Leticia Schwerz

“Desenvolvimento e avaliação comparativa de column switching e LC-MS em escalas convencional e miniaturizada para determinação de contaminantes emergentes em água.”

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica
Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos-Neto

Exemplar revisado
O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

2019

Aos meus pais, João Astor e Heloisa,
com gratidão, amor e admiração!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Álvaro, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa e ter confiado no meu trabalho. Agradeço a orientação, os ensinamentos e os longos papos – científicos ou não!

Ao Professor Fernando Lanças, agradeço a acolhida no Croma.

Aos meus pais, irmão e irmã, minhas sobrinhas, meu sobrinho e minha cunhada. Obrigada por serem meu esteio, meus exemplos, minha família! Vocês são preciosos!

À Karen, minha companheira nessa aventura que é a vida. Obrigada por me fazer rir, me acompanhar, me amparar. Obrigada pelas discussões sobre pesquisa e ciência, pelas conversas sobre tudo... e mais um pouco. Sou grata por seguir minha trajetória tendo você ao meu lado!

Aos amigos do CROMA com quem convivi, por ensinarem o que sabem, pelo bom humor, por serem incentivadores. Obrigada por dividirem os êxitos e os fracassos, ambos comuns no nosso dia-a-dia em pesquisa. Carinho define...

Ao Guilherme e Elaine, incansáveis e competentes!

À Amanda, amiga em todas as horas, sempre muito lúcida e evoluída. Te tenho como exemplo em tantas coisas...

À Professora Dra. Quezia Bezerra Cass por todo o conhecimento transmitido. Agradeço também a doação das fases estacionárias Luna.

À Professora Dra. Eny Maria Vieira, pelo carinho e disponibilidade.

À banca examinadora dessa Tese de Doutorado _ Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças, Prof. Dra. Eny Maria Vieira, Prof. Dra. Martha Bohrer Adaime, Prof. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli e Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes _ pelas sugestões, discussões e conhecimentos compartilhados.

Aos funcionários das oficinas mecânica, especialmente ao Alex, pelo suporte técnico prestado.

Guilherme, Arley, Márcio e Pipe - obrigada por todo o suporte, discussões científicas, risadas e ajuda. Obrigada pela amizade!

Á Andréia, Gislei e Dani pela paciência e simpatia.

Agradeço aos amigos, colegas e familiares por entenderem a pouca disponibilidade - especialmente nos momentos de muito trabalho – e mesmo assim continuarem me apoiando e se fazendo presentes na minha vida.

Gratidão a Deus e à espiritualidade, pelas oportunidades diárias de crescimento espiritual, de amadurecimento e autoconhecimento.

À CAPES pela bolsa concedida, CNPQ e FAPESP pelos recursos que mantém o laboratório operando.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Processos nº 2010/19910-9 e nº 2017/02147-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A todos que, direta ou indiretamente, participaram do desenvolvimento desse projeto.

RESUMO

O interesse por técnicas analíticas que ofereçam a detectabilidade adequada, que sejam econômicas, ambientalmente corretas e capazes de processar rapidamente um grande número de amostras de diferentes complexidades é cada vez maior. Nesse aspecto, a utilização da cromatografia líquida no modo multidimensional é alternativa promissora, especialmente quando estratégias de extração e pré-concentração em fase sólida acopladas de forma online com a separação são exploradas, tanto em escala convencional quanto em escala miniaturizada. A ocorrência ambiental de contaminantes emergentes e seus impactos nas formas de vida aquática e terrestre têm sido motivo de preocupação. A quantificação desses analitos no ambiente exige métodos com limites de quantificação muito baixos, fazendo das estratégias column switching, com a inerente pré-concentração online, pertinentes para satisfazer as exigências na determinação desses compostos. Nesse cenário, o desenvolvimento e avaliação de estratégias column switching para determinação de contaminantes emergentes em amostras de interesse ambiental como aplicação modelo no estudo comparativo entre as escalas convencional e miniaturizada se faz impactante. Várias estratégias abrangendo column switching capilar e convencional foram investigadas. Colunas extratoras preenchidas com fases comerciais foram avaliadas, e tiveram seu desempenho testado no acoplamento com diversas colunas analíticas. Métodos em column switching capilar e convencional foram desenvolvidos e validados para a quantificação de estriol, estradiol, etinilestradiol, estrona, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno e benzilparabeno, tendo sido avaliadas as principais figuras de mérito. Os limites de quantificação atingidos em CS-UHPLC-ESI-MS/MS variaram de 0,001 ng mL^{-1} (butilparabeno e benzilparabeno) a 0,1 ng mL^{-1} (estriol, estradiol e etinilestradiol); para o método CS-cLC-ESI-MS/MS, os limites de quantificação foram maiores, variando entre 0,008 ng mL^{-1} (butilparabeno e benzilparabeno) a 0,8 ng mL^{-1} (estriol, estradiol e etinilestradiol). A linearidade dos métodos foi atestada avaliando-se os gráficos de resíduos, coeficiente de determinação e aplicando-se ponderações quando pertinente. A exatidão e a precisão foram investigadas, apresentando valores dentro dos critérios de aceitação. Por fim, os métodos foram aplicados em amostras ambientais aquosas coletadas em São Carlos - SP, mostrando que os métodos são adequados ao fim a que se destinam.

ABSTRACT

The interest in analytical techniques that offer adequate detectability, that are economical, environmentally friendly and capable of rapidly processing many samples of different complexities is increasing. In this regard, the use of liquid chromatography in the multidimensional mode is a promising alternative, especially when solid phase extraction and preconcentration strategies coupled online with the separation are explored, both on a conventional scale and on a miniaturized scale. The environmental occurrence of emerging contaminants and their impacts on aquatic and terrestrial life forms have been of concern. Quantification of these analytes in the environment requires methods with very low quantification limits, making column switching strategies with the inherent preconcentration online relevant to satisfy the requirements in determining these compounds. In this scenario, the development and evaluation of column switching strategies for the determination of emerging contaminants in samples of environmental interest as an application model in the comparative study between conventional and miniaturized scales is striking. Several strategies covering capillary and conventional column switching were investigated. Extraction columns filled with commercial phases were evaluated, and their performance was tested in the coupling with several analytical columns. Methods in capillary and conventional column switching modes were developed and validated for the quantification of estriol, estradiol, ethynilestradiol, estrone, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, buthylparaben and benzylparaben, and the main figures of merit were evaluated. The quantification limits reached in CS-UHPLC-ESI-MS / MS ranged from 0.001 ng mL^{-1} (buthylparaben and benzylparaben) to 0.1 ng mL^{-1} (estriol, estradiol, ethynilestradiol); for CS-cLC-ESI-MS / MS method, the LQ were higher, ranging from 0.008 ng mL^{-1} (buthylparaben and benzylparaben) to 0.8 ng mL^{-1} (estriol, estradiol, ethynilestradiol). The linearity of the methods was attested by evaluating the residual plots, coefficient of determination and applying weighted calibration when needed. Accuracy and precision were investigated, presenting values within the acceptance criteria. Finally, the methods were applied in samples collected in São Carlos - SP, showing that the methods are suitable for the purpose.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 - Distribuição por ano das publicações compiladas na base de dados Scopus, incluindo a equação de busca “column switcinhg” and: “liquid chromatography”, “capillary LC”, “micro LC” e “nano LC”.....31

Figura 1.2- Distribuição das principais aplicações dos sistemas column switching segundo a natureza da amostra analisada, de acordo com as publicações encontradas no periodo entre 2010 e 2018 na base de dados Scopus. 32

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 - Foto do hardware de aço inoxidável. a) end fitting composto por anilha (ou ferrule) e conector; b) união; c) filtro tipo screen (tela) e d) tubo de aço. 49

Figura 2.2- A) Corte longitudinal detalhando as partes que compõem o hardware utilizado para o preenchimento com as fases extratoras; B) Detalhes do design que elimina o volume extra coluna. 50

Figura 2.3 - Fotos detalhando o processo de preenchimento das colunas 56

Figura 2.4- Desenho representativo da configuração cromatográfica multidimensional empregada para a avaliação do acoplamento entre coluna extratora e analítica.....57

Figura 2.5 -Desenho representativo das válvulas atuadoras V_6 e V_{10}, presentes no sistema UltiMate™ 3000 RSLCnano, indicando as etapas de transferência dos analitos em backflush e foreflush.....58

Figura 2.6 - Desenho representativo da configuração cromatográfica unidimensional empregada para a separação com fase móvel ternária dos 5 hormônios nas colunas capilares. 60

Figura 2.7 - Cromatograma típico da separação obtida para os 5 hormônios de interesse na coluna cromatográfica Acclaim C_{18} com extração online em Strata X. Fase móvel binária composta de acetonitrila e água utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1} e temperatura do forno da coluna de 40°C. 66

Figura 2.8- Sobreposição dos cromatogramas típicos da separação obtida para os 5 hormônios de interesse em: coluna cromatográfica Acclaim com extração online e eluição em backflush (preto) e em coluna cromatográfica Acclaim com extração online e eluição em foreflush (rosa). Fase móvel binária composta de acetonitrila e água utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1}, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 280 nm. 69

Figura 2.9- Cromatogramas típicos da separação obtida para os 5 hormônios de interesse nas colunas cromatográficas capilares analíticas comerciais acopladas a Strata X. Fase móvel binária composta de acetonitrila e água utilizando modo de

eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1} temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 280 nm. 71

Figura 2.10- Cromatogramas típicos da separação obtida para os 5 hormônios de interesse nas colunas cromatográficas capilares analíticas comerciais. Fase móvel ternária composta de água e mistura de metanol e acetato de etila (80:20, v/v), utilizando modo de eluição gradiente, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 280 nm. 73

Figura 2 11- Cromatograma típico da separação obtida para solução padrão dos 5 hormônios de interesse e do etilparabeno na coluna cromatográfica Zorbax com extração online em Strata X. Fase móvel ternária utilizando modo de eluição gradiente, vazão 12 µl min^{-1}, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 280 nm. 77

Figura 2.12- Cromatogramas típicos da separação obtida para os 5 hormônios de interesse e para o etilparabeno na coluna cromatográfica Zorbax, com extração online em colunas Discovery C_{18} (rosa) e C_8 (azul). Fase móvel ternária utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1}, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 280 nm. 80

Figura 2.13-Cromatogramas típicos da separação obtida para os 5 hormônios de interesse e para o etilparabeno na coluna cromatográfica Zorbax, com extração online em colunas Luna C_{18} (rosa) e C_8 (azul). Fase móvel ternária utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1}, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 280 nm. 84

Figura 2.14- Sobreposição dos cromatogramas obtidos para a injeção da progesterona nas colunas extratoras (diâmetro 254 µm) preenchidas com fase Luna C_{18} em diferentes tempos de carregamento. Fase móvel de carregamento: 5 % de metanol em água, com vazão de 200 µL min^{-1}. Fase móvel de eluição: fase móvel ternária com eluição gradiente, com vazão de 12 µL min^{-1}. Monitoramento da eluição de progesterona por UV em comprimento de onda de 254 nm. 87

Figura 2.15- Cromatogramas típicos da separação obtida para a injeção de 500 µL da mistura dos 5 hormônios de interesse e etilparabeno em água ultrapura (vermelho) e para a matriz (esgoto simulado) (azul). Acoplamento entre coluna extratora Luna C_{18} (254 µm i.d.) e coluna cromatográfica Zorbax. Fase móvel ternária utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1}, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 254 nm. 88

Figura 2. 16- Cromatogramas típicos da separação obtida para a injeção de 500 µL da mistura dos 5 hormônios de interesse e etilparabeno em matriz (esgoto simulado) (preto); em azul, cromatograma típico da matriz. Acoplamento entre coluna extratora Luna C_{18} (254 µm i.d.) e coluna cromatográfica Zorbax. Fase móvel ternária utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1}, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 254 nm e 28 nm (conforme indicado). 89

Figura 2. 17- Zoom dos cromatogramas (Figura 2.16) típicos da separação obtida para a injeção de 500 µL da mistura dos 5 hormônios de interesse e etilparabeno na matriz (esgoto simulado). Acoplamento entre coluna extratora Luna C_{18} (254 µm i.d.) e coluna cromatográfica Zorbax. Fase móvel ternária utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1} e temperatura do forno da coluna de 40°C.....90

CAPÍTULO 3

Figura 3.1- Gráfico da pressão em função da vazão de água em coluna extratora Luna C_{18} de 508 µm de diâmetro interno. 110

Figura 3.2- Cromatogramas ilustrando o perfil cromatográfico em CS-UHPLC-ESI-QToF, obtido para as colunas disponíveis. 111

Figura 3.3- Cromatograma típico da separação cromatográfica dos 4 hormônios e 5 parabenos em CS-UHPLC-ESI-QToF nas condições anteriormente descritas (Tabela 3.7). 115

Figura 3.4- Cromatogramas de diversas matrizes aquosas[a] para visualização dos efeitos de matriz causados por cada uma. 117

Figura 3.5- Curvas analíticas para hormônios em diferentes matrizes construídas para comparação da sensibilidade dos analitos em cada matriz.....119

Figura 3. 6 -Curvas analíticas para parabenos em diferentes matrizes construídas para comparação da sensibilidade dos analitos em cada matriz.....120

Figura 3.7 - Curvas analíticas obtidas por column switching para A) parabenos em água ultrapura e B) hormônios em água ultrapura. 122

Figura 3.8- Gráfico das áreas obtidas para cada analito, a cada injeção (500 µL), dentro do intervalo de 10 horas consecutivas. 123

Figura 3. 9- Gráfico das áreas obtidas para cada analito, a cada injeção (500 µL), dentro do intervalo de 74 horas consecutivas. 124

Figura 3.10- Sobreposição de cromatogramas obtidos nas mesmas condições, em 3 dias distintos, ilustrando a baixa precisão inter-dias do método desenvolvido.....125

Figura 3.11– Gráfico da pressão em função da vazão de água em coluna extratora Luna C_{18} de 254 µm de diâmetro interno. 127

Figura 3.12- Cromatograma típico da separação cromatográfica dos 5 hormônios e 5 parabenos em CS-cLC-ESI-QToF nas condições anteriormente descritas (Tabela 3.10). 129

Figura 3.13- Gráfico da área obtida para cada analito, a cada injeção (500 µL), dentro do intervalo de 57 horas consecutivas (aproximadamente dois dias e meio).....129

CAPÍTULO 4

Figura 4.1- Cromatogramas evidenciando a seletividade do método CS-cLC-ESI-MS/MS. 145

Figura 4. 2 - Cromatogramas evidenciando a seletividade do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS. 151

Figura 4.3– Cromatogramas representativos da avaliação do efeito de matriz experimentado pelo metilparabeno (esquerda) e estrona (direita) em cada uma das amostras analisadas pelo método CS-cLC-ESI-MS/MS. 158

Figura 4.4 – Cromatogramas representativos da avaliação do efeito de matriz experimentado pelo metilparabeno (esquerda) e estrona (direita) em cada uma das amostras analisadas pelo método CS-UHPLC-ESI-MS/MS.....158

Figura 4.5 - Cromatogramas típicos da análise de hormônios e parabenos em CS-cLC-ESI-MS/MS para o padrão em água ultrapura (à esquerda) e para a amostra de água do Rio Monjolinho, próximo ao Shopping Iguatemi (à direita). 160

Figura 4.6 -Cromatogramas típicos da análise de hormônios e parabenos em CS-UHPLC-ESI-MS/MS para o padrão em água ultrapura (à esquerda) e para a amostra de água do Rio Monjolinho, próximo ao Shopping Iguatemi (à direita). 161

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 -Classificação das escalas utilizadas em cromatografia líquida, relacionando o diâmetro interno da coluna com a vazão típica empregada. 29

Tabela 1 2- Principais trabalhos disponíveis nos últimos anos utilizando a abordagem column switching e cromatografia líquida na análise de EDC em matrizes ambientais. 35

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 Estruturas químicas e propriedades físico-químicas dos hormônios utilizados nesse estudo. 48

Tabela 2.2- Características das fases extratoras utilizadas. 51

Tabela 2.3- Colunas capilares C_{18} comerciais utilizadas e suas principais características. 51

Tabela 2.4- Composição do esgoto simulado utilizado no desenvolvimento do método de extração.....54

Tabela 2.5-Características das colunas extratoras. 54

Tabela 2. 6- Tempos, posições das válvulas e eventos envolvidos na avaliação da capacidade retentiva dos analitos na coluna Strata X em fase móvel de carregamento composta de metanol e água. 61

Tabela 2.7- Tempos, posições das válvulas e eventos envolvidos no acoplamento da coluna extratora e a coluna analítica. 67

Tabela 2.8 - Eluição do estriol em coluna extratora Strata X, em diversas vazões e composições de fase móvel de carregamento (extração). 75

