H. C. QUEIROZ, et al, **Rifampicin determination in plasma by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography**, J. Pharm. Biomed. Anal., 51 (2010) 1078.
51. C. YAMAGUCHI, W. YEE LEE, **A cost effective, sensitive, and environmentally friendly sample preparation method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in solid samples**, J. Chromatogr. A., 1217 (2010) 6816.
52. A. GIORDANO, P. RICHTER, I. AHUMADA, **Determination of pesticides in river water using rotating disk sorptive extraction and gas chromatography–mass spectrometry**, Talanta, 85 (2011) 2425.
53. K. T.N. NGUYEN, C. SCAPOLLA, M. DI CARRO, E. MAGI, **Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction**, Talanta, 85 (2011) 2375.
54. P. L.KOLE, J. M., J.C. MCELNAY, **Determination of diclofenac from paediatric urine samples by stir bar sorptive extraction (SBSE)–HPLC–UV technique**, Talanta, 85 (2011) 1948.
55. N. RAMÍREZ, R. M. MARCÉ, F. BORRULL, **Determination of parabens in house dust by pressurised hot water extraction followed by stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry**, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 6226.

56. A. IPARRAGUIRRE, A. PRIETO, P. NAVARRO, **Optimisation of stir bar sorptive extraction and in-tube derivatisation–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of several endocrine disruptor compounds in environmental water samples**, Anal. Bioanal. Chem., 401 (2011) 339.
57. A. M. C. FERREIRA, M. MÖDER, M.E. F. LAESPADA, **Stir bar sorptive extraction of parabens, triclosan and methyl triclosan from soil, sediment and sludge with in situ derivatization and determination by gas chromatography–mass spectrometry**, J. Chromatogr. A., 1218 (2011) 3837.
58. M. RIBANI, C.B.G. BOTTOLI, C.H. COLLINS, *et al*, **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**, Quim. Nova, 27 (2004) 771.
59. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução - RE nº899, maio de 2003.
60. T.ANGELOV, A.VLASENKO, W. TASHKOV, **HPLC Determination of pKa of Parabens and Investigation on their Lipophilicity Parameters**, J. Liquid Chromatogr. & Rel. Technol., 31 (2008) 188.
61. J. B. QUINTANA, R. RODIL, S. MUNIATEGUI-LORENZO, P. LOPEZ-MAHIA, D. PRADA-RODRIGUEZ, **Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction–liquid desorption–gas chromatography–mass spectrometry**, J. Chromatogr. A, 1174 (2007) 27.
62. T. A. M. MSAGATI, T. BARRI, N. LARSSON, J. A. JONSSON, **Analysis and quantification of parabens in cosmetic products by utilizing hollow fibre-supported liquid membrane and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection**, Int. J. Cosmet. Sci., 30 (2008) 297.

CAPÍTULO II

**Desenvolvimento da fase extratora molecularmente
impressa para extração em fase sólida (SPE) de parabenos
em amostras de leite humano e análises por cromatografia
líquida com detecção espectrofotométrica (SPE/LC-UV)**

1.2 Introdução

1.2.1 Leite humano

O leite humano é um alimento nutricional imprescindível para recém-nascidos. Este reúne as características nutricionais ideais, com balanceamento adequado de nutrientes, além de desenvolver inúmeras vantagens imunológicas e psicológicas para os bebês. O leite humano apresenta grande variabilidade na sua composição, que é influenciada por diferentes fatores, dentre os quais se destacam não apenas as condições de nutrição materna, mas também as condições ambientais às quais as nutrizes estão ou foram expostas ao longo da vida. Para lactantes, o leite humano pode ser a principal rota excretora de substâncias lipofílicas persistentes, as quais são armazenadas no organismo humano principalmente no tecido adiposo [63, 64].

Para crianças amamentadas, o leite humano torna-se a principal fonte de exposição a substâncias químicas ambientais. Essas substâncias químicas nocivas podem pôr em risco a saúde das crianças, pois durante este período de lactação, os bebês são mais vulneráveis, uma vez que o sistema imunológico deles não está completamente desenvolvido [64, 65].

Recentemente, compostos químicos considerados poluentes nocivos têm sido determinados e quantificados em amostras de leite humano, tais como pesticidas organoclorados [66], bifenilas policloradas [66], triclosan [14] e filtros UV [14]. No entanto, na literatura encontram-se apenas dois trabalhos voltados para as análises de parabenos em amostras de leite humano [66, 14].

1.2.2 Preparo de amostras de leite humano para análises de parabenos

O preparo de amostras biológicas visando posterior análise cromatográfica de parabenos em leite humano, normalmente, contempla as etapas de extração e/ou pré-concentração dos analitos. As amostras de leite humano apresentam vários interferentes, tais como gorduras, proteínas, vitaminas, sais minerais, entre outros compostos. A LLE [66] e a SPE [14] têm sido as técnicas utilizadas no preparo de amostras de leite humano para posterior análise cromatográfica de parabenos.

Na LLE, a eficiência da extração está relacionada às interações (coeficiente de partição) entre o analito e o solvente orgânico, ao volume de solvente, assim como do número de extrações. Lichtensteiger *et al* [66] analisaram parabenos em leite humano através da LC/MS/MS empregando a LLE. Para tanto, 200 μ L de acetonitrila foram adicionados às amostras de leite (200 μ L), centrifugadas e o sobrenadante foi evaporado em centrífuga de rotação a vácuo. Uma das desvantagens relacionadas à LLE se deve ao fato da formação de emulsão entre as fases imiscíveis, resultando em perda dos parabenos e menor sensibilidade analítica do método.

A SPE é uma técnica de separação líquido - sólido, a qual utiliza dispositivos de extração que contêm a fase sólida. Os dispositivos mais comumente empregados em SPE são os cartuchos e os discos de extração. Após etapa de condicionamento, a amostra contendo os analitos é percolada pelo cartucho de extração. Posteriormente, o analito retido no cartucho é eluído com pequeno volume de solvente com aplicação de vácuo. Se houver contaminantes

que possam interferir na análise, um procedimento de lavagem para eliminação dos interferentes precede a eluição.

Para as análises de parabenos em leite humano, Calafat *et al* [14] utilizaram uma coluna SPE LiChrosphere RP-18 ADS. Anterior ao processo de extração, os autores diluíram as amostras de leite humano (100 µL) com 290 µL de metanol. Após etapa de agitação e centrifugação, o sobrenadante foi acidificado e submetido ao processo de extração SPE para posterior análise por LC/MS/MS.

Os sorventes mais empregados como fase extratora para SPE têm sido aqueles baseados em compostos n-alkil-sílicas. Tais sorventes extraem os analitos principalmente através de interações hidrofóbicas. Em razão da complexidade das amostras de leite e da presença dos parabenos em níveis de traços nestas matrizes, o desenvolvimento de novas fases extratoras SPE é imprescindível para aumentar a seletividade e especificidade em torno dos analitos alvo. Neste contexto, os polímeros de impressão molecular têm se destacado como sorventes seletivos na extração de compostos orgânicos em matrizes complexas.

1.2.3 Polímeros molecularmente impressos

Os polímeros de impressão molecular (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*), são materiais sintéticos com propriedades de reconhecimento molecular baseados em sistemas biomiméticos semelhante aos sistemas específicos enzimas-substratos ou antígeno-anticorpo [67, 68].

Estes materiais sintéticos em relação aos materiais biológicos (enzimas e anticorpos) apresentam as vantagens, tais como estabilidade química, robustez, maior capacidade de adsorção, reprodutibilidade no preparo do polímero, baixo custo e não necessitam de ambientes especiais para armazenagem [69].

Os MIPs têm sido desenvolvidos para aplicações em diferentes áreas, tais como sensores químicos, catalisadores, sistemas de controle de liberação de drogas e como sorventes seletivos para técnicas de separação [67,69]. A primeira aplicação de MIPs na área de química analítica ocorreu em 1972, quando Wulff e Sarhan [70] desenvolveram um polímero com sítios seletivos para separação enantiomérica de racematos de açúcares.

De acordo com a literatura, a maioria dos polímeros de impressão molecular é baseada em polímeros acrílicos ou acrilatos orgânicos, os quais são sintetizados através da polimerização radicalar. A síntese dos MIPs (Figura 18) consiste, basicamente, em três etapas:

- a) Formação de um complexo pré-polímero através de interações covalentes ou não covalentes entre a molécula molde (analito) e o monômero funcional;
- b) Etapa de polimerização em torno do complexo molde-monômero, gerando uma cadeia polimérica tridimensional altamente entrecruzada;
- c) Remoção da molécula molde das cavidades do polímero.

Após a etapa de remoção da molécula molde, cavidades seletivas ao molde são estabelecidas, tanto em tamanho e forma, quanto à presença de grupos funcionais. Estas cavidades constituem os sítios específicos de ligação

que atuam no reconhecimento do molde e/ou compostos com estrutura química semelhante ao analito [67-69].

Figura 18: Esquema geral para síntese dos MIPs [adaptado da referência 71].

O processo de impressão molecular pode ser classificado de acordo com o tipo de interação formada entre a molécula molde e o monômero funcional na mistura de pré-polimerização e de religação do analito ao MIP. Segundo este critério, os procedimentos de impressão molecular são classificados em covalentes ou não covalentes [67-69, 71].

Os métodos clássicos de impressão molecular covalente envolvem reações de condensação reversíveis entre as moléculas do molde e monômero funcional. A alta estabilidade das ligações covalentes formadas resulta em sítios de ligações homogêneos, minimizando as interações não específicas no MIP. A impressão molecular covalente, no entanto, é restrita à moléculas contendo grupos aldeídos,

cetonas, aminas, álcoois ou ácidos carboxílicos [67]. Além disso, após a remoção da molécula molde dos sítios de ligação do polímero, novas ligações podem ser restabelecidas nos mesmos, tornando estes sítios inacessíveis para futuras ligações.

A impressão molecular não covalente tem sido o procedimento mais utilizado [69,72]. A natureza das ligações durante a etapa de complexação e religação do analito ao MIP é essencialmente não covalente (ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, π - π e hidrofóbicas). Esta abordagem é relativamente simples experimentalmente e diferentes monômeros funcionais estão disponíveis no comércio, possibilitando a aplicação da modelagem molecular para uma gama de compostos [69].

1.2.3.1 Reagentes de síntese para desenvolvimento de MIPs

A síntese dos MIPs consiste na adição dos seguintes reagentes ao meio reacional: molécula molde, monômero funcional, reagente reticulante, solvente porogênico e iniciador radicalar. A escolha destes reagentes deve ser feita criteriosamente, pois as características finais do polímero (superfície morfológica, densidade e tamanhos de poros) são altamente dependentes das interações químicas entre estas moléculas.

1.2.3.1.1 Monômeros funcionais

Os monômeros funcionais são compostos orgânicos do tipo acrílicos ou vinílicos, os quais possuem grupos funcionais adequados capaz de interagir com

a molécula molde durante a etapa de polimerização. A formação do complexo molde- monômero funcional obedece ao princípio de Le Chatelier, ou seja, um aumento na concentração do monômero funcional provoca o deslocamento do equilíbrio químico estabelecido no sentido de formação do complexo. Por esta razão, tem sido utilizada uma maior proporção de monômero funcional em relação ao molde, pois além de garantir a formação do complexo, o excesso de monômero funcional também pode proporcionar a interação de todos os grupos funcionais do molde, resultando na formação de sítios de ligação com alta seletividade e especificidade [68, 69].

A Figura 19 ilustra alguns dos principais monômeros funcionais descritos na literatura. Geralmente para analitos que possuam caráter ácido são utilizados monômeros com caráter básico ou vice-versa [68].

Figura 19: Estrutura química dos principais monômeros funcionais empregados no preparo de MIPs (a) ácido metacrílico, (b) ácido *p*-vinilbenzóico, (c) ácido acrílico, (d) acrilamida, (e) 4-vinilpiridina e (f) 2-vinilpiridina.

1.2.3.1.2 Reagente reticulante

O reagente reticulante é adicionado à mistura reacional para gerar uma estrutura polimérica altamente entrecruzada em torno do complexo molde: monômero. Além disso, o reagente reticulante também estabiliza os sítios de impressão molecular e fornece estabilidade mecânica adequada ao polímero. A razão molar entre reticulante e monômero funcional influencia o sucesso da impressão molecular, pois uma maior quantidade de reagente reticulante em relação aos monômeros funcionais resulta em polímeros mais porosos [67, 68, 69].

Os compostos, etileno glicol dimetacrilato e divinilbenzeno, têm sido os reagentes mais empregados para a produção de MIPs [67] (Figura 20). O uso de divinilbenzeno quando empregado em altas concentrações resulta em polímeros quimicamente mais resistente, rígidos e com menor flexibilidade. Já o etileno glicol dimetacrilato combina um grupo éster metacrilato reativo com um espaçador curto proporcionando um elevado número de conformações e rigidez adequada no polímero resultante [67].

Figura 20: Estrutura química dos monômeros (a) divinilbenzeno e (b) etileno glicol dimetacrilato.

1.2.3.1.3 Solvente porogênico

Para que as interações entre a molécula molde, o monômero funcional e o reagente reticulante sejam completamente efetivas e favoráveis à formação de polímeros macroporosos, o solvente porogênico (do grego “formador de poros”) deverá solubilizar os reagentes de sínteses. Por outro lado, o solvente não deve interferir na formação do complexo entre o molde e o monômero funcional, já que esta interferência poderá acarretar em sítios de ligação pouco seletivos [67, 68,69].

A natureza e o volume de solvente porogênico influencia as características morfológicas dos materiais poliméricos. Geralmente os solventes apolares (tolueno e clorofórmio) e polares apróticos (acetonitrila) são os mais empregados [73]. A porosidade dos polímeros impressos origina-se da separação de fases entre o solvente orgânico e as cadeias poliméricas que crescem durante a reação. Os solventes que apresentam baixa solubilidade de fase tendem a separar mais rapidamente e resultam em materiais com poros grandes e baixas áreas superficiais. Por outro lado, os solventes com alta solubilidade de fase separam-se mais lentamente, produzindo polímeros com poros pequenos e maiores áreas superficiais [68, 73].

1.2.3.1.4 Iniciador radicalar

As reações de polimerização radicalar ocorrem inicialmente através da adição de radicais livres às duplas ligações presentes nos monômeros funcionais e reticulantes. Para que estas reações tenham início é necessário a adição de um

iniciador radicalar ao meio reacional, para promover os primeiros radicais livres em solução [68, 74]. Os compostos, 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila e peróxido de benzoíla (Figura 21), têm sido os iniciadores radicalares mais utilizados, pois proporcionam condições suaves de síntese como a temperatura ambiente e pressão atmosférica.

A decomposição dos iniciadores radicalares deve primeiramente ocorrer com o acréscimo de uma energia extra ao sistema, a qual pode ser conseguida através de fotólise, utilizando uma lâmpada de vapor de mercúrio com emissão em 345 nm ou por termólise, aquecendo a mistura reacional a $\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ [68, 74].

Figura 21: Estutura química dos iniciadores radicalares, (a) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila e (b) peróxido de benzoíla.

1.2.3.2 Método de preparo dos MIPs

Os MIPs podem ser preparados por diferentes métodos de polimerização. Os métodos clássicos descritos na literatura são a polimerização em massa, por precipitação, em multi-etapas e suspensão.

1.2.3.2.1 Polimerização em massa

A polimerização em massa tem sido o procedimento descrito na literatura mais empregado para o preparo de MIPs via radicalar [69, 75]. Este método consiste na mistura reacional dos reagentes de síntese em um recipiente adequado o qual posteriormente é lacrado. A reação de polimerização é induzida por radiação UV ou calor na presença de nitrogênio gasoso. O tempo reacional geralmente é de aproximadamente 20 horas sendo geradas partículas de tamanho que podem variar de 20 a 50 μm [68, 69, 75].

No entanto, devido à alta viscosidade da solução pode ocorrer a formação de regiões de superaquecimento durante a polimerização. Portanto, são utilizados de 5 a 25% de volumes de solvente orgânico como auxiliar de polimerização, para reduzir o efeito gel.

