ARIANE MORGUETTI NOGUEIRA

**Desenvolvimento, avaliação e aplicações de novas fases para extração
por sorção em barra de agitação (SBSE)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos, da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de mestre em Ciências

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2007

*Dedico este trabalho aos
meus pais, Odair e Leonice e aos
meus irmãos, Adriano e André*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em minha vida.

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças, pela oportunidade, orientação e estímulo para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Carlos Rodrigues, pela grande e valiosa colaboração com o trabalho, pelas sugestões e pelo desenvolvimento do molde e da interface.

À Prof. Dra. Maria Eugênia Costa Queiroz e ao Prof. Dr. Dermeval de Carvalho pelo fornecimento de alguns padrões analíticos utilizados. Ao Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chieriche pelo fornecimento da poliuretana.

À todos os colegas e funcionários do Laboratório de Cromatografia, que durante o trabalho colaboraram com o mesmo. Em especial, à Elaine e Odete pela ajuda e paciência que sempre tiveram em me atender. Ao Daniel pelo auxílio no desenvolvimento das barras. Ao Wendel e à Gabriela pelo fornecimento do PDMS. À Claudete pela amizade e grande ajuda com treinamentos e discussões. Ao Guilherme pelo treinamento em HPLC. Ao Álvaro e ao Christian pelas discussões e valiosas sugestões.

Às funcionárias da Biblioteca do IQSC, às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação e aos funcionários da Oficina Mecânica, pela atenção que tiveram comigo durante o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, pelo amor, carinho, apoio e incentivo que sempre dedicaram a mim, pela grandiosa ajuda durante todo este tempo que estou distante, sem a qual não seria possível a execução deste trabalho.

Aos meus irmãos queridos e à minha sobrinha pela amizade, amor, carinho, incentivo, pela alegria de nossos encontros e pela colaboração com o meu mestrado.

Às minhas avós, Alice e Angelina, pelo amor e incentivo que sempre dedicaram a mim.

À toda minha família pelo carinho e apoio durante todo trabalho.

Ao Fernando e aos seus pais, Márcia e Jamal, pelo carinho e incentivo.

Às amigas que fiz em São Carlos e que dividiram muitos momentos de minha vida aqui: Ana Carla, Ana Cláudia, Carol, Clarissa, Cláudia, Fabiana, Fernanda, Francine, Paula e Raquel, pelas alegrias divididas durante todo o tempo.

À todos que colaboraram direta ou indiretamente para que eu pudesse concluir este trabalho.

*São precisamente as perguntas
sem resposta que marcam os limites
da possibilidade humana e que
traçam as fronteiras de nossa
existência.*

(Milan Kundera)

RESUMO

Neste trabalho desenvolveram-se diferentes tipos de barras para extração por sorção em barras de agitação (SBSE). Esta técnica foi desenvolvida para extrair analitos orgânicos de matrizes aquosas por meio da sorção destes em uma barra de agitação. As barras comerciais consistem em um magneto inserido no interior de um tubo de vidro, o qual é recoberto por uma camada de poli(dimetilsiloxano) (PDMS). A SBSE apresenta várias vantagens em relação às técnicas de extração convencionais, tais como: não utiliza solvente orgânico, não requer instrumentação analítica sofisticada, as barras de extração são reutilizáveis e, principalmente, possui um volume maior de recobrimento quando comparada com a microextração em fase sólida. As barras desenvolvidas para este estudo contêm fases mais seletivas, já que, comercialmente disponível, existe apenas um único tipo de recobrimento - o PDMS. Estas barras “home-made” foram preparadas com PDMS modificado com diferentes tipos de fases, as quais são usualmente empregadas no preparo de colunas de cromatografia gasosa. O objetivo desta modificação foi aumentar a polaridade das mesmas e, conseqüentemente, melhorar a eficiência e a seletividade da extração para analitos com características mais polares. As barras desenvolvidas foram aplicadas para a análise de anticonvulsivantes e antidepressivos em plasma humano e também para a análise de anti-helmínticos em plasma bovino. Em todas as aplicações realizadas, as barras “home-made” demonstraram um aumento de seletividade quando comparadas à barra comercial. Além disso, as barras foram empregadas em estudos visando o acoplamento entre as técnicas SBSE e HPLC, através de uma interface desenvolvida no Laboratório de Cromatografia. O acoplamento apresentou bons resultados para a análise de antidepressivos em plasma humano, sendo observada uma maior dessorção em temperaturas mais altas, devido ao aumento da transferência de massa dos analitos, do recobrimento da barra “home-made” para o solvente de dessorção.

ABSTRACT

The development of different kinds of bars for stir bar sorptive extraction (SBSE) was described in this work. This technique has been applied for the extraction of organic compounds from aqueous matrices due to their sorption on the stir bar. Stir bars are composed of a magneto inserted into a glass tube and coated with a polydimethylsiloxane (PDMS) layer. SBSE presents many advantages over the conventional extraction techniques such as, solventless sample preparation, simple analytical instrumentation, reuse of stir bars and mainly the higher volume of coating when compared to solid phase microextraction. The bars have been developed with more selective phases, once the unique commercially available bar presents the disadvantage of being coated solely with PDMS polymer. The home-made stir bars were prepared using PDMS modified with different materials, often used in gas chromatography columns. The goal of this modification was to increase coating polarity and to improve efficiency and selectivity of the extraction for polar compounds. The developed bars were applied to the analysis of anticonvulsivant and antidepressant in human plasma and anthelmintic in bovine plasma. In all applications, the home-made bars showed better selectivity when compared to commercial bars. An interface for coupling SBSE to HPLC developed at Laboratory of Chromatography was also evaluated for antidepressant analysis in human plasma. This coupling presented satisfactory results, being desorption more efficient when high temperatures was used. Temperature increases affinity between analytes and desorption solvent.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Cartucho típico empregado em SPE [5].	19
Figura 2. Dispositivo utilizado em SPME. Adaptado de [11].	20
Figura 3. Barra de agitação para SBSE disponível comercialmente. Adaptado de [13].	21
Figura 4. Esquema de uma extração por SBSE. Adaptado de [14].	22
Figura 5. Recuperação como função da razão entre o coeficiente de partição octanol/água e a relação de fases ($K_{o/w}/\beta$) para a extração por SPME e SBSE. Adaptado de [16].	24
Figura 6. Recuperação teórica de analitos por SBSE e SPME de uma amostra aquosa (10 mL) como função do seu coeficiente de partição octanol-água. Volume de PDMS na fibra de SPME: 0,5 μL . Volume de PDMS na barra magnética: 100 μL . Adaptado de [16].	25
Figura 7. Análise de 60 mL de água fortificada com PAHs. Em ambos os casos o tempo de equilíbrio usado foi de 30 minutos. Em SBSE a fortificação utilizada foi de 30 ng L^{-1} e em SPME, 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Adaptado de [12].	26
Figura 8. Estrutura química do polidimetilsiloxano (PDMS).	27
Figura 9. Comparação dos mecanismos de extração por adsorção e absorção. Diagramas da esquerda ilustram os estágios iniciais dos processos e diagramas da direita ilustram a condição de equilíbrio. Adaptado de [19].	29
Figura 10. Esquema da barra de extração de SBSE de fase-dupla. Adaptado de [33].	31
Figura 11. Estrutura química de alguns polisiloxanos. Adaptado de [7].	32
Figura 12. Estrutura química do polidietilenoglicolsuccinato (DEGS). Adaptado de [16].	33
Figura 13. Estrutura química dos anticonvulsivantes.	40
Figura 14. Estrutura química dos antidepressivos.	41
Figura 15. Estrutura química dos anti-helmínticos.	42
Figura 16. Esquema de extração por SBSE.	49
Figura 17. Dessorção com solvente.	50
Figura 18. Diagrama esquemático da câmara de dessorção da interface com aquecimento SBSE-HPLC.	51

Figura 19. Fotografia da (A) interface SBSE-LC interligada ao sistema cromatográfico, com detalhe para (B) a câmara de dessorção sem o bloco de aquecimento e (C) com o bloco de aquecimento.....	52
Figura 20. Frasco utilizado na imobilização dos filmes de siloxanos na superfície do tubo de sílica fundida com azo-t-butano.	53
Figura 21. Frasco usado para o entrecruzamento do PDMS com as fases empregadas na sua modificação, utilizando azo-t-butano.	56
Figura 22. Esquema do molde utilizado para o desenvolvimento das barras “home-made”.	60
Figura 23. Esquema (A) e foto (B) de uma barra desenvolvida com a utilização do molde.....	61
Figura 24. Resposta obtida na análise de anticonvulsivantes em plasma humano empregando uma barra PDMS contendo 5% de OV-17-OH, com e sem a etapa de entrecruzamento.	62
Figura 25. Cromatograma dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) obtido após extração com barra “home-made” de poliuretana pura [PU].	64
Figura 26. Cromatograma dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) obtido após extração com barra “home-made” de poliuretana contendo 2% de carbono [PU-2C].	64
Figura 27. Cromatograma dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) obtido após extração com barra “home-made” de poliuretana contendo 3% de carbono [PU-3C].	65
Figura 28. Cromatograma dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) obtido após extração com barra “home-made” de poliuretana contendo 5% de carbono [PU-5C].	65
Figura 29. Cromatograma dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) obtido após extração com barra “home-made” de poliuretana contendo 10% de carbono [PU-10C].	66
Figura 30. Cromatograma dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) obtido após extração com barra “home-made” de poliuretana contendo 20% de carbono [PU-20C].	66
Figura 31. Comparação das extrações dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) usando a barra de poliuretana pura [PU] e de poliuretana modificada com diferentes porcentagens carbono [PU-xC].	67
Figura 32. Comparação das extrações dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) usando a barra de poliuretana contendo 5% de carbono [PU-5C] (—) e a barra comercial de PDMS (—).	69

Figura 33. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de uma barra desenvolvida de PDMS.....	70
Figura 34. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de uma barra desenvolvida de PDMS contendo 50% de OV-17-OH.....	71
Figura 35. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de uma barra desenvolvida de poliuretana pura [PU].....	72
Figura 36. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de uma barra desenvolvida de poliuretana contendo 5% de carbono [PU-5C].	73
Figura 37. Espectro de infravermelho do recobrimento de PDMS.	74
Figura 38. Espectro de infravermelho do recobrimento de PDMS/OV-17-OH.....	75
Figura 39. Espectro de infravermelho do recobrimento de PU.	76
Figura 40. Cromatograma obtido após a extração dos anticonvulsivantes: fenobarbital (1), epóxido-carbamazepina (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) usando uma barra “home-made” de PDMS contendo 5% de OV-17 com OH terminal.	77
Figura 41. Cromatograma obtido após a extração dos anticonvulsivantes: fenobarbital (1), epóxido-carbamazepina (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) usando uma barra “home-made” de PDMS contendo 10% de DEGS.	78
Figura 42. Cromatograma obtido após a extração dos anticonvulsivantes: fenobarbital (1), epóxido-carbamazepina (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) usando uma barra “home-made” de PU contendo 5% de carbono.....	78
Figura 43. Comparação das extrações dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) usando a barra desenvolvida de PDMS contendo 5% de OV-17-OH (—), a de PDMS contendo 10% de DEGS (—) e a de PU contendo 5% de carbono (—).	79
Figura 44. Cromatograma obtido após a extração dos anticonvulsivantes: fenobarbital (1), epóxido-carbamazepina (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) em plasma humano usando uma barra comercial de PDMS.....	80
Figura 45. Cromatograma obtido após a extração dos anticonvulsivantes: fenobarbital (1), epóxido-carbamazepina (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) em plasma humano usando uma barra “home-made” de PDMS contendo 50% de OV-17 com OH terminal.....	81
Figura 46. Cromatograma obtido após a extração dos anticonvulsivantes: fenobarbital (1), epóxido-carbamazepina (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) em plasma humano usando uma barra “home-made” de PU contendo 5% de carbono [PU-5C].....	81

Figura 47. Comparações das áreas obtidas da extração dos anticonvulsivantes com uma barra comercial, uma barra “home-made” de PDMS contendo 50% de OV-17-OH e uma de PU contendo 5% de carbono.	83
Figura 48. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com a barra comercial.	84
Figura 49. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com a barra “home-made” de PDMS contendo 5% de OV-17 com vinil terminal.	85
Figura 50. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com a barra “home-made” de PDMS contendo 5% de OV-17 com OH terminal.	85
Figura 51. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com a barra “home-made” de PDMS contendo 10% de OV-17.	86
Figura 52. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com a barra “home-made” de PDMS contendo 10% de Silar 5-CP.	86
Figura 53. Gráfico da comparação das áreas obtidas da análise dos antidepressivos utilizando-se uma barra comercial e diferentes tipos de barras “home-made” de PDMS modificado.	87
Figura 54. Comparação das extrações dos dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com uma barra comercial (—) e uma barra desenvolvida de PU pura (—).	88
Figura 55. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com uma barra “home-made” de PU contendo 1% de carbono.	89
Figura 56. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com uma barra “home-made” de PU contendo 5% de carbono.	89
Figura 57. Gráfico da comparação das áreas obtidas da análise dos antidepressivos utilizando-se uma barra comercial, uma barra “home-made” de PU e de PU contendo diferentes porcentagens de carbono.	90
Figura 58. Cromatograma da extração dos antidepressivos: mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3), sertralina (4) realizada com a barra comercial.	91
Figura 59. Cromatograma da extração dos antidepressivos: mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3), sertralina (4) realizada com uma barra “home-made” de PDMS contendo 20% de OV-17 com vinil terminal.	92

Figura 60. Cromatograma da extração dos antidepressivos: mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3), sertralina (4) realizada com uma barra “home-made” de PDMS contendo 50% de OV-17 com OH terminal.....	92
Figura 61. Cromatograma da extração dos antidepressivos: mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3), sertralina (4) realizada com uma barra “home-made” de PDMS contendo 30% de pirrol.....	93
Figura 62. Cromatograma da extração dos antidepressivos: mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3), sertralina (4) realizada com uma barra “home-made” de PDMS contendo 50% de Silar 10C.....	93
Figura 63. Cromatograma da extração dos antidepressivos: mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3), sertralina (4) realizada com uma barra “home-made” de PDMS contendo 50% de DEGS.....	94
Figura 64. Gráfico da comparação das áreas obtidas da análise dos antidepressivos em plasma humano utilizando-se uma barra comercial e diferentes tipos de barras “home-made”.....	95
Figura 65. Cromatograma da extração da ivermectina com a barra comercial.....	96
Figura 66. Cromatograma da extração da ivermectina com a barra “home-made” de PDMS contendo 5% de OV-17-OH.....	97
Figura 67. Cromatograma da extração da ivermectina com a barra “home-made” de PDMS contendo 10% de DEGS.....	97
Figura 68. Cromatograma da extração da ivermectina com a barra “home-made” de poliuretana contendo 5% de carbono.....	98
Figura 69. Cromatograma comparando a extração da ivermectina realizada com a barra comercial (—) comparada com uma barra “home-made” de PDMS contendo 5% de OV-17-OH (—), com uma barra “home-made” de PDMS contendo 10% de DEGS (—) e com uma de poliuretana contendo 5% de carbono (—).....	99
Figura 70. Cromatograma da extração de sulfóxido de albendazol (1), albendazol sulfona (2), mebendazol (3) e albendazol (4) em plasma bovino feita com uma barra “home-made” de poliuretana.....	100
Figura 71. Cromatograma da extração de sulfóxido de albendazol (1), albendazol sulfona (2), mebendazol (3) e albendazol (4) em plasma bovino feita com uma barra “home-made” de poliuretana contendo 5% de carbono.....	100
Figura 72. Cromatograma da extração de sulfóxido de albendazol (1), albendazol sulfona (2), mebendazol (3) e albendazol (4) em plasma bovino feita com uma barra “home-made” de poliuretana contendo 10% de DEGS.....	101
Figura 73. Gráfico da comparação das áreas obtidas da análise de albendazol em plasma bovino utilizando-se uma barra “home-made” de PU, uma de PU contendo 5% de carbono e uma barra de PU contendo 10% de DEGS.....	102