Tabela 2.9- Porcentagem de matriz eliminada na coluna Strata X, nos primeiros 4 minutos de carregamento (extração), em diversas vazões e composições de fase móvel. 76

Tabela 2.10-Eluição do estriol em colunas extratoras Discovery C18 e Discovery C8, em diversas vazões e composições de fase móvel de carregamento (extração)....78

Tabela 2.11- Porcentagem de matriz eliminada nas colunas Discovery C_{18} e Discovery C_8, nos primeiros 4 minutos de carregamento, em diversas vazões e composições de fase móvel. 79

Tabela 2.12 Eluição do estriol em colunas extratoras Luna C_{18} e Luna C_8, em diversas vazões e composições de fase móvel de carregamento (extração). 81

Tabela 2.13- Relações existentes entre as fases estacionárias Luna C_{18} e Luna C_8. 82

Tabela 2.14- Porcentagem de matriz eliminada nas colunas Luna C_{18} e Luna C_8, nos primeiros 4 minutos de carregamento, em diversas vazões e composições de fase móvel. 83

Tabela 2.15- Eluição do estriol em colunas extratoras Luna C_{18} (triplicata), em diversas vazões e composições de fase móvel de carregamento (extração). 85

Tabela 2.16- Porcentagem de matriz eliminada na coluna Luna C18, nos primeiros 4 minutos de carregamento, nas vazões e composições de fase móvel descritas. 86

Tabela 2.17- Tempos, posições das válvulas e eventos envolvidos em column switching da coluna extratora Luna C_{18} (254 µm i.d.) e coluna analítica Zorbax C_{18}. 91

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1-Estruturas químicas e propriedades físico-químicas dos parabenos utilizados nesse estudo. 99

Tabela 3.2 -Colunas capilares C_{18} utilizadas e suas principais características. 100

Tabela 3.3- Relação *m/z* extraídas dos cromatogramas de íons totais. 107

Tabela 3.4- Condições experimentais utilizadas no espectrômetro de massas MicrOToF-QII para as escalas convencional e capilar. 108

Tabela 3.5- Eluição do metilparabeno em coluna extratora Luna C_{18} de 508 µm de diâmetro interno. 110

Tabela 3.6- Síntese das principais variáveis investigadas no desenvolvimento do método column switching em escala convencional (CS-UHPLC-ESI-QToF). 113

Tabela 3.7- Condições de análise otimizadas para column switching entre coluna Luna C_{18} e coluna Acclaim em CS-UHPLC-ESI-QToF. 114

Tabela 3.8– Concentrações da linearidade da faixa de trabalho. 121

Tabela 3.9- Eluição do metilparabeno em coluna extratora Luna C_{18} de 254 µm de diâmetro interno. 126

Tabela 3.10 - Condições cromatográficas resultantes da otimização do método CS-cLC-ESI-QToF. 128

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1- Figuras de mérito avaliadas, procedimento adotado e critério de aceitação. 140

Tabela 4.2- Condições experimentas em ESI (-) obtidas para a análise de hormônios e parabenos via IntelliStart. 142

Tabela 4.3 - Condições cromatográficas resultantes da otimização do método CS-cLC-ESI-MS/MS. 143

Tabela 4.4- Condições cromatográficas resultantes da otimização do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS. 144

Tabela 4.5 - Níveis de concentração da faixa linear de trabalho para CS-cLC-ESI-MS/MS. 146

Tabela 4.6 -Modelos de ponderação e respectivos parâmetros avaliados.....147

Tabela 4.7- Modelos matemáticos selecionados para o método CS-cLC-ESI-MS/MS. 148

Tabela 4.8 - Limites de detecção do método CS-cLC-ESI-MS/MS para hormônios e parabenos 148

Tabela 4.9- Valores de exatidão obtidos para as concentrações referentes aos pontos baixo, médio e alto do método CS-cLC-ESI-MS/MS. 149

Tabela 4.10- Resultados obtidos para a precisão intra -dia para o método CS-cLC-ESI-MS/MS.....150

Tabela 4.11- Resultados obtidos para a precisão inter-dias para o método CS-cLC-ESI-MS/MS.....150

Tabela 4. 12 -Níveis de concentração da faixa de trabalho do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS. 152

Tabela 4.13 - Modelos de ponderação e respectivos parâmetros avaliados para CS-UHPLC-ESI-MS/MS. 153

Tabela 4.14- Modelos matemáticos selecionados para o método CS-UHPLC-ESI-MS/MS. 154

Tabela 4.15- Limites de detecção do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS para hormônios e parabenos. 154

Tabela 4.16– Valores de exatidão obtidos para as concentrações referentes aos pontos baixo, médio e alto do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS.....155

Tabela 4.17– Resultados obtidos para a precisão intra-dia para o método CS-UHPLC-ESI-MS/MS.....156

Tabela 4.18 – Resultados obtidos para a precisão inter-dias para o método CS-UHPLC-ESI-MS/MS. 156

Tabela 4.19 - Amostras ambientais aquosas analisadas em CS-cLC-ESI-MS/MS. 159

Tabela 4. 20 - Amostras ambientais aquosas analisadas em CS-UHPLC-ESI-MS/MS 160

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 Column switching e cromatografia líquida em escalas convencional e miniaturizada para determinação de contaminantes emergentes em água 23

1.1 Column switching como estratégia para clean-up de amostras, extração e pré-concentração online dos analitos 24

1.1.1 Colunas de extração para uso em column switching 27

1.2 Escala convencional versus escala miniaturizada 28

1.3 Aplicações de sistemas column switching.....31

CAPÍTULO 2

1 OBJETIVO 47

1.1 Objetivos específicos 47

2 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....48

2.1 Material 48

2.1.1 Padrões analíticos.....48

2.1.1.1 Hormônios esteroides 48

2.1.2 Reagentes e solventes.....49

2.1.3 Hardware empregado nas colunas extratoras.....49

2.1.4 Fases estacionárias comerciais utilizadas no preenchimento das colunas extratoras 50

2.1.5 Colunas analíticas comerciais.....51

2.1.5.1 Colunas capilares C_{18}.....51

2.1.6 Equipamentos, softwares e sistemas.....52

2.1.6.1 Preenchimento das colunas extratoras 52

2.1.6.2 Cromatografia líquida em fase reversa em escala miniaturizada.....52

2.1.7 Amostras ambientais - esgoto simulado.....53

2.2 Métodos 54

2.2.1 Preenchimento das colunas extratoras 54

2.2.2 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Acclaim C_{18} com extração online em coluna Strata X – arranjo multidimensional em escala capilar com detecção UV-Vis 56

2.2.3 Avaliação do perfil cromatográfico em colunas capilares comerciais com extração online em Strata X - arranjo multidimensional em escala capilar com detecção UV-Vis 59

2.2.4 Avaliação do desempenho cromatográfico das colunas capilares comerciais com fase móvel ternária - arranjo unidimensional em escala capilar 59

2.2.5 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em coluna Strata X - fase móvel ternária e detecção UV-Vis 60

2.2.5.1 Estudo da capacidade retentiva da coluna Strata X.....60

2.2.6 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em colunas Discovery C_{18} e C_8 - fase móvel ternária e detecção UV-Vis 62

2.2.6.1 Estudo da capacidade retentiva das colunas Discovery C_{18} e C_8 62

2.2.6.2 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching entre colunas Discovery e coluna Zorbax 62

2.2.7 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em colunas Luna C_{18} e C_8 - fase móvel ternária e detecção UV-Vis 62

2.2.7.1 Estudo da capacidade retentiva das colunas Luna C_{18} e C_8 62

2.2.7.2 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching entre colunas Luna e coluna Zorbax 63

2.2.8 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em coluna Luna C_{18} (254 µm i.d.) - fase móvel ternária e detecção UV-Vis 63

2.2.8.1 Estudo da capacidade retentiva das colunas Luna C_{18} (254 µm i.d.).....63

2.2.8.2 Avaliação das condições de transferência dos analitos da coluna extratora para a coluna analítica 63

2.2.8.3 Avaliação do perfil cromatográfico – column switching entre coluna Luna C_{18} (diâmetro 254 µm) e coluna Zorbax 64

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 65

3.1 Colunas extratoras 65

3.2 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Acclaim C18 com extração online em coluna Strata X – arranjo multidimensional em escala capilar com detecção UV-Vis 65

3.3 Avaliação do perfil cromatográfico em colunas capilares comerciais com extração online em Strata X - arranjo multidimensional em escala capilar com detecção UV-Vis 70

3.4 Avaliação do desempenho cromatográfico das colunas capilares comerciais com fase móvel ternária - arranjo unidimensional em escala capilar 72

3.5 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em coluna Strata X - fase móvel ternária e detecção UV-Vis 74

3.5.1 Estudo da capacidade retentiva da coluna Strata X 74

3.5.2 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching da coluna Strata X com a coluna Zorbax 76

3.6 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em colunas Discovery C_{18} e C_8 - fase móvel ternária e detecção UV-Vis 78

3.6.1 Estudo da capacidade retentiva das colunas Discovery C_{18} e C_8 78

3.6.2 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching das colunas Discovery com a coluna Zorbax 79

3.7 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em colunas Luna C_{18} e C_8 - fase móvel ternária e detecção UV-Vis 81

3.7.1 Estudo da capacidade retentiva das colunas Luna C_{18} e C_8 81

3.7.2 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching das colunas Luna com a coluna Zorbax 83

3.8 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em coluna Luna C_{18} (254 µm i.d.) - fase móvel ternária e detecção UV-Vis 84

3.8.1 Estudo da capacidade retentiva das colunas Luna C_{18} (254 µm i.d.) 84

3.8.2 Avaliação das condições de transferência dos analitos da coluna extratora para a coluna analítica 86

3.8.3 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching entre coluna Luna C_{18} (diâmetro 254 µm) e coluna Zorbax 88

4 CONCLUSÕES 92

CAPÍTULO 3

1 OBJETIVO 96

1.1 Objetivos específicos 96

2 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL 98

2.1 Material 98

2.1.1 Reagentes e solventes 98

2.1.2 Padrões analíticos 98

2.1.2.1 Hormônios esteroides 98

2.1.2.2 Parabenos 98

2.1.3 Colunas extratoras 99

2.1.3.1 Escala convencional 99

2.1.3.2 Escala capilar 100

2.1.4 Colunas analíticas comerciais 100

2.1.4.1 Escala convencional 100

2.1.4.2 Escala capilar 101

2.1.5 Equipamentos, softwares e sistemas 101

2.1.6 Amostras ambientais 101

2.2 Métodos 102

2.2.1 Escala convencional e capilar 102

2.2.1.1 Determinação das *m/z* a serem extraídas dos cromatogramas de íons totais 102

2.2.2 Escala convencional 103

2.2.2.1 Estudo da capacidade retentiva da coluna extratora Luna C_{18} (508 µm i.d.) para parabenos (UV/Vis) 103

2.2.2.2 Investigação quanto à natureza do fluxo gerado na coluna extratora durante a etapa de carregamento da coluna Luna C18 (508 µm i.d.) 103

2.2.2.3 Avaliação do perfil cromatográfico em escala convencional - column switching entre coluna Luna C_{18} (diâmetro 508 µm) e diversas colunas comerciais – MicrOToF-QII 103

2.2.2.4 Desenvolvimento do método - column switching entre coluna extratora Luna C_{18} (diâmetro 508 µm) e coluna Acclaim (CS-UHPLC-ESI-QToF) 104

2.2.2.4.1 Avaliação qualitativa dos efeitos de matriz apresentados por diversas matrizes aquosas 104

2.2.2.4.2 Avaliação prévia da linearidade da faixa de trabalho, exatidão e precisão em água ultrapura 105

2.2.3 Escala capilar 105

2.2.3.1 Estudo da capacidade retentiva da coluna extratora Luna C_{18} (254 µm i.d.) para parabenos (UV/Vis) 105

2.2.3.2 Investigação quanto à natureza do fluxo gerado na coluna extratora durante a etapa de carregamento da coluna Luna C_{18} (254 µm i.d.) 105

2.2.3.3 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching entre coluna extratora Luna C18 (diâmetro 254 µm) e coluna BetaBasic18 106

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 107

3.1 Escala convencional e capilar 107

3.1.1 Determinação das *m/z* a serem extraídas dos cromatogramas de íons totais 107

3.2 Escala convencional 109

3.2.1 Estudo da capacidade retentiva da coluna extratora Luna C_{18} (508 µm i.d.) para parabenos (UV/Vis) 109

3.2.2 Investigação quanto à natureza do fluxo gerado na coluna extratora durante a etapa de carregamento da coluna Luna C_{18} (508 µm i.d.) 110

3.2.3 Avaliação do perfil cromatográfico em escala convencional - column switching entre coluna Luna C_{18} (diâmetro 508 µm) e diversas colunas comerciais – MicrOToF-QII 111

3.2.4 Desenvolvimento do método - column switching entre coluna extratora Luna C_{18} (diâmetro 508 µm) e coluna Acclaim (CS-UHPLC-ESI-QToF) 112

3.2.4.1 Avaliação qualitativa dos efeitos de matriz apresentados por diversas matrizes aquosas 115

3.2.4.2 Avaliação prévia da linearidade da faixa de trabalho, exatidão e precisão em água ultrapura 121

3.3 Escala capilar 126

3.3.1 Estudo da capacidade retentiva da coluna Luna C_{18} (254 µm i.d.) para parabenos (UV/VIS) 126

3.3.2 Investigação a respeito da presença ou ausência de fluxo turbulento durante a etapa de carregamento da coluna Luna C_{18} (254 µm i.d.) 127

3.3.3 Avaliação do perfil cromatográfico – column switching entre coluna Luna C_{18} (diâmetro 254 µm) e coluna BetaBasic$_{18}$ 128

3.3.4 Avaliação da precisão inter-dias 129

4 CONCLUSÕES 131

CAPÍTULO 4

1 OBJETIVO 134

1.1 Objetivos específicos 134

2 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL 135

2.1 Material 135

2.1.1 Padrões analíticos de hormônios esteroides e parabenos 135

2.1.2 Reagentes e solventes 135

2.1.3 Colunas extratoras 135

2.1.3.1 Escala capilar 135

2.1.3.2 Escala convencional 135

2.1.4 Colunas analíticas comerciais 136

2.1.4.1 Escala capilar 136

2.1.4.2 Escala convencional 136

2.1.5 Equipamentos, softwares e sistemas 136

2.1.6 Amostras ambientais 137

2.2 Métodos 138

2.2.1 Escalas capilar e convencional 138

2.2.1.1 Otimização das condições de ionização e fragmentação 138

2.2.2 Adequação do método cromatográfico desenvolvido 138

2.2.2.1 Escala capilar 138

2.2.2.2 Escala convencional 139

2.2.3 Avaliação de figuras de mérito para as escalas capilar e convencional 139

2.2.4 Avaliação qualitativa dos efeitos de matriz apresentados por diversas matrizes aquosas para as escalas capilar e convencional 141

2.2.5 Aplicação dos métodos em amostra de água para as escalas capilar e convencional 141

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 142

3.1 Otimização das condições de ionização e fragmentação – escalas capilar e convencional 142

3.2 Adequação do método cromatográfico desenvolvido 143

3.2.1 Escala capilar 143

3.2.2 Escala convencional.....144
3.3 Avaliação de figuras de mérito 144
3.3.1 Escala capilar 145
3.3.1.1 Seletividade.....145
3.3.1.2 Linearidade.....146
3.3.1.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....148
3.3.1.4 Exatidão 149
3.3.1.5 Precisão intra-dia e inter-dias.....149
3.3.2 Escala convencional.....151
3.3.2.1 Seletividade.....151
3.3.2.2 Linearidade.....152
3.3.2.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....154
3.3.2.4 Exatidão 155
3.3.2.5 Precisão intra-dia e inter-dias.....155
3.4 Avaliação qualitativa dos efeitos de matriz apresentados por diversas matrizes aquosas.....157
3.4.1 Escala capilar 157
3.4.2 Escala convencional.....158
3.5 Aplicação dos métodos em amostras ambientais 159
3.5.1 Escala capilar 159
3.5.2 Escala convencional.....160
4 CONCLUSÃO 162

PREFÁCIO

Para uma melhor organização, essa Tese está dividida em capítulos. São 4 capítulos, dispostos cronologicamente.

O primeiro capítulo contextualiza o que foi realizado durante todo o período de desenvolvimento do estudo, na forma de uma breve introdução aos temas abordados.

O segundo capítulo é dedicado a apresentar o amplo estudo que foi realizado em column switching na escala capilar buscando otimização na focalização e transferência da banda cromatográfica da primeira para a segunda dimensão. Hormônios em matriz aquosa foram objeto desse estudo.

O terceiro capítulo trata do desenvolvimento dos métodos cromatográficos para a determinação de hormônios e parabenos em água, utilizando column switching nas escalas convencional e capilar, hifenadas à espectrometria de massas de alta resolução.