1.2.3.2.2 Polimerização por precipitação

A polimerização por precipitação diferencia da polimerização em massa principalmente, no que diz respeito ao volume de solvente utilizado, o qual geralmente é cerca de cinco vezes superior. Durante a polimerização por precipitação as cadeias poliméricas crescem no meio reacional e tornam-se cada vez mais insolúveis na solução, e logo tende a precipitar na mesma. O polímero resultante é obtido na forma de um pó o qual não precisa ser peletizado. Estes sistemas são favorecidos por uma melhor transferência de calor devido à menor viscosidade da solução [68, 69, 76]. A polimerização por precipitação produz partículas mais uniformes ($\leq 10 \mu\text{m}$) e regulares.

1.2.3.2.3 Polimerização em multi-etapas

O processo de polimerização em multi-etapas consiste basicamente no emprego de partículas poliméricas as quais possuam diâmetro bem definido (por exemplo, o uso de partículas de poliestireno com diâmetro de 1 μm) [68, 69]. As primeiras reações envolvem etapas de expansão destas partículas juntamente com o monômero funcional e o solvente. A polimerização em multi-etapas resulta em partículas de tamanho até cinco vezes maiores ao tamanho das partículas iniciais. No entanto, este procedimento tem sido menos utilizado devido se tratar de um processo laborioso que exige várias etapas de síntese para obtenção do MIP [68, 69, 77].

1.2.3.2.4 Polimerização por suspensão

Quanto à polimerização por suspensão, a reação polimérica ocorre dentro das gotas dos monômeros funcionais na presença de um solvente imiscível, geralmente a água. Basicamente são montados dois sistemas, um deles contendo os reagentes da síntese solubilizados em um solvente orgânico apolar e outro contendo água e um agente estabilizante para evitar a coagulação das gotas dos monômeros durante o processo reacional. Após a mistura de ambos os sistemas, a reação prossegue com aquecimento e agitação. A presença de água facilita uma rápida remoção de calor do meio reacional [68, 69, 77].

Este método permite a obtenção de partículas uniformes com tamanhos de 6 a 40 μm . A principal desvantagem da polimerização por suspensão está relacionada com a possibilidade de ocorrer partição dos constituintes reacionais

entre a fase orgânica e a fase aquosa, resultando em polímeros com baixo reconhecimento molecular. Para resolver este problema, alguns autores têm utilizado agentes dispersantes como perfluoro metilciclohexano ao invés de água. No entanto, estes agentes têm elevado custo [68, 69, 77].

1.2.3.3 Limitação da polimerização via radicalar

Embora muito empregada para preparação de polímeros molecularmente impressos, a polimerização radicalar apresenta algumas limitações, tais como a concentração dos iniciadores radicalares deve ser controlada (geralmente 1% do número total de moles de duplas ligações polimerizáveis), a molécula molde não pode apresentar grupos suscetíveis a polimerização (como grupos tióis ou hidroquinona), ser estável nas condições de síntese (como temperaturas elevadas ou radiação UV) e a necessidade do uso de solventes orgânicos tóxicos.

O desenvolvimento da ciência dos materiais trouxe importantes contribuições no avanço da tecnologia. Neste contexto, a tecnologia sol-gel tem recebido a atenção de pesquisadores devido ao seu potencial analítico para a preparação de novos materiais poliméricos.

1.2.3.4 Processo sol-gel

O processo sol-gel envolve a formação de uma rede polimérica inorgânica através de reações de gelificação. As reações sol-gel resultam na transição de um líquido para um sólido, sendo que os precursores orgânicos e inorgânicos são geralmente alcóxidos de silício ou outros metais. Durante o processo, as reações

de gelificação levam à formação de um estado sol, que se caracteriza por apresentar oligômeros que formarão cadeias de dimensões coloidais e partículas primárias dispersas. O desenvolvimento do processo conduz ao estado gel que apresenta conectividade entre as unidades de dimensões coloidais, formando uma rede tridimensional [78-80].

A reação de polimerização sol-gel consiste em duas etapas básicas: reações de hidrólise e condensação de precursores alcóxidos em meio ácido ou básico. Geralmente, as reações de hidrólise e condensação ocorrem simultaneamente, assim que a hidrólise é iniciada. A hidrólise leva a formação de grupos silanóis ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$), enquanto que as reações de condensação levam a formação de ligações siloxano ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$) [78-81] (Figura 22).

A cinética das reações de hidrólise e condensação é fortemente influenciada pelo tamanho do grupo alcóxido, resultante de impedimentos estéricos. Os grupos alcóxidos volumosos e a maior quantidade de ramificações acarretam em menor taxa de hidrólise [80, 81]. Dentre os alcóxidos mais comumente empregados destacam-se o metóxi (OCH_3), o etóxi (OCH_2CH_3) e o n-própoxi ($\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$).

As propriedades físicas (área de superfície, distribuição e média de tamanho de poros) dos materiais resultantes das reações de hidrólise e condensação do processo sol-gel são influenciadas pelos parâmetros: razão água/silano, natureza e concentração do catalisador e os precursores alcóxidos [79,81].

Figura 22: Reações de hidrólise e condensação durante o processo sol-gel [81].

As reações sol-gel têm início quando o precursor é misturado com água, na presença de um catalisador ácido ou básico. As reações de hidrólise e condensação ocorrem via substituição nucleofílica bimolecular no átomo de silício. A gelificação em meio ácido resulta em polímeros com baixo volume de poros e diâmetros menores que 2 nm, denominados de microporos. Quando a gelificação ocorre em meio básico o gel tende a crescer de maneira mais uniforme resultando em partículas primárias esféricas. A interconexão das partículas primárias produz géis coloidais que, após a secagem, resultará em um material com poros mais volumosos e diâmetros das partículas entre 2 e 50 nm, denominadas de mesoporos [79-81].

O precursor sol-gel deve ser criteriosamente escolhido para fornecer uma porosidade adequada facilitando a difusão do(s) analito(s) através dos poros do polímero. Os precursores mais utilizados são os trialcoxissilanos e

tetraalcoxisilanos. Os trialcoxisilanos são utilizados como modificadores com a finalidade de melhorar as propriedades específicas do material, como a hidrofobicidade e a reatividade. Os tetraortoalcoxisilanos são representados pela fórmula geral Si(OR)_4 , destacando-se os compostos formados a partir de metanol (tetrametilortosilicato, TMOS) e etanol (tetraetilortosilicato, TEOS). Ambos os precursores produzem materiais com cadeias tridimensionais altamente entrecruzadas [78, 79,81].

1.2.3.4.1 Materiais híbridos orgânico-inorgânico impressos

Os materiais híbridos orgânico-inorgânico são formados pela combinação dos componentes orgânicos e inorgânicos, originando materiais com propriedades diferentes dos constituintes de partida. Os materiais híbridos baseados em sílica organicamente modificada, também conhecidos como ormosils, combinam as propriedades dos componentes inorgânicos, tais como boa estabilidade mecânica, térmica e química com a tenacidade e flexibilidade dos materiais orgânicos [78-79, 81-82]. Os ormosils impressos pelo método sol-gel apresentam-se como uma alternativa viável aos polímeros molecularmente impressos obtidos pelo processo radicalar.

A incorporação da molécula molde à rede polimérica, para gerar os sítios de impressão molecular, pode ser realizada através de interações não covalentes ou covalentes com os grupos orgânicos do monômero funcional, antes das reações de hidrólise e condensação. No processo não covalente (Figura 23), a molécula molde pode ser adicionada diretamente na solução sol-gel. Durante o

processo de secagem a pressão atmosférica, o solvente é removido, produzindo um xerogel (gel seco) [78, 79,81].

Figura 23: Processo de impressão molecular sol-gel não covalente [78].

Os materiais ormosils impressos podem também ser sintetizados através da copolimerização do precursor alcóxido com monômeros funcionais do tipo acrílicos ou vinílicos na presença da molécula molde [78] (Figura 24).

Figura 24: Impressão molecular sol-gel não covalente híbrido orgânico-inorgânico [78].

Já o método covalente envolve a formação de ligações covalentes reversíveis entre o precursor e o molde (Figura 25). Após o processo sol-gel, o molde é clivado quimicamente e removido, deixando os sítios de ligação impressos vazios para religação de moléculas com tamanhos e funcionalidade semelhante a ele [78].

Figura 25: Processo de impressão molecular sol-gel através de ligações covalentes [78].

1.2.3.4.2 Aplicações de materiais baseados em sílica molecularmente impressa

A Tabela 7 ilustra os trabalhos descritos na literatura empregando os materiais baseados em sílica molecularmente impressa como sorventes seletivos nas análises de compostos orgânicos em diferentes matrizes.

Tabela 7: Aplicações dos materiais impressos de sílica como sorvente seletivos.

Analito	Amostra	Reagentes sililantes	Técnica de extração	Sistema de detecção e LQ	Ref.
Compostos nitroaromáticos	Óleo de motor e sangue pós-mortem	¹ PTMS e ² TEOS	SPE	LC-DAD -	EDMISTON <i>et al</i> (2002) - 83
Cafeína	Água	³ MAAM, ⁴ VTMOS e TEOS	SPE	LC-DAD -	Der Lee <i>et al</i> (2003) - 84
Lisinopril dihidratado	Formulações farmacêuticas	APTES, PTMS e TEOS	SPE	LC-DAD -	MCLOUGHLIN <i>et al</i> (2004) - 85
Pentaclorofenol	Água	APTES e TEOS	SPE	LC-UV 6,0 ng. L ⁻¹	YAN <i>et al</i> (2005) - 86
Metilxantinas	Água, plasma e urina humana	APTMS e TEOS	SPE	LC-UV 85, 44 e 53 µg. L ⁻¹	AUGUSTO <i>et al</i> (2006) - 87
Ractopamina	Tecidos de porcos	⁵ APTES e TEOS	SPE	LC-FD 4,6 ng. L ⁻¹	HE <i>et al</i> (2009) - 88
Compostos nitroaromáticos	Materiais explosivos	PTMS e TEOS	SPE	LC-UV -	PICHONA <i>et al</i> (2010) - 89
Metil-3-quinoxalina-2-carboxílico	Tecidos de porcos	⁶ APTMS e TEOS	SPE	LC-UV 0,02 e 0,04 ng. g ⁻¹	WANG <i>et al</i> (2011) - 90

1: PTMS = feniltrimetóxisilano, 2: TEOS = tetraetilortosilicato, 3: MAAM = metacrilamida, 4: VTMOS = viniltrimetóxisilano, 5: APTES: 3-aminopropiltriethóxisilano, 6: APTMS = 3-aminopropiltrimetóxisilano.

2. Objetivo Geral

Desenvolvimento da fase extratora molecularmente impressa para SPE de parabenos em amostras de leite humano e análises por cromatografia líquida com detecção espectrofotométrica (SPE/LC-UV).

2.1 Objetivos específicos

- Síntese do MIP através do processo sol-gel;
- Caracterização estrutural e morfológica dos polímeros obtidos;
- Otimização do processo SPE/LC-UV miniaturizado;
- Validação analítica do método desenvolvido (SPE/LC-UV) para as análises de parabenos em amostras de leite humano;
- Análises de amostras de leite coletadas de mulheres lactantes.

3. Materiais e métodos

3.1 Padrões analíticos e reagentes

Os padrões primários, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, benzilparabeno, 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) e tetraetilortossilicato (TEOS) foram adquiridos da (Sigma Aldrich, São Paulo-SP, Brasil).

As soluções padrão diluídas dos parabenos foram preparadas em metanol, a partir da diluição de suas respectivas soluções estoques de $1,0 \text{ mg. mL}^{-1}$. Estas soluções foram estáveis por 45 dias, quando armazenadas a -20°C .

O metanol e a acetonitrila, ambos de grau cromatográfico foram adquiridos da (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA); ácido clorídrico, fosfato de potássico monobásico e dibásico, borato de sódio, acetato de sódio e ácido acético da (Mallinckrodt Baker, Xalostoc, México); hidróxido de amônio (NH_4OH) da (J.T. Baker, São Paulo-SP, Brasil). A água ultrapura utilizada no preparo das soluções tampão foi purificada pelo sistema Milli-Q da (Millipore, São Paulo-SP, Brasil).

3.2 Otimização das condições cromatográficas LC-UV

As análises cromatográficas dos parabenos foram realizadas por cromatografia líquida em fase reversa. Após a otimização da composição da fase móvel, a separação cromatográficas dos parabenos foram realizadas em cromatógrafo a líquido da *Varian*, modelo Prostar 230, equipado com detector

Ultravioleta (*Varian*, modelo Prostar 310), em comprimento de onda selecionado de 250 nm.

Os parabenos foram separados em coluna C18 Lichrospher®60 RP-Select B (5 µm, 250 x 4 mm) (Merk - Darmstadt, Alemanha), e pré-coluna C18 RP-Select B (Merk - Darmstadt, Alemanha), LiChroCART®4-4. A fase móvel selecionada para análise dos parabenos foi: água: metanol, 38:62 (v/v), com vazão de 1 mL. min⁻¹, no modo isocrático. O volume de amostra injetado foi de 20 µL.

3.3 Síntese do polímero molecularmente impresso

O polímero molecularmente impresso foi sintetizado pelo processo sol-gel [87]. A síntese do MIP foi realizada através da mistura reacional de 100 mg de APTMS, 1 mL de solução aquosa de benzilparabeno (molde) (a quantidade de benzilparabeno foi otimizada na síntese do MIP) e 500 mg de TEOS. 200 µL de NH₄OH concentrado foram utilizados como catalisador da reação. A mistura foi aquecida sob agitação constante a 40 °C até gelificação e formação de um sólido branco (monolito).

O polímero obtido foi deixado à temperatura ambiente por 24h para que ocorresse o envelhecimento desse material e posteriormente, estes foram secos em estufa a 120 °C “*overnight*”. Após a secagem em estufa, o monolito (MIP) foi triturado em almofariz com a ajuda de um pistilo e peneirado em peneira granulométrica (dp = 50 e 100 µm) para seleção do tamanho de partículas.

A remoção do molde da cavidade do MIP foi realizada através da lavagem do MIP utilizando uma mistura de solventes orgânicos em diferentes proporções na seguinte sequência: metanol/isopropanol (10/5 (v/v)), metanol/isopropanol

(10/1 (v/v)) e 100 % metanol. O procedimento de lavagem (aproximadamente 48h) foi realizado com agitação em vortex, cada etapa foi realizada em triplicata. Na última etapa de lavagem, alíquotas de metanol foram retiradas da solução, evaporadas sob fluxo de nitrogênio, ressuspensas com fase móvel e analisadas por LC-UV para monitorar a remoção das moléculas de benzilparabeno das cavidades do MIP. Após a remoção do molde, o material polimérico foi novamente seco em estufa por 12h e armazenado em dessecador.

O polímero não impresso (controle) foi preparado segundo a mesma rota sintética utilizada para a obtenção do MIP, porém sem adição de benzilparabeno (molde).

3.4 Caracterização estrutural e morfológica dos polímeros sintetizados

A superfície do material polimérico sintetizado foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As análises foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss EVO50) do Departamento de Química, FFCLRP da Universidade de São Paulo. As medidas foram feitas sob tensão de 20.00KV, magnitude 80.00 KX e resolução nominal de 2 μm .

As análises de Infravermelho foram realizadas em um espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (ABB Bomem série MB100) do Departamento de Química, FFCLRP da Universidade de São Paulo. Os espectros foram analisados em pastilhas de KBr numa faixa de 4000 a 400 cm^{-1} e com 200 varreduras cumulativas.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em um espectrômetro AC 300P Bruker. Os sinais de carbono e silício foram obtidos utilizando a técnica de polarização cruzada com rotação do ângulo mágico (CP/MAS). Os parâmetros usados para as amostras foram: 75,47 e 59,63 MHz de frequência para ^{29}Si e ^{13}C , respectivamente; tempo de aquisição variando de 0,11 a 0,17 s, intervalo entre pulsos de 2s para ^{13}C e 4s para ^{29}Si , com tempo de contato entre 1 a 2 ms e varredura entre 12500 a 26000 para ^{13}C e 1500 a 3500 para ^{29}Si . Estas medidas foram realizadas no Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista-SP.

3.5 Amostras de leite

A validação analítica do método SPE/LC-UV foi realizada com amostras de leite NAN comercial do tipo 1 como branco de referência. Estas amostras de leite contêm constituição e composição química próxima ao leite humano e são livres de parabenos. As amostras de leite branco de referência (100 μL) foram enriquecidas com soluções padrão de parabenos em diferentes concentrações e submetidas ao processo de extração SPE. A data de validade das amostras de leite NAN utilizadas como branco de referência foi considerada nas análises cromatográficas.