- Figura 74.** Cromatograma da análise dos antidepressivos fluoxetina (1) e clomipramina (2) em plasma humano através do acoplamento SBSE-HPLC: (—) temperatura ambiente; (—) 40 °C e (—) 60 °C..... 106
- Figura 75.** Cromatograma de extração da mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3) e sertralina (4) usando uma barra “home-made” de PDMS contendo 20% de OV-17-vinil. Comparação do processo com dessorção “off-line”(—) e “on-line” (—)..... 107
- Figura 76.** Cromatograma de extração da mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3) e sertralina (4) usando uma barra “home-made” de PDMS contendo 20% de OV-17-vinil. Dessorção em diferentes temperaturas: ambiente (—), a 45°C (—) e a 60°C (—). 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dimensões das barras de SBSE disponíveis comercialmente.	21
Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas nas análises dos anticonvulsivantes utilizando as barras de poliuretano com carbono.	45
Tabela 3. Condições cromatográficas utilizadas nas análises dos anticonvulsivantes em água.	46
Tabela 4. Condições cromatográficas utilizadas nas análises dos anticonvulsivantes em plasma.	46
Tabela 5. Condições cromatográficas utilizadas nas análises dos antidepressivos em água e em plasma.	47
Tabela 6. Condições cromatográficas utilizadas nas análises da ivermectina em plasma.....	47
Tabela 7. Condições cromatográficas utilizadas nas análises do albendazol, mebendazol, sulfona e sulfóxido de albendazol em plasma.	47
Tabela 8. Condições cromatográficas utilizadas na análise da Fluoxetina e Clomipramina.....	48
Tabela 9. Valores de log K_o/w e K_o/w para os antidepressivos.	83
Tabela 10. Valores de log $K_{O/W}$ e $K_{O/W}$ para os antidepressivos.	95
Tabela 11. Valores obtidos para a recuperação dos anticonvulsivantes.	103
Tabela 12. Valores obtidos para a recuperação dos antidepressivos.	103
Tabela 13. Valores obtidos para a recuperação da ivermectina.....	103

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. PREPARO DE AMOSTRAS	18
1.2. EXTRAÇÃO POR SORÇÃO EM BARRAS DE AGITAÇÃO (SBSE)	21
1.3. POLISILOXANOS.....	31
1.4. POLIURETANAS	32
1.5. OUTROS TIPOS DE MATERIAIS UTILIZADOS	33
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. OBJETIVOS GERAIS	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
2.3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1. REAGENTES E PADRÕES	39
3.2. AMOSTRAS ANALISADAS.....	44
3.3. INSTRUMENTAÇÃO	44
3.4. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	45
3.5. PROCEDIMENTO PARA SBSE.....	48
3.5.1. Método de extração	48
3.5.2. Métodos de dessorção.....	49
3.5.2.1. Método de dessorção “off-line”	49
3.5.2.2. Método de dessorção “on-line”	50
3.6. DESENVOLVIMENTO DAS BARRAS “HOME-MADE”	52

3.6.1. Preparo das barras de PDMS	53
3.6.2. Preparo das barras de PDMS modificado.....	54
3.6.3. Preparo das barras de poliuretana (PU)	56
3.6.4. Preparo de barras de poliuretana com carvão ativo	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1. DESENVOLVIMENTO DAS BARRAS “HOME-MADE”	59
4.1.1. Barras preparadas com PDMS e PDMS modificado.....	61
4.1.2. Barras desenvolvidas de poliuretana e de poliuretana com carbono	63
4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS BARRAS “HOME-MADE”	69
4.3. APLICAÇÕES USANDO AS BARRAS DESENVOLVIDAS	77
4.3.1. Análise dos anticonvulsivantes em água	77
4.3.2. Análise dos anticonvulsivantes em plasma	80
4.3.3. Análise dos antidepressivos em água	84
4.3.3.1. Aplicações realizadas com as barras “home-made” de PDMS modificado	84
4.3.3.2. Aplicações realizadas com as barras de PU e PU modificada com carbono.....	88
4.3.4. Análise dos antidepressivos em plasma humano.....	91
4.3.5. Análise de ivermectina em plasma bovino	96
4.3.6. Análises de albendazol, mebendazol, albendazol sulfona e sulfóxido de albendazol em plasma bovino	99
4.4. RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS.....	102
4.5. ANÁLISE DE ANTIDEPRESSIVOS UTILIZANDO SBSE-LC “ON-LINE”	105
4.5.1. Análise de fluoxetina e clomipramina em plasma por SBSE-LC “on-line”	105
4.5.2. Análise da mirtazapina, fluoxetina, paroxetina e sertralina em plasma humano por SBSE-LC “on-line”	107
4.5.3. Vantagens e limitações da interface “home-made”	109
5. CONCLUSÕES	111
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. PREPARO DE AMOSTRAS

Uma das etapas mais importantes em um processo analítico é o preparo de amostras. O objetivo desta é isolar e concentrar os analitos a níveis adequados, e providenciar uma limpeza adequada da amostra (“clean up”), de modo a não comprometer a análise química, uma vez que matrizes na forma bruta podem gerar interferências e incompatibilidades com equipamentos analíticos [1].

Um levantamento realizado por Majors, envolvendo um grande número de técnicas analíticas, demonstrou que cerca de 60% do tempo total de análise é gasto no preparo da amostra, enquanto que apenas cerca de 6% do tempo é consumido para a determinação dos seus constituintes. Além de ser a etapa mais demorada do processo de análise de uma amostra, o seu preparo também é a etapa mais susceptível à introdução de erros [2,3].

Um exemplo é a extração líquido-líquido (LLE), uma das mais antigas técnicas utilizadas para o preparo de amostras, a qual consome muito tempo e grande quantidade de solventes, além de expor o analista a riscos ocupacionais. Além disso, muitas vezes a LLE necessita da repetição de suas etapas e ainda de um posterior “clean up” [4].

Visando a eliminação dos problemas da LLE, em meados da década de 1970, uma nova técnica foi introduzida, a extração em fase sólida (SPE). Do ponto de vista prático, a SPE, em sua forma mais simples e conhecida, comporta-se como uma cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna aberta, usualmente denominada cartucho de extração, a qual contém a fase sólida. Basicamente, a solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada com pequeno vácuo, de forma a percolar através dele. Depois de drenada toda a fase líquida, o analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume

de solvente, de forma a coletar o analito em concentração já apropriada para análise. A Figura 1 ilustra um exemplo típico de um cartucho para SPE [5]. Entretanto, assim como a LLE, esta técnica apresenta algumas limitações, como o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes da matriz, utilização de solventes orgânicos para eluição, variações analíticas entre cartuchos extratores e várias etapas operacionais para sua execução [6].

Devido a todas as desvantagens citadas anteriormente, nos últimos anos houve um desenvolvimento de técnicas mais rápidas de preparo de amostras, principalmente para a análise de amostras complexas. Além da rapidez, outras características são requeridas para um bom método de preparo de amostras: simplicidade, baixo custo, repetibilidade e ausência de solventes orgânicos. Algumas técnicas mais atuais, como extração com fluido supercrítico (SFE) e extração acelerada com solvente (ASE), têm cumprido alguns destes requisitos. Apesar da vantagem destas técnicas sobre aquelas clássicas, como a extração líquido-líquido e extração com soxhlet, ainda continuam necessitando de grande quantidade de solvente para sua execução [7].

Figura 1. Cartucho típico empregado em SPE [5].

Assim sendo, a miniaturização das técnicas de extração tem se tornado uma tendência dominante em química analítica [8]. A microextração em fase sólida (SPME) é um exemplo de técnica miniaturizada, a qual foi introduzida por Arthur e Pawliszyn no início da década de 1990 [9]. Basicamente, a SPME utiliza uma fibra de sílica fundida coberta com um polímero ou um sólido adsorvente. Na extração a fibra é exposta à amostra e os analitos são sorvidos pela fibra de acordo com o seu coeficiente de partição (K) entre a fase de recobrimento da fibra e a matriz da amostra [10]. Esta fibra é montada em um dispositivo baseado em uma seringa, chamado comercialmente de “holder”, como é ilustrado na Figura 2. Embora esta seja uma técnica simples e rápida, a aplicação torna-se limitada pela pequena quantidade de material extrator que reveste a fibra (geralmente $< 0,5 \mu\text{L}$). Assim, novas técnicas têm sido pesquisadas e, como resultado, recentemente surgiu a extração por sorção em barra de agitação (SBSE).

Figura 2. Dispositivo utilizado em SPME. Adaptado de [11].

1.2. EXTRAÇÃO POR SORÇÃO EM BARRAS DE AGITAÇÃO (SBSE)

A extração por sorção em barra de agitação, do inglês stir bar sorptive extraction (SBSE), foi desenvolvida para extrair analitos orgânicos de matrizes aquosas por meio de sorção (notadamente absorção) destes em um filme espesso de polidimetilsiloxano (PDMS), conforme descrito por Baltussen et al [12]. Utiliza-se, para tanto, uma barra de agitação composta por um magneto inserido no interior de um tubo de vidro, o qual é recoberto por uma camada de PDMS, como apresentado na Figura 3.

De maneira simplificada, o procedimento de extração pode ser descrito da seguinte forma: a barra magnética revestida com PDMS é inserida na fase aquosa a ser analisada e a extração/concentração dos compostos de interesse ocorre durante o processo de agitação (Figura 4). Após um determinado tempo de agitação, a barra é removida da amostra e os analitos são dessorvidos da barra e introduzidos na coluna analítica.

As barras disponíveis comercialmente apresentam comprimento de 10 ou 20 mm, com volume de PDMS variando de 24 a 126 μL (Tabela 1). As barras com volume menor de PDMS são empregadas para extração de compostos presentes em amostras de 10 a 50 mL, já as barras maiores são aplicadas para amostras com volume acima de 250 mL [12].

Tabela 1. Dimensões das barras de SBSE disponíveis comercialmente.

Comprimento do filme (mm)	Espessura do filme (mm)	Volume (μL)
10	0,5	24
10	1,0	63
20	0,5	47
20	1,0	126

Figura 3. Barra de agitação para SBSE disponível comercialmente. Adaptado de [13].

Figura 4. Esquema de uma extração por SBSE. Adaptado de [14].

O princípio de funcionamento da SBSE é semelhante ao da SPME, já que ambas as técnicas são baseadas no equilíbrio estabelecido entre a matriz a ser analisada e a superfície da fase de extração que apresenta alta afinidade pelos analitos [4]. Além disso, todos os parâmetros que afetam a extração por SPME também atuam sobre a extração por SBSE, dentre eles: tempo de extração, velocidade de agitação, temperatura, força iônica, pH, presença de solvente orgânico.

De acordo com a teoria da SBSE, a extração está relacionada com a constante de distribuição (K) do analito, definida como:

$$K = \frac{C_{\text{PDMS}}}{C_{\text{W}}} \quad (1.1)$$

em que,

K : constante de distribuição, ou coeficiente de partição, para um determinado analito entre PDMS e a fase aquosa;

C_{PDMS} : concentração do analito em PDMS (g/L);

C_{W} : concentração do analito na fase aquosa (g/L).

Muitos trabalhos fazem uma aproximação muito conveniente, correlacionando o coeficiente de partição PDMS/água ($K_{\text{PDMS/W}}$) de um dado analito com o seu respectivo

coeficiente de partição octanol/água ($K_{O/W}$), sendo este último um parâmetro facilmente encontrado na literatura, para um grande número de compostos de interesse. Sendo $K_{O/W}$ uma medida da polaridade de um analito, elevados valores são observados para compostos apolares e, conseqüentemente, estes estão presentes quase que exclusivamente na fase octanólica, após o equilíbrio. No equilíbrio PDMS/água, o mesmo mecanismo ocorre e, assim, analitos apolares, ou seja, com altos valores de K , serão encontrados principalmente na fase de PDMS [15].

Considerando-se a aproximação entre os valores $K_{O/W}$ e K , tem-se que:

$$K_{O/W} \cong K_{PDMS/W} = \frac{C_{PDMS}}{C_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \times \frac{V_W}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \times \beta \quad (1.2)$$

para a qual,

m_{PDMS} : massa do analito na fase PDMS (g);

m_W : massa do analito na fase aquosa (g);

V_{PDMS} : volume da fase de PDMS (L);

V_W : volume da fase aquosa (L);

β : razão entre o volume da fase aquosa e o volume da fase PDMS.

A equação 1.2 pode ser reescrita da seguinte maneira:

$$\frac{K_{O/W}}{\beta} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_O - m_{PDMS}} \quad (1.3)$$

em que,

m_O : massa total do analito presente originalmente na fase aquosa (g).

Finalmente, a equação 1.3 dá origem à relação que descreve a eficiência de extração ou a recuperação:

$$\text{Recuperação} = \frac{m_{PDMS}}{m_O} = \frac{\frac{K_{O/W}}{\beta}}{1 + \frac{K_{O/W}}{\beta}} \quad (1.4)$$

Durante o processo de extração os analitos se distribuem entre a fase aquosa da matriz e a camada de PDMS, sendo a constante de partição do analito e a razão entre as duas fases (PDMS e água) os únicos parâmetros que governam a recuperação [12].

A Figura 5 mostra o processo de extração de um analito em função da razão $K_{O/W}/\beta$. Quando esta razão é igual a um, a recuperação é de 50%. Quando os valores são superiores a 5, a extração do analito da matriz é essencialmente quantitativa [12].

Em dispositivos comerciais de SPME, o volume máximo de PDMS que recobre a fibra é de cerca de 0,5 μL (para fibras com filme de 100 μm de espessura). Para um volume de amostra típico de 10 mL, a razão entre as fases seria igual a $2 \cdot 10^4$. Isto significa que uma extração quantitativa somente seria obtida com a SPME no caso de compostos com $K_{O/W}$ superior a 10^5 , sendo essa condição satisfeita apenas por um número limitado de compostos [12].

Figura 5. Recuperação como função da razão entre o coeficiente de partição octanol/água e a relação de fases ($K_{O/W}/\beta$) para a extração por SPME e SBSE. Adaptado de [16].

Em contraste com a SPME, para SBSE a situação é muito mais favorável. Uma barra magnética revestida com 100 μL de PDMS poderia ser utilizada para uma amostra aquosa de 10 mL, resultando em um valor de β igual a 100, o que implicaria em extrações quantitativas para compostos com $K_{O/W}$ acima de 500. Além de possibilitar tais extrações, asseguraria significantes aumentos de sensibilidade para os compostos com $K_{O/W}$ abaixo de 10^5 [17].