Finalmente, o quarto capítulo descreve a avaliação das figuras de mérito para os métodos cromatográficos desenvolvidos para a quantificação de hormônios e parabenos em água utilizando column switching e cromatografia líquida (em escala convencional e capilar) hifenada à espectrometria de massas sequencial.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 Column switching e cromatografia líquida em escalas convencional e miniaturizada para determinação de contaminantes emergentes em água

Depois dos grandes desenvolvimentos em melhorias no desempenho cinético, resolução e eficiência dos sistemas cromatográficos atingidos nos últimos 20 anos [1], cientistas de todo o mundo concordam que a principal demanda analitica continua sendo o incremento da produtividade com o desenvolvimento de métodos confiáveis e com alta frequência de análise, capazes de satisfazer a necessidade do número crescente de amostras a serem analisadas [2].

Na atualidade, o grande gargalo na obtenção de procedimentos rápidos de análises ainda é o preparo da amostra [3]. Dentre as diferentes etapas que compõem todo o processo de desenvolvimento de um método analítico, o clean-up, com extração e pré-concentração seletiva dos analitos de interesse, é usualmente considerado como a etapa de maior consumo de tempo, além de originar boa parte dos erros analíticos [4].

Assim, buscando aumentar eficiência, produtividade e confiabilidade dos procedimentos de preparo de amostra, enquanto se minimizam seus impactos econômicos e ambientais, grandes esforços têm sido empenhados na miniaturização e na automatização desses procedimentos.

Claramente, a miniaturização das técnicas de preparo de amostras e dos sistemas cromatográficos tem possibilitado diminuir o consumo das quantidades de amostras, solventes e sorventes. Já é possível contar com um grande acervo de diferentes tipos de técnicas de microextração, tanto em fase sólida (SPME, solid phase microextraction) [5,6], quanto em fase líquida (LPME, liquid phase microextraction) [7], passíveis de serem executadas tanto de forma manual quanto automatizada.

Por sua vez, a automatização tem buscado o desenvolvimento de métodos mais rápidos e robustos, com alta confiabilidade. Diferentes estratégias de automatização têm sido empregadas em química analítica, desde meados do século passado. Dentre essas, uma das mais populares entre os usuários tem sido a exploração da cromatografia líquida multidimensional. Essa ferramenta permite – por exemplo – o acoplamento online das etapas de preparo de amostra com a separação

cromatográfica, resultando em métodos analíticos com pré-concentração online, capazes de fornecer alta detectabilidade e reduzidos tempos de análise.

1.1 Column switching como estratégia para *clean-up* de amostras, extração e pré-concentração *online* dos analitos

Em cromatografia multidimensional a nomenclatura é alvo de algumas controvérsias e questionamentos. Há vertentes que somente consideram a "multidimensionalidade" se houver ortogonalidade entre as colunas utilizadas no acoplamento. Uma definição menos restritiva considera que o uso de duas ou mais colunas ou técnicas cromatográficas visando melhor separação, incluindo o aumento da resolução, da capacidade de pico e da produtividade, ou ainda incluindo o preparo de amostras, encaixa-se perfeitamente na definição de cromatografia multidimensional. (8)

Column switching é um modo multidimensional de separação que permite realizar o clean-up da amostra com extração e pré-concentração seletiva dos analitos de interesse na primeira dimensão, permitindo a transferência online dos analitos para a segunda dimensão, onde são separados e quantificados [8].

Há várias vantagens em se utilizar essa modalidade multidimensional, destacando-se: menor manipulação, investimento de tempo e recursos no preparo de amostra; melhor recuperação, atingindo limites de quantificação menores; compatibilidade com a automatização; diminuição do efeito de matriz, melhora na razão sinal/ruído e consequentemente, menores limites na detecção e quantificação dos analitos. (8, 9) Entretanto, para que a potencialidade dessa ferramenta analítica seja bem aproveitada, é necessário um rigoroso conhecimento da compatibilidade das condições cromatográficas a serem usadas em cada dimensão. Parâmetros como solvente e volume de amostra, solvente de carregamento, fases móveis, fases estacionárias, pressões envolvidas, temperaturas e vazões utilizadas, entre outros, determinam a eficiência no clean-up da amostra, bem como da extração e focalização dos analitos de interesse [9]. Por fim, todos esses parâmetros serão responsáveis pelo desempenho do método analítico desenvolvido e uma vez que sejam bem ajustados, garantirão resultados adequados e confiáveis.

A configuração instrumental para column switching normalmente consiste de duas colunas diferentes (não necessariamente ortogonais), duas bombas de alta

pressão de HPLC e uma válvula de seis pórticos, que permite a hifenação/comutação das colunas. Essa configuração permite, numa primeira etapa, carregar a amostra na coluna de extração (1D) com ajuda da bomba A, possibilitando a discriminação seletiva entre os analitos e a matriz, enquanto a coluna analítica (2D) é condicionada com a fase móvel proveniente da bomba B. Em uma segunda etapa, a válvula é comutada, conectando a coluna de extração com a bomba B, de forma que os analitos são dessorvidos e transferidos para a coluna analítica. Em seguida, a válvula retorna à configuração inicial, sendo a coluna de extração lavada com solvente proveniente da bomba A, enquanto os analitos são separados e conduzidos para detecção na segunda dimensão.

O carregamento dos analitos na primeira dimensão pode ser realizado passando a amostra através da coluna numa única vez, ou passando a amostra numa sequência de ciclos aspirar/dispensar através da coluna de extração [10]. Por sua vez, a eluição dos analitos da primeira para a segunda dimensão pode ser realizada de duas formas:

i) no modo foreflush (ou straightflush), onde os analitos são dessorvidos da coluna de extração por introdução de fase móvel proveniente da bomba B no mesmo sentido do fluxo em que os analitos foram carregados, ou

ii) no modo backflush, onde os analitos são dessorvidos no sentido contrário ao fluxo de seu carregamento.

Normalmente o modo backflush proporciona melhores respostas analíticas, uma vez que favorece a introdução dos analitos na coluna analítica numa estreita banda focalizada, minimizando desta forma o alargamento do pico. Por outro lado, o modo foreflush pode evitar que resíduos que tendem a acumular na entrada da coluna de extração sejam transferidos para a coluna analítica.

Em cromatografia multidimensional, a nomenclatura utilizada pode resultar ainda um tanto controversa. O termo column switching de fato agrupa várias estratégias de extração em fase sólida acoplada de forma *online* com a separação mediante cromatografia líquida, destacando-se a extração em fase sólida online (*online* SPE), microextração em fase sólida in-tube (IT-SPME), heart-cut 2D-LC e a extração em fluxo turbulento (TFC) [10].

A extração em fase sólida online é provavelmente, dentre as diferentes estratégias de column switching, a mais amplamente utilizada. O termo surgiu nos anos 80, e desde então tem encontrado grande aplicabilidade em diferentes áreas do

âmbito acadêmico, fornecendo várias vantagens sobre a versão off-line da técnica, como a redução do tempo envolvido no tratamento da amostra, a redução da exposição do analista a amostras e reagentes e o menor consumo de amostras, solventes e fases de extração [11].

O sistema de online SPE é composto por uma válvula de seis (ou mais) pórticos, bombas de carregamento e eluição, uma coluna de SPE (primeira dimensão) e a coluna analítica (segunda dimensão). O procedimento genérico de online SPE envolve 4 etapas: i) condicionamento da coluna extratora, ii) carregamento da amostra, iii) eluição, e iv) lavagem da coluna. Os três primeiros passos são praticamente os mesmos usados em SPE off-line, sendo a lavagem da coluna o único passo adicionado para evitar efeito de memória (carry over) e possibilitar a reutilização da coluna de extração na análise sequencial de múltiplas amostras. Em vários trabalhos são relatados ganhos na frequência analítica em comparação com o formato off-line da técnica [12–14].

Na in-tube SPME a coluna de extração, na primeira dimensão, é uma coluna capilar, empacotada, monolítica, ou tubular aberta [15]. Da mesma forma que em *online* SPE, os analitos são extraídos por passagem da amostra através do tubo capilar e posteriormente dessorvidos num fluxo continuo ou em modo estático, e finalmente conduzidos para a coluna analítica na segunda dimensão. Em in-tube SPME o carregamento da amostra pode ser realizado por passagem da amostra através do capilar numa única vez e numa única direção (flow through) ou por realização de ciclos aspirar/dispensar [16]. O primeiro modo é comumente utilizado com colunas capilares empacotadas e monolíticas, pois a permeabilidade destas colunas normalmente impossibilita a passagem da amostra em vários ciclos aspirar/dispensar. Já a aplicação do segundo modo é limitada a colunas de alta permeabilidade, tais como as colunas tubulares abertas. Adicionalmente, este modo de operação requer algumas modificações na configuração do sistema, pois neste caso a coluna de extração (1D) deve ser colocada entre a agulha de injeção e a alça de amostragem. Neste caso, a diferença da online SPE e do modo flow through, é que a válvula atuadora é parte do injetor. Embora esse seja um modo de extração automatizado, a possibilidade de realizar ciclos aspirar/dispensar para a carregamento da amostra não é uma opção disponível em todos os instrumentos de cromatografia líquida [17].

A cromatografia em fluxo turbulento (TFC), baseia-se no uso de colunas empacotadas com partículas maiores que as usuais e utilização de alta vazão de fase móvel, que permitem operar sob condições de fluxo não laminar [18]. Esta caraterística do fluxo possibilita a separação entre moléculas grandes (proteínas, ácidos húmicos, etc) e pequenas (analitos), enquanto favorece a transferência de massa, garantindo boa extração dos analitos, ao mesmo tempo em que matriz é removida [19,20]. Carregamento da amostra, transferência dos analitos, eluição e recondicionamento são as principais etapas na TFC [21]; comumente são utilizadas colunas preenchidas com partículas de tamanho médio na faixa de 30 a 60 μm e vazões maiores do que 1,5 mL min^{-1}.

1.1.1 Colunas de extração para uso em column switching

Em sistemas column switching é conveniente que as fases estacionárias de cada dimensão tenham propriedades físico-químicas diferentes no processo de eluição, uma vez que esta característica permite elevada ortogonalidade para a separação dos analitos, principalmente quando se trata de amostras de elevada complexidade [22]. Enquanto as colunas analíticas empregadas na segunda dimensão são normalmente as colunas analíticas convencionalmente utilizadas em cromatografia líquida, uma grande variedade de possibilidades de colunas de extração tem sido explorada pelos pesquisadores. A grande vantagem da estratégia de extração e pré-concentração *online* utilizando column switching é a possibilidade de injetar amostras complexas com pouquíssimo ou nenhum tratamento prévio diretamente na coluna de extração; não são raros os casos de injeção de amostras submetidas apenas à filtração ou centrifugação.

Na busca por alta seletividade e eficiência de extração, a maior parte dos esforços tem sido dedicados ao desenvolvimento de colunas baseadas em partículas [23]. No entanto, dada sua alta permeabilidade, colunas monolíticas também têm resultado de grande interesse, especialmente na fabricação de colunas de extração miniaturizadas [24,25]. As colunas tubulares abertas (OT) têm se mostrado úteis em escala miniaturizada, no entanto sua aplicabilidade como coluna de extração é ainda limitada devido à sua baixa capacidade de carga [26–28] e também aos aspectos cinéticos da dessorção. Observa-se um interesse crescente no desenvolvimento de colunas de extração em formatos alternativos, como as colunas de micro canais,

preparadas em segmentos de fibra ótica e as colunas recheadas com fibras (recobertas ou não com fase estacionária), dispostas longitudinalmente ao longo da coluna [29].

Em geral, em online SPE normalmente são utilizadas colunas de extração com diâmetro interno maior do que 1 mm e comprimento entre 10 e 50 mm, empacotadas com partículas de 30 a 50 µm, ou monolíticas. Em IT-SPME são usuais colunas capilares, com diâmetro interno inferior a 1 mm, com comprimento normalmente superior a 50 mm e normalmente do tipo monolíticas ou tubulares abertas. Já as colunas mais utilizadas em TFC são de 50 mm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro interno, empacotadas com partículas de tamanho superior a 50 µm [9,10].

Atualmente, um grande número de fases estacionárias passíveis de fornecer alta seletividade na primeira dimensão se encontram disponíveis para sistemas column switching [8–10]. Entre os materiais mais usados pelos pesquisadores, encontram-se as fases convencionalmente utilizadas em HPLC (tanto do modo reverso quanto dos modos normal e HILIC), fases poliméricas características de GC e SPME, materiais de acesso restrito (RAM), polímeros molecularmente impressos (MIP), associações do tipo RAM-MIP, materiais baseados em líquidos iônicos e materiais baseados em grafeno, nanotubos e outras formas do carbono poroso. Além desses, materiais para metabolômica e glicômica, colunas acopladas com nano LC para peptidômica, colunas de inmunoafinidade para proteômica targeted e fases de metal-óxido com afinidade para análises de fosfopetídeos são utilizadas em column switching [30,31].

1.2 Escala convencional *versus* escala miniaturizada

Diferentes nomenclaturas têm sido empregadas para classificar as diferentes escalas da cromatografia líquida e muita controvérsia a respeito existe ainda. Na atualidade a nomenclatura mais comumente utilizada é aquela proposta por Chervet e colaboradores, que relaciona o diâmetro interno da coluna com a vazão da fase móvel empregada (Tabela 1.1) [32,33].

Tabela 1.1 -Classificação das escalas utilizadas em cromatografia líquida, relacionando o diâmetro interno da coluna com a vazão típica empregada.

Classificação	**Diâmetro interno da coluna (*i.d.*)**	**Vazão típica empregada**
LC convencional	3,2 - 4,6 mm	0,5 - 2,0 mL min^{-1}
LC *microbore*	1,5 - 3,2 mm	100 - 500 µl min^{-1}
micro-LC (µLC)	0,5 - 1,5 mm	10 - 100 µl min^{-1}
LC capilar (cLC)	150 - 500 µm	1 - 10 µl min^{-1}
nano-LC	10 - 150 µm	10 - 1000 nl min^{-1}

Fonte: CHERVET, J.P. et al, 1996, p. 1509 [32]

As primeiras tentativas de miniaturização da cromatografia líquida remetem aos trabalhos pioneros de Horvath em 1967, seguidos pelos trabalhos de Giddings, Ishii e Novotnynas décadas seguintes. O desenvolvimento da cromatografia líquida miniaturizada foi inicialmente lento e permaneceu um tanto relegado até o início dos anos 90, porém o avanço em instrumentação analítica nos últimos anos tem permitido seu resurgimento [34,35].

Quando comparada à cromatografia líquida em escala convencional, a LC miniaturizada pode fornecer menores limites de detecção e quantificação, especialmente quando essa técnica é utilizada acoplada a detectores sensíveis a concentração do analito (como por exemplo espectrômetros de massas com ionização por electrospray (ESI)); ainda, permite diminuir o consumo de amostras, fases estacionárias e solventes Na hifenação da cromatografia líquida com a espectrometria de massas tem sido observadas melhorias na eficiência da ionização ao migrar da escala convencional à escala miniaturizada, especialmente devido a menor quantidade de fase móvel a ser evaporada na fonte de ionização por electrospray [36].

Incrementos na sensibilidade e redução no efeito de matriz ao passar da escala convencional para a miniaturizada foram demonstrados por Wang e Bennet no acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas de alta resolução [37]. No entato, em estudos de compração entre escalas convencional e miniaturizada, alguns autores apontam como vantagem da redução de escala

somente a diminuição no consumo de amostras e solventes, sem melhoras significativas na redução dos LD e LQ [37].

É importante ressaltar que essa maior detectabilidade em LC miniaturizada acoplada a detectores sensíveis a concentração, só pode ser atingida se a eficência cromatográfica for mantida e se volumes de amostra proporcionalmente maiores são injetados [35,38]. Isso significa que, para obter um real incremento na sensibilidade por redução da escala, volumes de injeção maiores que os aceitáveis para LC miniaturizada são necessários. Entretanto, a transferência de métodos da HPLC tradicional para a escala miniaturizada é normalmente guiada por um fator de escala proporcional à razão entre o quadrado do raio das colunas ($f = r^2$convencional/r^2miniaturizada) [39]; a redução dos volumes de injeção causados por esse escalonamento também são mais compatíveis com a capacidade de carga das colunas cromatográficas miniaturizadas.

O volume injetável depende do volume morto da coluna, do fator de retenção do soluto dentro do solvente da amostra e da fase móvel, e sua mistura antes de atingir o leito cromatográfico. Até mesmo o tipo de partículas tem um efeito no volume injetável. Por exemplo, as partículas de núcleo rígido possuem eficiência superior sobre partículas totalmente porosas, fornecendo bandas de analito mais estreitas; porém, devido ao reduzido volume poroso, elas são ligeiramente mais sensíveis à sobrecarga da amostra [40]. O efeito do volume de injeção na eficiência cinética de colunas Kinetex UHPLC (preenchidas com partículas de núcleo rígido) com diferentes comprimentos (50, 100 e 150 mm) foi relatado e colunas mais curtas mostraram-se propensas a perder sua eficiência antes que as mais longas [23].