As amostras de leite humano utilizadas para a aplicação do método desenvolvido foram obtidas de mulheres em fase de amamentação, sendo que a coleta destas amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa da EERP/USP na data 01/09/2011 (em anexo, item 6.1). Estas amostras foram

cedidas pelas Profa (s): Dra. Juliana C. S. Monteiro e Dra. Ana Márcia S. Nakano da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.

A coleta do leite humano foi realizada por meio da ordenha manual. Durante a coleta foi efetuada massagem na mama, seguida da expressão da região areolar para extração do leite; os primeiros jatos foram desprezados, e 5 ml de leite foram coletados em frascos de vidro com tampa, colocados abaixo da aréola mamária. As voluntárias responderam um questionário (anexo, item 6.2) anterior a coleta das amostras de leite.

3.6 Precipitação das proteínas do leite

As amostras de leite branco de referência e leite humano (100 μ L) foram submetidas a uma pré-etapa de precipitação de proteínas, anterior do processo de extração SPE, visando diminuir a viscosidade da amostra e adsorção irreversível das proteínas aos poros do MIP. Para tanto, diferentes solventes foram avaliados: metanol, acetonitrila e sulfato de amônio (pH 7,0) na proporção solvente/amostra (2:1 v/v), respectivamente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o solvente orgânico foi evaporado sob fluxo de N₂. O extrato seco foi ressuspensionado em 200 μ L de solução tampão.

3.7 Procedimento SPE e otimização das variáveis

Neste trabalho, filtros da marca Sterile CA Syringe Filter RC (celulose regenerada) com poros de 0,20 μ m e 4 mm de diâmetro foram utilizados como

dispositivos para cartuchos de extração SPE. Os cartuchos SPE foram empacotados com 10 mg dos polímeros sintetizados e recobertos com pequena quantidade de lã de vidro para conter a fase extratora dentro dos filtros.

As amostras de leite (100 μ L) foram enriquecidas com os padrões analíticos dos parabenos e submetidas ao processo de precipitação de proteínas com 200 μ L de acetonitrila. Após a evaporação do solvente orgânico, os extratos secos foram ressuspensos com 200 μ L de solução tampão (item 3.6). O procedimento de extração SPE miniaturizado dos parabenos foi realizado com auxílio de uma câmara de vácuo com capacidade para 12 cartuchos (Altech, EUA) acoplada a uma bomba de vácuo Fanem (Brasil). Inicialmente, os cartuchos SPE contendo as fases extratoras MIP e NIP foram condicionados pela percolação de 200 μ L de metanol e 200 μ L de água ultrapura. Após condicionamento dos cartuchos SPE, 200 μ L de solução tamponada contendo os parabenos foram percolados através dos cartuchos. A influência do pH da amostra (4, 5, 6, 7, e 8) foi avaliada ajustando o pH com soluções tampão fosfato (pK_a = 2,2 e 7,2), acetato (pK_a = 4,7) e borato (pK_a = 9,2). A seguir, a fase extratora foi seca a vácuo (20 mmHg) durante 5 min.

Para remoção de possíveis compostos interferentes, uma etapa de limpeza dos cartuchos SPE foi inserida. Para isto, foram avaliados diferentes proporções dos solventes, água:metanol (50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 (v/v) e 100% água). Após a etapa de limpeza dos cartuchos, os parabenos foram dessorvidos do MIP, através da eluição com solvente. Os solventes avaliados para dessorção dos parabenos foram: metanol, acetonitrila, fase móvel (água: metanol, 38/62 v/v, respectivamente), hexano e isopropanol. O volume de solvente orgânico utilizado no processo de dessorção também foi avaliado (100, 200, 300, 400 e 500 μ L). A

vazão média dos solventes nos cartuchos foi de aproximadamente $500 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ (10 mmHg).

Os extratos obtidos após dessorção dos parabenos dos cartuchos SPE foram evaporados sob fluxo de N_2 até completa evaporação do solvente orgânico e ressuspensos em $50 \mu\text{L}$ de fase móvel para pré-concentração dos analitos. $20 \mu\text{L}$ desta solução foram injetados no cromatógrafo a líquido.

4. Resultados e discussão

4.1 Análise cromatográfica LC-UV

4.1.1 Otimização das condições cromatográficas LC-UV

A fase móvel, água:metanol 38/62 (v/v), foi selecionada para separação cromatográfica dos parabenos. Nesta condição, os parabenos apresentaram adequada resolução e tempo de análise de 7 minutos (Figura 26).

Figura 26: Cromatograma referente à análise LC-UV da solução padrão de parabenos (100 ng. mL^{-1}): metilparabeno (1), etilparabeno (2) e propilparabeno (3), fase móvel: água: metanol, 38/62 (v/v).

A identificação dos parabenos nas amostras de leite foi realizada pela comparação dos tempos de retenção destes compostos, com os das soluções padrão, injetadas individualmente nas mesmas condições cromatográficas. Os espectros (absorbância versus comprimento de onda) na região do ultravioleta (UV) também foram considerados.

O comprimento de onda selecionado ($\lambda = 250 \text{ nm}$) corresponde à região de absorção UV máxima para os compostos analisados. Outros compostos presentes nas amostras de leite também apresentam absorção (UV) no λ selecionado. No entanto, no tempo de retenção dos analitos não foram observados picos interferentes da matriz. A quantificação dos parabenos nas amostras de leite foi realizada através da curva analítica.

4.2 Síntese do polímero molecularmente impresso

A síntese do MIP consistiu nas reações de hidrólise e condensação dos precursores alcóxidos (APTMS e TEOS) em meio básico, na presença de benzilparabeno (molde). O NH_4OH foi utilizado como catalisador da reação sol-gel. Sob condições básicas, a condensação dos grupos silanóis ocorre preferencialmente entre oligômeros altamente ramificados, os quais conduzem a formação de géis particulados que, após secagem, resultam em materiais poliméricos com alta porosidade [80,81]. A adição de TEOS resulta em maior entrecruzamento da rede.

Neste trabalho, a escolha de APTMS se deu em razão de suas propriedades específicas, tais como hidrofobicidade, reatividade e flexibilidade. Já o benzilparabeno foi escolhido como molde, pois, dentre os parabenos avaliados, o benzilparabeno apresenta tamanho adequado e deverá gerar cavidades com tamanho, forma e funcionalidade adequada para extração seletiva de análogos estruturais. Além disso, benzilparabeno não tem sido utilizado como conservante em produtos cosméticos, e não deverá ser encontrada em amostras de leite humano.

Na Figura 27 está ilustrado o esquema geral para a formação do MIP, conforme o procedimento descrito.

Figura 27: Esquema da síntese do MIP, (a) formação do complexo molde: monômero funcional, (b) polimerização sol-gel e (c) remoção do molde das cavidades do MIP. Adaptado da referência [87].

A remoção do benzilparabeno (molde) das cavidades do MIP foi realizada através da lavagem do polímero com a mistura dos solventes orgânicos, metanol e isopropanol, em diferentes proporções (item 3.3). No entanto, mesmo após processo exaustivo de lavagem (~ 48h), ainda se observou a sangria do molde, durante as análises SPE/LC-UV. O benzilparabeno apresentou tempo de retenção similar ao composto butilparabeno, consequentemente, as análises de butilparabeno ficaram comprometidas, não sendo possível quantificá-lo nas amostras de leite humano.

A quantidade de benzilparabeno (1, 5, 10, 15 e 20 mg) empregada na síntese dos MIP foi avaliada, mantendo constante a proporção dos reagentes, APTMS e TEOS (item 3.3). Após a obtenção dos materiais impressos, 10 mg do polímero sintetizado foi empacotada nos cartuchos SPE, os quais foram condicionados com 200 µL de metanol, seguidos de 200µL de água ultrapura, antes do procedimento de extração.

De acordo com o gráfico da Figura 28, observou-se que diminuindo a quantidade de benzilparabeno na síntese do MIP obteve-se maior eficiência de extração dos parabenos alvos, consequentemente, a síntese do MIP foi realizada utilizando a relação molde: monômero funcional na proporção de 1:10, sendo que o excesso de APTMS tem como função gerar um maior número de sítios de ligação.

Segundo Spivak *et al* [91], as interações formadas entre a molécula molde e o monômero funcional são responsáveis pela formação de um complexo pré-polímero, que ocorre durante a reação de polimerização sol-gel. Por se tratar de um equilíbrio, o excesso de monômero funcional irá deslocar o equilíbrio no

sentido de formação do complexo, e consequentemente resultar em sítios de ligação com alta seletividade e especificidade.

Figura 28: Otimização da quantidade de benzilparabeno utilizada na síntese do MIP.

A repetibilidade no preparo do MIP foi avaliada realizando o procedimento de síntese do polímero em triplicata. Os MIPs sintetizados foram empacotados em diferentes cartuchos (10mg), os quais foram divididos em três lotes (A, B e C), e submetidos ao processo de extração SPE ($n = 3$). As análises SPE/LC-UV foram realizadas com amostras de leite branco de referência enriquecidas com os padrões analíticos dos parabenos (50 ng. mL^{-1}). O valor médio das áreas dos picos obtidos das análises SPE/LC-UV foram plotadas em gráficos (Figura 29) com seus respectivos desvios padrão ($n = 3$).

Figura 29: Avaliação da repetibilidade da síntese do MIP.

O CV utilizando diferentes lotes foi de 11%. O rendimento da síntese do MIP, nas condições otimizadas, foi de aproximadamente 200 mg.

4.3 Caracterização estrutural e morfológica dos materiais MIP e NIP

A caracterização estrutural dos polímeros impresso e controle foi realizada por medidas de espectroscopia de absorção vibracional na região do Infravermelho e espectroscopia de RMN de ^{29}Si e ^{13}C . Já a morfologia da superfície dos polímeros foi avaliada por imagens de MEV.

4.3.1 Espectroscopia de absorção vibraconal na região do Infravermelho

A análise dos espectros de Infravermelho é uma importante técnica de caracterização, pois fornece uma avaliação qualitativa da presença de grupos funcionais inerentes aos MIPs. As medidas na região do infravermelho foram realizadas na região de 4000 a 400 cm^{-1} (Figura 30).

Figura 30: Espectro de absorção vibracional na região do Infravermelho de 4000 a 400 cm^{-1} , (a) MIP e (a) NIP.

Os espectros de absorção de Infravermelho dos materiais MIP e NIP (Figura 30) apresentaram similaridade estrutural. Baseados nas análises de Infravermelho são possíveis a atribuição das seguintes bandas nos espectros: as bandas em 3424 e 3408 cm^{-1} são referentes às vibrações N-H de estiramento simétrico e assimétrico de amina primária.

As bandas de absorção para as ligações C-H encontram-se em 2938 cm^{-1} (referentes ao estiramento assimétrico dos grupos CH_2) e aquelas na região de 790 cm^{-1} são atribuídas à deformação angular simétrica fora do plano do grupamento N-H da amina. Sendo esta banda bastante sensível a formação de ligações de hidrogênio. Quanto à banda presente em 1653 cm^{-1} é típica de ligação N-H gerada por grupos funcionais (amino) presentes em ambos os polímeros.

A confirmação da presença de átomos de silício ligados à cadeia polimérica pode ser atribuída às bandas na região de 970 cm^{-1} correspondentes à deformação de grupos silanóis livres (Si-OH). Também pode ser observada a presença de bandas na região de 1090 cm^{-1} , referente ao estiramento de ligação de grupos silicatos (Si-O). As bandas características de ligações siloxano encontram-se na região de 460 cm^{-1} .

4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de silício ^{29}Si e ^{13}C no estado sólido

Por se tratarem de materiais insolúveis, as informações a respeito das ligações dos átomos de carbono e silício presentes nos materiais MIP e NIP foram obtidas através de ressonância magnética nuclear do estado sólido. Neste caso,

foi empregada a técnica de polarização cruzada com ângulo mágico de rotação (CP-MAS).

A técnica de RMN-MAS de ^{29}Si é uma ferramenta útil quando se deseja caracterizar a estrutura de materiais a base de sílica. Por meio dessa técnica pode-se verificar como os átomos de silício encontram-se ligados, avaliar efeitos da presença de outros átomos combinados e alterações estruturais. Os espectros de RMN de ^{29}Si obtidos para os polímeros, MIP e NIP, estão representados na Figura 31.

Nos espectros de RMN de ^{29}Si (Figura 31), observou-se um sinal em -112,7 ppm (1). Este sinal foi atribuído ao átomo de silício ligado a outros quatro grupos siloxanos, $\text{Si}^*(\text{OSi}\equiv)_4$. O pico detectado em -100,2 ppm (2) indica a presença de silício ligado a um grupo hidroxila, o qual caracteriza um silanol livre, e a outros três grupos siloxanos $\text{Si}^*(\text{OH})(\text{OSi}\equiv)_3$. O pico em -57,2 ppm (4) está associado às ligações covalentes do átomo de silício com o agente sililante APTMS, formando ligações do tipo siloxano com a estrutura da sílica. A presença de um pico localizado em -65,45 ppm (3) é indicativo de ligações do tipo $\text{RSi}(\text{OSi})_3$.

Figura 31: Espectro de RMN de ^{29}Si : (a) MIP e (b) NIP.

Quatro picos de ressonância relativos aos grupos funcionais do APTMS foram identificados nos espectros de ^{13}C dos materiais MIP e NIP (Figura 32). O pico referente ao deslocamento químico em 57,4 ppm (5) é indicativo de grupos metóxi remanescentes ($-\text{OCH}_3$). Os picos em 9,5 ppm (1), 22,3 ppm (3) e

43,0 ppm (4) são atribuídos aos deslocamentos químicos correspondem aos carbonos ($-\text{CH}_2-$) da cadeia alifática do APTMS. A presença de um pico em 16,5 ppm (2) corresponde a grupos ($-\text{CH}_3$) ligados covalentemente aos átomos de silício (Figura 32).

Figura 32: Espectro de RMN de ^{13}C : (a) MIP e (b) NIP.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

As morfologias das superfícies dos polímeros MIP e NIP foram avaliadas por MEV (Figura 33).

(a)

(b)

Figura 33: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura: (a) MIP e (b) NIP (aumento de 80000 vezes).

Como observado na Figura 33, a superfície morfológica de ambos os polímero, MIP e NIP, apresentou aglomerados de partículas irregulares com tamanhos não uniformes. Estas irregularidades foram causadas pelo processo de trituração dos materiais poliméricos, já que após a síntese, estes materiais foram obtidos no formato de um monolito.

4.4 Otimização do processo de extração SPE miniaturizado

A otimização do processo SPE foi realizada visando obter extratos mais puros e reduzir o número de interações não específicas no material impresso. A influência dos parâmetros, pH da amostra, condições de lavagem dos cartuchos, natureza e volume de solvente de dessorção foram avaliadas no processo SPE.

Os cartuchos SPE foram primeiramente empacotados com 10 mg dos polímeros MIP e NIP. Em seguida foram condicionados com 200 μ L de metanol e 200 μ L de água. Após este procedimento, os cartuchos foram secos sob vácuo de 10mmHg durante 5 minutos.

O pH da amostra foi primeiramente avaliado no processo de extração dos parabenos. Diferentes valores de pH foram avaliados (pH: 4, 5, 6, 7 e 8) com as soluções tampão de fosfato, acetato e borato. De acordo com a Figura 34, observou-se maior eficiência de extração dos parabenos em valores de pH 5. Segundo os valores de pka dos parabenos ($pka = 8,0$), em valores de pH menor ou igual a 6, deverão predominar as ligações de hidrogênio entre grupos hidroxila nas moléculas de parabenos e grupos amino presentes no APTMS. No entanto, em valores de $pH > 6$, interações eletrostáticas de grupos negativamente carregados nos parabenos são esperadas com os grupos aminos protonados

(APTMS ($pK_a = 10,8$)). Considerando que as interações do tipo eletrostáticas são mais difíceis de serem rompidas, em relação às ligações de hidrogênio, optou-se por trabalhar com soluções tamponadas em valores de pH 5.