Na Figura 6, a recuperação de analitos de uma amostra aquosa de 10 mL é apresentada para as técnicas de SPME e SBSE. É bastante claro que uma extração quantitativa para compostos com baixos $K_{O/W}$ é obtida com maior facilidade em SBSE do que em SPME. Para os casos de extrações incompletas utilizando SBSE, a calibração ainda é possível, sendo realizada de maneira muito análoga à SPME, ou seja, utilizando-se soluções aquosas nas quais foram adicionadas quantidades conhecidas de analitos como soluções-padrão [12].

Figura 6. Recuperação teórica de analitos por SBSE e SPME de uma amostra aquosa (10 mL) como função do seu coeficiente de partição octanol-água. Volume de PDMS na fibra de SPME: 0,5 μL . Volume de PDMS na barra magnética: 100 μL . Adaptado de [16].

Em um estudo realizado por Baltussen et al. [12], foi feita uma comparação da eficiência de extração de PAHs por SBSE (barra com 55 μL de PDMS) e SPME (fibra com 0,5 μL); os cromatogramas estão apresentados na Figura 7. O princípio de extração e a fase utilizada foram os mesmos em ambas as técnicas; contudo houve uma notável diferença na recuperação dos analitos. Em SBSE todos os compostos foram extraídos igualmente enquanto em SPME os compostos mais apolares foram extraídos em maior quantidade do que os menos apolares. Isso pode ser atribuído à relação de fases entre o revestimento de PDMS e a amostra aquosa.

As barras de SBSE comercialmente disponíveis são recobertas com apenas um tipo de polímero, o polidimetilsiloxano (PDMS). Este é uma fase líquida não-polar; sendo assim, extrai melhor os analitos de baixa polaridade, apresentando recuperações mais pobres para compostos com alta polaridade [14].

Figura 7. Análise de 60 mL de água fortificada com PAHs. Em ambos os casos o tempo de equilíbrio usado foi de 30 minutos. Em SBSE a fortificação utilizada foi de 30 ng L^{-1} e em SPME, 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Adaptado de [12].

O PDMS possui algumas características que o tornam adequado para o enriquecimento de analitos em amostras aquosas. Em primeiro lugar, os analitos não são retidos tão fortemente nas superfícies ativas do material extrator como no caso de outros adsorventes, sendo particionados ou dissolvidos no filme polimérico, distribuindo-se em toda sua espessura. Como este processo de dissolução ou associação é relativamente fraco, a degradação de analitos instáveis é significativamente menor ou ausente em PDMS quando comparada às associações com fases como sílica, alumina ou Florisil. Em segundo lugar, devido às fracas interações com os analitos, estes podem ser dessorvidos em temperaturas moderadas, minimizando as perdas de analitos termolábeis. Em terceiro, a capacidade de retenção do PDMS para um determinado analito não é influenciada pela presença de elevada quantidade de água, ou outros analitos, pois todos os solutos possuem o seu próprio equilíbrio de partição na fase polimérica e deslocamentos não ocorrem. Em quarto lugar, os fragmentos de degradação do filme de PDMS são facilmente reconhecidos com um detector de massas.

O PDMS (Figura 8) se comporta como um solvente orgânico típico, é altamente inerte e possui estabilidade térmica entre -100 °C e 350 °C [12].

Figura 8. Estrutura química do polidimetilsiloxano (PDMS).

A difusão dos analitos, da amostra para o meio extrator, ocorre até que seja atingido o equilíbrio entre as fases. A escolha do meio extrator deve ser feita baseada no princípio que estabelece que “semelhante extrai semelhante”, ou seja, uma substância terá alta afinidade pela fase com propriedades similares a ela. Isto significa que para um composto apolar que será extraído de uma matriz polar, deve ser utilizado um meio extrator apolar. Deve-se salientar que procedimentos como agitação ou sonicação são usados para promover melhor difusão dos analitos da amostra para o meio extrator [18].

Esta difusão inicia-se imediatamente após a introdução da barra de agitação na amostra a ser analisada. O processo de extração pode ocorrer por dois mecanismos: **absorção** e/ou **adsorção** [10]. Em ambos os casos, o processo de extração se inicia pela **adsorção** do analito na superfície da barra; se o coeficiente de difusão do analito na fase estacionária for alto, ocorre a partição do analito entre as duas fases e a extração ocorre por **absorção**. Por outro lado, se o coeficiente de difusão for baixo, o analito permanece na superfície da barra e a extração ocorre por **adsorção**. A Figura 9 ilustra os estágios inicial e final dos processos de extração por **adsorção** e **absorção** [10, 19].

Além disso, enquanto a **absorção** é um processo não competitivo, **adsorção** é competitivo e uma molécula com afinidade maior pelo recobrimento pode deslocar uma molécula com menor afinidade. Dessa forma, a quantidade de analito extraída por uma barra pode ser significativamente afetada pela composição da matriz da amostra [19].

Figura 9. Comparação dos mecanismos de extração por adsorção e absorção. Diagramas da esquerda ilustram os estágios iniciais dos processos e diagramas da direita ilustram a condição de equilíbrio. Adaptado de [19].

A SBSE pode ser combinada com dessorção térmica e cromatografia gasosa (SBSE-TD-GC), sendo um sistema simples e muito sensível para análise de compostos voláteis e semi-voláteis. Um outro tipo de dessorção é realizado empregando-se solventes, sendo este modo utilizado para análise de compostos de elevada massa molecular e termolábeis, possibilitando a utilização da cromatografia líquida [12, 20].

A SBSE foi primeiramente aplicada na análise de poluentes orgânicos em água [12], isso devido à característica apolar do PDMS. Posteriormente, a técnica também foi utilizada combinada com a dessorção térmica e cromatografia gasosa na determinação de pesticidas apolares ou de polaridade média em água [21]; em alimentos [22], para diagnóstico em medicina [23] e na análise de fármacos em fluidos biológicos [20, 24-26]. Sendo assim, a SBSE usando barras revestidas apenas por PDMS é uma técnica muito sensível para análise de compostos voláteis e semi-voláteis. Porém, ela é menos eficiente na extração de compostos mais polares [27].

Uma forma de contornar o fato de existir apenas um tipo de recobrimento, quando se deseja analisar compostos de maior polaridade, é a derivatização do analito de interesse. Este enfoque tem se tornado comum para análise de fármacos em fluidos biológicos com posterior análise por cromatografia gasosa [28-31].

Na derivatização de amostras, nem sempre os analitos polares produzem espécies mais hidrofóbicas. Neste caso, a extração de compostos mais polares com barras revestidas por PDMS é limitada. Para superar esta limitação, uma nova barra de fase-dupla tem sido produzida e comercializada pela empresa Gerstel. Esta consiste de um tubo vazio de PDMS (1 cm de comprimento e 0,5-1 mm de espessura) que pode ser preenchido com o sorvente desejado (Figura 10). Até o presente somente os materiais carbonáceos foram avaliados como sorventes de preenchimento. Os resultados obtidos por Bicchi et al. [32] revelaram o importante aumento no rendimento da extração de compostos mais polares (compostos voláteis do café e pesticidas) comparados com aqueles conseguidos usando o tubo vazio de PDMS [33].

Além disso, para análise de cafeína e metabólitos em fluidos biológicos, Lambert et al. [34], desenvolveram barras de SBSE baseadas em materiais de acesso restrito (RAM), as quais apresentaram boa robustez e simplicidade no preparo das amostras. Recentemente, Zhu et al. [35] relataram a capacidade das barras de extração de SBSE recobertas com polímeros sintéticos com impressão molecular, mais conhecidos como MIP (“Molecular Imprinted Polymers”) para extração de monocrotofos. Hu et al. [36] utilizaram a técnica sol-gel na preparação de barras com polidimetilsiloxano e β -ciclodextrina (PDMS/ β -CD) na análise de estrogênios e bisfenol A. Esta barra apresentou melhor seletividade para os compostos polares comparada com as barras de PDMS e maior capacidade de extração quando comparada com fibras de SPME.

Figura 10. Esquema da barra de extração de SBSE de fase-dupla. Adaptado de [33].

A SBSE combinada com HPLC é um campo ainda não muito explorado, existindo poucas publicações nesta área. Já foram feitos estudos de PAHs em amostras de água [37] e em amostras de chás [38], pesticidas em laranja [39] e em mel [40], hormônios em amostras de água e urina [41], fluoxetina em plasma [42] e antidepressivos em amostras de plasma [43].

1.3. POLISILOXANOS

O único sorbente utilizado no revestimento das barras de SBSE, disponível comercialmente, é o PDMS, o qual já foi discutido no item anterior.

A principal característica dos polisiloxanos, em geral, é que suas propriedades de extração e dessorção estão presentes acima da temperatura de transição vítrea (T_g). Esta característica confere aos siloxanos comportamento análogo aos líquidos, e propriedades como constante de partição e difusão similares às dos solventes orgânicos, proporcionando boa solubilidade para a maioria dos analitos [16].

As características de polaridade dos polisiloxanos podem ser modificadas com a inserção de grupos fenil e cianopropil na cadeia polimérica. Esses compostos representam uma importante classe de polímeros a base de polisiloxanos com média polaridade [44], amplamente utilizados como fase estacionária para colunas capilares de cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC) para separar diferentes classes de compostos orgânicos. No

presente trabalho, estes polímeros foram utilizados para modificar o PDMS no desenvolvimento de barras para SBSE, uma vez que os grupos cianopropil e fenil presentes na cadeia polimérica dos polisiloxanos proporcionam momento dipolar à molécula, e podem melhorar a quantidade extraída por interações específicas com os analitos [7].

A Figura 11 ilustra a estrutura química de polisiloxanos nos quais grupos metil foram substituídos por grupos com características mais polares (por exemplo fenil, os quais são comercializados com as siglas OV-17 e cianopropil, comercializados com as siglas Silar, acompanhadas de números que correspondem à quantidade adicionada do polímero em questão). Vale ressaltar que foram citadas apenas as fases comerciais utilizadas neste trabalho, mas existem muitas outras com diferentes grupos substituintes.

Figura 11. Estrutura química de alguns polisiloxanos. Adaptado de [7].

1.4. POLIURETANAS

Outro tipo de polímero utilizado neste trabalho foi baseado em poliuretanas. Este termo se aplica à classe de polímeros que contém ligação uretana, mesmo que existam outras ligações presentes. Diferentemente de outros polímeros, as poliuretanas não contêm unidades uretanas repetidas de modo regular e não têm uma fórmula empírica que seja representativa

de um todo. Uma poliuretana típica pode conter, além dos grupos uretana, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, grupos éster, éter, uréia, amida, etc.

As poliuretanas são basicamente produto de uma reação de substâncias polihidroxiladas (polióis), com diisocianatos ou poliisocianatos, conforme reação descrita abaixo [45].

Esquema 1. Síntese da poliuretana.

1.5. OUTROS TIPOS DE MATERIAIS UTILIZADOS

Além das fases citadas anteriormente, foram utilizados outros tipos de materiais neste trabalho, tais como: polidietilenoglicolsuccinato (DEGS) e carvão ativo. O DEGS é um poliéster, sendo o mais importante de sua classe. Os poliésteres estão dentre os polímeros que exibem polaridade alta e estabilidade térmica entre 200 e 225 °C. Como o próprio nome sugere, os poliésteres são formados por macromoléculas de ésteres carboxílicos, a estrutura química do DEGS está apresentada na Figura 12. Frequentemente, as colunas cromatográficas preparadas com o DEGS, são utilizadas para analisar éster metílico de ácidos graxos saturados e insaturados, bem como pesticidas [46].

Figura 12. Estrutura química do polidietilenoglicolsuccinato (DEGS). Adaptado de [16].

O carvão ativo é sintetizado a partir de madeira e vegetais, sendo uma forma de carbono puro com grande porosidade. É um adsorvente bastante conhecido, muito utilizado devido a sua seletividade e capacidade de adsorção. Este material tem sido aplicado com sucesso como adsorvente em SPME, como por exemplo, na análise de flúor em creme dental [47]. Além disso, Wang et al. [48] relataram o preparo de fibras de SPME com carvão ativo e aplicaram na análise de BTEX e halocarbonos em água, obtendo bons resultados. Em SBSE este material também está sendo utilizado para o preparo de barras com fase dupla, assim como descrito anteriormente, já foi aplicado na análise de compostos voláteis presentes no café e em pesticidas [33].

2

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolvimento de novos tipos de recobrimentos para barras de SBSE. Avaliação das barras “home-made” para análise de fármacos e em fluidos biológicos, e comparação da eficiência destas com a das barras comerciais de PDMS.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Desenvolver novos tipos de recobrimento para barras de SBSE, utilizando PDMS, PDMS modificado com diferentes tipos de fases (usualmente empregadas no preparo de colunas cromatográficas de HRGC), poliuretanas e poliuretanas modificadas com carbono;
- 2 - Caracterização das barras desenvolvidas, empregando Infravermelho e Microscopia Eletrônica de Varredura;
- 3 - Avaliação das barras desenvolvidas no laboratório para análise de fármacos das classes dos anticonvulsivantes e antidepressivos, bem como fármacos de uso veterinário em fluidos biológicos (plasma);
- 4 - Realização de um estudo comparativo entre as barras magnéticas comerciais e as barras desenvolvidas recobertas com fases mais seletivas, ampliando as possibilidades de aplicação da SBSE.
- 5 - Estudo do acoplamento “on-line” SBSE-LC empregando interface “lab-made”.

2.3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

A SBSE, como descrita anteriormente, é uma técnica simples do ponto de vista instrumental; entretanto, não há produção comercial das barras de extração no Brasil. No momento, elas somente são produzidas comercialmente pela empresa alemã Gerstel. Por ser uma técnica muito recente e necessitar de importação, um kit contendo 10 barras com diferentes tamanhos (forma em que é comercializada) custa em torno de R\$10.000,00. Apesar do alto custo, a durabilidade das barras comerciais é pequena para amostras reais (aproximadamente 30 extrações), principalmente quando se trata de uma matriz complexa, como é o caso dos fluidos biológicos. As barras desenvolvidas neste trabalho apresentam um custo muito mais reduzido. Para uma barra de PDMS modificado, o custo total calculado foi de R\$ 20,00, para as demais barras este valor é ainda menor.

Além de ser uma técnica muito cara quando comparada às anteriores, sua principal desvantagem é o fato das barras comerciais serem recobertas apenas com um tipo de polímero, o PDMS, um recobrimento apolar e não-seletivo. Isto dificulta a análise de compostos semi-polares e polares, como é o caso de alguns analitos utilizados neste trabalho.

Devido a estes fatos, uma solução encontrada foi o desenvolvimento de barras no próprio laboratório para serem utilizadas em SBSE, com outros tipos de recobrimentos, e a um preço muito mais acessível.

3

Materiais e

Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES E PADRÕES

Os padrões analíticos dos anticonvulsivantes carbamazepina, 10, 11-epóxido-carbamazepina, fenobarbital e hidantoína, cujas estruturas químicas estão representadas na Figura 13, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinhein, Alemanha).

Os padrões de antidepressivos fluoxetina e paroxetina foram gentilmente doados pelas indústrias farmacêuticas Lilly (São Paulo, Brasil) e Libbs (São Paulo, Brasil), respectivamente. Citalopram, mirtazapina e sertralina foram doados pela Roche (São Paulo, Brasil). O padrão de cloridrato de clomipramina foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinhein, Alemanha). As estruturas dos antidepressivos estão representadas na Figura 14.