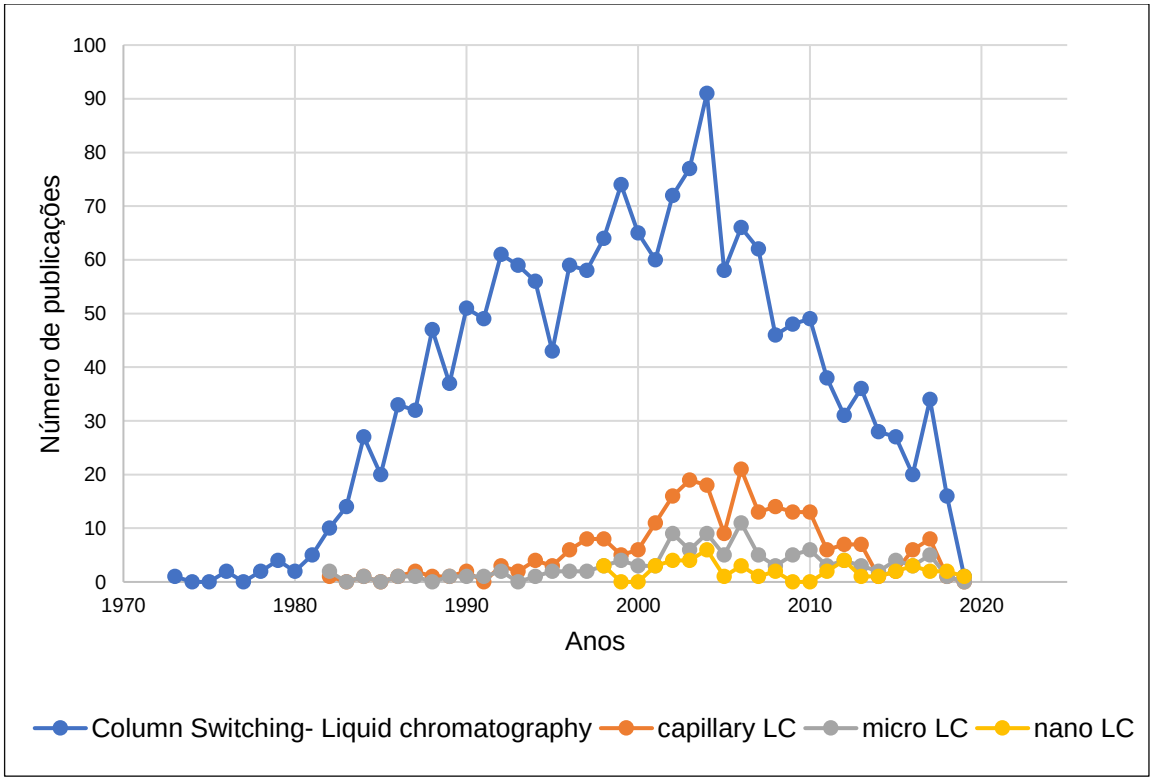
O volume de injeção pode ser aumentado com a focalização na coluna, situação na qual o solvente da amostra tem menor força de eluição que a fase móvel. Várias estratégias têm sido descritas para este propósito [40]: Márta e colaboradores [41] conseguiram reduções do limite de quantificação entre 2 a 5 vezes na determinação de hormônios esteroides em plasma humano; para isso utilizaram micro UHPLC com aumento do volume de injeção, estudando colunas com diâmetros entre 0,3-0,5 µm i.d. e diferentes geometrias e fases estacionárias.

De modo geral, column switching em LC miniaturizada não só permite a integração das etapas de preparo de amostra e separação cromatográfica, mas também se apresenta como a melhor alternativa disponível para injetar maior volume de amostra, e consequentemente, maior massa de analito na escala miniaturizada,

com focalização na primeira dimensão, enquanto possibilita o real incremento na detectabilidade prometida pela redução da escala [42].

No entanto, a utilização de sistemas column switching com formas miniaturizadas da cromatografia líquida é ainda bastante limitada quando comparada com seu uso na escala convencional. Essa constatação é facilmente visualizada a partir do levantamento das publicações descrevendo o uso de sistemas column switching compiladas na base de dados Scopus (Figura 1.1).

Figura 1. 1 - Distribuição por ano das publicações compiladas na base de dados Scopus, incluindo a equação de busca “column switcinhg” and: “liquid chromatography”, “capillary LC”, “micro LC” e “nano LC”.



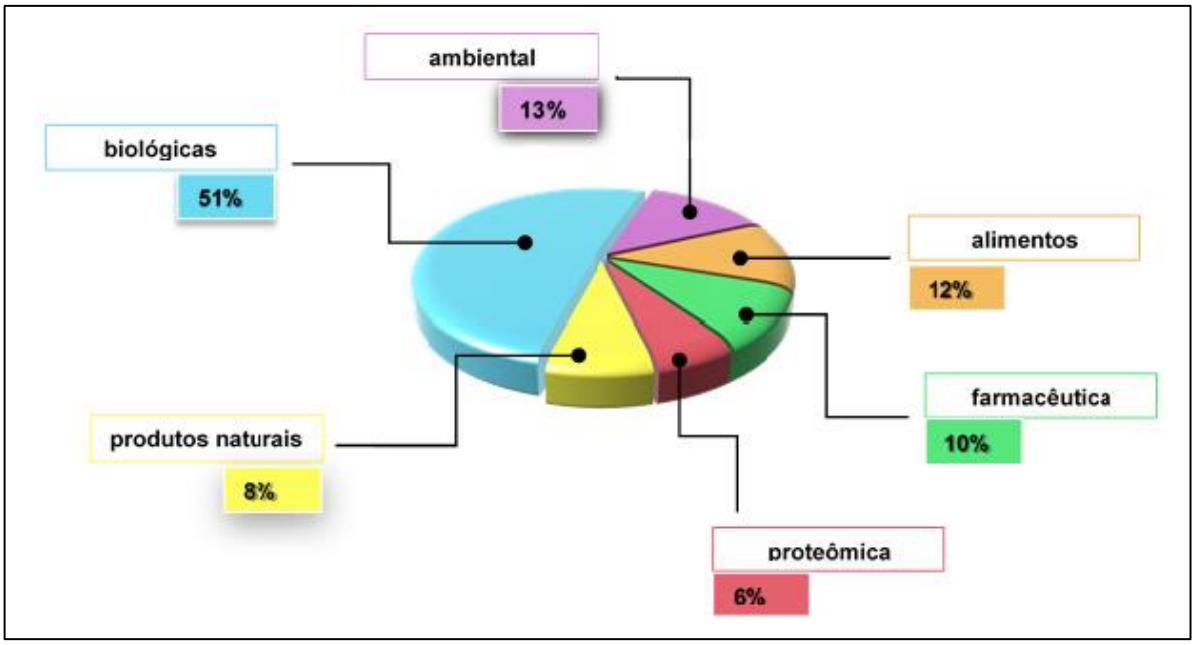
Fonte: Base de Dados Scopus (consulta em novembro de 2018)

1.3 Aplicações de sistemas column switching

Os sistemas column switching surgiram na década de 70 [43] como uma estratégia capaz de permitir a injeção direta de amostras biológicas nos sistemas cromatográficos. Atualmente são amplamente utilizados, tanto na determinação de uma variedade de moléculas pequenas a partir de uma grande diversidade de matrizes, quanto no desenvolvimento de análises nas ciências ômicas.

Na determinação de pequenas moléculas, uma revisão das diferentes aplicações publicadas na base de dados Scopus no período compreendido entre 2010 a 2018 (Figura 1.2) demonstrou que os sistemas column switching continuam encontrando sua principal aplicação na análise de amostras biológicas com fins farmacêuticos, toxicológicos e/ou forenses (~51% das publicações), sendo as amostras de plasma, urina e tecido cerebral as principalmente analisadas. Aplicações na área de alimentos, no controle de qualidade nas indústrias cosméticas e farmacêuticas são comuns, assim como no estudo de produtos naturais. Observa-se ainda que os sistemas column switching têm encontrado grande aplicabilidade na análise de amostras de interesse ambiental, permitindo a determinação de todo tipo de contaminantes em amostras de águas, sedimentos e solos.

Figura 1. 2- Distribuição das principais aplicações dos sistemas column switching segundo a natureza da amostra analisada, de acordo com as publicações encontradas no periodo entre 2010 e 2018 na base de dados Scopus.



Fonte: Base de dados Scopus (consulta em novembro de 2018).

Nas últimas décadas, estudos das características de águas residuárias tem chamado a atenção no que diz respeito à presença ambiental de uma gama de substâncias recentemente identificadas e que são provenientes exclusivamente da atividade humana. A ocorrência desses compostos, chamados “contaminantes emergentes” e seus impactos nas formas de vida aquática e terrestre – assim como na saúde humana - têm sido motivo de preocupação não somente entre cientistas,

mas também para a população em geral [44]. Contaminantes emergentes (EC – do inglês, Emerging Contaminants) são compostos químicos de origem sintética ou derivados de uma fonte natural que tenham sido recentemente identificados no meio ambiente e cujos riscos ambientais e à saúde pública ainda precisam ser estabelecidos [45]. Em sua maioria, os contaminantes emergentes pertencem a 3 categorias principais: produtos farmacêuticos, produtos de cuidado e higiene pessoal e compostos desreguladores endócrinos [44]. Entretanto, tais contaminantes não se limitam a essas 3 categorias; nanomateriais, drogas ilícitas, adoçantes sintéticos, metabólitos de contaminantes emergentes[44-46] e inclusive genes [44] têm sido citados na literatura

Dentre os contaminantes emergentes, os desreguladores endócrinos (EDC – do inglês, Endocrine Disrupting Compounds) tem demandado muita atenção da comunidade científica, principalmente na identificação das fontes emissoras e no modo de transferência para os ecossistemas aquáticos. Compostos orgânicos que apresentam atividade hormonal são potenciais desreguladores endócrinos, incluindo compostos sintéticos (fármacos, conservantes, pesticidas) e os hormônios esteroides naturais. Uma vez que ínfimas quantidades desses compostos podem provocar desregulação endócrina, métodos analíticos que sejam confiáveis e sensíveis são imprescindíveis como ferramenta para a avaliação do impacto causado por esses compostos no ambiente, especialmente no meio aquático [47-49].

Na literatura vários são os métodos descritos para a determinação de desreguladores endócrinos em águas superficais e residuais, majoritariamente utilizando cromatografia líquida hifenada à espectrometria de massas. Têm sido relatados tanto métodos envolvendo a determinação de diferentes grupos de EDC simultaneamente - incluindo estrógenos sintéticos e naturais, compostos alquil fenólicos, parabenos, benzotriazóis e retardantes de chama – quanto métodos para a análise de um grupo especifico de compostos com propriedades similares, como por exemplo bisfenol e seus derivados clorados [47], BPA, bisfenol AF, tetraclorobisfenol A, e tetrabromobisfenol A [14], além de estrógenos sintéticos e naturais [48].

Pelo viés analítico, talvez o grupo mais desafiante de EDC seja o dos hormônios estrogênicos. Esses hormônios sexuais são produzidos em peixes, anfíbios, pássaros e mamíferos. No ser humano, são naturalmente produzidos em ambos os sexos, mas em maiores concentrações nas mulheres. São extremamente importantes no desenvolvimento dos órgãos sexuais femininos e das caracterísiticas sexuais

secundárias, além de atuarem ativamente na manutenção e regulação do sistema reprodutor feminino. São, ainda, fundamentais no desenvolvimento do sistema reprodutor masculino [49]. Por sua vez, hormônios estrogênicos sintéticos são comumente utilizados nas terapias de reposição hormonal [50] e como contraceptivos [51-52]

Outra classe de compostos também capaz de causar desregulação do sistema endócrino e que vem sendo estudada são os parabenos. Apesar de serem utilizados desde os meados da década de 1920, somente em 1996 foram publicados resultados analíticos referentes a sua ocorrência em água.[53] Parabenos são amplamente utilizados como agentes conservantes, antibactericidas e antifúngicos em produtos de cuidado e higiene pessoal, alimentos, bebidas e fármacos. Não é rara a associação de dois ou mais parabenos em uma mesma formulação, e características como boa estabilidade térmica e química, além de baixo custo, tornam sua utilização bastante frequente. [54-56] Apesar de considerados compostos de baixa toxicidade, parabenos são facilmente absorvidos pelo tecido epitelial sem que sejam degradados pelas enzimas esterase; isso, associado a capacidade desreguladora endócrina, pode ser responsável pela incidência de câncer de mama e pele [57].

Indústrias farmacêuticas e veterinárias, esgoto doméstico e hospitalar, descarte inapropriado de fármacos e ineficientes processos de purificação nas estações de tratamento de água são as principais fontes emissoras de estrógenos e parabenos para o ambiente, especialmente o aquático [58].

De fato ainda se sabe muito pouco a respeito do impacto que os contaminantes emergentes causam no ambiente aquático e terrestre. Entretanto, é consenso entre a comunidade científica que mesmo quando em quantidades muito pequenas, a presença desses contaminantes no ambiente não é inóqua. A quantificação desses analitos no ambiente exige métodos com limites de detecção (LD) muito baixos, fazendo das estratégias column switching pertinentes para satisfazer as exigências na determinação desses compostos. A Tabela 1.2 apresenta os principais trabalhos disponíveis nos últimos anos utilizando a abordagem column switching e cromatografia líquida na análise de EDC em matrizes ambientais.

Tabela 1 2- Principais trabalhos disponíveis nos últimos anos utilizando a abordagem column switching e cromatografia líquida na análise de EDC em matrizes ambientais.

Analitos	Matriz	Técnica analitica	Coluna SPE	Coluna analitica	LOD	Ref
Bisfenol A	Água de torneira Água de lago	LC-MS	Coluna monolitica de inmunoafinidade (50 mm x 4.6 mm)	Diamonsil C18 (150 mmx 4,6 mm; 5 µm)	0,3 ng L^{-1}	[59]
Alquil fenóis Esteroides Hormônios sexuais	Sedimento de rio	LC-MS	RAM-LiChrospher ADS C4 (25 mm x 4.0 mm, 25µm)	LiChrospher 100 RP 18 (250 mmx 4,0 mm; 5 µm)	0,5-5 ng L^{-1}	[60]
Bisfenol Alquil fenóis Esteroides Parabenos Fluorocarbonados	Sedimento Esgoto	TFC-LC-MS/MS	NI: Cyclone (50 mm x 0,5 mm) PI: : Cyclone-MCX (50 mm x 0,5 mm)	NI: Hypersil GOLD (75 mm x 2,1 mm, 3 µm) PI: Purospher STAR RP-18 (125 mm x 2,0 mm, 5 µm	0,0025-321 ng L^{-1}	[61]
Bisfenol e derivados Clorados	Água de rio Água de garrafa	LC-MS/MS	Hypersil Gold C18 (20 mm x 2,1 mm, 12 µm)	Ascentis Express C18 (Fused core)	-	[47]
Bisfenol e derivados	Água de torneira Água de rio	UHPLC-MS/MS	XP XBridge™ C18 (30 mm x 2,1 mm, 10 µm)	Aquity shiel PR18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm)	0,5 -18 ng L^{-1}	[14]
Estrogênios naturais e sintéticos	Esgoto Efuente de tratamento Água de garrafa	LC-MS/MS	Hypersil Gold C18 (20 mm x 2,1 mm, 12 µm)	Hypersil Gold C18 (50 mm x 2,1 mm, 3,0 µm)	2,0 -50 ng L^{-1}	[62]
Estrogênios Progesteronas	Esgoto Água de rio Água de garrafa	LC-MS/MS	PLRP-s (10 mm x 2,1 mm, 12 µm)	Purospher star RP C18 (125 mm x 2,0 mm, 5 µm)	0,03 – 2,1 ng L^{-1}	[63]
Hormônios esteroides	Esgoto	LC-MS/MS	Hypersil Gold aQ (20 mm x 2,0 mm, 12 µm) (dois em modo tandem)	Hypersil Gold aQ (100 mm x 2,1 mm, 1,9 µm)	8,0 – 60 ng L^{-1}	[64]
Estrogênios e androgênios	Água de rio Entrada e saida de planta de tratamento	LC-MS/MS	Ion Pac NG (4,0 mm x 35 mm)	Acclaim PA2 (150 mm x 3,0 mm, 3,0 µm)	0,5 – 5,0 ng L^{-1}	[65]
Hormônios naturais e sintéticos	Água de rio Esgoto	LC-MS/MS	Oasis HLB HySphere-C18 (EC) (10 mm x 2,0 mm)	HyPURITY-C18 (250 mm x 2,1 mm, 5,0 µm)	1,3 – 6,9 ng L^{-1}	[66]
Compostos alquil fenólicos Esteroides Hormônios sexuais	Diferentes tipos de amostras sólidas e liquidas	LC-MS/MS	Oasis HLB (50 mm x 2,1 mm, 20 µm) Duas em paralelo	Acuity BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm)	0,1 – 2,1 ng L^{-1}	[67]
Hormônios	Águas urina	LC-MS/MS	BetaBasic (20 × 2.1 mm, 5 µm	Betabasic 18 (100 × 2.1 mm, 3.0 µm)	6,9 – 76 ng L^{-1}	[68]
Estrogênios	Águas	LC-UV	Cartucho de aço (15mm x 4 mm) empacotados com Filtros de cigarro e/ou C18	Alltima-C18 (250mm x 4.6 mm, 5 µm)	0,9 – 78 ng L^{-1}	[69]
Bisfenol	Águas	LC-UV	Cartucho de aço (5 mm x 4,6 mm) empacotados com Nanaofibras de poliamida	Ascentis® Express C18 (10 cm × 4.6 mm)	0,6 – 2 µg L^{-1}	[70]

Entretanto, apesar de promissora, essa não é uma abordagem comum. Levando em consideração a frequência de publicações na temática de contaminantes emergentes, poucos são os trabalhos científicos explorando column switching e cromatografia líquida para a análise de hormônios e parabenos. Até onde é de nosso conhecimento, nenhuma estratégia totalmente miniaturizada associando column switching e cromatografia líquida foi reportada para a análise de hormônios e parabenos em água.