Figura 34: Avaliação do pH da amostra no processo de extração SPE: Condição SPE: amostra de leite enriquecida com os parabenos (200 ng. mL^{-1}) e ressuspendida em $200 \text{ }\mu\text{L}$ de solução tampão após a pré-etapa de precipitação de proteínas. Lavagem do cartucho com $200 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura e dessorção dos parabenos com $300 \text{ }\mu\text{L}$ de metanol.

A contribuição de ambos os tipos interações química (ligações hidrogênio e eletrostáticas), citadas anteriormente, foram responsáveis pelas interações não covalentes entre os parabenos e grupos amino, relativo ao APTMS, localizados nas cavidades do polímero impresso.

Após a percolação dos analitos pelos cartuchos SPE, um processo de lavagem dos cartuchos foi inserido. Para tanto, diferentes proporções de

metanol/água foram avaliadas. No entanto, o processo de lavagem empregando metanol acarretou em grande perda dos parabenos, resultando em menor sensibilidade analítica do método. Consequentemente, para as demais extrações, o processo de lavagem dos cartuchos contendo a fase extratora MIP foi realizado com 200 μ L de água ultrapura, volumes superiores a este não influenciou na limpeza dos cartuchos.

A dessorção dos parabenos dos sítios de ligação do MIP deverá ser influenciada pelo tipo de solvente utilizado. Os solventes avaliados no processo de dessorção SPE foram: metanol, acetonitrila, fase móvel (água:metanol, 38/62 v/v, respectivamente), hexano e isopropanol (Figura 35).

O uso de hexano mostrou-se inadequado como solvente de dessorção, pois resultou na obstrução dos poros do polímero, o que pode ser atribuído ao seu tamanho molecular. Com isopropanol, o tempo de dessorção foi muito longo, tornado inviável o processo.

De acordo com a Figura 35, acetonitrila foi o solvente que apresentou maior eficiência para dessorção dos parabenos dos sítios de ligação do MIP. Os parabenos são compostos de baixa polaridade e deverão apresentar maior solubilidade em acetonitrila (solvente polar aprótico) em relação ao metanol (solvente polar prótico). A acetonitrila também apresentou rápida difusão pelos poros do MIP contido nos cartuchos SPE, resultando em menor tempo de dessorção. Já a dessorção dos parabenos utilizando a fase móvel acarretou em diminuição do sinal analítico, devido à menor solubilidade dos parabenos em água.

Para a dessorção dos parabenos do NIP (Figura 35), não se observou diferença significativa na quantidade de analito extraído utilizando diferentes

solventes. O material polimérico não impresso extraiu os parabenos por interações não específicas, em concentrações muito inferiores às obtidas com o MIP.

O volume de solvente orgânico utilizado no processo de dessorção foi também avaliado (Figura 36). Segundo o gráfico obtido na Figura 36, etil- e propil parabenos foram completamente dessorvidos com a percolação de 200 μ L de acetonitrila, já o metilparabeno com 300 μ L.

Figura 35: Avaliação do solvente de dessorção no processo SPE. Condição SPE: amostra de leite enriquecida com os parabenos (200 ng. mL⁻¹) e ressuspensa em 200 μ L de solução tampão pH 5 após a pré-eta de precipitação de proteínas. Lavagem do cartucho com 200 μ L de água ultrapura e dessorção dos parabenos com 300 μ L de solvente. Compostos: 1= metilparabeno, 2= etilparabeno e 3= propilparabeno.

Figura 36: Avaliação do volume de solvente de dessorção (acetonitrila) no processo SPE. Condição SPE: amostra de leite enriquecida com os parabenos (200 ng. mL^{-1}) e ressuspensa em $200 \text{ }\mu\text{L}$ de solução tampão pH 5 após a pré- etapa de precipitação de proteínas. Lavagem do cartucho com $200 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura e dessorção dos parabenos com acetonitrila.

Segundo os resultados obtidos, as melhores condições para SPE, dentre as avaliadas foram: condicionamento dos cartuchos com $200 \text{ }\mu\text{L}$ de metanol e $200 \text{ }\mu\text{L}$ de água, eluição dos parabenos em $200 \text{ }\mu\text{L}$ de solução tampão fosfato pH 5, processo de lavagem com $200 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura e dessorção com $300 \text{ }\mu\text{L}$ de acetonitrila.

4.5 Desempenho analítico do MIP

O polímero não impresso extraiu os analitos através de interações não específicas. No entanto, o polímero impresso contém cavidades seletivas para extração de compostos estruturalmente similar ao benzilparabeno (molde), resultando em interações específicas com os parabenos alvos. De acordo com os cromatogramas (Figura 37), observou-se que o cromatograma do MIP, em razão das interações específicas, apresentou menor número de picos interferentes e picos cromatográficos mais intensos e definidos.

Para avaliar o desempenho do MIP, calculou-se o fator de impressão (IF), o qual é expresso pela razão entre as áreas dos picos cromatográficos dos analitos extraídos pelo MIP em relação ao NIP (na mesma concentração) [76,81]. Quanto maior for a quantidade de analito extraída utilizando o MIP, melhor será o desempenho seletivo do material impresso. O IF obtido para o analito deve ser superior a 1 [81]. Neste trabalho, o fator de impressão obtido para os parabenos foram: metilparabeno (14), etilparabeno (12) e propilparabeno (10). Na literatura, os valores de IF encontrados para materiais impressos baseados em sílica tem sido: 20, 12, 10, 12 e 16, para metilxantinas [87], olaquinox [90], ciadox [90], mequinox [90] e carbadox [90], respectivamente.

Figura 37: Cromatogramas das análises SPE/LC-UV obtidos após extração de parabenos em amostras de leite branco de referência enriquecidas ($50,0 \text{ ng. mL}^{-1}$), (1) metilparabeno, (2) etilparabeno e (3) propilparabeno.

4.6 Validação analítica do método SPE/LC-UV

Para validação analítica do método SPE/LC-UV miniaturizado as amostras de leite (branco de referência) foram enriquecidas com soluções padrão de parabenos em diferentes concentrações. Segundo a ANVISA [59], os parâmetros de validação avaliados foram à seletividade, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão analítica.

4.6.1 Seletividade analítica

Baseado na referência [14, 66], os parabenos foram estáveis nas amostras de leite humano, nas condições de bancada (temperatura ambiente controlada) e de armazenagem por 45 dias a -20°C .

A seletividade analítica do método SPE/LC-UV foi demonstrada pelos cromatogramas das análises de amostras de leite branco de referência (Figura 38a), e amostras de leite branco de referência enriquecidas com as soluções dos parabenos ($50,0 \text{ ng. mL}^{-1}$) (Figura 38b). Pela comparação de ambos os cromatogramas não se observou a presença significativa ($< 20\%$) de picos interferentes da matriz nos tempos de retenção dos compostos avaliados.

Figura 38: Cromatograma das análises SPE/LC-UV. (a) amostra de leite branco de referência sem adição de parabenos (b) amostra de leite branco de referência enriquecida com os parabenos, 1- metilparabeno, 2 – etilparabeno e 3 - propilparabeno ($50,0 \text{ ng. mL}^{-1}$).

4.6.2 Linearidade, LQ e recuperação

A linearidade do método SPE/LC-UV foi avaliada com amostras de leite branco de referência enriquecidas com soluções de padrões analíticos de parabenos. O método SPE/LC-UV apresentou faixa linear correspondente ao LQ a 150 ng. mL^{-1} e coeficientes de determinação maiores que 0,99 (Tabela 8).

Os valores de limites de quantificação foram determinados como a menor concentração na curva analítica com razão sinal/ruído ≥ 10 . O coeficiente de variação no LQ foi $< 13\%$ com valores de exatidão variando de 101 a 107%.

A recuperação do método SPE/LC-UV foi avaliada com amostras de leite branco de referência enriquecidas com padrões analíticos de parabenos que resultaram nas concentrações de 50 e 100 ng. mL^{-1} ($n = 5$). Os valores de recuperação são apresentados na Tabela 8. Segundo os resultados obtidos, as taxas de recuperação variaram de 70 a 107% (50 ng. mL^{-1}) e de 86 a 88 % (100 ng. mL^{-1}). Segundo a ANVISA [59], taxas de recuperação do analito próximo a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que o método padronizado seja preciso e exato.

Tabela 8: Regressão linear, LQ e recuperação do método SPE/LC-UV.

Parabenos	Regressão linear ($y = a + bx$) LQ a 150 ng. mL ⁻¹	r^2	LQ (ng. mL ⁻¹)	Recuperação (%) (n = 5)	
				(50 ng. mL ⁻¹)	(100 ng. mL ⁻¹)
Metilparabeno	$y = 1506 + 386x$	0,992	10	107	86
Etilparabeno	$y = 1784 + 152x$	0,993	20	71	88
Propilparabeno	$y = 759 + 255x$	0,995	20	70	87

A Figura 39 ilustra as curvas analíticas ($n = 3$), utilizadas nas análises quantitativas dos parabenos nas concentrações (LQ, 50, 75, 100 e 150 ng. mL⁻¹) com seus respectivos desvios padrão.

Figura 39: Curvas analíticas obtidas das análises SPE/LC-UV para as determinações de (a) metilparabeno, (b) etilparabeno e (c) propilparabeno, realizadas com amostras de leite branco de referência enriquecidas com os parabenos.

4.6.3 Precisão interensaios e exatidão

A precisão interensaios do método SPE/LC-UV foi realizada utilizando-se amostras de leite branco referência enriquecidas com soluções de padrões analíticos de parabenos em três níveis (baixa, média e alta). A precisão foi realizada em dias diferentes (2 dias) em quintuplicatas. Os valores de coeficiente de variação obtidos das análises de precisão interensaios (Tabela 9) variaram de 2,6 a 12 %. Quanto à exatidão do método desenvolvido, esta foi determinada utilizando-se, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), as quais contemplaram o intervalo linear, sendo realizadas 5 (cinco) determinações por concentração. Os valores de exatidão do método SPE/LC-UV variaram de 86 a 117% (Tabela 9).

O método SPE/LC-UV miniaturizado apresentou valores de recuperação, precisão e exatidão analítica similares aos obtidos por Ye *et al* (recuperação, 87 a 103%, precisão, 3,5 a 7,7% e exatidão, 84 a 119%) utilizando uma coluna SPE LiChrosphere RP-18 ADS e detecção LC/MS/MS [14].

Neste trabalho, cada cartucho SPE foi reutilizado três vezes sem perda significativa da eficiência de extração, após pré-etapa de precipitação de proteínas do leite. Este número aumentou para 9 vezes, quando utilizou-se amostras aquosas enriquecidas com os parabenos. Este resultado ilustra o efeito da matriz (amostras de leite) no processo de extração e na robustez da fase extratora.

Tabela 9: Valores de precisão interensaios e exatidão obtida para o método SPE/LC-UV em amostras de leite branco de referência.

Parabenos	Concentração adicionada (ng. mL ⁻¹)	Concentração determinada (ng. mL ⁻¹) $\bar{x} \pm S$	Precisão interensaios CV (%) (n = 5)	Exatidão (%) (n = 5)
Metilparabeno	10,0 (LQ)	10,2 ± 0,887	8,6	102
	50,0	58,6 ± 1,51	2,6	117
	75,0	75,2 ± 3,28	4,4	100
	150,0	152,6 ± 10,9	7,1	102
Etilparabeno	20,0 (LQ)	21,5 ± 1,25	6,0	107
	50,0	44,9 ± 1,35	3,0	89
	75,0	66,1 ± 8,52	12	88
	150,0	151,0 ± 4,55	3,0	101
Propilparabeno	20,0 (LQ)	23,2 ± 2,86	12	116
	50,0	43,0 ± 1,86	4,3	86
	75,0	70,6 ± 2,59	3,7	94
	150,0	158,0 ± 16,8	10	105

4.7 Análises das amostras de leite humano de voluntárias lactantes

Para demonstrar a aplicabilidade do método SPE/LC-UV miniaturizado, padronizado e validado de acordo com as normas da ANVISA [59], amostras de leite humano de lactantes voluntárias foram analisadas. Estas amostras foram coletadas em frasco de vidro com tampa de 5 mL e armazenadas a - 20° C.

Foram analisadas 6 (seis) amostras de leite de mulheres em fase de amamentação. De acordo com questionário realizado (item 3.6.2), 100% das voluntárias declaram serem usuárias de cremes hidratantes para a pele e antitranspirantes em creme e 50 % usuárias de filtro solar. A idade das voluntárias (todas em fase de amamentação) variou de 19 a 30 anos. Segundo os resultados das análises SPE/LC-UV das amostras de leite, os parabenos avaliados não

foram determinados em concentrações superiores aos valores de LQ do método padronizado. A Figura 40 ilustra um cromatograma das análises SPE/LC-UV de amostra de leite humano coletada de uma lactante.

Figura 40: Cromatograma representativo das análises SPE/LC-UV de amostra de leite humano de uma voluntária lactante.

5. Conclusões

O processo sol-gel em relação aos procedimentos de sínteses clássicos como a polimerização via radicalar, resultou em rota sintética simples e confiável para obtenção do MIP. O uso do monômero funcional, APTMS, possibilitou a extração de parabenos através de ligações de hidrogênio no pH otimizado. O benzilparabeno (molde) gerou sítios de impressão molecular com tamanho, forma e funcionalidade adequada para extração seletiva de análogos estruturais. O MIP apresentou-se estável nas condições de bancada (temperatura ambiente controlada) e armazenagem (25°C).

As técnicas espectroscópicas, absorção na região do Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear, forneceram informações estruturais importantes para investigar a composição química dos polímeros sintetizados. Desta forma, a presença de grupos amino e ligações do tipo siloxano com a estrutura da sílica foi confirmada. A Microscopia Eletrônica de Varredura permitiu visualizar morfologia polimérica com aglomerados de partículas irregulares de tamanhos não uniformes.

O sistema de SPE miniaturizado minimizou o consumo de solvente orgânico e permitiu a reutilização da fase extratora. A otimização do processo de SPE resultou no aumento da sensibilidade analítica do método e reduziu o número de interações não específicas junto ao material impresso. Os cromatogramas do MIP, em razão das interações específicas, apresentaram menor número de picos interferentes. O material polimérico não impresso extraiu os parabenos por interações não específicas, em concentrações muito inferiores

às obtidas com o MIP. Desta forma, confirmou-se a especificidade das interações entre o MIP e os analitos.

Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método padronizado SPE/LC-UV miniaturizado é adequado para análises de parabenos em amostras de leite humano. A aplicabilidade do método SPE/LC-UV foi demonstrada através das análises de amostras de leite humano de lactantes, as quais não apresentaram parabenos em concentrações superiores aos valores de LQ do método padronizado.

6. Anexos

6.1 Parecer emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da EERP/USP

Parecer emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da EERP/USP, aprovado na data 01/09/2011, para realização do trabalho proposto no capítulo II.

Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde
para o Desenvolvimento da Pesquisa em Enfermagem

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

Avenida Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil - CEP 14040-902
Fone: 55 16 3602.3382 - 55 16 3602.3361 - Fax: 55 16 3602.0518
www.eerp.usp.br - eerp@edu.usp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA EERP/USP

Of.CEP-EERP/USP – 358/2011

Ribeirão Preto, 01 de setembro de 2011

Prezada Senhora,

Comunicamos que o projeto de pesquisa, abaixo especificado, foi analisado e considerado **APROVADO AD REFERENDUM** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em 01 de setembro de 2011.

Protocolo: nº 1397/2011

Projeto: Determinação de parabenos em leite humano por microextração em seringa empacota e cromatografia líquida.

Pesquisadores: Juliana Cristina dos Santos Monteiro

Em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou a sua interrupção.