Os padrões de antihelmínticos albendazol, mebendazol, albendazol sulfona e sulfóxido de albendazol, cujas estruturas estão representadas na Figura 15, foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Dermeval de Carvalho da Biotox de Ribeirão Preto.

O padrão de ivermectina, cuja estrutura também está representada na Figura 15, foi adquirido da Wendt-Chemie (Hamburgo, Alemanha).

Para o preparo das soluções estoque dos anticonvulsivantes, antidepressivos, sulfóxido de albendazol e ivermectina, pesou-se 5 mg do padrão de cada composto e dissolveu-se em metanol, em um balão volumétrico de 5 mL. Para o albendazol, mebendazol e albendazol sulfona, as soluções estoques foram preparadas com 0,5 mg de cada padrão, dissolvido em metanol, em um balão volumétrico de 5 mL. As soluções de trabalho utilizadas no processo analítico foram preparadas com metanol, a partir da diluição das soluções estoque.

CARBAMAZEPINA

10, 11 EPÓXIDO CARBAMAZEPINA

FENOBARBITAL

HIDANTOÍNA

Figura 13. Estrutura química dos anticonvulsivantes.

CITALOPRAM

CLOMIPRAMINA

FLUOXETINA

MIRTAZAPINA

PAROXETINA

SERTRALINA

Figura 14. Estrutura química dos antidepressivos

IVERMECTINA

ALBENDAZOL

MEBENDAZOL

ALBENDAZOL SULFONA

SULFÓXIDO DE ALBENDAZOL

Figura 15. Estrutura química dos anti-helmínticos

O metanol (MeOH) e a acetonitrila (ACN), grau HPLC, utilizados no preparo das soluções estoque e na fase móvel foram adquiridos da Tedia (Fairfield, USA). Trietilamina, grau HPLC, empregada em testes para reduzir a assimetria dos picos foi adquirida da J. T. Baker (Phillipsburg, USA). Os sais usados no preparo das soluções tampão utilizadas como fase móvel, grau PA, foram: fosfato de potássio monobásico e dibásico da Mallinckrodt (Xalostoc, México), acetato de amônio da J. T. Baker (Xalostoc, México), carbonato de sódio da Synth (Diadema, Brasil). Ácido tricloroacético utilizado para precipitar as proteínas do plasma bovino foi adquirido da Alfa Aesar (Haverhill, USA).

Para o desenvolvimento das barras de SBSE utilizou-se pentano, adquirido da Merck (Rio de Janeiro, Brasil), carvão ativo adquirido da Synth (Diadema, Brasil) e azo-t-butano adquirido da Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, USA).

As fases utilizadas no recobrimento das barras foram: polidimetilsiloxano (PDMS) adquirido da Dow Corning Corporation com a marca Sylgard 184 (Midland, USA); OV-17-OH adquirido da Ohio Valley Specialty Chemical (Ohio, USA); polidietilenoglicolsuccinato (DEGS) adquirido da Analabs (North Haven, USA); OV-17-vinil, OV-17, Silar 5CP e Silar 10C adquiridos da Alltech (Deerfield, USA) e pirrol adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

A poliuretana, bem como o catalisador utilizado no processo de cura da mesma, foram gentilmente cedidos pelo Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros do Instituto de Química de São Carlos coordenado pelo Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chieriche.

3.2. AMOSTRAS ANALISADAS

As amostras de plasma humano branco, livres de anticonvulsivantes e antidepressivos e sorologicamente negativos para hepatite B e C, HIV, chagas e sífilis, foram cedidas pela Casa de Saúde e Maternidade São Carlos.

As amostras de plasma bovino branco, livres dos anti-helmínticos foram cedidas pelo Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste - CPPSE - da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa.

3.3. INSTRUMENTAÇÃO

Para analisar os padrões de anticonvulsivantes, antidepressivos e anti-helmínticos foi utilizado um cromatógrafo líquido modelo LC-10 A_{VP}, equipado com duas bombas (solvente orgânico e solvente aquoso) modelo LC-10A_i, forno para a coluna modelo CTO-10AS_{VP}, detector UV-Vis de comprimento de onda fixo modelo SPD-10A_{VP}, amostrador automático modelo Sil-10A_i, controlador de sistema modelo SCL-10 A_{VP} e software de aquisição de dados Class-VP, todos da empresa Shimadzu (Kioto, Japão).

As colunas cromatográficas utilizadas para as análises foram: SupelcosilTM LC-18 (15 cm x 4,6 mm, 5 µm) adquirida da Supelco (Bellefonte, USA) e Agilent Zorbax Eclipse XDB-18 (15 cm x 2,1 mm, 5µm) adquirida da Agilent Technologies (Santa Clara, USA).

As barras comerciais utilizadas tinham revestimento com 10 mm de comprimento, 0,5 mm de diâmetro, totalizando 24 µL de PDMS, e foram adquiridas da Gerstel (Mulheim an der Ruhr, Alemanha).

As fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas em um equipamento LEO-440, com um detector Oxford, operando com feixe de elétrons de 20

keV. As barras foram fixadas no suporte com uma fita de carbono e foram recobertas com 20 nm de ouro em um metalizador Balsers (modelo SDC 050).

Além disso, para a caracterização química dos materiais utilizados para o recobrimento das barras foi usado um espectrômetro de infravermelho Bomem Hartmann & Braun MB- Series (Quebec, Canadá). As amostras, neste caso, foram preparadas em um disco de sílicio de 13 x 2 mm, sendo feito o recobrimento de um dos lados do disco com a fase a ser caracterizada. Os espectros de absorção dos materiais foram obtidos na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} .

3.4. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Apesar da instrumentação empregada em todos os experimentos ser a mesma (item 3.3.), as condições experimentais e as colunas não foram mantidas constantes. A diversidade dos analitos estudados e suas características químicas, exigiram modificações de maneira a separar-se apropriadamente os compostos de interesse. As Tabelas 2 a 8 ilustram as condições experimentais usadas.

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas nas análises dos anticonvulsivantes utilizando as barras de poliuretana com carbono.

Coluna:	Supelcosil TM LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m)
Fase móvel:	tampão fosfato de potássio 0,010mol L ⁻¹ (pH 6,4)/ACN/MeOH (62:19:19, v/v/v)
Modo de eluição:	gradiente, variando a concentração dos solventes orgânicos de 38% para 70% durante os 20 minutos de análise.
Vazão da fase móvel:	0,8 mL min ⁻¹
Temperatura:	35 °C
Comprimento de onda:	210 nm
Volume injetado:	20 μ L

Tabela 3. Condições cromatográficas utilizadas nas análises dos anticonvulsivantes em água.

Coluna:	Agilent Zorbax Eclipse XDB-18 (150 x 2,1 mm, 5 μ m)
Fase móvel:	tampão fosfato de potássio 0,010mol L ⁻¹ (pH 6,4)/MeOH/ACN (60:20:20, v/v/v)
Modo de eluição:	isocrático
Vazão da fase móvel:	0,3 mL min ⁻¹
Temperatura:	35°C
Comprimento de onda:	210 nm
Volume injetado:	20 μ L

Tabela 4. Condições cromatográficas utilizadas nas análises dos anticonvulsivantes em plasma.

Coluna:	Agilent Zorbax Eclipse XDB-18 (150 x 2,1 mm, 5 μ m)	
Fase móvel:	tampão fosfato de potássio 0,010mol L ⁻¹ (pH 6,4)/MeOH/ACN	
Modo de eluição:	gradiente	
Programação:	tempo (min)	Quantidade de solvente orgânico (%)
	0,01	18:18
	4,00	23:23
	25,00	30:30
Vazão da fase móvel:	0,3 mL min ⁻¹	
Temperatura:	35°C	
Comprimento de onda:	210 nm	
Volume injetado:	20 μ L	

Tabela 5. Condições cromatográficas utilizadas nas análises dos antidepressivos em água e em plasma.

Coluna:	Agilent Zorbax Eclipse XDB-18 (150 x 2,1 mm, 5 μ m)
Fase móvel:	tampão acetato de amônio 0,025mol L ⁻¹ (pH 5,0) com trietilamina 0,025mol L ⁻¹ /ACN (35:65, v/v)
Modo de eluição:	isocrático
Vazão da fase móvel:	0,3 mL min ⁻¹
Temperatura:	35°C
Comprimento de onda:	210 nm
Volume injetado:	20 μ L

Tabela 6. Condições cromatográficas utilizadas nas análises da ivermectina em plasma.

Coluna:	Supelcosil TM LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m)
Fase móvel:	MeOH/H ₂ O (90:10, v/v)
Modo de eluição:	isocrático
Vazão da fase móvel:	0,8 mL min ⁻¹
Temperatura:	40°C
Comprimento de onda:	245 nm
Volume injetado:	20 μ L

Tabela 7. Condições cromatográficas utilizadas nas análises do albendazol, mebendazol, sulfona e sulfóxido de albendazol em plasma.

Coluna:	Supelcosil TM LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m)
Fase móvel:	tampão acetato de amônio 0,010 mol L ⁻¹ (pH 5,0)/ACN (65:35, v/v)
Modo de eluição:	isocrático
Vazão da fase móvel:	0,8 mL min ⁻¹
Temperatura:	35°C
Comprimento de onda:	290 nm
Volume injetado:	20 μ L

Tabela 8. Condições cromatográficas utilizadas na análise da Fluoxetina e Clomipramina.

Coluna:	Supelcosil TM LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m).
Fase móvel:	tampão acetato de amônio 0,050 mol L ⁻¹ (pH 5,5) com 0,1 % de Trietilamina/ACN (30:70, v/v)
Modo de eluição:	isocrático
Vazão da fase móvel:	0,8 mL min ⁻¹
Temperatura:	35°C
Comprimento de onda:	227 nm
Volume injetado:	20 μ L

3.5. PROCEDIMENTO PARA SBSE

3.5.1. Método de extração

As extrações de todos os fármacos estudados neste trabalho foram feitas da mesma maneira. Em um frasco de vidro de 20 mL, adicionou-se a amostra dos padrões em metanol, a serem analisados, na concentração de 10 μ g mL⁻¹ e evaporou-se sob fluxo de nitrogênio. Em seguida, adicionou-se 1 mL de plasma e 3 mL de solução tampão (utilizou-se diferentes tampões de acordo com cada analito). Para os anticonvulsivantes e para a ivermectina foi utilizada solução tampão fosfato de potássio, 0,060 mol L⁻¹; para os antidepressivos, solução tampão carbonato de sódio, 0,060 mol L⁻¹. Para o albendazol, mebendazol, albendazol sulfona e sulfóxido de albendazol utilizou-se solução tampão acetato de amônio, 0,010 mol L⁻¹. A seguir, adicionou-se 30% em massa de NaCl, esta mistura foi homogeneizada por 20 s, após este processo, colocou-se a barra de extração dentro do frasco e este foi lacrado. O tempo de extração foi de 30 minutos para todos os analitos, exceto para a ivermectina, que foi de 35 minutos. A temperatura de extração utilizada foi de 45°C e a velocidade de agitação de 1000 rpm para a barra comercial e de 400 rpm para as barras desenvolvidas, em todos os casos. O esquema de extração está ilustrado na Figura 16.

Figura 16. Esquema de extração por SBSE.

Nas análises da ivermectina realizou-se uma etapa de precipitação de proteínas do plasma bovino antes de iniciar a extração. Adicionou-se 0,5 mL de ácido tricloroacético em 1 mL de plasma bovino. Esta mistura foi submetida ao vórtex por um minuto, deixada em repouso por 20 minutos sob refrigeração e centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi utilizado na extração.

3.5.2. Métodos de dessorção

3.5.2.1. Método de dessorção “off-line”

Nesta etapa realizou-se a dessorção com solvente, da seguinte maneira: colocou-se um “insert” de 300 µL dentro de um frasco para amostrador automático de HPLC com capacidade de 1,5 mL, adicionou-se 200 µL de solvente e colocou-se a barra de SBSE com os analitos extraídos, conforme ilustrado na Figura 17. O solvente usado na dessorção consistiu em uma mistura de MeOH/H₂O (70/30, v/v), em todos os casos, exceto para a ivermectina (para a qual foi usada a mesma proporção da sua fase móvel de eluição). A seguir, após aquecer o banho de ultra-som a 60°C, colocou-se o frasco dentro do mesmo, com o auxílio de um suporte. O tempo de dessorção utilizado em todos os casos foi de 20 minutos. Após esta etapa, uma alíquota de 20 µL foi retirada e introduzida no injetor do sistema cromatográfico.

Figura 17. Dessorção com solvente.

3.5.2.2. Método de dessorção “on-line”

Para possibilitar o acoplamento entre as técnicas SBSE-LC foi desenvolvida uma interface no Laboratório de Cromatografia, com base em um projeto anterior, o qual visava o acoplamento SPME-LC.

A interface foi toda construída em aço 316 L (aço cirúrgico), por ser um material totalmente inerte. A câmara de dessorção foi projetada com um volume interno total de 100 μL , e fica envolvida por um bloco de aquecimento. As temperaturas da câmara e do bloco são mantidas constantes com a utilização de uma resistência de 25 W com 9,4 mm diâmetro e 39 mm de comprimento, e um termopar PT 100 adquiridos da Casa Ferreira (São Paulo, Brasil).

A Figura 18 mostra o diagrama esquemático da câmara de dessorção da interface com aquecimento SBSE-LC.

Figura 18. Diagrama esquemático da câmara de dessorção da interface com aquecimento SBSE-HPLC.

A interface para acoplamento SBSE-LC é composta por um módulo contendo uma válvula de 6 vias Valco (Houston, USA), a câmara de dessorção SBSE-LC, um bloco de aquecimento e o suporte para a interface, ilustrados na Figura 19.

Para efetuar a dessorção “on-line”, a barra é introduzida na câmara de dessorção com o auxílio de um suporte. A dessorção dos analitos é realizada no modo estático, ou seja, a barra permanece durante um certo intervalo de tempo, na interface, em contato com um volume de 100 μL de fase móvel (para os antidepressivos estudados este tempo foi 40 minutos). Terminado o tempo de dessorção, retira-se a barra da câmara, muda-se a válvula de injeção da posição “load” para a posição “inject” e os analitos são eluídos para a coluna analítica.

Figura 19. Fotografia da (A) interface SBSE-LC interligada ao sistema cromatográfico, com detalhe para (B) a câmara de dessorção sem o bloco de aquecimento e (C) com o bloco de aquecimento.

3.6. DESENVOLVIMENTO DAS BARRAS “HOME-MADE”

As primeiras barras de SBSE, desenvolvidas no Laboratório de Cromatografia, foram produzidas utilizando-se um capilar de sílica fundida de 630 μm de diâmetro externo e 530 μm de diâmetro interno, sendo selada uma barra de aço magnetizada no interior deste capilar. Em seguida, a fase a ser utilizada como recobrimento foi diluída com pentano em um frasco, no qual mergulhou-se o capilar de sílica, cuidando para que o recobrimento fosse uniforme por toda a extensão do mesmo. Este procedimento foi repetido por 3 vezes.