Claramente, é graças ao avanço das técnicas e instrumentação analíticas que a ocorrência desses contaminantes ambientais pode ser identificada e muitas vezes, quantificada (tipicamente em concentrações na ordem de ng L^{-1}). Isso permite, em última análise, que esforços sejam empregados no entendimento dos potenciais riscos e impactos gerados por esses contaminantes.

Nesse cenário, esta tese teve por objetivo o desenvolvimento e avaliação de estratégias column switching para determinação de contaminantes emergentes em amostras de interesse ambiental como aplicação modelo no estudo comparativo entre as escalas convencional e miniaturizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] D'ATRI, V.; FEKETE, S.; CLARKE, A.; VEUTHEY, J.-L.; GUILLARME, D. Recent advances in chromatography for pharmaceutical analysis. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 21-239, 2019.

[2] DESMET, G.; GRITTI, F.; WANG, X.; STEINER, F.; BELL, D.; FARKAS, T.; EUERBY, M. LC column technology: The state of the art. **LCGC Europe**, v. 30, n. 11, p. 9–11, 2017.

[3] RAYNIE, D. E.; MAJORS, R. E. Trends in sample preparation. **LCGC**, v. 29, n. 3, p. 142–154, 2016.

[4] MAJORS, R. E. 2015 LCGC Overview of Sample Preparation. **LCGC North America**, v. 33, n. 11, p. 46–51, 2015

[5] MOEIN, M. M.; SAID, R.; BASSYOUNI, F.; ABDEL-REHIM, M. Solid phase microextraction and related techniques for drugs in biological samples. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2014, 2014.

[6] PŁOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPAŃSKA, N.; DE LA GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 73, p. 19–38, 2015.

[7] PŁOTKA-WASYLKA, J.; OWCZAREK, K.; NAMIEŚNIK, J. Modern solutions in the field of microextraction using liquid as a medium of extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 46–64, 2016.

[8] SANTOS NETO, A. J. Tese - Cromatografia líquida multidimensional e espectrometria de massas em tandem para análise direta de fármacos em fluidos biológicos: da escala convencional à miniaturizada. **Instituto de Química de São Carlos**, 2007.

[9] MACIEL, E. V. S.; DE TOFFOLI, A. L.; LANÇAS, F. M. Current status and future trends on automated multidimensional separation techniques employing sorbent-based extraction columns. **Journal of Separation Science**, n. August, p. 1–15, 2018.

[10] FUMES, B. H.; ANDRADE, M. A.; FRANCO, M. S.; LANÇAS, F. M. Online approaches for the determination of residues and contaminants in complex samples. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 1, p. 183–202, 2017.

[11] LISKA, I. Online versus off-line solid-phase extraction in the determination of organic contaminants in water. Advantages and limitations. **Journal of Chromatography A**, v. 655, n. 2, p. 163–176, 1993.

[12] ROGEBERG, M.; MALEROD, H.; ROBERG-LARSEN, H.; AASS, C.; WILSON, S. R. Online solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 120–129, 2014.

[13] VALSECCHI, S.; POLESELLO, S.; MAZZONI, M.; RUSCONI, M.; PETROVIC, M. Online sample extraction and purification for the LC-MS determination of emerging contaminants in environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 8, p. 27–37, 2015.

[14] YANG, Y.; LI, Z.; ZHANG, J.; YANG, Y.; SHAO, B. Simultaneous determination of bisphenol A, bisphenol AF, tetrachlorobisphenol A, and tetrabromobisphenol A concentrations in water using online solid-phase extraction with ultrahigh-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 16–27, 2014.

[15] KATAOKA, H.; ISHIZAKI, A.; SAITO, K. Recent progress in solid-phase microextraction and its pharmaceutical and biomedical applications. **Analytical Methods**, v. 8, n. 29, p. 5773–5788, 2016.

[16] MOLINER-MARTINEZ, Y.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; VERDÚ-ANDRÉS, J.;

MOLINS-LEGUA, C.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 205–213, 2015.

[17] FERNÁNDEZ-AMADO, M.; PRIETO-BLANCO, M. C.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review. **Analytica Chimica Acta**, v. 906, p. 41–57, 2016.

[18] HERMAN, J. L.; EDGE, T. Theoretical Concepts and Applications of Turbulent Flow Chromatography. **LCGC North America**, v. 30, n. 3, p. 200–214, 2012.

[19] LANÇAS, F. M. Cromatografia em fluxo turbulento (TFC). **Scientia Chromatographica**, v. 6, n. 3, p. 205–211, 2014.

[20] COUCHMAN, L. Turbulent flow chromatography in bioanalysis: A review. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 8, p. 892–905, 2012.

[21] FUMES, B. H.; ANDRADE, M. A.; FRANCO, M. S.; LANÇAS, F. M. Online approaches for the determination of residues and contaminants in complex samples. **Journal of separation science**, 2016.

[22] DI PALMA, S.; HENNRICH, M. L.; HECK, A. J. R.; MOHAMMED, S. Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3791–3813, 2012.

[23] OLÁH, E.; TARNAI, M.; FEKETE, J. Possibility of large volume injection and band focusing in UHPLC. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 9, p. 839–844, 2013.

[24] REGNIER, F. E. Microfabricated monolith columns for liquid chromatography: Sculpting supports for liquid chromatography. **HRC Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, n. 1, p. 19–26, 2000.

[25] SVEC, F. Organic polymer monoliths as stationary phases for capillary HPLC.

Journal of Separation Science, v. 27, n. 17–18, 2004.

[26] ROGEBERG, M.; VEHUS, T.; GRUTLE, L.; GREIBROKK, T.; WILSON, S. R.; LUNDANES, E. Separation optimization of long porous-layer open-tubular columns for nano-LC-MS of limited proteomic samples. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 17, 2013.

[27] FORSTER, S.; KOLMAR, H.; ALTMAIER, S. Synthesis and characterization of new generation open tubular silica capillaries for liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1265, p. 88–94, 2012.

[28] LI, R. N.; WANG, Y. N.; PENG, M. H.; WANG, X. Y.; GUO, G. S. Preparation and Application of Porous Layer Open Tubular Capillary Columns with Narrow Bore in Liquid Chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 1865–1873, 2017.

[29] HU, Y.; SONG, C.; LI, G. Fiber-in-tube solid-phase microextraction with molecularly imprinted coating for sensitive analysis of antibiotic drugs by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1263, p. 21–27, 2012.

[30] FRANCO, M. S.; PADOVAN, R. N.; FUMES, B. H.; LANÇAS, F. M. An overview of multidimensional liquid phase separations in food analysis. **Electrophoresis**, v. 37, n. 13, p. 1768–1783, 2016.

[31] MARLOT, L.; FAURE, K. Preparative two dimensional separations involving liquid–liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1494, p. 1–17, 2017.

[32] CHERVET, J. P.; URSEM, M.; SALZMANN, J. B. Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography. **Anal. Chem.**, v. 68, n. 9, p. 1507-1512, 1996.

[33] DESMET, G.; EELTINK, S. Fundamentals for LC miniaturization. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 543–556, 2013.

[34] NAZARIO, C. E. D; FUMES, B. H.; RIBEIRO, M.; LANÇAS, F. M. **Chapter 13 - Miniaturized Column Liquid Chromatography**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

[35] NAZARIO, C. E. D.; SILVA, M. R.; FRANCO, M. S.; LANÇAS, F. M. Evolution in miniaturized column liquid chromatography instrumentation and applications: An overview. **Journal of Chromatography A**, v. 1421, 2015.

[36] ISHII, D.; TAKEUCHI, T. Miniaturization in column liquid chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 152–157, 1990.

[37] WANG; BENNETT. Performance assessment of microflow LC combined with high-resolution MS in bioana lysis. **Bioanalysis**, v. 5, n. 10, p. 1249–1267, 2013.

[38] VISSERS, J. P. C. Recent developments in microcolumn liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n. 1–2, p. 117–143, 1999.

[39] SZUMSKI, M.; BUSZEWSKI, B. State of the art in miniaturized separation techniques. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 1–46, 2002.

[40] GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Overload behavior and apparent efficiencies in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1254, p. 30–42, 2012.

[41] MÁRTA, Z.; BOBÁLY, B.; FEKETE, J.; MAGDA, B.; IMRE, T.; MÉSZÁROS, K. V.; SZABÓ, P. T. Pushing quantitation limits in micro UHPLC–MS/MS analysis of steroid hormones by sample dilution using high volume injection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 129, p. 135–141, 2016.

[42] SANTOS-NETO, A. J.; MARKIDES, K. E.; SJÖBERG, P. J. R.; BERGQUIST, J.; LANCAS, F. M. Capillary column switching restricted-access media-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry system for simultaneous and direct analysis of drugs in biofluids. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 16, p. 6359–6367, 2007.

[43] HUBER, J. F. K.; ECKER, E. COLUMN SWITCHING. v. 83, p. 267–277, 1973.

[44] GOGOI, A.; MAZUMDER, P.; TYAGI, V. K.. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 6, n. December 2017, p. 169–180, 2018.

[45] NAIDU, R. et al. Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. **Chemosphere**, v. 154, p. 350–357, 2016.

[46] TRAN, N. H.; REINHARD, M.; GIN, K. Y. H. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. **Water Research**, v. 133, p. 182–207, 2018.

[47] GALLART-AYALA, H.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Online solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 21, p. 3511–3518, 2010.

[48] VIGLINO, L.; ABOULFADL, K.; PRÉVOST, M.; SAUVÉ, S. Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 1088–1096, 2008.

[49] RIČANYOVÁ, J. et al. Estrogens and Their Analytics by Hyphenated Separation Techniques. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 13–31, 3 fev. 2009.

[50] GUO, F.; LIU, Q.; QU, G. BO; SONG, S. JUN; SUN, J. TENG; SHI, J. BO; JIANG, G. BIN Simultaneous determination of five estrogens and four androgens in water samples by online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1281, p. 9–18, 15 mar. 2013.

[51] LIU, Z. et al. Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: a review. **The Science of the total environment**, v. 409, n. 24, p. 5149–61, 15 nov. 2011.

[52] SUN, L. et al. Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1216, n. 28, p. 5416–23, 10 jul. 2009.

[53] HAMAN, C. et al. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review. **Water Research**, v. 68, p. 1–11, 2015.

[54] GALINARO, C. A.; PEREIRA, F. M.; VIEIRA, E. M. Determination of parabens in surface water from Mogi Guaçu River (São paulo, Brazil) using dispersive liquid-liquid microextraction based on low density solvent and LC-DAD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 11, p. 2205–2213, 2015.

[55] OCAÑA-GONZÁLEZ, J. A. et al. New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 858, n. 1, p. 1–15, 2015.

[56] CRISTINA JARDIM, V. et al. Determination of parabens in urine samples by microextraction using packed sorbent and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 974, p. 35–41, 2015.

[57] NOWAK, K. et al. Parabens and their effects on the endocrine system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 474, n. March, p. 238–251, 2018.

[58] HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. **Water research**, v. 46, n. 18, p. 5813–33, 15 nov. 2012.

[59] LI, L. et al. Development and characterization of an immunoaffinity monolith for selective online extraction of bisphenol A from environmental water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 620, n. 1–2, p. 1–7, 2008.

[60] PETROVIC, M.; TAVAZZI, S.; BARCELO, D. Column-switching system with restricted access pre-column packing for an integrated sample cleanup and liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of alkylphenolic compounds and steroid sex hormones in sediment. **Journal of Chromatography A**, v. 971, n. 1–2, p. 37–45, 2002.

[61] GORGA, M.; INSA, S.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Analysis of endocrine disrupters and related compounds in sediments and sewage sludge using online turbulent flow chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1352, p. 29–37, 2014.

[62] GORGA, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1295, p. 57–66, 2013.

[63] KUSTER, M.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; HERNANDO, M. D.; PETROVIC, M.; MARTÍN-ALONSO, J.; BARCELÓ, D Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). **Journal of Hydrology**, v. 358, n. 1–2, p. 112–123, 2008.

[64] FAYAD, P. B.; PRÉVOST, M.; SAUVÉ, S. Online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters. **Talanta**, v. 115, p. 349–360, out. 2013.

[65] GUO, F.; LIU, Q.; QU, G. BO; SONG, S. JUN; SUN, J. TENG; SHI, J. BO; JIANG, G. BIN. Simultaneous determination of five estrogens and four androgens in water samples by online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 9–18, 2013.

[66] SNOW, D. D.; DAMON-POWELL, T.; ONANONG, S.; CASSADA, D. A. Sensitive and simplified analysis of natural and synthetic steroids in water and solids using

online solid-phase extraction and microwave-assisted solvent extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry atmospheric pressure photoioni. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 5, p. 1759–1771, 2013.

[67] VEGA-MORALES, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Evaluation of the presence of endocrine-disrupting compounds in dissolved and solid wastewater treatment plant samples of Gran Canaria Island (Spain). **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

[68] NALDI, A. C.; FAYAD, P. B.; PROVOST, M.; SAUVÉ, S Analysis of steroid hormones and their conjugated forms in water and urine by online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chemistry Central Journal**, v. 10, n. 1, 2016.

[69] WANG, S.; HUANG, W.; FANG, G.; HE, J.; ZHANG, Y Online coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 194–201, 2008.

[70] HÁKOVÁ, M.; CHOCHOLOUŠOVÁ HAVLÍKOVÁ, L.; CHVOJKA, J.; SOLICH, P.; ŠATÍNSKÝ, An online coupling of nanofibrous extraction with column-switching high performance liquid chromatography – A case study on the determination of bisphenol A in environmental water samples. **Talanta**, v. 178, n. August 2017, p. 141–146, 2018.

CAPÍTULO 2

Column switching em cromatografia líquida miniaturizada para análise de hormônios em água: estratégias para melhora do perfil cromatográfico priorizando focalização e transferência da banda cromatográfica (CS-cLC-UV/Vis)

1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi a avaliação de diferentes estratégias visando alcançar perfis cromatográficos adequados para a quantificação hormônios esteroides em matrizes aquosas. Para tanto, técnicas online de preparo e pré-concentração de amostras foram avaliadas, bem como a utilização de diferentes materiais extratores e arranjos instrumentais envolvendo column switching em cromatografia líquida capilar com detecção UV/Vis.

1.1 Objetivos específicos

- Preparar diferentes colunas capilares para extração em fase sólida (SPE) online
- Avaliar comparativamente as colunas extratoras preparadas com relação a:
  - capacidade retentiva para os compostos de interesse e
  - capacidade de limpeza da matriz
- Avaliar o tempo de transferência dos analitos das colunas extratoras para a coluna analítica
- Avaliar diferentes colunas capilares analíticas comerciais ante os compostos de interesse
- Avaliar o acoplamento das colunas extratoras de interesse à coluna analítica, selecionando o melhor arranjo em column switching capilar

2 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

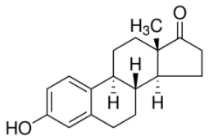
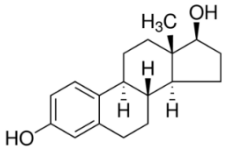
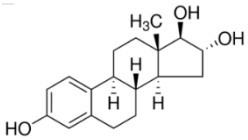
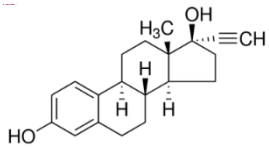
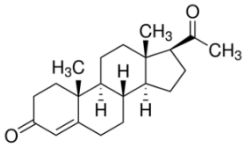
2.1 Material

2.1.1 Padrões analíticos

2.1.1.1 Hormônios esteroides

As estruturas químicas e propriedades físico-químicas mais relevantes dos hormônios utilizados são apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Estruturas químicas e propriedades físico-químicas dos hormônios utilizados nesse estudo.