Atenciosamente,

Enfª Maria Antonieta Spinoso Prado
Vice-Coordenadora do CEP-EERP/USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Juliana Cristina dos Santos Monteiro
Depto. de Enfermagem Materno-Infantil e Saúde Pública
Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP

6.2 Instrumento de coleta de dados (questionário respondido pelas voluntárias)

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS		
Data: ____/____/____	Formulário nº _____	
A. Características sócio-demográficas		
Iniciais do nome da entrevistada _____ Nº Hygia: _____ 1. Idade: _____ anos completos 2. Escolaridade: _____ (Completar com número referente ao grau do curso (Ex.: 1º grau, 2º grau, etc.) e com o último ano completo (Ex.: 7ª série do 1º grau, completar com 1.7). 3. Ocupação: realiza trabalho remunerado fora do lar - sim(☐) não(☐) 4. Estado marital: solteira(☐) casada(☐) amasiada(☐) divorciada/separada(☐) 5. Situação de moradia: própria(☐) alugada(☐) emprestada(☐) outra(☐) 6. Renda familiar: _____ salários mínimos. 7. Altura: _____ m 8. Peso atual: _____ kg 9. Peso antes da gestação: _____ kg		
B. Características obstétricas e neonatais		
10. Nº de gestações: _____ 9. Nº de partos: _____ 10. Nº de abortos: _____ 11. Data do parto: _____ 12. Via de parto atual: normal(☐) cesárea(☐) fórceps(☐) 13. Sexo da criança: feminino(☐) masculino(☐) 14. Peso da criança ao nascer: _____ g 15. Peso da criança no momento coleta de dados: _____ g 16. aleitamento no momento da coleta de dados: (☐) aleitamento materno exclusivo (☐) aleitamento materno predominante (com chá ou água) (☐) aleitamento materno + outros leites (☐) aleitamento artificial		
C. Utilização de produtos cosméticos		
Qual destes produtos cosméticos você usa?		
17. Cremes hidratantes para a pele Não(☐) Sim(☐) Qual marca? _____ Diariamente(☐) Algumas vezes na semana(☐) Algumas vezes no mês(☐)		
18. Perfumes Não(☐) Sim(☐) Qual marca? _____		

()	Diariamente()	Algumas vezes na semana()	Algumas vezes no mês
19. Desodorantes em spray			
Não()	Sim()	Qual marca?_____	
()	Diariamente()	Algumas vezes na semana()	Algumas vezes no mês
20. Antitranspirantes em creme			
Não()	Sim()	Qual marca?_____	
()	Diariamente()	Algumas vezes na semana()	Algumas vezes no mês
21. Batom ou brilho labial			
Não()	Sim()	Qual marca?_____	
()	Diariamente()	Algumas vezes na semana()	Algumas vezes no mês
22. Filtro solar			
Não()	Sim()	Qual marca?_____	
()	Diariamente()	Algumas vezes na semana()	Algumas vezes no mês
23. Tintura de cabelo			
Não()	Sim()	Qual marca?_____	
		Com qual frequência? _____	

7. Referências bibliográficas

63. H. BENEMARYIA, H. ROBBERECHT, H. DEELSTRA, **Hair trace element analysis in human ecology studies**, Sci. Total Environ., 2 (1995) 164.
64. J.G. DÓREA, **Zinc Deficiency in Nursing Infants**, J. Amer. Coll. Nutr., 2 (2002) 2.
65. A. P. SIMOPOULOS, **Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases**, J. Amer. Coll. Nutr., 21 (2002) 495.
66. M. SCHLUMPF, K. KYPKE, M. WITTASSEK, *et al*, **Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: correlation of UV filters with use of cosmetics.**, Chemosphere, 81 (2010) 1171.
67. A.G. MAYES, M.J. WHITCOMBE, **Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers**, Adv. drug. deliver. rev., 57 (2005) 1742.
68. H. YAN, K. HO ROW, **Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer**, Int. J. Mol. Sci., 7 (2006) 155.
69. C. R. T. TARLEY, M. D. P. T. SOTOMAYOR, L. T. KUBOTA, **Polímeros biomiméticos em química analítica. parte 1: preparo e aplicações de MIP (“molecularly imprinted polymers”) em técnicas de extração e separação**, Quim. Nova, 28 (2005) 1076.
70. G. WULFF, A. SARHAN, **Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung**, Angewandte Chemie, 84 (1972) 364.

71. J.O. MAHONY, K. NOLAN, M.R. SMYTH, B. MIZAIKOFF, **Molecularly imprinted polymers- potential and challenges in analytical chemistry**, Anal. Chim. Acta, 534 (2005) 31.
72. S. WEI, B. MIZAIKOFF, **Recent advances on noncovalent molecular imprints for affinity separations**, J. Sep. Sci., 30 (2007) 1794.
73. V. PICHON, **Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers**, J. Chromatogr. A., 1152 (2007) 41.
74. P.A.G. CORMACK, A.Z. ELORZA, **Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization**, J. Chromatogr. B., 804 (2004) 173.
75. F. G. TAMAYO, E. TURIEL, A. MARTÍN-ESTEBAN, **Molecularly imprinted polymers for solid phase microextraction: Recent developments and future trends**, J. Chromatogr. A., 1152 (2007) 32.
76. C.R.T. TARLEY, M.P.T. SOTOMAYOR, L.T. KUBOTA, **Polímeros Biominéticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em Técnicas de Extração e Separação**, Quím. Nova, 28 (2005) 1076.
77. N. PÉREZ-MORAL, A.G. MAYES, **Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerization methods**, Anal. Chim. Acta, 504 (2004) 15.
78. M. E. DÍAZ-GARCÍA, R. B. LAÍNO, **Molecular Imprinting in Sol-Gel Materials: Recent Developments and Applications**, Microchim. Acta, 149 (2005) 19.
79. R. GUPTA, A. KUMAR, **Molecular imprinting in sol–gel matrix**, Biotech. Advances, 26 (2008) 533.

80. A. S. ALFAYA, L. T. KUBOTA, **A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores**, Quim. Nova, 25 (2002) 835.
81. R. G. C. SILVA, **Materiais sorventes impressos molecularmente preparados por processos sol-gel**. 2009. 137f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração - Química) - Instituto de Química, Universidade de Campinas, São Paulo. 2009.
82. F. A. PAVAN, T. M. H. COSTA, E. E. V. BENVENUTTI, **Extração de Al(III), Cr (III) e Fe(III) de meio etanólico usando o xerogel anilinapropilsílica**, Quim. Nova, 27 (2004) 730.
83. A. L. GRAHAM, C. A. CARLSON, P. L. EDMISTON, **Development and Characterization of Molecularly Imprinted Sol-Gel Materials for the Selective Detection of DDT**, Anal. Chem., 74 (2002) 458.
84. C. I. LIN, A. K. JOSEPH, C. K. CHANG, *et al*, **Synthesis of molecular imprinted organic-inorganic hybrid polymer binding caffeine**, Anal. Chim. Acta, 481 (2003) 175.
85. A. OLWILL, H. HUGHES, M. O'RIORDAIN, P. MCLOUGHLIN, **The use of molecularly imprinted sol-gels in pharmaceutical separations**, Bios. Bioelectr. 20 (2004) 1045.
86. D. HANA, G. FANG, X. YAN, **Preparation and evaluation of a molecularly imprinted sol-gel material for on-line solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of trace pentachlorophenol in water samples**, J. Chromatogr. A, 1100 (2005) 131.
87. R.G.C SILVA, F. AUGUSTO, **Sol-gel molecular imprinted ormosil for solid-phase extraction of methylxanthines**, J. Chromatogr. A, 1114 (2006) 216.

88. S. WANG, L. LIU, G. FANG, *et al*, **Molecularly imprinted polymer for the determination of trace ractopamine in pork using SPE followed by HPLC with fluorescence detection**, J. Sep. Sci., 32 (2009) 1333.
89. S. LORDELA, F. CHAPUIS-HUGONA, V. EUDESB, V. PICHONA, **Development of imprinted materials for the selective extraction of nitroaromatic explosives**, J. Chromatogr. A., 1217 (2010) 6674.
90. Z. DUAN, L. PENG FAN, G. FANG, *et al*, **Novel surface molecularly imprinted sol–gel polymer applied to the online solid phase extraction of methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid and quinoxaline-2-carboxylic acid from pork muscle**, Anal. Bioanal. Chem., 401 (2011) 2291.
91. D. A. SPIVAK, **Optimization, evaluation, characterization of molecularly imprinted polymers**, Adv. drug. deliver. rev., 57 (2005) 1779.

CAPÍTULO III

**Avaliação da microextração em fase sólida no capilar
("in-tube" SPME) acoplada à cromatografia líquida (LC) com
detecção espectrofotométrica (LC-UV) para análises de
rifampicina em amostras de plasma**

1.3 Introdução

1.3.1 Tuberculose

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta moléstia afeta principalmente os pulmões, mas, também pode comprometer outros órgãos do corpo humano, como ossos, rins e meninges (membranas que envolvem o cérebro) [92, 93].

A tuberculose tem preocupado as autoridades da área da saúde em todo o mundo. Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a situação da tuberculose como estado de emergência. A OMS assinala como principais causas para o agravamento da situação atual da tuberculose no mundo os seguintes fatores: desigualdade social, advento da AIDS, envelhecimento da população e grandes movimentos migratórios [92, 93].

Segundo os dados emitidos pela OMS, em 2010 a tuberculose matou 1,4 milhões de pessoas. O relatório de controle global da tuberculose de 2011 afirma ainda que o número de infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* é de 8,8 milhões em todo mundo. O Brasil ocupa o 19º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose mundial. De acordo com as informações emitidas pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN-MS), anualmente notificam-se no Brasil aproximadamente 85 mil casos de tuberculose, sendo que, destes, 71 mil casos são recentes. Atualmente cerca de 4.800 indivíduos contaminados pelo *Mycobacterium tuberculosis* morrem anualmente de tuberculose no país.

1.3.2 Rifampicina

Os antibióticos são substâncias produzidas por diferentes espécies de microorganismos (bactérias e fungos) ou sintetizados em laboratórios que combatem outros microorganismos ou inibem seu crescimento. Os antibióticos permitem o controle e a cura das doenças infecciosas, interrompendo a sua evolução natural. Porém, dez anos depois da descoberta da penicilina e antes mesmo da disponibilização para o uso clínico, a presença de beta-lactamases em bactérias foi identificada, caracterizando resistência de algumas espécies aos antimicrobianos, o que passou a ser um problema cada vez mais preocupante [92 - 95].

A escolha do antimicrobiano é orientada pela eficácia microbiológica e farmacológico clínica. A eficácia microbiológica é determinada *in vitro* e corresponde à capacidade de um antibacteriano eliminar (efeito bactericida) ou inibir a multiplicação das bactérias (efeito bacteriostático) [92].

A rifampicina (Figura 41) foi introduzida na terapia da tuberculose no início da década de 1970. É extremamente efetiva contra o *Mycobacterium tuberculosis*, sendo um antibiótico de amplo espectro de ação [50, 96]. A Concentração Inibitória Mínima da rifampicina, 0,25 a 0,5 mg. mL⁻¹ em meio líquido [92], foi definida como a mais baixa entre os fármacos que inibem o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*.

A rifampicina tem caráter anfótero (“zwitterion”) com pka de 1,7 relacionado ao grupamento 4-hidroxila, e pka de 7,9 relacionado ao nitrogênio do grupo piperazina [10]. Em solução aquosa, seu ponto isoelétrico é 4,8 [96, 97].

A administração oral de 450 mg a 600 mg de rifampicina resultam em concentrações plasmáticas de 1,9 - 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. As concentrações plasmáticas máximas são atingidas após 2 a 4 horas [98]. Após absorção gastrointestinal, a rifampicina sofre rápida eliminação na bile, com consequente circulação entero-hepática [98].

A rifampicina é normalmente bem tolerada, quando administrada nas doses recomendadas. No entanto, algumas reações adversas podem ser apresentadas, tais como náuseas, vômitos, icterícia, asma, urticária, hemorragia e insuficiência hepática. Consequentemente, a terapia com rifampicina requer a monitorização terapêutica para assegurar a eficácia clínica do tratamento e minimizar os efeitos adversos provenientes do medicamento [50, 96-98].

Figura 41: Estrutura química da rifampicina.

1.3.3 Monitorização terapêutica [99,100]

A monitorização terapêutica é descrita como valioso recurso clínico, na individualização do regime de dosagem, de acordo com a concentração do fármaco e/ou de seus produtos de biotransformação em amostras de plasma ou soro, coletadas com base nos princípios da farmacocinética.

O objetivo da monitorização terapêutica é assegurar a eficácia clínica e minimizar os efeitos adversos dos fármacos prescritos. Os fármacos monitorados são aqueles que apresentam intervalos terapêuticos bem estabelecidos. As maiorias dos pacientes, que apresentam concentrações plasmáticas dentro destes intervalos fixos, apresentam menores efeitos adversos e maior eficácia clínica.

A monitorização terapêutica também tem sido aplicada a fármacos de baixo índice terapêutico, alta variabilidade interindividual na farmacocinética e em casos de resposta clínica que não sejam facilmente ou imediatamente mensuráveis.

Outra aplicação clínica da monitorização terapêutica é em situações onde a eficácia do medicamento é questionada, quando o paciente exhibe toxicidade provavelmente relacionada ao fármaco, quando há suspeita de não aderência do paciente ao regime de dosagem estabelecido, nas situações de interações de fármacos com outros fármacos administrados, nos casos do paciente apresentar patologias associadas, capazes de alterar a disposição do fármaco, ou ainda nas situações de mudanças na formulação [99, 100].

1.3.4 Preparo de amostras de plasma para análises de rifampicina

A rifampicina é um fármaco pouco estável, principalmente na presença de oxigênio atmosférico. Na literatura, as técnicas descritas para análises de rifampicina em amostras de plasma têm sido a LLE [101 -103] e SPE [104, 105], as quais exigem várias etapas para sua execução acarretando em longo tempo de análise.

O acoplamento da técnica de extração com os sistemas cromatográficos diminuirá o número de etapas dos procedimentos analíticos e consequentemente minimizará os erros experimentais. Geralmente, em sistemas “on line”, os analitos são pré-concentrados em sorvente e quantitativamente dessorvidos com alguns microlitros para os sistemas cromatográficos. Desta forma, os sistemas analíticos automatizados resultam em métodos analíticos rápidos, exatos e de alta sensibilidade analítica com baixos coeficientes de variação.

Estes sistemas são facilmente miniaturizados permitindo a redução do volume das amostras e do consumo de solventes orgânicos, direcionando para o desenvolvimento de métodos ambientalmente corretos. Neste contexto, pode-se destacar a técnica “in-tube” SPME.

1.3.5 “in-tube” SPME

O sistema SPME/LC-UV (microextração em fase sólida acoplada à cromatografia líquida, LC), denominado “in-tube” SPME, foi desenvolvido para a microextração e pré-concentração de fármacos menos voláteis e/ou termicamente instáveis. Este sistema utiliza um tubo capilar aberto de sílica fundida (dispositivo

SPME), com a superfície interna revestida com fase estacionária (Figura 42), o qual tem sido acoplado em linha com o sistema LC. Esta técnica permite automação do processo de extração, resultando em maior precisão analítica e menor tempo de análise, quando comparado às técnicas convencionais [106-109].

O sistema “in-tube” SPME/LC-UV pode ser montado, fixando-se uma coluna capilar entre a alça de amostragem e a agulha do injetor automático do LC ou substituindo a alça de amostragem pelo capilar de extração. O injetor automático aspira à amostra do frasco, em seguida esta é levada para o capilar a uma velocidade linear constante. O volume de amostra aspirado é posteriormente dispensado no frasco do injetor. Na coluna capilar ocorre o processo de sorção do analito com a fase estacionária, até que o equilíbrio de sorção seja atingido [106 -109].

Figura 42: Dispositivo geral para “in-tube” SPME utilizando capilares abertos [106].

O equilíbrio de sorção tem sido rapidamente atingido, pois a extração é realizada sob agitação pela vazão da amostra, entrando e saindo da coluna capilar. Durante o processo de extração, a válvula do injetor LC deverá estar na posição carregar (Figura 43a). O capilar tem sido lavado e condicionado antes do processo de extração com solução de metanol/água ou com a fase móvel. Após posicionar a válvula do injetor de seis pórticos (LC) para a posição injetar (Figura 43b), a fase móvel é redirecionada para o capilar, permitindo à rápida dessorção dos analitos. Desta forma, a técnica “in-tube” SPME é um processo automático que não requer uma interface especial SPME/LC-UV para dessorção dos analitos como nas análises LC de SPME convencional [106 -109].