Para a imobilização do filme polimérico, foi utilizado o reagente azo-t-butano como gerador de radicais livres para as reações de entrecruzamento da cadeia de polisiloxanos. Esse procedimento foi realizado em uma câmara fechada, onde fixou-se a barra e adicionou-se 1 μL de azo-t-butano, conforme ilustra a Figura 20. Em seguida este frasco foi colocado no

forno a uma temperatura de 200°C. O procedimento de imobilização do filme polimérico, ilustrado na Figura 19 foi repetido 3 vezes.

Figura 20. Frasco utilizado na imobilização dos filmes de siloxanos na superfície do tubo de sílica fundida com azo-t-butano.

Como este método não se mostrou eficiente, houve a necessidade de realizar um outro meio de obtenção das barras. Sendo assim, desenvolveu-se um molde cilíndrico bipartido de teflon, onde uma barra de aço magnetizada de 2,5 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro foi presa por um suporte na sua parte superior. A fase utilizada como recobrimento é colocada no molde e a cura ocorre no seu interior.

3.6.1. Preparo das barras de PDMS

O PDMS adquirido comercialmente é constituído de uma fase viscosa e de um agente de cura. Para formar o polímero na consistência desejada para o preparo das barras de SBSE foi feita uma mistura dos dois na proporção 10:1 (m/m), respectivamente.

Aproximadamente 0,3 g da fase viscosa foi pesada em balança analítica em um frasco de vidro, seguido da adição de 0,03 g do agente de cura. Com uma pequena espátula de plástico, a fase foi misturada vigorosamente, por aproximadamente 5 minutos. Em seguida,

um sistema a vácuo foi montado no frasco para eliminar as bolhas que surgem devido ao processo de homogeneização, e a mistura ficou neste sistema por cerca de 15 minutos.

Com o auxílio de uma espátula, parte da mistura foi transferida com facilidade para a região do molde que envolve a barra magnética. Um excesso foi adicionado para garantir que toda a região ao redor da barra fosse preenchida quando as duas partes do molde fossem unidas.

Após adicionado o polímero, a barra foi posicionada no molde, e as duas partes foram unidas. Para garantir que não haveria vazamento, um suporte de aço foi colocado ao redor do molde e, por meio de um ajuste manual, o molde foi pressionado de forma que suas duas partes ficassem firmemente unidas.

Em seguida, o molde foi levado ao forno por uma hora, a uma temperatura de 60°C. Passado esse tempo, o mesmo foi resfriado a temperatura ambiente, e a barra revestida foi retirada do sistema. Contudo, o processo de cura do polímero ainda não está completo. Para completar o processo, a barra foi presa em uma de suas extremidades por um pequeno suporte de teflon impedindo que a camada polimérica entrasse em contato com a superfície. Feito isso, a mesma foi levada ao forno na temperatura de 40°C por 30 minutos. Após esse tempo, uma programação de aquecimento a 10°C/minuto foi realizada, até que a temperatura de 250°C fosse atingida, sendo mantida por duas horas. Realizado esse procedimento, a barra é armazenada e está pronta para uso.

3.6.2. Preparo das barras de PDMS modificado

O procedimento para o preparo de barras com PDMS modificado é análogo ao anteriormente discutido. Contudo, além do PDMS, uma nova fase, com característica mais polar, foi adicionada para efetuar a cura dentro do molde. As diferentes fases utilizadas para

modificação do PDMS foram fases usualmente empregadas no preparo de colunas de cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC). Da mesma forma que realizado anteriormente, foram pesadas na proporção de 10:1 (m/m) o PDMS e o agente de cura, respectivamente; contudo, uma pequena quantidade de uma fase com características diferentes do PDMS foi adicionada. Essa quantidade variou entre 5% e 50% em massa da quantidade total de polímero preparado. A adição de uma nova fase não modificou o aspecto viscoso do PDMS, e o mesmo foi facilmente transferido para o molde, da mesma forma como foi descrito anteriormente. A partir disso, a confecção das barras foi realizada da mesma maneira. O único aspecto que teve de ser modificado em relação ao procedimento descrito anteriormente foi a programação final do forno; a temperatura final que antes atingia 250°C teve de ser reduzida para temperaturas menores (200 °C e 180 °C), de acordo com a nova fase utilizada, cuidando para não atingir a temperatura de decomposição da mesma.

Ao final deste procedimento foi realizada uma etapa de entrecruzamento com azo-t-butano. Este procedimento foi feito da seguinte forma: em um frasco de vidro, colocou-se a barra presa em um suporte e adicionou-se 1 µL de azo-t-butano. O frasco foi levado ao forno à 200°C por uma hora e este mesmo procedimento foi repetido três vezes. A Figura 21 ilustra o sistema descrito.

Figura 21. Frasco usado para o entrecruzamento do PDMS com as fases empregadas na sua modificação, utilizando azo-t-butano.

3.6.3. Preparo das barras de poliuretana (PU)

O preparo da poliuretana é baseado na mistura de um polioli, cuja função é análoga ao agente de cura utilizado no PDMS, com a poliuretana.

Em um frasco de vidro, foi pesado o polioli e a poliuretana na proporção de 1:3 (m/m), respectivamente. Após homogeneização, o aspecto da mistura é ainda mais viscoso comparado com o PDMS, tornando-se mais fácil seu manuseio.

O procedimento adotado, portanto, é o mesmo que o mencionado anteriormente. A temperatura utilizada para a cura dentro do molde também foi de 60°C, por uma hora. Ao terminar este processo, a barra foi retirada do molde e não necessitou de aquecimento adicional para concluir a polimerização, a exemplo do que ocorre com o PDMS.

Contudo, um problema detectado na utilização desse polímero foi a quantidade de bolhas que surgem devido à reação de polimerização. Para solucionar o problema, a reação foi prolongada dentro do frasco de vidro e, com auxílio do sistema à vácuo, as bolhas foram retiradas gradativamente, antes da inserção do polímero no molde.

3.6.4. Preparo de barras de poliuretana com carvão ativo

Barras de poliuretana com diferentes quantidades de carvão ativo foram produzidas. Essas quantidades foram definidas como o percentual em massa de carbono na mistura total da poliuretana com o polioliol.

Desta forma, as quantidades das primeiras barras produzidas variavam entre 0,5% e 5%. A massa necessária de carvão para cada uma dessas proporções foi pesada em frasco de vidro, seguida da adição da poliuretana e do polioliol. O procedimento a partir desse ponto é análogo ao já citado anteriormente.

Contudo, as barras com concentrações acima de 2% mostraram problemas. O tempo excessivo necessário para a cura do polímero fazia com que o carvão se dispersasse no molde, gerando falhas no recobrimento. A solução encontrada foi a obtenção de um agente catalisador. Uma pequena gota dessa substância foi suficiente para acelerar a velocidade da reação de forma expressiva. Dessa forma, foi possível aumentar as concentrações de carbono em até 20%, além de tornar o procedimento muito mais prático.

4

Resultados e

Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DESENVOLVIMENTO DAS BARRAS “HOME-MADE”

As primeiras barras desenvolvidas no laboratório foram preparadas em capilares de sílica. Porém, este procedimento mostrou-se falho em diversos aspectos, especialmente pelo fato de que os capilares apresentam uma grande fragilidade, dificultando seu manuseio, pois com um leve impacto o capilar já se partia. Por ser de espessura muito fina, contendo uma barra de aço magnetizada muito pequena, a barra não promovia uma agitação eficiente da amostra.

Outra desvantagem encontrada nestas barras foi a espessura do recobrimento, pois a técnica utilizada para fixar a fase no capilar era pouco precisa. Mesmo efetuando o procedimento três vezes, a quantidade de recobrimento que aderiria ao tubo de sílica fundida era muito pequena e o filme produzido era muito fino; desta forma, a eficiência da extração foi muito baixa. Adicionalmente, era muito difícil medir o recobrimento obtido no final do processo e a repetibilidade era muito baixa. Uma outra desvantagem era a pequena aderência do recobrimento no capilar, a qual não foi satisfatória pois, em alguns casos, após a barra de extração estar pronta para uso ocorria o desprendimento do recobrimento com facilidade durante ou após o processo de extração.

Devido a todos os problemas citados acima, concluiu-se que o procedimento adotado não estava sendo eficiente, e portanto, foi necessário desenvolver uma outra forma de desenvolvimento das barras.

A solução encontrada foi o uso de um molde de teflon cilíndrico bipartido, no qual o recobrimento era feito diretamente em uma barra de aço magnetizada eliminando, assim, o problema da fragilidade encontrada com o capilar de sílica.

A Figura 22 (A) ilustra o suporte utilizado para prender a barra de aço que será recoberta com o polímero, e a Figura 22 (B) ilustra um corte lateral do molde, mostrando a forma com que a barra magnética é fixada no mesmo. Ao lado, a Figura 22 (C) ilustra a vista superior do molde, mostrando o encaixe das duas faces do cilindro, os quais fixam a barra magnética em seu interior. Na posição onde se encontra a barra, existe um espaço vazio no molde, o qual é preenchido com o polímero, revestindo-o em uma dada extensão. Por fim, pode-se visualizar na Figura 22 (D) o molde fechado, utilizando para tal um suporte de aço.

Figura 22. Esquema do molde utilizado para o desenvolvimento das barras “home-made”.

As barras desenvolvidas com a utilização do molde apresentaram um recobrimento maior, o que possibilitou uma melhor eficiência de extração. As barras preparadas através deste procedimento possuem um volume de 22 μL de fase recobrindo o magneto. Conseguiu-se uma maior repetibilidade no desenvolvimento destas quando comparadas com o procedimento anterior. A Figura 23 (A) ilustra um esquema das barras desenvolvidas com a utilização do molde e a Figura 23 (B) uma foto.

Figura 23. Esquema (A) e foto (B) de uma barra desenvolvida com a utilização do molde.

4.1.1. Barras preparadas com PDMS e PDMS modificado

As barras de PDMS, o único tipo de recobrimento produzido comercialmente, não apresentaram uma boa eficiência de extração para os analitos estudados no presente trabalho, apesar de possuírem desempenho similar às barras de PDMS disponíveis comercialmente. Sendo assim, foram feitas modificações neste polímero, adicionando outros tipos de fases mais seletivas. Esta modificação foi feita com o intuito de obter barras com recobrimentos mais polares e, desta forma, aumentar a recuperação dos fármacos em questão.

Para realizar a modificação no PDMS foram adicionadas diferentes porcentagens de diversos polímeros ao mesmo. Os testes realizados no laboratório mostraram que uma porcentagem maior dificulta o processo de cura, tornando o procedimento inviável para algumas fases, como por exemplo OV-17-vinil, cuja a quantidade máxima conseguida para a modificação do PDMS foi de 20%.

Além disso, um entrecruzamento com azo-t-butano foi realizado antes de utilizar as barras de PDMS modificado. Esta etapa foi realizada para ligar as unidades poliméricas do PDMS com as fases mais seletivas, usadas para sua modificação.

O gráfico da Figura 24 mostra a diferença de área obtida utilizando-se uma barra de PDMS contendo 5% de OV-17-OH, com e sem a etapa de entrecruzamento, para a análise de anticonvulsivantes em plasma humano. Pode-se perceber que esta etapa é muito importante, já que ocorre uma melhora na eficiência da extração, principalmente para a carbamazepina.

Desta forma, esta etapa de entrecruzamento foi realizada para todas as barras desenvolvidas empregando PDMS modificado com os polímeros classicamente empregados como fase estacionária na construção de colunas de cromatografia gasosa.

As aplicações realizadas com as barras de PDMS modificado serão ilustradas no item 4.2 deste trabalho.

Figura 24. Resposta obtida na análise de anticonvulsivantes em plasma humano empregando uma barra PDMS contendo 5% de OV-17-OH, com e sem a etapa de entrecruzamento.

4.1.2. Barras desenvolvidas de poliuretana e de poliuretana com carbono

As barras de poliuretana pura desenvolvidas neste trabalho não apresentaram extrações eficientes para os analitos estudados. Sendo assim, optou-se por dopar estas barras com diferentes porcentagens de carbono. Desta forma, conseguiu-se uma melhora significativa no processo de extração dos fármacos, principalmente no caso dos anticonvulsivantes.

O desenvolvimento de barras de poliuretana com carbono, ou seja, barras PU-C, foram baseadas na existência de fibras de SPME com fases mistas do tipo PDMS/Carboxen, comercializadas pelo Supelco. Além da melhora na eficiência da extração, as barras “home-made” apresentaram melhor resistência, pois utilizam a poliuretana como base, diferentemente das fibras de SPME que utilizam PDMS, o qual possui uma baixa resistência mecânica. Isto pode ser concluído desenvolvendo-se uma barra de PDMS com carbono, a qual apresentou baixa resistência e pouca eficiência. Adicionalmente, o uso de PDMS limita a quantidade de carbono que é possível adicionar no mesmo, já que quanto maior essa quantidade, mais baixa é a resistência mecânica da barra produzida. Por outro lado, como as barras de poliuretana são mais resistentes, permitem que uma maior quantidade de carbono seja imobilizada.

Para ilustrar esta diferença obtida na extração com barras contendo diferentes porcentagens de carbono, a seguir, estão os cromatogramas das extrações dos anticonvulsivantes (Figuras 25 a 30).

Figura 25. Cromatograma dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) obtido após extração com barra “home-made” de poliuretana **pura** [PU].

Figura 26. Cromatograma dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) obtido após extração com barra “home-made” de poliuretana contendo **2% de carbono** [PU-2C].

Figura 27. Cromatograma dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) obtido após extração com barra “home-made” de poliuretana contendo **3% de carbono** [PU-3C].

Figura 28. Cromatograma dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) obtido após extração com barra “home-made” de poliuretana contendo **5% de carbono** [PU-5C].

Figura 29. Cromatograma dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) obtido após extração com barra “home-made” de poliuretana contendo **10% de carbono** [PU-10C].

Figura 30. Cromatograma dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) obtido após extração com barra “home-made” de poliuretana contendo **20% de carbono** [PU-20C].

De acordo com os cromatogramas apresentados nas Figuras 25 a 30, pode-se perceber que existem muitas diferenças na eficiência de extração ao se adicionar diferentes porcentagens de carbono à poliuretana. O cromatograma da Figura 25 ilustra a extração realizada com uma barra de poliuretana pura [PU], ficando evidente que esta foi a barra que apresentou a menor eficiência quando comparada com as demais.

A barra de PU dopada com apenas 2% de carbono [PU-2C] também apresentou baixa eficiência, entretanto ao se aumentar esta porcentagem para 3% [PU-3C], já se observou melhoras. Uma vez que os cromatogramas ficaram visualmente muito parecidos a partir desta quantidade, a Figura 31 apresenta as respostas (área) obtidas para cada um dos analitos empregando-se as fases de poliuretana sem carvão e poliuretana dopada com carvão nas quantidades de 2 a 20%.

Figura 31. Comparação das extrações dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) usando a barra de poliuretana pura [PU] e de poliuretana modificada com diferentes porcentagens carbono [PU-xC].

De acordo com os resultados apresentados pode-se prever que nestas barras há ocorrência dos dois mecanismos de extração, absorção e adsorção, na superfície do carbono pois, ao variar a quantidade de carbono adicionado à poliuretana, os analitos se comportaram de maneira diferente. No caso da barra de poliuretana contendo 3% de carbono os compostos extraídos com melhor eficiência foram 4 e 5, já no caso da barra contendo 5% de carbono os compostos 1 e 2 foram extraídos com melhor eficiência. A barra contendo 10% extraiu com maior eficiência os compostos 3 e 4, enquanto a de 20% de carbono extraiu melhor os analitos 2 e 3.