Nome (Abreviação)	Estrutura Química	MM (g mol^{-1})	Solubilidade em água (mg L^{-1} a 20ºC)	Log K_{OW}	pKa
Estrona (E1)		270,17	5,0[c]	4,31[c]	10,77[a]
17β-Estradiol (E2)		272,18	13,0[c]	3,75[c]	10,71[a]
Estriol (E3)		288,17	13,0[c]	2,67[c]	10,40[b]
17α-Etinilestradiol (EE2)		296,18	4,8[c]	4,15[c]	10.33[c]
Progesterona (P)		314,46	8,8[c]	3,83[c]	NA

Autoria Própria.
Fonte: [a] LEWIS, K. M.; ARCHER, R. D. pKa values of estrone, 17 beta-estradiol and 2-methoxyestrone. **Steroids**, v. 34, n. 5, p. 485–99, 1979. [1]
[b] MARQUES, R.; VAZ, F. A. S.; POLONINI, H. C.; OLIVEIRA, M. A. I. Optimized separation method for estriol, 17-β-estradiol and progesterone by capillary eletrochromatography with monolithic column and its application to a transdermal emulsion. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 3, p. 609-618, 2015. [2]
[c] CHEMAXON. Properties viewer, Budapest. Disponível em: <http://www.chemicalize.org/>. Acesso em: 10 jan 2015. [3]

Os padrões analíticos dos hormônios esteroides utilizados neste trabalho foram: 17 β-estradiol (E2), com 99% de pureza; estriol (E3), com 99% de pureza; 17 α- etinilestradiol (EE2), com 99% de pureza, e progesterona (P), com 98% de pureza, todos adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), além de estrona (E1), com 97% de pureza, adquirida de Fluka. Nessa etapa do trabalho foi avaliado o uso de etilparabeno (EP) como surrogate. Esse padrão, de 99% de pureza, foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

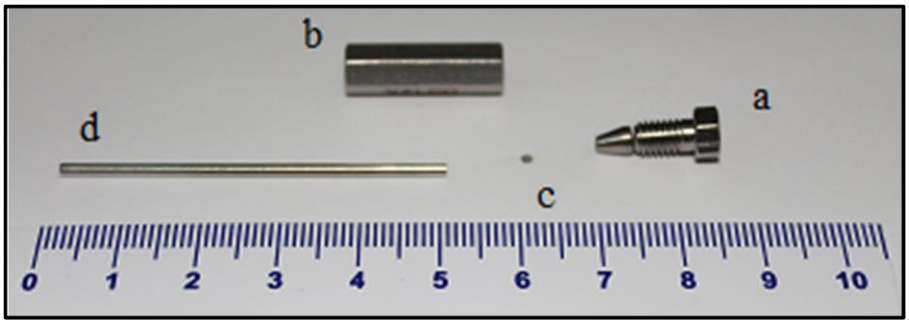
2.1.2 Reagentes e solventes

Acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e acetato de etila (AcOEt), todos grau HPLC, da Tedia (Fairfield, USA) foram usados nesta etapa do trabalho. A água purificada foi obtida de sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, USA). Membranas hidrofóbicas de 0,2 µm e hidrofílicas de 0,45 µm e 0,2 µm, utilizadas para a filtração de solventes e amostras, foram adquiridas da Millipore.

2.1.3 Hardware empregado nas colunas extratoras

As colunas para extração online foram montadas utilizando-se tubos de aço inoxidável com 50 mm de comprimento, com diâmetro de 508 µm i.d. e 1/16” o.d ou 254 µm i.d. e 1/16” o.d., fornecidas pela VICI (Valco Instruments Co. Inc.). As uniões, end fittings e filtros tipo tela (screens), de 2 ou 10 µm de poro, utilizados são de aço inoxidável e foram também fornecidos pela VICI. A Figura 2.1 mostra a fotografia das partes que compõem o hardware de cada uma das colunas utilizadas para a extração online.

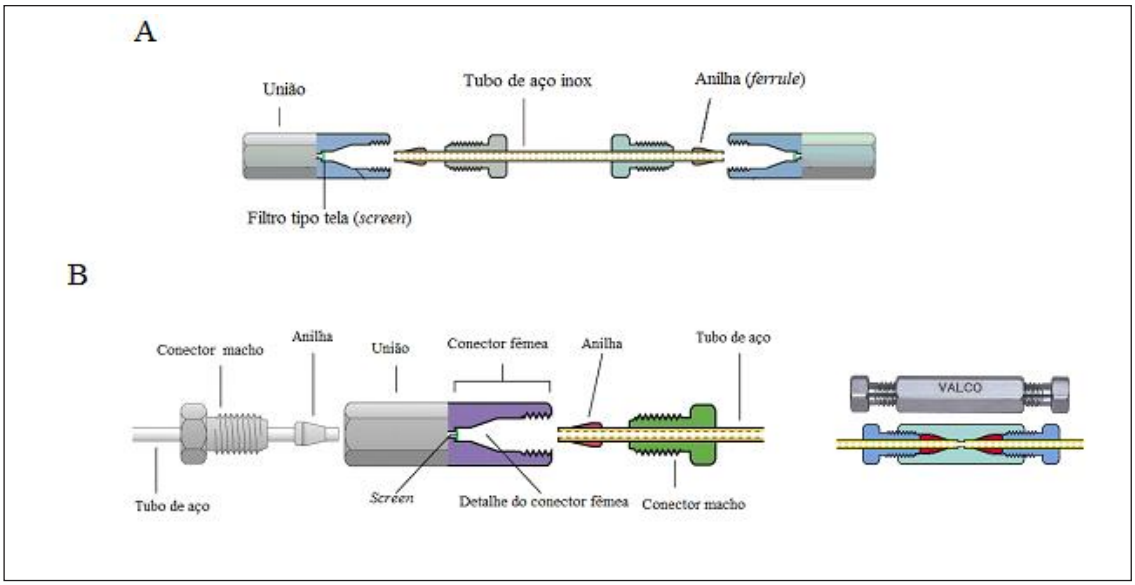
Figura 2.1 - Foto do hardware de aço inoxidável. a) end fitting composto por anilha (ou ferrule) e conector; b) união; c) filtro tipo screen (tela) e d) tubo de aço.



Autoria própria.

A Figura 2.2 apresenta o corte longitudinal detalhando as partes que compõem o hardware utilizado (2.2.A), destacando o *design* que elimina o volume extra coluna (2.2.B).

Figura 2.2- A) Corte longitudinal detalhando as partes que compõem o hardware utilizado para o preenchimento com as fases extratoras; B) Detalhes do design que elimina o volume extra coluna.



Fonte: Adaptado de VALCO INSTRUMENTS Co. Inc. (VICI). Valco Fittings. Disponível em: <http://www.vici.com/vfit/vfit.php>; Acessos em: 22 março 2013 (2.2A) e 10.09.2015 (2.2B).

2.1.4 Fases estacionárias comerciais utilizadas no preenchimento das colunas extratoras

Para o preenchimento das colunas de extração foram utilizadas as seguintes fases estacionárias: fase polimérica Strata X (Phenomenex); fase de sílica quimicamente modificada Discovery C_{18} e Discovery C_8 (Supelco); fase de sílica quimicamente modificada Luna C_{18} e Luna C_8 (Phenomenex). Essas fases são fases utilizadas em cromatografia em fase reversa.

A Tabela 2.2 apresenta as fases extratoras utilizadas, com respectivos tamanhos médios de partículas, poro e outras características importantes.

Tabela 2.2- Características das fases extratoras utilizadas.

Fase Extratora	Forma/Tamanho médio das partículas (µm)	Tamanho do poro (Å)	Carga de carbono (%)	Cobertura fase ligada (µmol m^{-2})	Área superficial (m^2 g^{-1})	Faixa de trabalho (pH)
Strata X[a]	Irregular / 33	85	NA	NA	800	1-14
Discovery C_{18}[b]	Irregular / 50	70	18	2,5	480	2-8
Discovery C_8[b]	Irregular / 50	70	9	NI	480	2-8
Luna C_{18}[c]	Esférica / 10	100	17,5	3	400	1,5-10
Luna C_8[c]	Esférica / 10	100	13,5	5,5	400	1,5-10

Autoria própria
Fonte: [a]Disponível em:< http://phx.phenomenex.com/lib/br75930712_w.pdf>; Acesso em 10.07.2015 [4]
[b] Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/11300/11262.pdf>; Acesso em 10.07.2015 [5]
[c] Disponível em: <https://www.che.utah.edu/department_equipment/ProjectsLab/AHPLC/ MI SLunaColumnData. pdf>; Acesso em:10.07.2015. [6]
NA: Não Aplicável; NI: Não Informado.

2.1.5 Colunas analíticas comerciais

2.1.5.1 Colunas capilares C_{18}

Colunas analíticas capilares comerciais preenchidas com fase estacionária C_{18} (sílica modificada com grupos octadecil) foram utilizadas durante o desenvolvimento do método na escala capilar. A Tabela 2.2 mostra as colunas capilares C_{18} utilizadas e suas principais características.

Tabela 2.3- Colunas capilares C_{18} comerciais utilizadas e suas principais características.

Identificação da coluna C_{18}	Dimensões (L x i,d., mm)	Tamanho de partícula (µm)	Tamanho do poro (Å)	Fornecedor
ACCLAIM (Acclaim PepMap RSLC)	150 x 0,30	2,0	100	Thermo Scientific/ Dionex, USA
ASCENTIS (Ascentis Express Fused Core)	150 x 0,50	2,7*	90	Supelco, USA
HYPERSIL (Hypersil Gold AQ)	100 x 0,32	1,9	175	Thermo Scientific, USA
SYNERGI (Synergi Fusion)	150 x 0,30	4,0	80	Phenomenex, USA
ZORBAX (Zorbax Eclipse XDB)	150 x 0,30	3,5	80	Agilent Technologies, Alemanha

*partícula de sílica superficialmente porosa
Autoria própria

2.1.6 Equipamentos, softwares e sistemas

Para as medidas de massa foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo, modelo AG285. As medições de pH foram realizadas em um potenciômetro Qualxtron, modelo 8010.

Para o tratamento e descrição dos dados foi utilizado o pacote Microsoft® Office™, para tratamento das figuras o CorelDraw™ e o software Chromeleon™ 7.1 para aquisição e tratamento dos dados cromatográficos.

Os equipamentos e sistemas utilizados no preenchimento das colunas capilares extratoras são descritos a seguir, bem como o equipamento utilizado para as avaliações das colunas de extração para o desenvolvimento de método em fase reversa na escala capilar.

2.1.6.1 Preenchimento das colunas extratoras

Para o preenchimento das colunas utilizadas para extração online foi utilizada uma bomba LC-20AT, da Shimadzu (Kioto, Japão). Uma coluna cromatográfica vazia de aço inox (50 x 4,6 mm) foi utilizada como reservatório para a suspensão das partículas da fase extratora, no momento do empacotamento.

2.1.6.2 Cromatografia líquida em fase reversa em escala miniaturizada

Para as avaliações das colunas extratoras e etapas de desenvolvimento de método utilizou-se o cromatógrafo UltiMate™ 3000 RSLCnano da Thermo Scientific Dionex.

Trata-se de um equipamento extremamente versátil, capaz de realizar análises cromatográficas tanto na escala convencional (inclusive análises por UHPLC) quanto nas escalas nano, capilar ou micro. Permite ainda análises em modo unidimensional ou multidimensional, com eluição em foreflush ou backflush.

A configuração disponível nas dependências do CROMA (IQSC, USP São Carlos) conta com um sistema composto por 3 bombas independentes: uma bomba para gradiente de alta pressão, com disponibilidade de 2 linhas de solvente, suportando pressões primárias de até 800 bar, e que na configuração capilar tem capacidade de bombeamento preciso de misturas de solventes em vazões de até 15

µL min^{-1}, denominada bomba NC (do inglês Nano-Capillary); uma bomba para gradiente de baixa pressão, com disponibilidade de 3 linhas de solvente, que suporta pressões de até 500 bar, e tem capacidade de bombeamento de até 2,5 mL min^{-1}, denominada bomba de carregamento ou LP (do inglês Loading Pump); e por fim, uma bomba para gradiente de alta pressão, com disponibilidade de 2 linhas de solvente, que suporta pressões de até 1000 bar, e possui capacidade de bombeamento de até 5 mL min^{-1}, responsável pelas análises na escala convencional e/ou em UHPLC, denominada bomba HPG-RS (do inglês High Pressure Gradient - Rapid Separation. As bombas podem ser utilizadas em conjunto ou individualmente.

O equipamento UltiMate™ 3000 RSLCnano possui um amostrador automático com controle de temperatura, equipado com uma válvula injetora que suporta pressões de até 900 bar, e que pode ser configurado para volumes de injeção de nanolitros até mililitros de amostra, bastando utilizar seringa, loop e agulha compatíveis com o volume desejado.

O sistema cromatográfico conta com um forno termostatizado para colunas, que acomoda, na configuração disponível no laboratório, duas válvulas atuadoras: V_6 (válvula de duas posições e 6 portas), e V_{10} (válvula de duas posições e 10 portas) que oferecem ao sistema diversas possibilidades de configuração para cromatografia multidimensional, no sentido amplo da terminologia. Fazem ainda parte do sistema um detector UV-Vis de comprimento de onda variável e até 4 canais para aquisição de dados, compatível com o sistema capilar (cela com volume de 45 nL e caminho ótico de 10 mm), um detector de arranjo de diodos (DAD) compatível com o sistema UHPLC (cela com volume de 2,5 µL), além do desgaseificador e do software Chromeleon™ 7.1 para aquisição e tratamento dos dados.

2.1.7 Amostras ambientais - esgoto simulado

Amostras de esgoto simulado foram utilizadas para o desenvolvimento do método de extração online. Antes da injeção no sistema cromatográfico, as amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm. A Tabela 2.4 mostra a composição do esgoto simulado utilizado neste trabalho.

Tabela 2.4- Composição do esgoto simulado utilizado no desenvolvimento do método de extração.

Composição	Quantidade para 1 L
Sacarose	35 mg
Amido	114 mg
Extrato de carne	208 mg
Óleo de soja	51 mg
NaCl	250 mg
$MgCl_2.6H_2O$	7 mg
$CaCl_2.2H_2O$	4 mg
$NaHCO_3$	200 mg
Detergente	3 gotas

Adaptado de TORRES, P., 1992. [7]

2.2 Métodos

2.2.1 Preenchimento das colunas extratoras

Foram preenchidas 9 colunas extratoras, seguindo o mesmo procedimento, variando-se apenas a fase extratora. Na Tabela 2.5 podem ser observadas algumas características das colunas capilares extratoras preparadas.

Tabela 2.5-Características das colunas extratoras.

Fase extratora utilizada	Comprimento do tubo (mm)	Diâmetro interno do tubo (µm)	Tamanho médio das partículas da fase (µm)	Tamanho do poro dos filtros screen (µm)
Strata X	50	508	33	10
Discovery C_{18}	50	508	50	10
Discovery C_8	50	508	50	10
Luna C_{18}	50	508	10	2
Luna C_8	50	508	10	2
Luna C_{18} *	50	254	10	2
Luna C_8	50	254	10	2

* Triplicata (para verificação de reprodutibilidade lote-a-lote).
Autoria própria

Inicialmente montou-se o hardware, fechando apenas um dos lados do tubo de aço com a anilha, end fitting e uma união contendo o filtro tipo tela (screen) para retenção das partículas da fase extratora (Figura 2.3.A); a outra extremidade do tubo contendo apenas a anilha e end fitting foi conectada ao tubo de aço vazio - reservatório para a suspensão da fase extratora - (Figura 2.3.B). A suspensão de 10 mg da fase extratora (Tabela 2.3) em 1 mL de metanol (solvente de suspensão) foi agitada em banho de ultrassom por aproximadamente 2 minutos, e transferida para o tubo de aço (reservatório).

Em seguida, o conjunto (coluna acoplada ao reservatório contendo a suspensão) foi conectado à bomba de HPLC e procedeu-se o empacotamento, utilizando-se metanol como solvente propulsor. A bomba permaneceu ligada com vazão constante de metanol (0,2 mL min^{-1} para hardwares de 508 µm i.d. e 0,1 mL min^{-1} para hardwares de 254 µm i.d.) por aproximadamente 30 minutos. A bomba foi então desligada e o frasco contendo metanol foi substituído por outro contendo água ultrapura. Após purga do sistema, a bomba foi novamente ligada e o conjunto foi condicionado em água, respeitando-se as vazões utilizadas anteriormente, por mais 30 minutos.