A eficiência da extração SPME tem sido determinada através da quantidade de analito extraída pela fase estacionária do capilar. Para as fases estacionárias que extraem os analitos baseados no processo de absorção, a quantidade de analito extraído pode ser expressa segundo a **Equação 3**:

$$n_A = K_A V_f V_s C^{\circ}A / (K_A V_f + V_s) \quad (1)$$

onde n_A representa a quantidade de analito A extraído pela fase estacionária, quando estabelecido o equilíbrio de partição ou sorção entre as fases, V_f e V_s : os volumes da fase estacionária do capilar e da solução de amostra, respectivamente; $C^{\circ}A$: a concentração inicial de analito na amostra, e K_A : o coeficiente de partição [107, 108].

(a)

(b)

Figura 43: Esquema do processo "in-tube" SPME/LC-UV [110] (a) processo de extração (b) processo de dessorção.

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

Equação 4:

$$t_e = L [1 + K_A \times (V_f/V_v)] / \mu \quad (2)$$

Nesta equação, L representa o comprimento do capilar, K_A : coeficiente de partição, V_f : volume da fase estacionária do capilar, V_v : volume livre do capilar, μ : velocidade linear da amostra.

Durante as extrações SPME as dimensões físicas: L, V_f , V_v e o valor K_A são fixos; desta forma, o tempo de extração depende da velocidade linear da amostra [107, 108].

1.3.5.1 Otimização das variáveis do processo “in-tube” SPME

As variáveis “in-tube” SPME, tais como fase estacionária da coluna capilar, volume de amostra, ciclos aspirar/dispensar e vazão deverão ser otimizadas visando obter maior eficiência do processo.

1.3.5.1.1 Seleção da fase estacionária

Várias colunas capilares encontram-se comercialmente disponíveis com diferentes fases estacionárias, diâmetros internos, comprimentos e espessuras de filme. A seleção da fase estacionária baseia-se na regra “similar solubiliza similar”.

Por exemplo: em coluna apolar, como a fase líquida polidimetilsiloxano, os compostos hidrofóbicos são retidos de forma seletiva; no entanto, compostos hidrofílicos apresentam maior afinidade com a fase de polietilenoglicol (polar) [106].

O diâmetro interno, comprimento e espessura do filme do capilar estão linearmente relacionados com a quantidade de analitos extraídos, no entanto, o aumento destes parâmetros pode formar picos cromatográficos alargados e com caudas, assim como dessorção não quantitativa dos analitos. Na maioria das análises têm-se utilizado colunas capilares de 50 a 60 cm de comprimento, com filmes finos ($< 0,1 \mu\text{m}$), as quais têm resultado em extrações eficientes, cromatogramas bem definidos e ausência de efeito memória [106, 107].

Embora as colunas capilares com fase líquida quimicamente ligada ou “cross-linked” sejam estáveis na presença de água ou solventes orgânicos, estas podem ser facilmente deterioradas por ácidos ou bases fortes [106]. Desta forma, torna-se necessário a avaliação da estabilidade da fase estacionária, quando exposta à fase móvel durante o processo de dessorção. Como exemplo, a coluna Omegawax 250 foi utilizada em mais de 500 extrações sem alteração da eficiência nas extrações de ranitidina [111] e anfetaminas [112].

1.3.5.1.2 Efeito das modificações da amostra

As fases estacionárias empregadas em colunas capilares comerciais, em grande parte, não são trocadoras de íons; extraíndo, principalmente, os analitos na sua forma não ionizada. Desta forma, o pH da amostra deverá ser ajustado para análises de ácidos e bases fracos, de acordo com os valores de pka [108].

Para garantir que 99% dos compostos ácidos, presentes na amostra, possam ser convertidos em sua forma neutra, o pH deverá ter valor, no mínimo, duas unidades abaixo dos valores de pKa dos analitos. Já para os analitos básicos, o pH deverá ter valor, no mínimo duas unidades acima dos valores dos pKa dos analitos [108].

A adição de solventes orgânicos hidrofílicos, como o metanol, na solução contendo a amostra reduz a eficiência de extração, pois aumenta a solubilidade do analito na amostra e diminui o coeficiente de partição do mesmo com a fase extratora [107]. No entanto, pequenas alíquotas de solvente orgânico têm sido adicionadas aos fluidos biológicos anterior ao processo “in-tube” SPME, para precipitar as proteínas.

Kataoka *et al* [113] empregaram um capilar “in-tube” SPME supel-Q plot comercial para análises de cortisol em amostras de saliva. Os autores avaliaram o efeito do pH da amostra no processo “in-tube” SPME. A diluição da amostra com solução tampão acetato (pH 4,0, 20 mM) resultou em maior eficiência de extração.

1.3.5.1.3 Efeito do volume de amostra, número de ciclos aspirar/dispensar e vazão

Em condição ideal, a amostra deverá ser aspirada/dispensada até atingir o equilíbrio de sorção dos compostos com a fase estacionária. Este equilíbrio tem sido avaliado através de gráficos do rendimento da extração *versus* número de ciclos de amostra aspirada/dispensada. No entanto, quando alta sensibilidade

analítica não é requerida, extrações fora do equilíbrio são realizadas com o objetivo de diminuir o tempo de análise [106, 108].

A extração de verapamil e seus metabólitos foram realizados em capilar PPY com 40 ciclos de 30 μL de amostra e velocidade linear de 100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. O aumento da velocidade linear de 35 a 100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ resultou em extrações mais eficientes em menor tempo de análise [114]. Mullett *et al.* [115] observaram que a diminuição da velocidade linear de fluxo de 100 para 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, durante 10 ciclos, resultou no aumento de eficiência do processo “in-tube” SPME, nas análises de propranolol em amostras de soro.

Para a extração de estereóides anabólicos em amostras de urina, 20 ciclos de 40 μL de amostra foram transportados para a coluna capilar supel-Q plot de 60 cm de comprimento [116]. Adicional aumento no número de ciclos e no volume de amostra resultou em maior tempo de análise, sem aumento significativo na sensibilidade analítica, e a formação de picos cromatográficos com caudas.

1.3.5.1.4 Dessorção dos analitos da fase estacionária

A dessorção dos analitos da coluna capilar é um processo rápido, pois estes capilares apresentam fase estacionária com espessura ao redor de 0,1 μm [106]. O processo de dessorção “in-tube” SPME pode ser realizado nos modos dinâmico (dessorção através da fase móvel) e estático (quando solvente orgânico é aspirado e transportado para o capilar). A dessorção estática é aplicada para analitos fortemente adsorvidos à fase estacionária. Neste caso a dessorção deverá ser rápida e eficiente, com reduzido volume de solvente. Para um capilar (60 cm x 0,25 mm d.i.) a dessorção geralmente é realizada aspirando

40 μL de solvente. Deve-se considerar a capacidade da coluna e a solubilidade do solvente com a fase móvel. Já para o modo dinâmico é possível dessorção direta redirecionando a fase móvel para o capilar, girando a válvula do LC para a posição injetar [106 - 108].

O efeito de memória após o processo de dessorção pode ser observado nas análises de amostras muito concentradas. Este problema tem sido facilmente solucionado com a limpeza da seringa de injeção e da coluna capilar com metanol ou fase móvel entre as extrações [106, 109].

A técnica “in-tube” SPME tem sido aplicada com êxito para análises de fármacos em diferentes fluidos biológicos. A Tabela 10 ilustra alguns trabalhos utilizando o método “in-tube” SPME/LC-UV.

Tabela 10: Aplicações da técnica “in-tube” SPME/LC-UV para análises de fármacos em fluidos biológicos.

Analitos	Amostra	Ciclos, volume e Vazão de amostra	Capilar	Sistema de detecção e LQ	Ref.
Benzodiazepínicos	Soro e Urina	10 ciclos , 30 μL , Vazão: 0,3 mL. min^{-1}	¹ Supel-Q PLOT	LC-MS 0,5 e 2 ng. mL^{-1}	PAWLISZYN <i>et al</i> (2000) -117
Antidepressivos	Urina	Vazão: 80 $\mu\text{L. min}^{-1}$	² HM / DB-5	CE-UV 50 ng. mL^{-1}	HAYASHIDA <i>et al</i> (2001) - 118
Verapamil e metabólitos	Plasma e Urina	40 ciclos, 30 μL , Vazão: 100 $\mu\text{L. min}^{-1}$	³ PPY	LC-MS 100 ng. mL^{-1}	PAWLISZYN <i>et al</i> (2002) - 119
Benzodiazepínicos	Soro	4 ciclos, 20 μL , Vazão: 20 $\mu\text{L. min}^{-1}$	⁴ RAM/ADS	LC-UV 50 ng. mL^{-1}	PAWLISZYN <i>et al</i> (2002) - 120

Tabela 10 continua ...

Continuação da Tabela 10 ...

Analitos	Amostra	Ciclos, volume e Vazão de amostra	Capilar	Sistema de detecção e LQ	Ref.
Derivados de Xantina	Soro	Vazão: 40 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	⁵ Poli (MAA-EGDMA) monolítico	LC-UV 21 – 39 ng. mL^{-1}	SHI <i>et al</i> (2004) - 121
⁶ ARA-IIs	Plasma, Urina	Fluxo: 40 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	Poli (MAA-EGDMA) monolítico	LC-UV - FD 0,5 – 50 ng. mL^{-1}	FENG <i>et al</i> (2005) - 122
Anfetaminas	Urina	20 μL , Fluxo: 0,04 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	Coluna monolítica poli(MAA-EGDMA)	LC-UV 50 ng. mL^{-1}	ZHANG <i>et al</i> (2005) - 123
Fluoxetina	Soro	20 ciclos, 50 μL , Vazão: 400 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	Fase imunosorvente	LC-MS 5,0 ng. mL^{-1}	PAWLISZYN <i>et al</i> (2007) - 124
Antidepressivos	Plasma	15 ciclos, 100 μL , Vazão: 100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	⁷ OV-1701	LC-UV 20 - 50 ng. mL^{-1}	QUEIROZ <i>et al</i> (2008) - 125
Fluoxetina e norfluoxetina	Plasma	20 ciclos, 100 μL , Vazão: 315 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	PPY	LC-FD 10 - 15 ng. mL^{-1}	QUEIROZ <i>et al</i> (2009) - 126
Antidepressivos	Urina e plasma	1 ciclo, 300 μL , Fluxo: 0,04 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	Sol-gel	LC-MS 1 – 10 ng. mL^{-1} (urina) 1 – 20 ng. mL^{-1} (plasma)	FENG <i>et al</i> (2010) - 127
Biomoléculas com grupos cis-diol	Urina	20 mL , Vazão: 100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	⁸ Poli (VPBA-co-EDMA)	LC-MS/MS 5,0 ng. mL^{-1}	RENA <i>et al</i> (2010) - 128
Estereóides anabólicos	Urina	20 ciclos, 40 μL , Vazão: 150 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	Supel-Q PLOT	LC-MS 0,5 ng. mL^{-1}	KATAOKA <i>et al</i> (2010) - 129
α - interferon	Plasma	1 ciclo, 250 μL -	RAM	LC-FD 0,06 MIU. mL^{-1}	QUEIROZ <i>et al</i> (2011) - 130
Rifampicina	Plasma	10 ciclos, 200 μL , Vazão: 315 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	PEG	LC-UV 100 ng. mL^{-1}	QUEIROZ <i>et al</i> (2011) - 96

¹Supel-Q-plot: polímero de divinilbenzeno, ²HM: fibra de Zilon, ³PPY: polipirrol, ⁴RAM/ADS: acesso a material restrito / alquil diol sílica, ⁵Poli (MAA-EGDMA) monolítico: poli (metacrilato ácido-etileno glicol dimetacrilato) monolítico, ⁶ARA-IIs: receptor antagonista de angiotensina II, ⁷OV-1701: (14% cianopropilfenilmetil- polisiloxano), ⁸Poli (VPBA-co-EDMA): poli (ácido vinilfenilborônico- etileno glicol dimetacrilato),

2. Objetivo Geral

Avaliação da microextração em fase sólida no capilar (“in-tube” SPME) acoplada à cromatografia líquida (LC) com detecção espectrofotométrica (LC-UV) para análises de rifampicina em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica.

2.1 *Objetivos específicos*

- ❖ Desenvolvimento do método “in-tube” SPME/LC-UV para a determinação de rifampicina em amostras de plasma;
 - Otimização das condições cromatográficas LC-UV;
 - Otimização das variáveis “in-tube” SPME;
- ❖ Validação analítica do método “in-tube” SPME/LC-UV padronizado para a análise de rifampicina em amostras de plasma;
- ❖ Aplicação do método “in-tube” SPME/LC-UV validado para análises de amostras de plasma de paciente em terapia com rifampicina para fins de monitorização terapêutica.

3. Materiais e métodos

3.1 Padrões analíticos e reagentes

Os padrões cromatográficos, rifampicina ((Sigma–Aldrich, Inc. St. Louis, USA) e carbamazepina (padrão interno, Ciba-Geigy, São Paulo-SP, Brasil), foram gentilmente doados pela Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP).

As soluções padrão diluídas dos fármacos foram preparadas em metanol considerando o intervalo terapêutico, a partir da diluição de suas respectivas soluções estoques de 1,0 mg. mL⁻¹ em metanol. Estas soluções foram armazenadas a -20 °C, sendo que as soluções de rifampicina, contendo 1,0 mg. mL⁻¹ de ácido ascórbico, foram armazenadas em tubos de vidros âmbar.

O metanol e a acetonitrila, ambos de grau cromatográfico foram adquiridos da (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA); ácido clorídrico, fosfato de potássico monobásico e dibásico, borato de sódio, acetato de sódio e ácido acético da (Mallinckrodt Baker, Xalostoc, México). A água ultrapura utilizada nos ensaios foi purificada pelo sistema Milli-Q da (Millipore, São Paulo-SP, Brasil).

3.2 Otimização das condições cromatográficas LC-UV

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido da *Varian*, modelo Prostar 230, equipado com detector Ultravioleta (*Varian*, modelo Prostar 310). O comprimento de onda selecionado foi 225 nm.

A rifampicina foi analisada por cromatografia líquida em fase reversa utilizando uma coluna C18 Lichrospher®60 RP-Select B (5 μ m, 250 x 4 mm) (Merk - Darmstadt, Alemanha), e pré-coluna C18 RP-Select B (Merk - Darmstadt, Alemanha), LiChroCART®4-4. A fase móvel, acetonitrila e tampão fosfato pH 5,0 (40:60 v/v), foi selecionada para as análises de rifampicina com vazão de 1 mL.min⁻¹, no modo isocrático. O volume de amostra injetado foi de 50 μ L.

3.3 Amostras de plasma

As amostras de plasma, branco de referência, livre de rifampicina, sorologia negativa para hepatite B e C, chagas, HIV, HTLV-I/II, TGP e sífilis foram cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP. Estas amostras foram enriquecidas com soluções do padrão interno e soluções padrão de rifampicina em diferentes concentrações, as quais resultaram em concentrações plasmáticas que incluem os níveis terapêuticos. Estas amostras de plasma (branco de referência) enriquecidas com os padrões analíticos foram utilizadas na otimização das variáveis “in-tube” SPME e na validação analítica do método proposto.

As amostras de plasma de pacientes em terapia com rifampicina foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiroz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. A coleta destas amostras de plasma foi realizada segundo os critérios estabelecidos pelo Comitê de ética da FCFRP/USP.

3.4 Desenvolvimento do programa do injetor automático (LC) para as análises “in-tube” SPME.

As extrações “in-tube” SPME foram realizadas segundo o programa do injetor automático descrito na Tabela 11.

Tabela 11: Programa utilizado nas extrações “in-tube” SPME.

AÇÃO	POSIÇÃO	QUANTIDADE	VAZÃO	ALTURA DA AGULHA* / ETAPAS
LAVAR AGULHA	-----	250 µL (água metanol, 50:50 v/v)	-----	-----
VÁLVULA INJETOR	CARREGAR	-----	-----	-----
ASPIRAR	FRASCO A	200 µL (água: metanol, 50:50 v/v)	625 µL min ⁻¹	5 mm
DISPENSAR	FRASCO B	200 µL (água: metanol, 50:50 v/v)	625 µL min ⁻¹	5 mm
REPETIR	-----	2 VEZES	625 µL min ⁻¹	2 etapas anteriores
ASPIRAR	AMOSTRA	200 µL	315 µL min ⁻¹	5 mm
DISPENSAR	AMOSTRA	200 µL	315 µL min ⁻¹	5 mm
REPETIR	-----	9 VEZES	-----	2 etapas anteriores
VÁLVULA INJETOR	INJETAR	-----	-----	-----
AJUSTAR A SAÍDA	INJETAR	-----	-----	-----

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

3.5 Precipitação das proteínas do plasma

As proteínas das amostras de plasma foram precipitadas antes do processo “in-tube” SPME/LC-UV, para prevenir sorção irreversível destes compostos endógenos à coluna capilar. Diferentes solventes foram avaliados para a precipitação das proteínas, tais como: metanol, acetonitrila e sulfato de amônio (pH 7,0), nas proporções (solvente:plasma 2:1 v/v). Posteriormente, as amostras

foram agitadas e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o solvente orgânico foi evaporado sob fluxo de N₂. O extrato seco foi ressuspensionado em solução tampão fosfato.