Comparando-se qualquer uma das barras desenvolvidas de poliuretana contendo carbono, com a de poliuretana pura, nota-se que a melhora na extração de todos os analitos foi muito significativa, exceto para a barra de poliuretana contendo 2% de carbono que extraiu a carbamazepina com menor eficiência do que a barra de poliuretana pura.

Pode-se concluir, desta forma, que ao aumentar a quantidade de carbono adicionado à poliuretana os mecanismos de extração tornam-se competitivos ao invés de aditivos, já que na barra que possuía uma concentração de carbono de 5% houve uma diminuição na resposta da hidantoína quando comparada à barra de 3% de carbono. Isso mostra que houve um recobrimento excessivo do polímero pelo carbono, diminuindo a área de troca de massa, e consequentemente, a superfície disponível para partição, sendo que a extração concentrou-se nos sítios ativos do carbono (adsorção).

Como a barra contendo 5% de carbono foi a que extraiu o composto 1 com maior eficiência, concluiu-se que esta foi a melhor barra para a extração dos anticonvulsivantes. A Figura 32 apresenta uma comparação da extração obtida empregando esta barra [PU-5C] com uma extração empregando-se a barra comercial de PDMS. Pelos cromatogramas, ao se comparar as áreas obtidas em ambas as extrações, conclui-se que a barra de PU contendo 5% de carbono [PU-5C] extraiu o analito 1 com uma eficiência 5 vezes maior que a barra

comercial, o analito 2 com área 4 vezes maior, o analito 3, duas vezes maior e o analito 4, com uma área 10 vezes maior.

Figura 32. Comparação das extrações dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) usando a barra de poliuretano contendo 5% de carbono [PU-5C] (—) e a barra comercial de PDMS (—).

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS BARRAS “HOME-MADE”

Para realizar a caracterização das barras desenvolvidas selecionou-se aquelas que apresentaram resultados mais interessantes. As barras escolhidas foram: PDMS, uma de PDMS modificado (PDMS/OV-17-OH), uma de poliuretano pura [PU] e também de uma de poliuretano dopada com 5% de carbono [PU-5C].

As principais características morfológicas destas barras são apresentadas nas Figura 33 a 36 por meio de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Os aumentos mostrados são de 100, 500, 1000 e 5000 vezes, respectivamente.

Além disso, foram obtidos também os espectros vibracionais da região do infravermelho dos respectivos materiais citados anteriormente (Figura 37-39).

A Figura 33 ilustra a imagem obtida de uma barra revestida com PDMS, onde pode ser observada a eficiência do recobrimento na barra de aço (A). Além disso, percebe-se que sua superfície não é uniforme em toda sua extensão.

(A) 100 x

(B) 500 x

(C) 1000 x

(D) 5000 x

Figura 33. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de uma barra desenvolvida de PDMS.

A imagem obtida de uma barra desenvolvida com PDMS/OV-17-OH está ilustrada na Figura 34. Observa-se que esta também apresenta uma superfície não uniforme, além de algumas cavidades em toda sua extensão, o que pode ser melhor visualizado na última fotografia apresentada com um aumento de 5000 vezes. Estas cavidades representam uma área maior para a absorção dos analitos durante o processo de extração.

(A) 100 x

(B) 500 x

(C) 1000 x

(D) 5000 x

Figura 34. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de uma barra desenvolvida de PDMS contendo 50% de OV-17-OH.

A Figura 35 ilustra a imagem obtida de uma barra “home-made” de poliuretana pura, onde pode-se visualizar a existência de uma superfície mais rugosa do que as anteriores. Além disso, como já foi comentado neste trabalho, as barras desenvolvidas com poliuretana apresentam grande formação de bolhas, o que pode ser muito bem visualizado pelas manchas brancas nas imagens obtidas pelo MEV. O problema das bolhas foi minimizado com o uso do vácuo, não sendo, contudo, eliminado por completo.

(A) 100 x

(B) 500 x

(C) 1000 x

(D) 5000 x

Figura 35. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de uma barra desenvolvida de poliuretana pura [PU].

A imagem obtida de uma barra revestida com poliuretana contendo 5% de carbono está ilustrada na Figura 36, a qual foi a única que apresentou superfície homogênea e sem rugosidades. Sendo essa característica atribuída à adição de carbono. Contudo, ela também apresentou algumas bolhas em sua extensão, provavelmente em decorrência do processo de cura da poliuretana.

(A) 100 x

(B) 500 x

(C) 1000 x

(D) 5000 x

Figura 36. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de uma barra desenvolvida de poliuretana contendo 5% de carbono [PU-5C].

O espectro de absorção no infravermelho do material de revestimento PDMS está ilustrado na Figura 37. As bandas de absorção em 2960,8 e 2902,9 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações de deformação axial assimétrica e simétrica, respectivamente, das ligações C—H dos grupamentos metila. As bandas em 1448,8 e 1414,2 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações de deformação angular simétrica e assimétrica, respectivamente, das ligações C—H dos grupamentos metila [49].

A banda intensa de absorção em 1266,6 cm^{-1} foi atribuída à ligação Si—CH₃ e a banda fraca de absorção em 869,7 cm^{-1} foi atribuída às ligações (CH₃)₂Si—O— presentes no PDMS; as bandas de absorção em 1084,3 e 1020,3 cm^{-1} foram atribuídas às ligações Si—O—Si.

Figura 37. Espectro de infravermelho do recobrimento de PDMS.

O espectro de absorção no infravermelho do material de revestimento PDMS/OV-17-OH está ilustrado na Figura 38. As bandas de absorção em 2961,7 e 2902,9 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações de deformação axial assimétrica e simétrica, respectivamente, das ligações C—H dos grupamentos metila [49].

A banda de absorção em 1431,5 cm^{-1} foi atribuída à ligação Si—Ph, e, as bandas de absorção em 735,9 e 700,8 cm^{-1} foram atribuídas às ligações $\text{CH}_3\text{PhSi—O—}$, as quais servem para diferenciar este material do PDMS puro. A banda intensa de absorção em 1263,5 cm^{-1} foi atribuída à ligação Si— CH_3 , as bandas de absorção em 1087,4 e 1022,9 cm^{-1} foram atribuídas às ligações Si—O—Si [50].

Figura 38. Espectro de infravermelho do recobrimento de PDMS/OV-17-OH.

O espectro de absorção no infravermelho do material de revestimento PU está ilustrado na Figura 39. As bandas de absorção em 3342,6 e 1599,4 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações da ligação N—H. As bandas de absorção em 2925,5 e 2856,2 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações de deformação axial assimétrica e simétrica, respectivamente, das ligações C—H dos grupamentos metileno [50 e 51].

A banda intensa de absorção em 1743,9 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial da ligação C=O. A banda de absorção em 1054,9 cm^{-1} foi atribuída a deformação axial de C—O e a de 1016,6 cm^{-1} à deformação axial assimétrica C—O—C [51].

A banda de absorção em 1222,9 cm^{-1} foi atribuída à ligação C—N e a de 725,2 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular da ligação N—H [51].

Figura 39. Espectro de infravermelho do revestimento de PU.

A banda de absorção do isocianato corresponde a 2250 cm^{-1} [52]. Como no espectro obtido neste trabalho observa-se uma banda de pouca intensidade em $2267,3\text{ cm}^{-1}$, pode-se concluir que nem todo o isocianato foi convertido em poliuretana, ou seja, a reação não ocorreu por completo.

O espectro de absorção no infravermelho da barra desenvolvida com poliuretana contendo 5% de carbono foi o mesmo da poliuretana, já que a adição de carbono não mudou a estrutura do polímero em questão, o que já era esperado.

4.3. APLICAÇÕES USANDO AS BARRAS DESENVOLVIDAS

4.3.1. Análise dos anticonvulsivantes em água

A seguir estão ilustrados, nas Figuras 40 a 42, os cromatogramas das análises realizadas com anticonvulsivantes em água.

Figura 40. Cromatograma obtido após a extração dos anticonvulsivantes: fenobarbital (1), epóxido-carbamazepina (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) usando uma barra “home-made” de PDMS contendo 5% de OV-17 com OH terminal.

Figura 41. Cromatograma obtido após a extração dos anticonvulsivantes: fenobarbital (1), epóxido-carbamazepina (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) usando uma barra “home-made” de PDMS contendo 10% de DEGS.

Figura 42. Cromatograma obtido após a extração dos anticonvulsivantes: fenobarbital (1), epóxido-carbamazepina (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) usando uma barra “home-made” de PU contendo 5% de carbono.

De acordo com os cromatogramas apresentados e com a comparação dos mesmos ilustrada na Figura 43 pode-se notar que a barra desenvolvida de PDMS contendo 5% de OV-17-OH extraiu melhor todos os anticonvulsivantes estudados neste trabalho do que as outras barras testadas. Já a barra “home-made” de PDMS contendo 10% de DEGS extraiu muito pouco os analitos em questão.

Dentre as barras desenvolvidas com poliuretana e carbono descritas, no item 4.1.2, concluiu-se que a barra modificada com 5% de carbono foi a que apresentou melhores resultados e portanto, foi selecionada para as aplicações dos anticonvulsivantes em água e em plasma. Esta barra apresentou boa eficiência na extração.

Figura 43. Comparação das extrações dos anticonvulsivantes fenobarbital (1), epóxido (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) usando a barra desenvolvida de PDMS contendo 5% de OV-17-OH (—), a de PDMS contendo 10% de DEGS (—) e a de PU contendo 5% de carbono (—).

4.3.2. Análise dos anticonvulsivantes em plasma

A seguir, nas Figuras de 44 a 46 estão ilustrados os cromatogramas das análises realizadas com os anticonvulsivantes em plasma humano. Ao mudar a matriz dos anticonvulsivantes de água para plasma foi necessário efetuar eluição com gradiente ao invés da isocrática utilizada nas análises feita com água, pois o plasma apresenta interferentes que só puderam ser separados naquele modo.

Figura 44. Cromatograma obtido após a extração dos anticonvulsivantes: fenobarbital (1), epóxido-carbamazepina (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) em plasma humano usando uma barra comercial de PDMS.

Figura 45. Cromatograma obtido após a extração dos anticonvulsivantes: fenobarbital (1), epóxido-carbamazepina (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) em plasma humano usando uma barra “home-made” de PDMS contendo 50% de OV-17 com OH terminal.

Figura 46. Cromatograma obtido após a extração dos anticonvulsivantes: fenobarbital (1), epóxido-carbamazepina (2), carbamazepina (3) e hidantoína (4) em plasma humano usando uma barra “home-made” de PU contendo 5% de carbono [PU-5C].

O cromograma ilustrado na Figura 45 apresenta a extração realizada com a barra desenvolvida com PDMS contendo 50% de OV-17 com OH terminal. Ao se comparar este cromatograma com o da Figura 40 que apresenta a análise dos anticonvulsivantes em água usando uma barra de PDMS contendo 5% da mesma fase citada anteriormente, nota-se uma grande discrepância em relação a recuperação dos analitos extraídos. Isso ocorreu porque a barra utilizada para efetuar a análise em água foi desenvolvida com uma fase OV-17-OH disponível no laboratório. Após a execução de muitas extrações com a mesma barra, de diferentes analitos, foi necessário desenvolver outra barra para efetuar as extrações em plasma. Como não havia mais a disponibilidade desta fase no laboratório, foi necessário realizar importação para dar continuidade ao trabalho. Entretanto, o novo polímero adquirido do mesmo fabricante, com mesmo “part number” e lote, não apresentou as mesmas características e os resultados obtidos com ambos foram muito diferentes, não sendo possível uma adequada comparação dos resultados.

Desta forma, a barra que apresentou o melhor resultado para a análise de anticonvulsivantes em plasma foi a barra desenvolvida de poliuretano contendo 5% de carbono. O gráfico da Figura 47 ilustra com mais detalhes esta afirmação.

Figura 47. Comparações das áreas obtidas da extração dos anticonvulsivantes com uma barra comercial, uma barra “home-made” de PDMS contendo 50% de OV-17-OH e uma de PU contendo 5% de carbono.

As extrações obtidas para os anticonvulsivantes apresentaram recuperação muito baixa; isso se deve ao valor reduzido de $K_{O/W}$ dos mesmos (Tabela 9), exceto o $K_{O/W}$ da hidantoína.

Tabela 9. Valores de $\log K_{O/W}$ e $K_{O/W}$ para os anticonvulsivantes.

	$\log K_{O/W}^*$	$K_{O/W}$
Carbamazepina	2,25	177,8
Fenobarbital	1,33	21,4
Hidantoína	2,71	512,9

* valores calculados pelo programa KowWin, disponível na referência [53].

4.3.3. Análise dos antidepressivos em água

4.3.3.1. Aplicações realizadas com as barras “home-made” de PDMS modificado

A seguir estão ilustrados nas figuras de 48 a 52 os cromatogramas das extrações dos antidepressivos em água utilizando a barra comercial e barras desenvolvidas com PDMS modificado com diferentes fases.

Figura 48. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com a barra comercial.

Figura 49. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com a barra “home-made” de PDMS contendo 5% de OV-17 com vinil terminal.

Figura 50. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com a barra “home-made” de PDMS contendo 5% de OV-17 com OH terminal.

Figura 51. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com a barra “home-made” de PDMS contendo 10% de OV-17.

Figura 52. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com a barra “home-made” de PDMS contendo 10% de Silar 5-CP.

Todos os cromatogramas apresentados neste item foram feitos com as barras “home-made”. Foi feita análise com a barra comercial para comparar a eficiência das extrações.

Para melhor comparação das análises feitas com as barras desenvolvidas e a barra comercial, construiu-se o gráfico ilustrado na Figura 53.

A barra de PDMS com 5% de OV-17 com vinil terminal extraiu todos os analitos com eficiência maior do que a barra comercial, exceto o citalopram. Já a barra de PDMS contendo 10% de OV-17 só não superou a barra comercial na extração do citalopram e da sertralina. E a barra de PDMS modificado com 10% da fase Silar 5-CP apresentou melhor eficiência na extração do citalopram apenas. A barra de PDMS modificado com 5% de OV 17 com OH terminal não superou a barra comercial para nenhum dos analitos.

Figura 53. Gráfico da comparação das áreas obtidas da análise dos antidepressivos utilizando-se uma barra comercial e diferentes tipos de barras “home-made” de PDMS modificado.

4.3.3.2. Aplicações realizadas com as barras de PU e PU modificada com carbono

A seguir, estão ilustrados os cromatogramas das análises dos antidepressivos em água realizadas com as barras “home-made” de poliuretana e de poliuretana modificada com 1 e com 5% de carbono, respectivamente (Figuras 54 a 56).

Figura 54. Comparação das extrações dos dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com uma barra comercial (—) e uma barra desenvolvida de PU pura (—).

Figura 55. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com uma barra “home-made” de PU contendo 1% de carbono.

Figura 56. Cromatograma da extração dos antidepressivos: citalopram (1), mirtazapina (2), paroxetina (3), fluoxetina (4), sertralina (5) realizada com uma barra “home-made” de PU contendo 5% de carbono.