A seguir, foi realizada novamente a substituição do solvente (água por metanol), condicionando-se a coluna com metanol por 30 minutos (nas mesmas vazões aplicadas nas etapas anteriores). A bomba foi então desligada e a coluna de extração capilar, preenchida com fase extratora, foi removida do reservatório. Por fim, a entrada da coluna foi fechada utilizando-se o respectivo end fitting e a união contendo o filtro tipo tela (screen); então a coluna foi devidamente identificada. Depois de preparadas, as colunas extratoras foram condicionadas com fase móvel composta por água/MeOH (50:50, v/v) por no mínimo 8 horas.

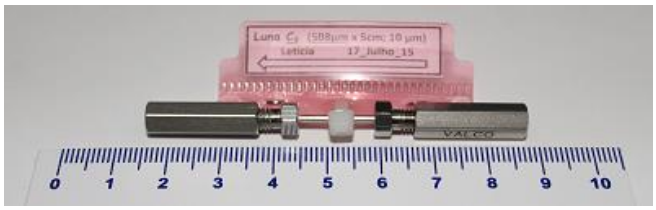
A fotografia de uma das colunas preparadas pode ser observada na Figura 2.3.C.

Figura 2.3 - Fotos detalhando o processo de preenchimento das colunas

2.3.A- Hardware montado antes do empacotamento, apenas com uma união.

2.3.B- Hardware conectado à coluna de empacotamento.

2,3.C- Coluna empacotada, pronta para uso.

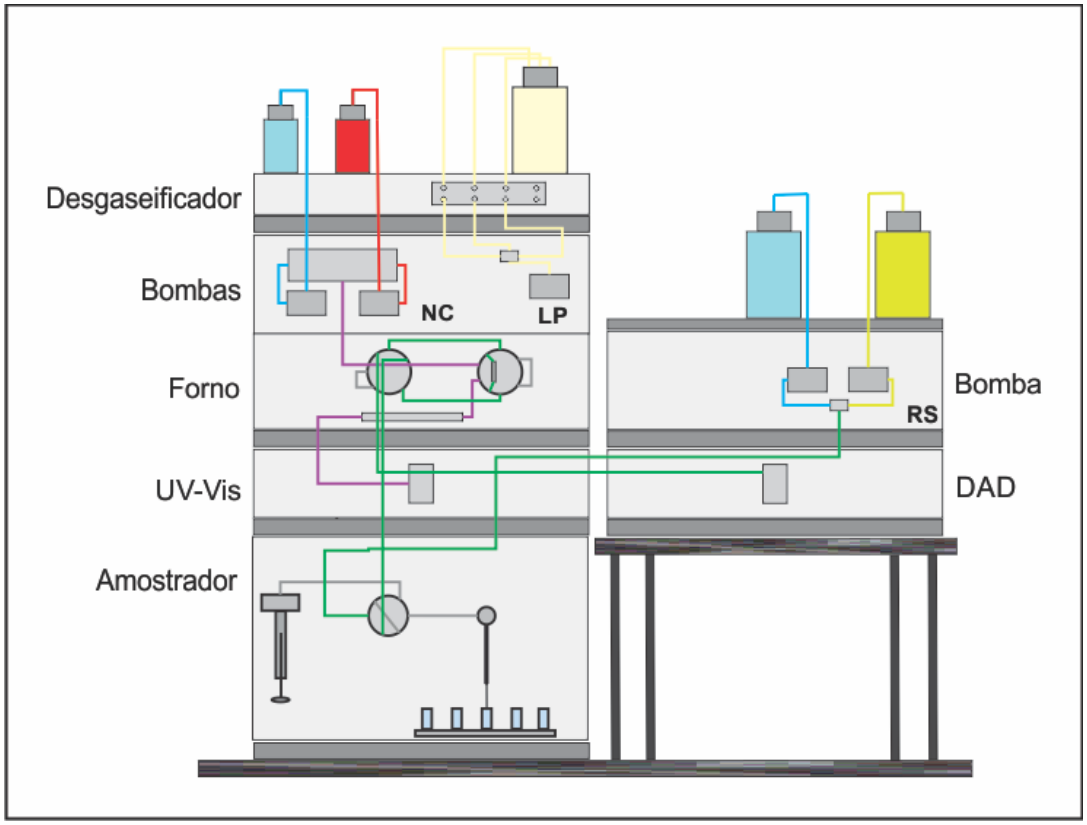


Autoria própria.

2.2.2 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Acclaim C_{18} com extração online em coluna Strata X – arranjo multidimensional em escala capilar com detecção UV-Vis

O sistema UltiMate™ 3000 RSLCnano no modo multidimensional e em escala capilar foi utilizado para estes experimentos, conforme ilustrado na Figura 2.4.

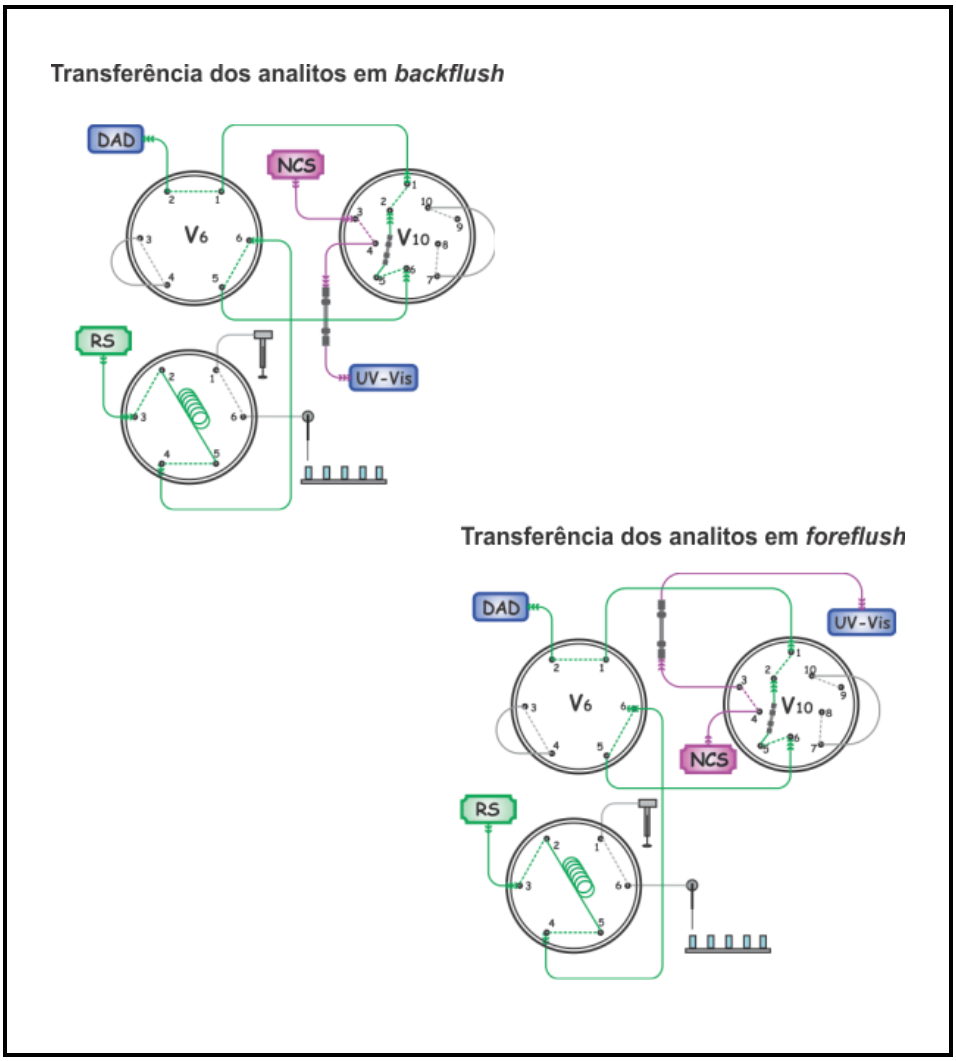
Figura 2.4- Desenho representativo da configuração cromatográfica multidimensional empregada para a avaliação do acoplamento entre coluna extratora e analítica.



Autoria própria

Neste arranjo, a bomba HPG-RS (UHPLC) foi responsável pelo carregamento da amostra do sistema injetor até a coluna extratora; já a bomba NC (capilar) fez a transferência dos analitos da coluna Strata X (coluna de extração) para a coluna analítica Acclaim C_{18}, bem como a separação dos hormônios nesta coluna. Os eventos de column switching nos experimentos foram possíveis graças à presença das duas válvulas atuadoras (V_6 e V_{10}), que neste arranjo específico oferecem versatilidade com considerável facilidade. Por exemplo, a transferência dos analitos da coluna extratora para a analítica pode ser realizada tanto em foreflush quanto em backflush, bastando inverter na V_{10} a entrada da bomba NC e a saída para a coluna analítica, como pode ser observado em detalhe da Figura 2.5.

Figura 2.5 -Desenho representativo das válvulas atuadoras V_6 e V_{10}, presentes no sistema UltiMate™ 3000 RSLCnano, indicando as etapas de transferência dos analitos em backflush e foreflush.



Autoria própria

Nesta etapa do estudo, volumes de 125 µL de amostra (soluções padrão dos hormônios, individuais ou na forma de mistura, em água ultrapura) foram injetados na otimização do acoplamento entre colunas. Variáveis como tempo de extração (ou tempo de carregamento), vazão e composição da fase móvel de extração utilizados na coluna extratora, além do tempo de transferência da fração da coluna extratora para a analítica já haviam sido definidas no estudo prévio realizado no grupo. [7]

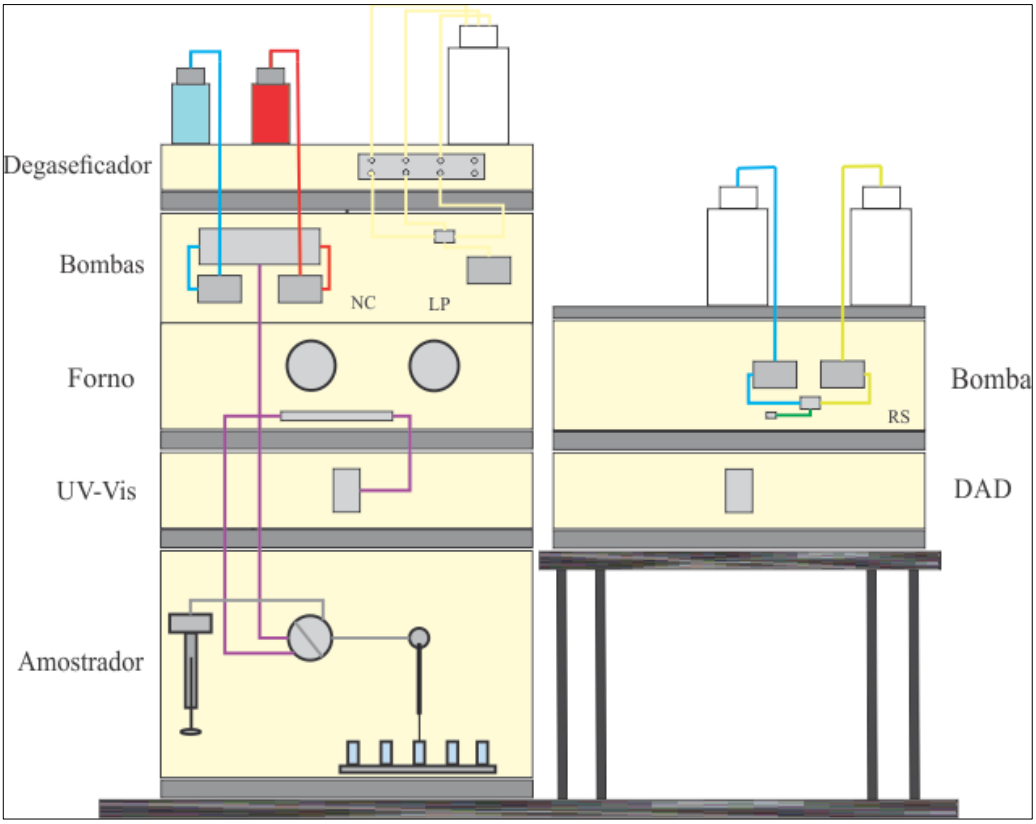
2.2.3 Avaliação do perfil cromatográfico em colunas capilares comerciais com extração online em Strata X - arranjo multidimensional em escala capilar com detecção UV-Vis

O sistema UltiMate™ 3000 RSLCnano no modo multidimensional e em escala capilar foi utilizado para a avaliação do acoplamento entre a coluna extratora e colunas analíticas, ambas capilares. O arranjo descrito anteriormente (item 2.2.2) foi utilizado para estes experimentos.

2.2.4 Avaliação do desempenho cromatográfico das colunas capilares comerciais com fase móvel ternária - arranjo unidimensional em escala capilar

Para a avaliação da separação cromatográfica dos 5 hormônios com fase móvel ternária nas colunas comercias disponíveis (item 2.1.5.1), o sistema UltiMate™ 3000 RSLCnano no modo unidimensional e em escala capilar foi montado. A eluição dos compostos de interesse (E1, E2, E3, EE2 e P) foi promovida pela bomba NC (capilar), em modo gradiente. O sistema injetor foi arranjado de modo a capacitar a injeção de 1 µL de amostra (soluções padrão dos hormônios, individuais ou na forma de mistura, em água ultrapura). O caminho cromatográfico foi escolhido para tornar o volume extra coluna no sistema o menor possível. As proporções dos solventes da fase móvel e sua vazão, assim como a temperatura do forno foram variadas, a fim de se obter as melhores condições de separação. O detector utilizado nesta etapa do trabalho foi UV-Vis e nenhuma das duas válvulas seletoras (V_6 e V_{10}) presentes no sistema cromatográfico foram envolvidas (atuadas) neste arranjo. A configuração empregada para cromatografia capilar unidimensional é apresentada na Figura 2.6.

Figura 2.6 - Desenho representativo da configuração cromatográfica unidimensional empregada para a separação com fase móvel ternária dos 5 hormônios nas colunas capilares.



Autoria própria

As condições cromatográficas para a separação dos 5 hormônios nas colunas capilares anteriormente citadas utilizando fase móvel ternária foram otimizadas, avaliando-se efeitos de temperatura, composição (proporções) da fase móvel ternária e vazão de eluição da fase móvel.

2.2.5 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em coluna Strata X - fase móvel ternária e detecção UV-Vis

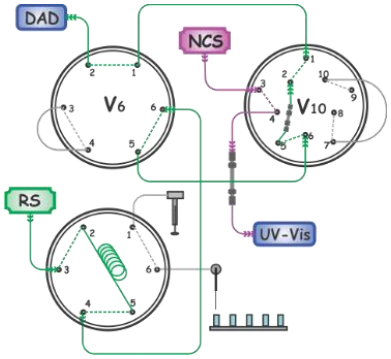
2.2.5.1 Estudo da capacidade retentiva da coluna Strata X

Para a avaliação do desempenho retensivo da coluna capilar Strata X para extração online, o sistema UltiMate™ 3000 RSLCnano foi utilizado no modo unidimensional. Entretanto, aproveitou-se o mesmo arranjo multidimensional

desenvolvido em 2.2.2 (Figura 2.4). Este arranjo pode ser usado tanto no modo unidimensional como no multidimensional de análise, bastando somente valer-se do giro de válvula para a escolha do modo a ser utilizado, o que o torna bastante prático. Observa-se que as duas válvulas atuadoras (V_6 e V_{10}) estão participando do arranjo; entretanto, para a avaliação da coluna extratora utilizando esta configuração, nenhum giro de válvula foi necessário.

Nesta etapa do trabalho, foi utilizada somente a bomba HPG-RS (UHPLC), responsável pelo carregamento da amostra e pela eluição dos compostos da coluna extratora. A bomba capilar (NC) apenas mantém condicionada a coluna capilar analítica (sob baixa vazão, por exemplo, 1 µL min^{-1}). Consequentemente, o detector UV-Vis também não é utilizado nesta etapa, ficando desligado. A Tabela 2.6 ilustra o arranjo utilizado.

Tabela 2. 6- Tempos, posições das válvulas e eventos envolvidos na avaliação da capacidade retentiva dos analitos na coluna Strata X em fase móvel de carregamento composta de metanol e água.