3.6 Acoplamento “in-tube” SPME/LC-UV e otimização das variáveis

O capilar de sílica fundida foi acoplado junto ao injetor automático do LC, substituindo a alça de amostragem. A conexão do capilar foi facilitada utilizando tubos PEEK (poliéter éter cetona) nas extremidades. As colunas capilares, OV-1701 (80 cm, 0,25 mm d.i. e 0,05 µm de espessura), PEG (60 cm x 0,32 mm d.i. e 0,05 µm de espessura) e capilar de sílica fundida não revestido (80 cm x 0,32 mm d.i.) foram avaliadas. Antes do processo de extração “in-tube” SPME, o capilar foi condicionado com a fase móvel, tampão fosfato (0,05 mol. L⁻¹, pH = 5,0) e acetonitrila, 60:40 v/v, respectivamente, durante 30 minutos com vazão de 1,0 mL. min⁻¹.

Os parâmetros avaliados na otimização do processo “in-tube” SPME/LC-UV foram: fase extratora, pH e volume da amostra, número de ciclos aspirar/dispensar e vazão. O procedimento de otimização das variáveis “in-tube” SPME foi realizado em frascos de 2 mL com tampa de rosca e septo de silicone, específico para o injetor automático. 0,5 mL de amostra de plasma foram enriquecidas com as soluções padrão de rifampicina (100µL, 100,0 µg. mL⁻¹) e do padrão interno (30µL, 100,0 µg. mL⁻¹). Após a precipitação das proteínas, 0,5 mL de solução tampão fosfato foram adicionados ao extrato seco. A influência do pH da amostra no processo SPME foi avaliada em diferentes valores de pH (3,0, 5,0,

7,0 e 9,0). O frasco contendo a amostra foi colocado na bandeja do injetor automático para a realização do processo “in-tube” SPME/LC-UV.

Considerando os volumes dos capilares (39 a 48 μL), da agulha do injetor automático e volume “morto”, os seguintes volumes de amostra foram avaliados: 50, 100, 150, 200 e 250 μL . Após a otimização do volume de amostra aspirada/dispensada, a influência do número de ciclos (1, 5, 10, 15 e 20) e da vazão (125 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 315 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ e 625 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) foram também avaliados.

Entre cada extração “in-tube” SPME, a seringa do injetor automático e o capilar foram lavados com 250 μL de solução de metanol e água Milli-Q (50:50 v/v).

4. Resultados e discussão

4.1 Análise cromatográfica LC-UV

4.1.1 Otimização da fase móvel

A fase móvel, solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 5,0) e acetonitrila 60:40 (v/v), respectivamente, foi selecionada para as análises de rifampicina e o padrão interno. Nesta condição, os compostos apresentaram satisfatória resolução e tempo de análise total de 7 minutos (Figura 44).

Figura 44: Cromatograma referente à análise LC-UV da solução padrão de rifampicina (1) ($10,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$) e padrão interno (2) ($3,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$) utilizando a fase móvel: solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol. L}^{-1}$, pH 5,0):acetonitrila (60:40 v/v).

4.1.2 Identificação e quantificação de rifampicina em amostras de plasma

A identificação dos fármacos nas amostras de plasma foi realizada pela comparação dos tempos de retenção destes, com os das soluções padrão,

injetadas individualmente nas mesmas condições cromatográficas. Os espectros (absorbância versus comprimento de onda) na região do ultravioleta (UV) também foram considerados. O comprimento de onda selecionado, $\lambda = 225 \text{ nm}$, corresponde à região de absorção UV máxima apresentada pela rifampicina. No tempo de retenção dos analitos (t_r) não foram observados picos interferentes oriundos da amostra de plasma. Além disso, neste comprimento de onda selecionado, a acetonitrila e o tampão fosfato são transparentes. Os limites de absorbância no UV (nm) para a acetonitrila e tampão fosfato, são de 190 nm e menores que 200 nm, respectivamente.

Para a quantificação da rifampicina em amostras de plasma, utilizou-se o método calibração com adição de padrão interno. A carbamazepina foi selecionada como padrão interno, pois não coeluiu com a rifampicina e apresentou coeficiente de partição com a fase extratora similar à rifampicina. De acordo com Lord *et al.* em SPME se o padrão interno é extraído com diferenças significativas daquelas dos analitos sob análise, a precisão e a linearidade do método analítico poderão ser comprometidas [112].

O padrão interno também não deverá estar presente nas amostras de plasma analisadas. Carbamazepina não tem sido co-administrada com rifampicina, pois o uso concomitante (politerapia) de ambos os fármacos pode aumentar os níveis plasmáticos de carbamazepina acarretando em sintomas de toxicidade [131].

Outros fármacos foram avaliados como padrão interno para as análises de rifampicina em amostras de plasma. O composto, ácido *p*-dimetilaminobenzóico [132], apresentou boa resolução e não coeluiu com a rifampicina ($t_r = 4,5 \text{ min}$),

podendo desta forma, ser utilizado como padrão interno alternativo à carbamazepina.

4.2 Otimização das variáveis do processo “in-tube” SPME

As variáveis “in-tube” SPME foram otimizadas visando aumentar o coeficiente de partição dos fármacos com a fase extratora e diminuir o tempo de análise. A otimização das variáveis “in-tube” SPME foi realizada com amostras de plasma enriquecidas com soluções padrão de rifampicina e de padrão interno. Nos gráficos a seguir são apresentados os valores médios ($n = 3$) das áreas obtidas nas análises “in-tube” SPME/LC-UV, com seus respectivos desvios padrão.

Primeiramente avaliou-se a fase estacionária do capilar de extração. Três fases extratoras foram testadas como dispositivo para extração “in-tube” SPME, a fase de PEG (fase polar), OV-1701 (fase apolar) e capilar de sílica fundida não revestido. De acordo com a Figura 45, a rifampicina apresentou maior coeficiente de partição com a fase extratora de PEG quando comparada aos demais revestimentos.

Figura 45: Avaliação de diferentes fases extratoras utilizadas nas análises “in-tube” SPME/LC-UV. OV-1701 (80 cm x 0,25 mm d.i. e 0,05 μ m de espessura), PEG (60 cm x 0,32 mm d.i. e 0,05 μ m de espessura) e capilar de sílica fundida não revestido (80 cm x 0,25 mm d.i.).

Os parâmetros como diâmetro interno, comprimento e espessura do filme da coluna capilar poderão influenciar a eficiência de extração “in-tube” SPME [106-109]. Como pôde ser observado, o capilar de PEG (60 cm x 0,32 mm d.i.) possui maior volume em relação ao capilar de OV-1701 (80 cm x 0,25 mm d.i.) resultando em maior capacidade de amostra e, portanto em maior quantidade de analito extraído.

A fase de PEG encontra-se quimicamente entrecruzada a parede interna do capilar de sílica fundida, resultando em adequada estabilidade frente ao uso de

solventes empregados na fase móvel por cromatografia líquida. Estas fases têm sido aplicadas com êxito nas análises de fármacos em fluidos biológicos que apresentam grupamentos polares [133-135]. Portanto, para as extrações posteriores a fase de PEG foi selecionada.

O revestimento de PEG extrai os compostos, principalmente, na sua forma não ionizada, desta forma o ajuste do pH da matriz biológica com adição de soluções tampão, pode resultar em maior eficiência de extração. De acordo com os valores de pK_a (1,7 e 7,9), a rifampicina pode estar presente em solução aquosa na forma catiônica, aniônica ou intermediária.

Segundo a Figura 46, a diluição da amostra de plasma com solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol. L}^{-1}$, pH 7,0) resultou em maior quantidade de analito extraído. Em valores de pH 7 a rifampicina apresenta maior estabilidade, uma vez que em soluções ácidas ($\text{pH} \leq 4,5$), a rifampicina pode sofrer hidrólise gerando 3-formil rifampicina e 1-amino-4-metil piperazina. Já em condições alcalinas (pH 7,5 – 9,0), pode ocorrer oxidação na presença de oxigênio gerando rifampicina quinona [96, 97].

O processo de diluição da amostra é vantajoso, pois diminuiu a viscosidade da amostra de plasma favorecendo desta forma, o processo de difusão dos analitos para a fase extratora, considerando que a eficiência do processo de precipitação de proteínas do plasma foi menor que 100%.

O efeito da força iônica tem sido considerado no processo de extração SPME convencional, pois, o aumento da força iônica da solução, efeito “salting out”, poderá resultar no aumento das taxas de recuperação. No entanto, para “in-tube” SPME, o processo de adição de sal a amostra poderá causar obstrução

do capilar através da deposição de sal [106 -109]. Portanto, este parâmetro não foi avaliado para preservar o capilar.

Figura 46: Otimização do pH da amostra para as análises “in-tube” SPME. Condições “in-tube” SPME: amostra plasma (0,5 mL) enriquecida com rifampicina na concentração de $10,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$. Seguido de precipitação das proteínas e adição de 0,5 mL de solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol. L}^{-1}$, pH 7,0) ao extrato seco; 150 μL de amostra foi aspirada/dispensada durante 10 ciclos com vazão de $315 \mu\text{L. min}^{-1}$.

O volume de amostra aspirada/dispensada está diretamente relacionado com a capacidade do capilar e ao volume morto do sistema [106, 109]. Consequentemente, o volume de amostra aspirado/dispensado avaliado variou de 50 a 250 μL . Segundo a Figura 47, com 200 μL de amostra, obteve-se a maior eficiência de extração para as análises “in-tube” SPME de rifampicina, acima deste volume de amostra a quantidade de analito extraído foi constante.

No processo “in-tube” SPME, a amostra é aspirada e dispensada do capilar até atingir o equilíbrio de partição. No entanto, o aumento do número de ciclos poderá resultar em dessorção parcial do analito, durante a etapa dispensar, em picos com caudas e um maior tempo de análise. O equilíbrio de partição da rifampicina com a fase PEG foi alcançado após 10 ciclos (Figura 48) aspirar/dispensar (com 200 μL de amostra), após este número de ciclos a quantidade de analito extraído manteve-se constante.

Figura 47: Otimização do volume de amostra aspirado/dispensado para as análises “in-tube” SPME. Condições “in-tube” SPME: amostra plasma (0,5 mL) enriquecida com rifampicina na concentração de $10,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$. Seguido de precipitação das proteínas e adição de 0,5 mL de solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol. L}^{-1}$, pH 7,0) ao extrato seco, 10 ciclos aspirar/dispensar com vazão de $315 \mu\text{L. min}^{-1}$.

Figura 48: Otimização do número de ciclos aspirar/dispensar para as análises “in-tube” SPME. Condições “in-tube” SPME: amostra plasma (0,5 mL) enriquecida com rifampicina na concentração de $10,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$. Seguido de precipitação das proteínas e adição de 0,5 mL de solução tampão fosfato ($0,05 \text{ mol. L}^{-1}$, pH 7,0) ao extrato seco; 200 μL de amostra aspirada/dispensada com vazão de $315 \mu\text{L. min}^{-1}$.

De acordo com Kataoka *et al.* [106], o processo aspirar/dispensar “in-tube” SPME corresponde à velocidade de agitação magnética utilizadas em SPME convencional e, portanto a eficiência de extração aumenta com o aumento da vazão da amostra. Para “in-tube” SPME a vazão está diretamente relacionada com o tempo total requerido para alcançar o equilíbrio de partição, onde a sensibilidade analítica alcançada é máxima (equação 4, item 1.3.5). Para comprovar este efeito, três diferentes vazões foram avaliadas: 125, 315 e

625 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, e suas respectivas eficiências de extração comparadas, utilizando-se 10 ciclos aspirar/dispensar (Figura 49).

Segundo a Figura 49, observou-se pequeno aumento na quantidade de analito extraído aumentando a vazão de 125 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ (baixo) para 315 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ (médio), a qual foi selecionada para as análises subsequentes. Vazões superiores a este valor não foram adequadas, pois resultou na formação de bolhas no capilar.

Figura 49: Otimização da vazão para as análises “in-tube” SPME. Condições “in-tube” SPME: amostra aquosa (0,5 mL) enriquecida com rifampicina na concentração de 10,0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Seguido de precipitação das proteínas e adição de 0,5 mL de solução tampão fosfato (0.05 mol. L^{-1} , pH 7,0) ao extrato seco, 200 μL de amostra aspirada/dispensada durante 10 ciclos.

O processo de dessorção “in-tube” SPME foi realizado redirecionando a fase móvel para a coluna capilar de extração (mudando a válvula do injetor automático da posição carregar para a posição injetar). A composição da fase móvel (solução

tampão fosfato pH 5,0 e acetonitrila 60:40 (v/v)) foi adequada para a dessorção da rifampicina sem efeito de memória.

Segundo os resultados obtidos da otimização das variáveis “in-tube” SPME, as melhores condições foram às seguintes: fase extratora de PEG, volume de 200 μL de amostra, 10 ciclos aspirar/dispensar com vazão de 315 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

4.3 Validação analítica do método “in-tube” SPME/LC-UV

Para a validação analítica do método “in-tube” SPME/LC-UV desenvolvido, amostras de plasma (branco de referência) foram enriquecidas com solução de padrão interno (carbamazepina, 30 μL , 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), e soluções padrão de rifampicina. Segundo as normas da ANVISA [59] foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação.

4.3.1 Estabilidade e seletividade analítica

Baseado em nossos estudos anteriores (testes de estabilidade em curto prazo) [50], a rifampicina foi estável nas amostras de plasma, analisadas após 12 h, em concentrações de 0,2 e 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Segundo descrito na literatura [98,136], a rifampicina, adicionada às amostras de plasma, também foi estável por 8 e 15 h nas condições de bancadas e no injetor automático, respectivamente. De acordo com Perri *et al* [136], estudos de estabilidade em longo prazo demonstrou que a degradação de rifampicina nas amostras de plasma, durante 3 meses, foi menor que 20%.

Para prevenir a oxidação da rifampicina, ácido ascórbico foi adicionado às soluções padrões e às amostras de plasma de pacientes. Nesta condição, rifampicina (armazenada na ausência de luz) foi estável nas amostras de plasma, nas condições de armazenamento (- 20°C) por 3 (três) meses e nas condições de bancada (temperatura ambiente controlada).

O estudo da seletividade do método “in-tube” SPME/LC-UV padronizado foi realizado pela comparação dos cromatogramas das análises de amostras de plasma branco de referência (Figura 50a), e amostra de plasma branco de referência enriquecida com padrão analítico de rifampicina, na concentração de 10,0 µg. mL⁻¹ (n = 3) (Figura 50b). Em ambos os cromatogramas obtidos destas análises não se observou a presença significativa de picos interferentes no tempo de retenção de rifampicina e padrão interno.

A rifampicina pode ser prescrita em conjunto com outros fármacos no tratamento da tuberculose. Portanto, vários fármacos foram testados nas condições cromatográficas otimizadas, para avaliar possível coeluição com o analito ou pi. Os fármacos testados foram: isoniazida, pirazinamida, etambutol, minociclina, ofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, claritromicina, dapsona, monoacetildapsona, clofazimina, cefalexina, diazepam e diclofenaco. Também foram testados outros compostos, os quais podem estar presentes no plasma de pacientes, tais como cafeína, propranolol, metropolol, cimetidina, ácido salicílico e ranitidina. Estes fármacos não coeluíram com a rifampicina ou pi. Desta forma, comprovou-se a seletividade do método “in-tube” SPME/LC-UV para análises de rifampicina em amostras de plasma.