Para os antidepressivos, a barra de PU não apresentou um bom resultado, quando comparado com a barra comercial, o que pode ser ilustrado na Figura 54. Entretanto com a adição de carbono, os resultados melhoraram.

Para melhor visualização destes resultados foi construído um gráfico (Figura 57), o qual compara a extração realizada com a barra comercial e as barras de poliuretano e poliuretano modificada com carbono. Desta forma, fica claro que, para citalopram e sertralina, nenhuma das barras apresentaram eficiência de extração superior à barra comercial; contudo, para os demais analitos a barra desenvolvida de poliuretano contendo 1% de carbono foi a que apresentou melhores resultados.

Figura 57. Gráfico da comparação das áreas obtidas da análise dos antidepressivos utilizando-se uma barra comercial, uma barra “home-made” de PU e de PU contendo diferentes porcentagens de carbono.

4.3.4. Análise dos antidepressivos em plasma humano

Para as análises de antidepressivos realizadas em plasma humano foi necessário retirar o citalopram da mistura, pois o mesmo degradou com o tempo.

Além disso, como já foi evidenciado no item anterior, as barras de poliuretana não apresentaram bons resultados para esta classe de analito, então, não se efetuou extrações com essas barras em plasma. Dessa forma, as aplicações ilustradas nos cromatogramas das Figuras de 59 a 63 são das barras desenvolvidas com PDMS modificado. Já a Figura 58 apresenta o cromatograma da extração feita com a barra comercial, uma vez que será efetuada a comparação desta com as demais barras que foram desenvolvidas durante este estudo.

De acordo com os dados apresentados no subitem 4.2.3.1, concluiu-se que a barra de PDMS contendo OV-17-vinil foi a que apresentou melhor eficiência na extração. Desta forma, optou-se por aumentar a porcentagem desta fase de 5 para 20% para efetuar a aplicação realizada com o plasma, com a barra de PDMS modificada com OV-17-OH, aumentou-se a porcentagem de 5 para 50%.

Figura 58. Cromatograma da extração dos antidepressivos: mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3), sertralina (4) realizada com a barra comercial.

Figura 59. Cromatograma da extração dos antidepressivos: mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3), sertralina (4) realizada com uma barra “home-made” de PDMS contendo 20% de OV-17 com vinil terminal.

Figura 60. Cromatograma da extração dos antidepressivos: mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3), sertralina (4) realizada com uma barra “home-made” de PDMS contendo 50% de OV-17 com OH terminal.

Figura 61. Cromatograma da extração dos antidepressivos: mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3), sertralina (4) realizada com uma barra “home-made” de PDMS contendo 30% de pirrol.

Figura 62. Cromatograma da extração dos antidepressivos: mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3), sertralina (4) realizada com uma barra “home-made” de PDMS contendo 50% de Silar 10C.

Figura 63. Cromatograma da extração dos antidepressivos: mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3), sertralina (4) realizada com uma barra “home-made” de PDMS contendo 50% de DEGS.

Para efetuar as comparações entre as extrações realizadas com a barra comercial e com as barras “home-made”, construiu-se o gráfico da Figura 64.

As comparações mostram que a barra de PDMS contendo 20% de OV-17 com vinil terminal continuou sendo a melhor barra para a extração dos antidepressivos, o que era esperado. Esta barra extraiu quase todos os analitos com eficiência maior do que a barra comercial, exceto a sertralina, a qual apresentou uma eficiência um pouco mais baixa do que a barra comercial.

A barra de PDMS contendo 50% de OV-17 com OH terminal superou a extração da barra comercial para a mirtazapina e a fluoxetina.

Além das barras desenvolvidas com as fases citadas anteriormente, produziu-se novos tipos de barras, utilizando PDMS modificado com 30% de pirrol, 50% de DEGS e 50% de Silar 10C; entretanto nenhuma apresentou boa recuperação dos analitos.

Figura 64. Gráfico da comparação das áreas obtidas da análise dos antidepressivos em plasma humano utilizando-se uma barra comercial e diferentes tipos de barras “home-made”.

Para as aplicações realizadas com os antidepressivos, pode-se perceber que a barra comercial extrai os compostos com maior eficiência do que no caso dos anticonvulsivantes, como foi mostrado no item 4.3.2. Estas discrepâncias existentes entre os anticonvulsivantes e os antidepressivos podem ser atribuídas à diferença de polaridade dos mesmos. Os valores de $K_{O/W}$ dos antidepressivos estão listados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de $\log K_{O/W}$ e $K_{O/W}$ para os antidepressivos.

	$\log K_{O/W}^*$	$K_{O/W}$
Citalopram	3,74	5.495,4
Fluoxetina	5,65	446.683,5
Mirtazapina	4,65	44.668,4
Paroxetina	3,95	8.912,5
Sertralina	5,29	194.984,5

* valores calculados pelo programa KowWin, disponível na referência [53].

Pelos valores altos de $K_{O/W}$, concluiu-se que os antidepressivos são menos polares e, desta forma, são melhores extraídos com fases apolares, diferentemente dos anticonvulsivantes, como por exemplo o fenobarbital que tem o $K_{O/W}$ igual a 21,4.

4.3.5. Análise de ivermectina em plasma bovino

As barras “home-made” foram aplicadas para a análise de fármacos para uso veterinário em plasma bovino. Os cromatogramas das figuras de 65 a 68 apresentam estas aplicações para a ivermectina.

Figura 65. Cromatograma da extração da ivermectina com a barra comercial.

Figura 66. Cromatograma da extração da ivermectina com a barra “home-made” de PDMS contendo 5% de OV-17-OH.

Figura 67. Cromatograma da extração da ivermectina com a barra “home-made” de PDMS contendo 10% de DEGS.

Figura 68. Cromatograma da extração da ivermectina com a barra “home-made” de poliuretana contendo 5% de carbono.

No cromatograma da Figura 69 fez-se uma comparação das extrações realizadas com as barras “home-made” com a barra comercial.

A barra de PDMS contendo 5% de OV-17 com OH terminal extraiu o analito em questão com uma eficiência 4,5 vezes maior do que a barra comercial. Já a barra de PDMS modificado com 10% de DEGS apresentou superioridade de 1,7 vezes comparada à barra comercial.

Como a barra de OV-17-OH apresentou alta eficiência na extração deste analito não houve a necessidade de avaliar outros tipos de barras de PDMS modificado, já que esta se apresentou muito superior à comercial.

Fez-se também uma aplicação com uma barra de poliuretana contendo 5% de carbono, a qual não apresentou boa eficiência, extraindo uma quantidade de ivermectina menor, quando comparada à barra comercial.

Figura 69. Cromatograma comparando a extração da ivermectina realizada com a barra comercial (—) comparada com uma barra “home-made” de PDMS contendo 5% de OV-17-OH (—), com uma barra “home-made” de PDMS contendo 10% de DEGS (—) e com uma de poliuretana contendo 5% de carbono (—).

4.3.6. Análises de albendazol, mebendazol, albendazol sulfona e sulfóxido de albendazol em plasma bovino

Os cromatogramas ilustrados na figuras 70 a 72, ilustram os resultados obtidos após a aplicação das barras “home-made” na análise de albendazol, mebendazol e seus metabólitos – albendazol sulfona e sulfóxido de albendazol em plasma bovino.

Para estes analitos foram utilizadas as barras de poliuretana e poliuretana cotendo 5% de carbono. Além destas duas, foi realizado um teste, modificando a poliuretana com uma fase utilizada em cromatografia gasosa, o DEGS.

Figura 70. Cromatograma da extração de sulfóxido de albendazol (1), albendazol sulfona (2), mebendazol (3) e albendazol (4) em plasma bovino feita com uma barra “home-made” de poliuretana.

Figura 71. Cromatograma da extração de sulfóxido de albendazol (1), albendazol sulfona (2), mebendazol (3) e albendazol (4) em plasma bovino feita com uma barra “home-made” de poliuretana contendo 5% de carbono.

Figura 72. Cromatograma da extração de sulfóxido de albendazol (1), albendazol sulfona (2), mebendazol (3) e albendazol (4) em plasma bovino feita com uma barra “home-made” de poliuretana contendo 10% de DEGS.

Os resultados podem ser melhor analisados com a comparação entre as áreas obtidas nas extrações dos diferentes tipos de barras usados para análise dos anti-helmínticos em plasma bovino (Figura 73).

Percebe-se, claramente, que a barra que apresentou melhor resultado foi a de poliuretana contendo 5% de carbono, já que extraiu todos os analitos com maior eficiência quando comparada às demais.

A barra de poliuretana apresentou menor eficiência de extração, superando apenas a barra de poliuretana contendo 10% de DEGS para o sulfóxido albendazol.

Figura 73. Gráfico da comparação das áreas obtidas da análise de albendazol em plasma bovino utilizando-se uma barra "home-made" de PU, uma de PU contendo 5% de carbono e uma barra de PU contendo 10% de DEGS.

4.4. RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS

Em todos os casos, a recuperação foi calculada por meio da razão entre as áreas dos picos cromatográficos obtidos após a extração e daqueles obtidos pela injeção direta dos padrões na concentração equivalente à 100% da massa adicionada ao plasma e presente no volume de dessorção utilizado. As extrações utilizadas para comparação foram feitas em plasma com as barras "home-made" que apresentaram melhores resultados e com a barra comercial. Os resultados estão descritos abaixo da Tabela 11 a 13. Para o albendazol os valores não foram calculados, já que não efetuou-se a comparação com a barra comercial.

Tabela 11. Valores obtidos para a recuperação dos anticonvulsivantes.

	RECUPERAÇÃO (%)			
	fenobarbital	epóxido	carbamazepina	hidantoína
Barra comercial	0,085	0,325	0,698	0,392
PU + 5% C	0,472	0,835	1,490	4,757
PDMS + 5% OV-17-OH*	9,650	8,550	8,610	9,600

* barra “home-made” aplicada na análise dos anticonvulsivantes em água.

Tabela 12. Valores obtidos para a recuperação dos antidepressivos.

	RECUPERAÇÃO (%)			
	mirtazapina	paroxetina	fluoxetina	sertralina
Barra comercial	18,60	10,36	16,67	12,62
PDMS + 20% OV-17-vinil	21,01	12,08	17,48	12,26

Tabela 13. Valores obtidos para a recuperação da ivermectina.

	RECUPERAÇÃO (%)	
	Barra comercial	PDMS + 5% OV-17-OH
ivermectina	7,11	31,94

Os valores de recuperação dos anticonvulsivantes em plasma variaram entre 0,47 e 4,76% para a barra “home-made” de PU contendo 5% de carbono. Já para a barra que apresentou o melhor resultado em água, os valores variaram de 8,55 a 9,65%, porém esta não pôde ser aplicada às análises em plasma, conforme discutido anteriormente. Quando esses valores são comparados com outras técnicas de extração, eles podem ser considerados baixos; contudo, baixas recuperações são comuns para técnicas em micro-escala, as quais não empregam extração exaustiva, como é o caso da SBSE. Comparando os valores de recuperação obtidos em SBSE com os valores obtidos por SPME no trabalho de Alves [54], observa-se que a recuperação em SBSE é maior, como já era esperado, devido ao maior

volume de recobrimento. Além da SBSE não ser uma técnica exaustiva, os baixos valores de recuperação podem ser atribuídos também aos baixos valores de $K_{O/W}$ dos fármacos em questão, citados no item anterior.

Os valores de recuperação dos antidepressivos em plasma variaram entre 12,08 a 21,01% para a barra “home-made” de PDMS modificado com 20% de OV-17 com vinil terminal. Os valores obtidos quando comparados com um estudo realizado por Chaves et al [43] foram mais baixos, uma vez que neste caso os valores variaram de 52 a 103%. Entretanto, os métodos utilizados no presente trabalho não foram otimizados para nenhum dos analitos estudados; como pode-se perceber no capítulo 3, utilizou-se um único método para todos os analitos em questão. Assim este foi mais um fator que colaborou para os baixos valores de recuperação obtidos.

O valor de recuperação obtido para a ivermectina foi de 31,94%. O trabalho desenvolvido por Prieto et al. [55] foi realizado com extração líquido-líquido de ivermectina em plasma bovino, apresentando recuperação entre 78,1 e 92,8%. Entretanto, não foi encontrado na literatura trabalhos que fizessem estudo desse analito com técnicas de extração em micro-escala para efeito de comparação. As discrepâncias observadas nos valores apresentados se devem ao fato da SBSE não ser uma técnica de extração exaustiva como a LLE, conforme discutido anteriormente.

Com os valores de recuperação calculados observou-se ainda que para todas as classes de analitos estudados, as barras “home-made” apresentaram valores superiores à barra comercial, exceto para a sertralina, em que ambas as barras apresentaram valores muito próximos.

4.5. ANÁLISE DE ANTIDEPRESSIVOS UTILIZANDO SBSE-LC “ON-LINE”

O acoplamento “on-line” entre SBSE e cromatografia gasosa é possível, pois existe uma interface disponível, comercializada pela Gerstel, que emprega dessorção térmica e focalização criogênica (SBSE-TD-GC). Entretanto, para o acoplamento SBSE-LC não há, até o momento, nenhuma interface disponível comercialmente.

Para que exista a possibilidade de analisar compostos não voláteis e termicamente lábeis por SBSE sem nenhum consumo de solventes, houve a necessidade de se desenvolver uma interface que permitisse o acoplamento das técnicas em questão. Desta forma, uma interface foi desenvolvida no Laboratório de Cromatografia.

A interface foi desenvolvida com base em um projeto para o acoplamento de SPME-LC já existente, a qual também foi desenvolvida pelo grupo de pesquisas, conforme descrita por Rodrigues et al. [56]. A principal diferença entre ambas é o volume da câmara de dessorção que no caso da interface para SPME-LC é de 60 μL e para SBSE-LC foi aumentada para 100 μL de maneira a acondicionar a barra e um volume de solvente.

Para avaliar a interface “home-made” efetuou-se análises de antidepressivos em plasma humano utilizando barras desenvolvidas de PDMS modificado, conforme descrito a seguir.

4.5.1. Análise de fluoxetina e clomipramina em plasma por SBSE-LC “on-line”

O cromatograma da Figura 74 ilustra o resultado obtido da extração de fluoxetina e clomipramina por SBSE com dessorção realizada na interface “home-made”, em diferentes temperaturas. Neste caso, a barra “home-made” utilizada para extração dos analitos foi uma micro-barra recoberta com PDMS, a primeira barra desenvolvida no laboratório, na qual o revestimento foi feito em um capilar de sílica, a qual apresentava recobrimento muito fino.

Figura 74. Cromatograma da análise dos antidepressivos fluoxetina (1) e clomipramina (2) em plasma humano através do acoplamento SBSE-HPLC: (—) temperatura ambiente; (—) 40 °C e (—) 60 °C.

Assim como em SPME, em SBSE também ocorre um processo de difusão em que os analitos se dividem entre a amostra e a fase polimérica (recobrimento da barra de SBSE). Isto ocorre quando a barra é inserida na amostra por um período de tempo determinado. Desta forma, na extração dos analitos, o aumento de temperatura ocasiona aumento no coeficiente de difusão dos analitos e diminuição do coeficiente de partição [57].