Figura 50: Cromatograma “in-tube” SPME/LC-UV. (a) amostra de plasma branco de referência, (b) amostra de plasma branco enriquecida com (1) rifampicina na concentração de $10,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$ e (2) padrão interno ($3,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

4.3.2 Linearidade e LQ

A linearidade do método “in-tube” SPME/LC-UV foi avaliada com amostras de plasma enriquecidas com os padrões analíticos de rifampicina do LQ a $100,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$. A equação de regressão linear e o coeficiente de correlação foram, $y = 0,1227x + 0,0264$ e $r^2 = 0,998$, respectivamente. A Figura 51 ilustra a curva analítica, utilizada nas análises quantitativas de rifampicina nas

concentrações na faixa linear do LQ a $100,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$ com seus respectivos desvios padrão.

O limite de quantificação do método “in-tube” SPME/LC-UV foi de $0,1 \mu\text{g. mL}^{-1}$, o qual foi determinado como a menor concentração na curva de calibração foi baseado na razão sinal/ruído ≥ 10 , precisão analítica com $\text{CV} \leq 20\%$ e exatidão $> 80\%$.

Figura 51: Curva analítica contemplando o intervalo linear para as análises “in-tube” SPME/LC-UV realizadas com amostras de plasma branco de referência enriquecida com padrões analíticos de rifampicina e padrão interno.

4.3.3 Recuperação, precisão interensaios e exatidão

Neste trabalho o capilar de PEG foi fixado no lugar da alça de amostragem do injetor automático, os ensaios de recuperação não foram realizados, pois poderiam gerar resultados não proporcionais à solução padrão, uma vez que não

se pode afirmar corretamente a quantidade de amostra (pré-concentração no capilar) enviada à coluna analítica, inviabilizando desta forma, a comparação entre a injeção de solução padrão introduzida através do sistema convencional do injetor automático e as injeções após as análises “in-tube” SPME.

A precisão interensaios do método “in-tube” SPME/LC-UV foi realizada utilizando-se amostras de plasma branco de referência, enriquecidas com padrões analíticos de rifampicina nas concentrações de 10, 25 e 75 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, os quais contemplaram o intervalo linear do método desenvolvido. A precisão foi realizada em dias 2 consecutivos, pois os valores de CV (%) obtidos destas análises expressam melhor a influência das variáveis, tais como variações na temperatura do laboratório, na fase móvel, na coluna de separação cromatográfica, no preparo de amostra, dentre outros.

As análises de precisão interensaios (Tabela 12), apresentaram CV menores que 2% para as concentrações analisadas. A exatidão foi determinada utilizando-se, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), as quais contemplaram o intervalo linear, sendo realizadas 5 (cinco) determinações por concentração (Tabela 12). Estes valores foram adequados para as determinações de rifampicina em amostras de plasma e estão de acordo com os critérios estabelecidos pela ANVISA.

Tabela 12: Valores de precisão interensaios e exatidão analítica para o método “in-tube” SPME/LC-UV (n = 5).

Concentração adicionada ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	Concentração determinada ($\mu\text{g. mL}^{-1}$) $\bar{x} \pm S$	Precisão interensaios (n = 5) CV %	Exatidão (%) (n = 5)
10,0	8,6 $\pm$ 0,099	1,2	86
25,0	20,9 $\pm$ 0,258	1,2	83
75,0	69,3 $\pm$ 1,175	1,7	92

4.4 Comparação do método “in-tube” SPME/LC-UV com os métodos convencionais descritos na literatura.

O método “in-tube” SPME/LC-UV desenvolvido neste trabalho foi comparado com outros métodos descritos na literatura para análises de rifampicina em amostras de plasma. Como pode ser observado pela Tabela 13, o método “in-tube” SPME/LC-UV apresentou maior faixa linear e valores de coeficiente de variação menores (precisão interensaios), quando comparado aos métodos convencionais empregando as técnicas, ELL e SPE.

O tempo de análise total de análise neste estudo foi 32 minutos (etapa de precipitação de proteínas, processo de extração, dessorção e separação cromatográfica). O tempo de análise poderá diminuir com a execução simultânea do preparo de amostra e do processo “in-tube” SPME/LC-UV. O capilar PEG, após ser reutilizado por 200 vezes, não apresentou perda significativa da eficiência da extração, demonstrando sua robustez.

Tabela 13: Comparação dos parâmetros: linearidade, limite de quantificação, precisão interensaios e volume de amostra entre o método “in-tube” SPME desenvolvido e métodos convencionais descritos na literatura para análises de rifampicina em amostras de plasma.

Técnica de extração	Sistema de detecção	Linearidade ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	Precisão interensaios (CV%)	Volume de amostra (μL)	Ref.
LLE*	LC/UV	0,125 - 50	0,125	< 10,0	200	50
LLE	LC/UV	1 - 50	0,05	< 15,0	100	101
LLE	LC/UV	2 - 20	2,0	< 5,3	100	102
SPE**	LC/UV	0,05 - 35	0,05	$\leq$ 6,0	500	104
LLE	LC/UV	0,25 - 15	0,25	$\leq$ 5,0	200	103
SPE	LC/UV	0,16 - 20	0,16	$\leq$ 5,0	500	105
“in-tube” SPME	LC/UV	0,3 - 100	0,3	$\leq$ 1,7	200	96

4.5 Análises de amostras de plasma de pacientes

Para comprovar a aplicabilidade do método “in-tube” SPME/LC-UV, padronizado e validado de acordo com as normas da ANVISA [59], amostras de plasma de 6 pacientes em tratamento com rifampicina foram analisadas. Estas amostras foram coletadas segundo descrito no item 3.3, protegidas da luz e armazenadas a - 20° C na presença de ácido ascórbico.

A concentração média determinada nas amostras de plasma de pacientes analisadas variou de 1,7 a 7,0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Estes níveis plasmáticos de rifampicina

determinados estão de acordo com os níveis terapêuticos reportados na literatura [99].

A Figura 52 ilustra o cromatograma das análises “in-tube” SPME/LC-UV de amostra de paciente tuberculástico em administração oral de 600 mg/dia de rifampicina. Observou-se na Figura 52 similaridade do perfil cromatográfico do pico da rifampicina com o obtido em amostras de plasma branco de referência enriquecida com padrão analítico de rifampicina (Figura 51b).

Figura 52: Cromatograma representativo das análises “in-tube” SPME/LC-UV de amostra de plasma de paciente em terapia com rifampicina (1) ($7,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$), (2 = padrão interno).

5. Conclusões

O processo on-line “in-tube” SPME/LC-UV permitiu extração contínua, pré-concentração do analito, dessorção e injeção utilizando o injetor automático convencional LC. A otimização das variáveis “in-tube” SPME (fase estacionária do capilar, volume de amostra, número de ciclos aspirar/dispensar e vazão) resultou no aumento da sensibilidade analítica do método e reduziu o tempo necessário para se atingir o equilíbrio de partição com a fase extratora.

Segundo os parâmetros de validação analítica avaliados, o método analítico “in-tube” SPME desenvolvido apresentou seletividade, linearidade, precisão e exatidão analítica adequada para análises de rifampicina em amostras de plasma em concentrações que contemplam o intervalo terapêutico ou de pacientes em terapia com rifampicina.

O método “in-tube” SPME/LC-UV, quando comparado com os métodos convencionais descritos na literatura, empregando as técnicas de preparo de amostras, LLE e SPE, apresentou as seguintes vantagens: automação do processo de análise, maior precisão analítica, menor tempo de análise, menor volume de solvente orgânico e de fluido biológico. Desta forma, o método “in-tube” SPME/LC-UV é adequado para determinação de rifampicina em amostras de plasma para monitorização terapêutica.

6. Referências bibliográficas

92. W. S. CARVALHO, S. S. MIRANDA, J. L. PESQUERO, M. A. GOMES, **Diagnóstico de resistência do Mycobacterium tuberculosis à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase**, Braz. J. Pharm. Sci., 43 (2007) 31.
93. A. RUFFINO-NETTO, **Tuberculose: a calamidade negligenciada**, Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 35 (2002) 51.
94. R., REESE, R., BETTS, B., GUMUSTOP, **Handbook of antibiotics**. 3a. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2000.
95. F. FUCHS, **Princípios gerais do uso de antimicrobianos**. In: Fuchs FD & Wannmacher L, eds. Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional. 3a. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, no prelo.
96. L.P. MELO, R.H.C. QUEIROZ, M.E.C. QUEIROZ, **Automated determination of rifampicin in plasma samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography**, J. Chromatogr. B., 879 (2011) 2454.
97. S. SINGH, T.T. MARIAPPAN, R. SANKAR, et al , **A critical review of the probable reasons for the poor/variable bioavailability of rifampicin from anti-tubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem**, Int. J. Pharmac., 228 (2001) 5.
98. A.L.ALLANSON, M.M. COTTON, J.N.A. TETTE, A.C. BOYTER, **Determination of rifampicin in human plasma and blood spots by high performance liquid chromatography with UV detection: A potential method for therapeutic drug monitoring**, J. Pharm. Biomed. Anal. 44 (2007) 963.
99. J.P. WORDEN, **Therapeutic drug monitoring**. Curr. Surg., 51 (1994) 4299.

100. W.J. TAYLOR, J.D. ROBINSON, S. SPIVEY-MILLER, **Handbook therapeutic monitoring**. 2 ed. Cincinnati: Harvey Whitney Books Company, p. 1-10, 1993.
101. I. CALLEJA, M.J. BLANCO-PRIETO, N. RUZ, et al, **High-performance liquid–chromatographic determination of rifampicin in plasma and tissues**, J. Chromatogr. A, 1031 (2004) 289.
102. R. PANCHAGNULA, A. SOOD, N. SHARDA, et al, **Determination of rifampicin and its main metabolite in plasma and urine in presence of pyrazinamide and isoniazid by HPLC method**, J. Pharm. Biomed. Anal., 18 (1999) 1013.
103. A.K.H. KUMAR, I. CHANDRA, R. GEETHA, et al, **A validated high-performance liquid chromatography method for the determination of rifampicin and desacetyl rifampicin in plasma and urine**, Indian J. Pharmacol., 36 (2004) 231.
104. Y. YI LAUA, G.D. HANSON, B.J. CAREL, **Determination of rifampin in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection**, J. Chromatogr., B, 676 (1996) 147.
105. K.J. SWART, M. PAPGIS, **Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of rifampicin in plasma**, J. Chromatogr., A, 593 (1992) 21.
106. H. KATAOKA, A. ISHIZAKI, Y.N.K. SAITO, **Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review**, Anal. Chim. Acta 655 (2009) 8.
107. H., KATAOKA, **Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application – a review**, Anal. Bioanal. Chem., 373 (2002) 31.

108. M.E.C., QUEIROZ, F.M., LANÇAS, **Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência**, Quím. Nova., 28 (2005) 880.
109. H. KATAOKA, K. SAITO, **Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis**, J. Pharm. Biomed. Anal., 54 (2011) 926.
110. H. KATAOKA, S. NARIMATSU, H.L.LORD, J. PAWLISZYN, **Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the determination of beta-blockers and metabolites in urine and serum samples**, Anal. Chem. 71 (1999) 4237.
111. T.K. MAZAWA, K.P. LEE, O. SATO, O. SUZUKI, **Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis**, Anal. Chim. Acta., 492 (2003) 49.
112. H. LORD, J. PAWLISZYN, **Microextraction of drugs**, J. Chromatogr. A., 902 (2000) 17.
113. H. KATAOKA, E. MATSUURA, K. MITANI, **Determination of cortisol in human saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry**, J. Pharm. Biomed. Anal., 44 (2007) 160.
114. W. MULLET, K. LEVSEN, J. BORLAK, G. WUNSCH, J. PAWLISZYN. **Verapamil drug metabolism studies by automated in-tube solid phase microextraction**, J. Pharm. and Biomed., Anal. 30 (2002) 307.
115. W. MULLETT, P. MARTIN, J. PAWLISZYN, **In-Tube Molecularly Imprinted Polymer Solid-Phase Microextraction for the Selective Determination of Propranolol**, Anal. Chem., 73 (2001) 2383.
116. J. WU, H. LORD, H. J. PAWLISZYN, H. KATAOKA, **Polypyrrole-coated capillary in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry for the**

determination of β -blockers in urine and serum samples, J. Microcol. Sep., 12 (2000) 255.

117. Y. H. MESTER, Z., LORD, H., PAWLISZYN., **Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry for the determination of selected benzodiazepines**, J. Anal. Toxicol. 24 (2000) 718.

118. J. K. KAWAZOE, M., SAITO, Y., TAKEICHI, T., HAYASHIDA, **Sample preparation with fiber-in-tube solid-phase microextraction for capillary electrophoretic separation of tricyclic antidepressant drugs in human urine**, Electrophoresis. 22 (2001) 3785.

119. W. MULLET, K. LEVSEN, J. BORLAK, G. WUNSCH, J. PAWLISZYN., **Verapamil drug metabolism studies by automated in-tube solid phase microextraction**, J. Pharm. and Biomed. Anal., 30 (2002) 307.

120. W. M. MULLETT, K. LEVSEN, D.LUBDA, J. PAWLISZYN, **Bio-compatible in-tube solid-phase microextraction capillary for the direct extraction and high-performance liquid chromatographic determination of drugs in human serum**, J. Chromatogr. A 963 (2002) 325.

121. Y. FAN, Y.-Q., FENG, Z.-G. SHI, **Poly (methacrylic acid–ethylene glycol dimethacrylate) monolithic capillary for in-tube solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography and its application to determination of basic drugs in human serum**, Anal. Chim. Acta. 523 (2004) 251.

122. M. ZHANG, Y. FAN, Y. WEN, B. XIANG, Y.-Q. FENG. **Biocompatible in-tube solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma and urine**, J. Chromatogr. B. 828 (2005) 62.

123. YI F. YU-QI FENG, JIAN-T. ZHANG, SHI-L. DA, M. ZHANG, **Poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith in-tube solid**

phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography and analysis of amphetamines in urine samples, J. Chromatogr. A, 1074 (2005) 9.

124. M. E. C. QUEIROZ, E.B. OLIVEIRA, F. BRETON, J. PAWLISZYN, **Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry for analysis of fluoxetine in serum samples**, J. Chromatogr. A, 1174 (2007) 72.

125. B.J.A. SILVA, F. M., LANÇAS, M. E. C., QUEIROZ, **In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC-UV) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma**, J. Chromatogr. A 862 (2008) 181.

126. B. J. G. SILVA, F. M. LANCA, M. E. C. QUEIROZ, **Determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by polypyrrole-coated capillary in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection**, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 8590.

127. M. ZHENG, S. WANG, W. HU, Y. FENG, **In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography–mass spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma**, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 7493.

128. J. HEA, Z. LIUA, L. RENA, **On-line coupling of in-tube boronate affinity solid phase microextraction with high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of cis-diol biomolecules**, Talanta 82 (2010) 270.

129. K. SAITO, K. YAGI, A. ISHIZAKI, H. KATAOKA, **Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry**, J. Pharm. and Biomed. Anal. 52 (2010) 727.

130. A. R. CHAVES, B.J.G. SILVA, F.M. LANCAS, M.E.C. QUEIROZ, **Biocompatible in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection for determination of interferon α in plasma samples**, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 3376.
131. M. ZOLEZZI, **Antituberculosis agents and carbamazepine**, Am. J. Psychiatry., 159 (2002) 874.
132. K. CHAN, **Rifampicin concentrations in cerebrospinal fluid and plasma of the rabbit by high performance liquid chromatography**, Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 8 (1986) 721.
133. H. KATAOKA, H.L. LORD, J. PAWLISZYN, **Automated in-tube solid-phase microextraction–liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry for the determination of ranitidine**, J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl., 731 (1999) 353.
134. H. KATAOKA, S. NARIMATSU, H.L. LORD, J. PAWLISZYN, **Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Determination of β -Blockers and Metabolites in Urine and Serum Samples**, Anal. Chem., 71 (1999) 4237.
135. H. KATAOKA, H.L. LORD, J. PAWLISZYN, **Simple and Rapid Determination of Amphetamine, Methamphetamine, and Their Methylenedioxy Derivatives in Urine by Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry**, J. Anal. Toxicol., 24 (2000) 257.
136. L. BAIETTO, A.D. AVOLIO, F.G. ROSA, *et al*, **Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin, and rifampicin in human plasma**, Anal. Bioanal. Chem., 396 (2010) 791.