Com o aumento da temperatura no processo de dessorção, facilitado pelo bloco de aquecimento existente na interface, o coeficiente de difusão dos analitos aumenta e o coeficiente de partição diminui, desta forma os analitos tendem a migrar com mais facilidade para a fase móvel, aumentando a eficiência do processo de dessorção. Isto pode ser observado no resultado obtido com a interface, pois o aumento de temperatura de dessorção ocasionou um aumento na transferência de massa do analito da barra de agitação para a fase móvel aquecida, tornando a temperatura um fator muito importante a ser estudado na dessorção dos analitos. Isto ficou evidente no cromatograma da Figura 74, onde pode-se visualizar os

cromatogramas obtidos com a dessorção feita em diferentes temperaturas: temperatura ambiente, a 40°C e a 60°C. Pode-se observar que na temperatura de dessorção mais elevada, no caso 60°C, obteve-se áreas mais de 20 vezes maiores do que aquelas obtidas a temperatura ambiente.

Além disso, a interface “home-made” também permite que a quantidade total dos analitos dessorvidos seja injetada no HPLC, diferente do processo “off-line”, onde somente parte da solução é analisada.

4.5.2. Análise da mirtazapina, fluoxetina, paroxetina e sertralina em plasma humano por SBSE-LC “on-line”

Realizou-se também análise da mirtazapina, fluoxetina, paroxetina e sertralina em plasma humano por SBSE com dessorção realizada na interface desenvolvida no Laboratório de Cromatografia (Figuras 75 e 76). A barra de extração utilizada foi a de PDMS contendo 20% de OV-17-vinil, a qual apresentou melhor resultado na extração destes analitos com dessorção “off-line”.

Figura 75. Cromatograma de extração da mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3) e sertralina (4) usando uma barra “home-made” de PDMS contendo 20% de OV-17-vinil. Comparação do processo com dessorção “off-line”(—) e “on-line” (—).

Figura 76. Cromatograma de extração da mirtazapina (1), paroxetina (2), fluoxetina (3) e sertralina (4) usando uma barra “home-made” de PDMS contendo 20% de OV-17-vinil. Dessorção em diferentes temperaturas: ambiente (—), a 45°C (—) e a 60°C (—).

No cromatograma da Figura 75, foi feita uma comparação entre os processos “on-line” e “off-line” com o mesmo volume de injeção e observou-se que o processo “on-line” foi mais eficiente na dessorção dos analitos em questão. Isto ocorre porque a interface “home-made” permite que a quantidade total dos analitos dessorvidos seja injetada no HPLC, diferentemente do processo “off-line”, onde somente parte da solução é analisada.

Já no cromatograma da Figura 76 fez-se a comparação da dessorção em diferentes temperaturas, ambiente, 45°C e 60°C e assim como no primeiro caso, o aumento da temperatura contribuiu para a etapa de dessorção dos analitos, já que a dessorção “on-line” a 60°C foi a de maior eficiência.

Entretanto, nas análises dos antidepressivos pode-se perceber nos cromatogramas que houve alargamento dos picos cromatográficos. Isso ocorreu devido ao volume injetado ser muito grande (100 μ L), tendo esse fato sido agravado pelo menor diâmetro interno da coluna

cromatográfica (2,1 mm), que foi utilizada na análise em questão. Este parâmetro deverá ser otimizado no futuro.

4.5.3. Vantagens e limitações da interface “home-made”

A interface desenvolvida possibilita a análise “on-line” de compostos termolábeis e pouco voláteis. Além disso, ela melhora a dessorção dos analitos quando comparada ao processo “off-line”, uma vez que a quantidade total dos analitos dessorvidos é injetada, diferentemente do processo “off-line”, onde somente parte da solução é analisada.

O aquecimento da câmara de dessorção promove o aumento da transferência de massa do analito contido na barra para a fase móvel ou solvente de dessorção aquecido. Dessa forma, o emprego de temperatura na dessorção também diminui o efeito de memória (“carry over”), fato responsável por problemas com a repetibilidade de área entre uma extração e outra.

Adicionalmente, o processo realizado com o acoplamento SBSE-LC, após ser otimizado, é mais rápido do que o processo “off-line”.

Entretanto, este acoplamento ainda apresenta alguns problemas, tais como: o fluxo dentro da câmara é laminar, sendo assim a transferência dos analitos contido na barra para a fase móvel, ocorre devido ao aquecimento da câmara, diferente do que ocorre no ultra-som (dessorção com solvente) que além de agitação ainda possibilita o aquecimento. Sendo assim, a transferência de massa pode não ser completa, causando um efeito de memória mais pronunciado do que em SPME, devido ao maior volume de recobrimento.

Além disso, como o volume da câmara de dessorção é de 100 μL isto pode gerar um alargamento dos picos cromatográficos, conforme foi mostrado nos cromatogramas das Figuras 75 e 76, sendo assim, conclui-se então que a interface ainda necessita de algumas etapas de otimizações para superar estes problemas.

5

Conclusões

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados no trabalho pode-se concluir que o desenvolvimento de barras para SBSE possui relevância científica e econômica. Cientificamente, foram desenvolvidas com sucesso barras de seletividade bastante superior àquela disponível comercialmente.

Os revestimentos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura e infravermelho e os resultados demonstraram a presença dos grupos de interesse na modificação do PDMS, bem como nos grupos característicos da poliuretana.

Os resultados apresentados demonstraram um aumento de seletividade das novas barras quando comparadas à de PDMS, comercialmente disponível, para os anticonvulsivantes e antidepressivos em plasma humano e anti-helmínticos em plasma bovino.

Adicionalmente, as barras são de baixo custo, quando comparado ao valor das barras comerciais, e o desenvolvimento desta tecnologia representa um avanço considerável para a técnica de SBSE.

As análises de antidepressivos realizadas com a interface SBSE-LC também desenvolvida no Laboratório de Cromatografia mostraram que as dessorções são mais eficientes, quando comparadas ao processo “off-line”. Além disso, mostrou que a temperatura é um fator importante na dessorção e que deve ser considerado. Entretanto, ainda são necessários mais alguns ajustes para que a dessorção “on-line” não provoque o alargamento dos picos cromatográficos.

6

Referências

Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, p. 523-529, 2000.
- [2] MAJORS, R. E. An overview of sample preparation. **LC-GC**, v. 9, p. 16-20, 1991.
- [3] MAJORS, R. E. New approaches to sample preparation. **LC-GC**, v. 13, p. 82-94, 1995.
- [4] SMITH, R.M. Before the injection – modern methods of sample preparation for separations techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 3-27, 2003.
- [5] LANÇAS, Fernando M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004. 96p.
- [6][QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida "no tubo" e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.
- [7] LACERDA, Cristina Alves. **Desenvolvimento de fibras para a microextração em fase sólida (SPME): caracterização e aplicação**. 2003. 127 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- [8] DAVID, F.; TIENPONT, B.; SANDRA, P. Stir-bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrices. **LC GC Europe**, v. 21, p. 2-7, 2003.
- [9] ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.
- [10] PAWLISZYN, J. Theory of solid-phase microextraction. **Journal of Chromatographic Science**, v. 38, p. 270-278. 2000.
- [11] PAWLISZYN, J. **Solid-phase microextraction: theory and practice**. Ontario: Wiley-VCH, 1997. 247p.
- [12] BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, n. 10, p. 737-747, 1999.
- [13] OCHIAI, N.; SASAMOTO, K.; KANDA, H.; YAMAGAMI, T.; DAVID, F.; SANDRA, P. Multi-residue method for the determination of five groups of pesticides in non-fatty food samples by dual stir bar sorptive extraction (dual SBSE) and thermal desorption GC-MS. **Global Analytical Solutions**, p. 1-16, 2005.

- [14] KAWAGUCHI, M.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 500-508, 2006.
- [15] ZUIN, Vânia Gomes. Desenvolvimento de metodologias para a análise de pesticidas em plantas medicinais brasileiras: métodos convencionais vs. modernos. São Carlos, 2001. 168 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
- [16] BALTUSSEN, H. A. **New concepts in sorption based sample preparation for chromatography**. 2000. 241 f. Tese (Doutorado) – Technische Universiteit Eindhoven, Eindhoven, 2000.
- [17] TIENPOINT, B.; DAVID, F.; BICCHI, C.; SANDRA, P. High capacity headspace sorptive extraction. **Journal of Microcolumn Separations**. v. 12, p. 577- 584, 2000.
- [18] BALTUSSEN, E.; CRAMERS, C.; SANDRA, P. Sorptive sample preparation – a review. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 3-22, 2002.
- [19] GÓRECKI, T.; YU, X.; PAWLISZYN, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibers. **Analyst**, v. 124, p. 643-649, 1999.
- [20] TIENPOINT, B.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS applied to biological fluids. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 46-55, 2002.
- [21] NAKAMURA, S.; DAISHIMA, S. Simultaneous determination of 64 pesticides in river water by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica & Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 99-107, 2005.
- [22] SANDRA, P.; TIENPONTAND, B.; DAVID, F. Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–capillary gas chromatography–mass spectrometry . **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 299-309, 2003.
- [23] STOPFORTH, A.; TREDOUX, A.; CROUCH, A.; HELDEN, P.; SANDRA, P. A rapid method of diagnosing pulmonary tuberculosis using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1071, p. 135-139, 2005.
- [24] TIENPOINT, B.; DAVID, F.; BENIJTS, T.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS for profiling and target component analysis of pharmaceutical drugs in urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 569-579, 2003.

- [25] STOPFORTH, A.; BURGER, B.; CROUCH, A.; SANDRA, P. Urinalysis of 4-hydroxynonenal, a marker of oxidative stress, using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 834, p. 134-140, 2006.
- [26] KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; SAKUI, N.; ITO, R.; IZUMI, S.; MAKINO, T.; OKANOUCHI, N.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 119-125, 2004.
- [27] SERÔDIO, P.; NOGUEIRA, J. Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 517, p. 21-32, 2004.
- [28] DESMET, K.; TIENPOINT, B.; SANDRA, P. Analysis of 1-hydroxypyrene in urine as PAH exposure marker using in-situ derivatisation stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography- mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 57, p. 681-685, 2003.
- [29] KAWAGUCHI, M.; INOUE, K.; YOSHIMURA, M.; ITO, R.; SAKUI, N.; OKANOUCHI, N.; NAKAZAWA, H. Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 805, p. 41-48, 2004.
- [30] KAWAGUCHI, M.; SAKUI, N.; OKANOUCHI, N.; ITO, R.; IZUMI, S.; MAKINO, T.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for measurement of phenolic xenoestrogens in human urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 820, p. 49-57, 2005.
- [31] KAWAGUCHI, M.; ISHII, Y.; SAKUI, N.; OKANOUCHI, N.; ITO, R.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. 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. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, p. 57-65, 2005.
- [32] BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO E.; RUBIOLO, P.; SGORBINI, B.; DAVID, F.; SANDRA, P. Dual-phase twisters: a new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, p. 9-16, 2005.
- [33] QUINTANA, J.; RODRÍGUEZ, I. Strategies for the microextraction of polar organic contaminants in water samples. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 1447-1461, 2006.

- [34] LAMBERT, J.; MULLETT, W.; KWONG, E.; LUBDA D. Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, p. 43-49, 2005.
- [35] ZHU, X. L.; CAI, J. B.; YANG, J.; SU, Q. D.; GAO, Y. Films coated with molecular imprinted polymers for the selective stir bar sorption extraction of monocrotophos. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, p. 37-44, 2006.
- [36] HU, Y.; ZHENG, Y.; ZHU, F.; LI, G. Sol-gel coated polydimethylsiloxane/ β -cyclodextrin as novel stationary phase for stir bar sorptive extraction and its application to analysis of estrogens and bisphenol A. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, p. 16-22, 2007.
- [37] POPP, P.; BAUER, C.; WENNRICH, L. Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v.436, p. 1-9, 2001.
- [38] ZUIN, V.; MONTERO, L.; BAUER, C.; POPP, P. Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. **Journal of Chromatography A**, v. 1091, p. 2-10, 2005.
- [39] BLASCO, C.; FONT, G.; PICÓ, Y. Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 970, p.201-212, 2002.
- [40] BLASCO, C.; FERNÁNDEZ, M.; PICÓ, Y. Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1030, p.77-85, 2004.
- [41] ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1303-1311, 2006.
- [42] FERNANDES, C.; JIAYU, P.; SANDRA, P.; LANÇAS, F. Stir bar sorptive extraction-LC-MS for the analysis of fluoxetine in plasma. **Chromatographia**, v. 64, p. 517-521, 2006.
- [43] CHAVES, A.; SILVA, S.; QUEIROZ, R.; LANÇAS, F.; QUEIROZ, M. Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography B**, v. 850, p. 295-302, 2007.
- [44] BEMGARD, A.; BLOMBERG, L.; LYMAN, M.; TABACCHI, R. Siloxane/silarylene copolymers as stationary phases for capillary gas chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 11, p. 881-890, 1988.

- [45] PLEPIS, Ana Maria de Guzzi. **Caracterização térmica e viscoelástica de resinas Poliuretanas derivadas de óleo de mamona**. 1991. 155f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1991.
- [46] UNGER, K. K. Packings and stationary phases in chromatographic techniques. In: PORSCHAMANN, J.; ENGEWALD, W. **Solid and liquid stationary phase in gas chromatography**. New York, Marcel Dekker, 1990. v. 47, p. 158-161.
- [47] WEJNEROWSKA G.; KARCZMAREK, A.; GACA, J. Determination of fluoride in toothpaste using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, p. 173-177, 2007.
- [48] WANG, S. T.; WANG, Y.; YOU, H.; YAO, J. Preparation of a carbon-coated SPME fiber and application to the analysis of BTEX and halocarbons in water. **Chromatographia**, v. 63, p. 365-371, 2006.
- [49] LAUNER, P. J. **Infrared analysis of organosilicon compounds: spectra-structure correlations**. In: ARKLES, B. (Ed.). **Silicone compounds register and review**. New York: Petrarch Systems, 1987. p. 100-103.
- [50] SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução de R. B. De Alencastro. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 94-95.
- [51] LAGE, L. M., **Poliuretanas: caracterização, avaliação estrutural e efeito induzido pela radiação gama**. 2003. 144f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- [52] BAUDRIT, J. V.; BALLESTERO, M. S.; VÁZQUEZ, P.; MACIÁ, R. T.; MARTÍNEZ, J. M. M. Properties of thermoplastic polyurethane adhesives containing nanosilicas with different specific surface area and silanol content. **International Journal of Adhesion & Adhesives**, v. 27, p. 469-479, 2007.
- [53] SYRACUSE research corporation – environmental science . Disponível em: http://www.syrres.com/esc/est_kowdemo.htm. Acesso em: 10 jan. 2007.
- [54] ALVES, Claudete. **Análise de fármacos em fluidos biológicos empregando o acoplamento SPME-LC/MS**. 2006. 173 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- [55] PRIETO, J. G.; MERINO, G.; PULIDO, M. M.; ESTEVEZ, E.; MOLINA, A. J.; VILA, L.; ALVAREZ, A. I. Improved LC method to determine ivermectin in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 639-645, 2003.

[56] RODRIGUES, J. C.; NETO, A. J. S.; FERNANDES, C.; ALVES, C. CANTADORI, A.; LANÇAS, F. M. Development of an improved heated interface for coupling solid-phase microextraction to high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, p. 208-212, 2006.

[57] LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs (Review). **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 17-63, 2000.