Tempo (min)	**V_6**	**V_{10}**	**Configuração das válvulas**	**Coluna analítica / Bomba**	**Coluna de extração / Bomba**
0	1_2	1_2		Condicionamento / NC (não participa da análise)	Carregamento da amostra e eluição dos analitos / HPG-RS
25	Término da corrida cromatográfica				

Autoria própria

O arranjo utilizado conecta a bomba responsável pela eluição ao sistema injetor do equipamento e este à coluna de extração. A detecção dos analitos eluídos é realizada pelo DAD, conectado à saída da coluna extratora. O volume de injeção foi mantido constante e a injeção de 500 µL de amostra (solução do padrão em água

ultrapura) foi realizada no modo full loop (uma das possibilidades oferecidas pelo equipamento).

2.2.6 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em colunas Discovery C_{18} e C_8 - fase móvel ternária e detecção UV-Vis

As colunas capilares extratoras preenchidas com as fases Discovery C_{18} e Discovery C_8 (item 2.2.1) foram utilizadas nessa etapa do estudo.

2.2.6.1 Estudo da capacidade retentiva das colunas Discovery C_{18} e C_8

Para este experimento, tanto o arranjo quanto o procedimento descritos em 2.2.5.1 foram utilizados; o estriol foi analito selecionado para a avaliação da capacidade retentiva das colunas de extração Discovery C_{18} e Discovery C_8.

2.2.6.2 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching entre colunas Discovery e coluna Zorbax

Para o acoplamento entre a colunas Discovery C_{18} e C_8 e a coluna Zorbax foi utilizado o mesmo arranjo multidimensional descrito no item 2.2.2 (Figura 2.4).

2.2.7 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em colunas Luna C_{18} e C_8 - fase móvel ternária e detecção UV-Vis

As colunas extratoras preenchidas com as fases Luna C_{18} e Luna C_8 (item 2.2.1) foram utilizadas nessa etapa do estudo.

2.2.7.1 Estudo da capacidade retentiva das colunas Luna C_{18} e C_8

Para este experimento, tanto o arranjo quanto o procedimento descritos em 2.2.5.1 foram utilizados; o estriol foi analito selecionado para a avaliação da capacidade retentiva das colunas de extração Luna C_{18} e Luna C_8.

2.2.7.2 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching entre colunas Luna e coluna Zorbax

Para o acoplamento entre as colunas Luna C_{18} e C_8 e a coluna Zorbax foi utilizado o mesmo arranjo multidimensional descrito no item 2.2.2 (Figura 2.4).

2.2.8 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em coluna Luna C_{18} (254 µm i.d.) - fase móvel ternária e detecção UV-Vis

As colunas extratoras preenchidas com as fases Luna C_{18} de diâmetro interno de 254 µm (item 2.2.1) foram utilizadas nessa etapa do estudo.

2.2.8.1 Estudo da capacidade retentiva das colunas Luna C_{18} (254 µm i.d.)

Para este experimento, tanto o arranjo quanto o procedimento descritos em 2.2.5.1 foram utilizados; o estriol foi analito selecionado para a avaliação da capacidade retentiva dessas colunas.

As colunas de extração preenchidas com Luna C_{18} e de dimensões 50 x 0,254mm, preparadas em triplicata (conforme item 2.2.1), foram avaliadas com relação à capacidade retentiva para o estriol.

2.2.8.2 Avaliação das condições de transferência dos analitos da coluna extratora para a coluna analítica

Para a avaliação das condições de transferência dos analitos da coluna extratora para a coluna analítica, o sistema UltiMate™ 3000 RSLCnano no modo column switching foi utilizado. O arranjo desenvolvido no item 2.2.2 foi novamente utilizado, tendo-se apenas substituído a coluna capilar analítica por uma união. O objetivo dessa modificação é reproduzir o caminho cromatográfico experimentado pelo(s) analito(s), sem que haja, no entanto, separação cromatográfica. Nesta etapa, a bomba capilar (NC) participa do experimento, além da bomba HPG-RS (UHPLC) e as válvulas atuadoras tem importante papel. A bomba HPG-RS foi responsável pelo carregamento da amostra. Já a bomba NC (capilar) foi responsável pela eluição do analito da coluna capilar extratora até o detector UV-Vis. Nesse experimento, foi

avaliada a transferência da progesterona, analito mais retido nas condições estudadas, da coluna extratora para a coluna analítica.

2.2.8.3 Avaliação do perfil cromatográfico – column switching entre coluna Luna C_{18} (diâmetro 254 µm) e coluna Zorbax

Para o acoplamento entre as colunas Luna C_{18} de diâmetro interno 254 µm e a coluna Zorbax foi utilizado o mesmo arranjo multidimensional descrito no item 2.2.2 (Figura 2.4).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Colunas extratoras

As colunas preparadas em triplicata foram submetidas às mesmas condições cromatográficas e os resultados obtidos foram comparados. As colunas foram avaliadas no que diz respeito à capacidade retentiva para os analitos de interesse. Os resultados obtidos mostraram perfis retentivos semelhantes para as triplicatas, comprovando a reprodutibilidade lote-a-lote no preparo das colunas extratoras produzidas.

As colunas extratoras apresentadas na Tabela 2.5 foram preparadas e avaliadas durante o desenvolvimento de cada etapa do estudo; essas etapas são descritas e discutidas nos próximos itens desse Capítulo.

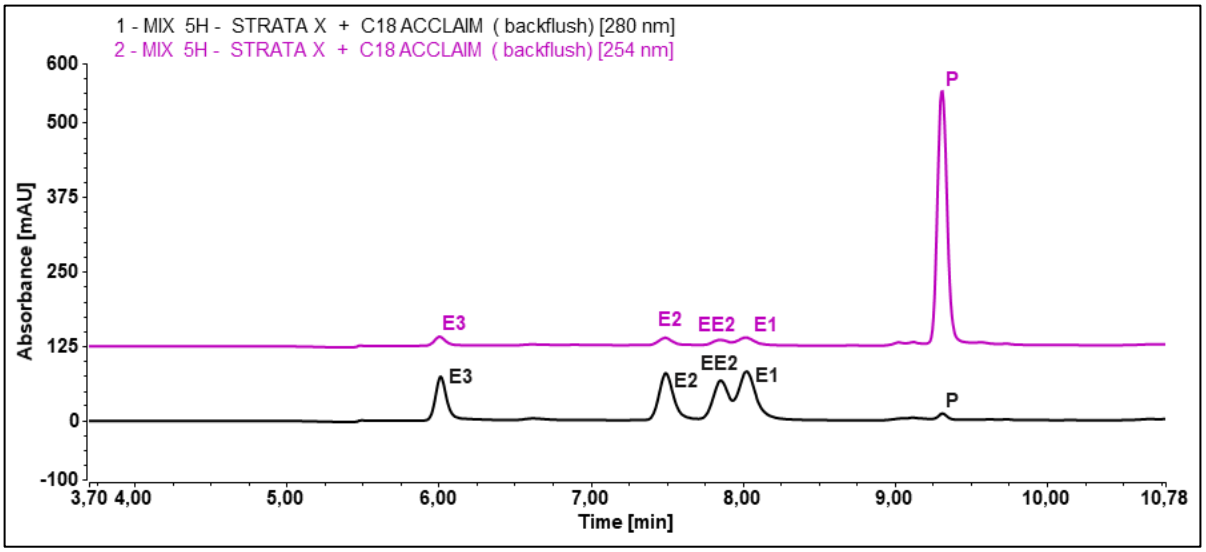
3.2 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Acclaim C18 com extração online em coluna Strata X – arranjo multidimensional em escala capilar com detecção UV-Vis

Ao iniciar-se o trabalho de desenvolvimento de método na escala capilar, alguns resultados preliminares para a separação de 4 hormônios (E1, E2, E3 e EE2) já haviam sido obtidos no grupo [7] Uma separação havia sido alcançada com o acoplamento da coluna extratora Strata X com a coluna analítica capilar Acclaim, com eluição gradiente de fase móvel composta por água e acetonitrila. Optou-se por iniciar os estudos a partir dos resultados obtidos até então, introduzindo-se o quinto hormônio de interesse, a progesterona (P).

Entretanto, ao se aplicar exatamente o mesmo gradiente de eluição previamente utilizado, dessa vez para separar cromatograficamente os 5 hormônios, a separação ficou bastante comprometida. A alta retenção experimentada pela progesterona evidenciou a necessidade de explorar a composição (proporções de cada solvente) do gradiente de eluição, a fim de se alcançar a separação cromatográfica dos 5 hormônios no acoplamento entre a coluna Strata X e a coluna Acclaim.

O melhor resultado alcançado para o acoplamento entre as colunas Strata X e Acclaim C_{18} é ilustrado na Figura 2.7.

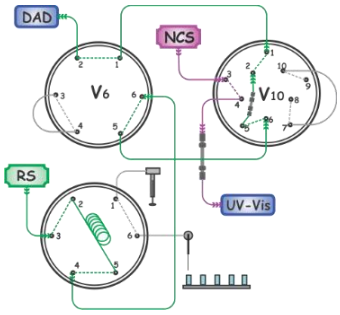
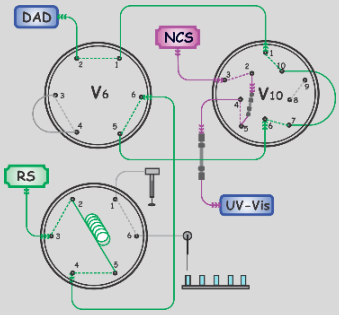
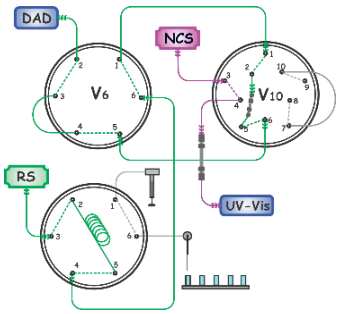
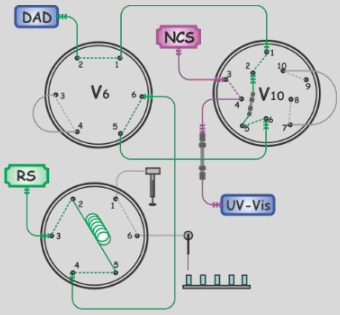
Figura 2.7 - Cromatograma típico da separação obtida para os 5 hormônios de interesse na coluna cromatográfica Acclaim C_{18} com extração online em Strata X. Fase móvel binária composta de acetonitrila e água utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl/min e temperatura do forno da coluna de 40°C.



Autoria própria

Os eventos envolvidos no arranjo de column switching desenvolvido que propiciaram a melhor separação cromatográfica para o acoplamento entre coluna extratora Strata X e coluna analítica Acclaim C_{18} (em escala capilar) estão sumariados na Tabela 2.7 e são detalhadamente descritos em seguida.

Tabela 2.7- Tempos, posições das válvulas e eventos envolvidos no acoplamento da coluna extratora e a coluna analítica.

Tempo (min)	V_6	V_{10}	Configuração das válvulas	Coluna analítica / Bomba	Coluna de extração / Bomba
0	1_2	1_2		Condicionamento / NC	Carregamento da amostra / RS
4	1_2	10_1		Transferência (recebe amostra da coluna extratora) / NC	Transferência backflush / NC
7	6_1	1_2		Separação analítica / NC	Lavagem backflush / RS
9	1_2	1_2		Separação analítica / NC	Lavagem e Condicionamento foreflush / RS
13	Término da corrida cromatográfica				

Autoria própria

Durante a etapa de extração (ou carregamento), as duas válvulas (V_6 e V_{10}) encontram-se na posição 1_2. A bomba HPG-RS impulsiona a fase móvel composta de 5% de acetonitrila em água ultrapura através do sistema injetor, carregando a amostra para a coluna de extração; nesta etapa, os analitos ficam retidos na coluna Strata X e o que não fica retido é direcionado para descarte, passando antes pelo detector DAD, para monitoramento. Simultaneamente, a bomba NC impulsiona a fase móvel condicionando a coluna Acclaim C_{18} com 36 % de acetonitrila em água (etapa de equilíbrio).

Na etapa de transferência da fração contendo os analitos da coluna Strata X para a coluna analítica, a válvula de 6 portas (V_6) permanece na posição 1_2 e a V_{10} (10 portas) é atuada e mantida na posição 10_1. A bomba HPG-RS impulsiona fase móvel (5 % de acetonitrila em água ultrapura), que é diretamente dispensada para o DAD e descartada. Enquanto isso, a bomba NC impulsiona a fase móvel do gradiente de eluição, transferindo, em backflush, os analitos retidos no início da coluna extratora para a coluna analítica. A separação dos analitos é iniciada na coluna analítica, com detecção por UV.

Para a limpeza (lavagem) da coluna extratora em backflush, a válvula V_6 é atuada e mantida na posição 6_1 e concomitantemente a V_{10} é atuada e mantida na posição 1_2. Dessa forma, a bomba HPG-RS impulsiona ACN (90 %) para a lavagem da coluna de extração, enquanto que a bomba NC continua impulsionando a fase móvel do gradiente de eluição pela coluna analítica, promovendo a separação.

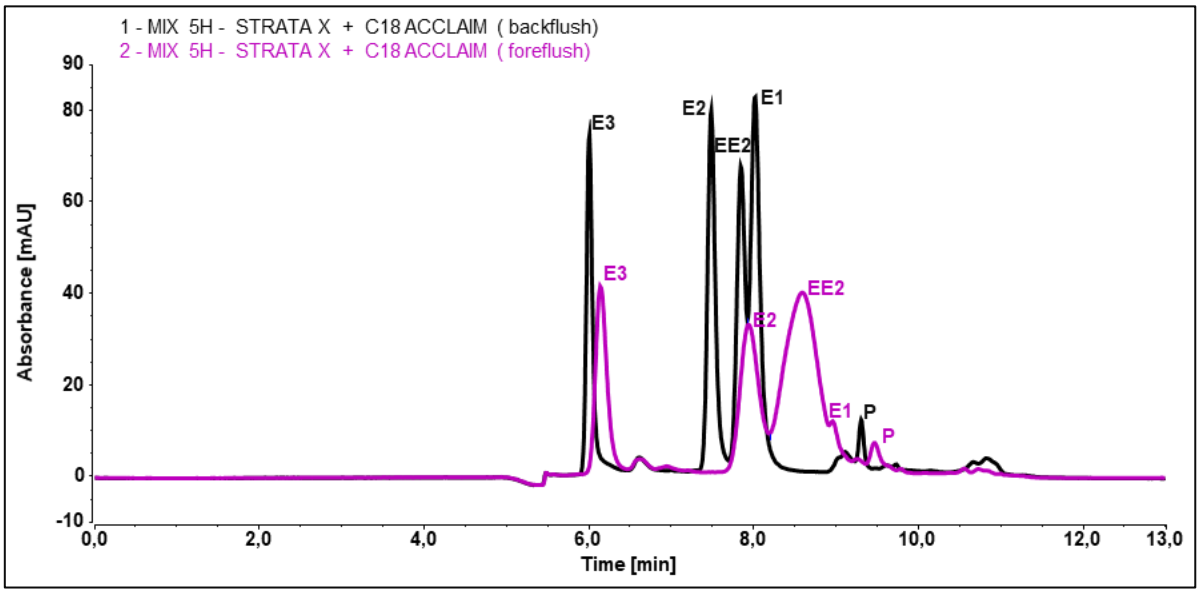
A última etapa refere-se ao condicionamento em foreflush da coluna de extração, deixando-a apta para extrair a próxima amostra. Assim, enquanto a V_{10} permanece na posição 1_2, a V_6 é atuada para a posição 1_2; a bomba NC continua promovendo a separação analítica, enquanto a bomba HPG-RS condiciona a coluna extratora com a composição da fase móvel utilizada para o carregamento da amostra (e extração). Dessa forma, quando a corrida analítica termina, tanto V_6 quanto V_{10} estão na posição 1_2, idêntica ao início do experimento.

Ainda utilizando o acoplamento da coluna Strata X com a coluna Acclaim C_{18} nas condições que promoveram o melhor resultado, as duas possibilidades de acoplamento em column switching foram avaliadas: o modo foreflush e o modo backflush, como possibilidade de se obter melhor separação cromatográfica. Em termos de configuração, a única mudança que teve que ser realizada foi a inversão da entrada da bomba NC e saída para a coluna analítica: para transferência da fração

da coluna Strata X para a coluna Acclaim, a bomba NC deve ser conectada à porta 4 da válvula V_{10}; já a coluna analítica deve ser conectada à porta 3 da mesma válvula. Assim, a eluição dos analitos se dará no mesmo sentido do carregamento (foreflush).

Como pode ser visto na Figura 2.8, as bandas cromatográficas obtidas em foreflush mostraram-se mais alargadas que as obtidas em backflush. De fato, trabalhos encontrados na literatura relatam que a transferência em backflush promove melhor fator de pré-concentração e focalização dos analitos, diminuindo o alargamento das bandas cromatográficas provocado pela menor eficiência cromatográfica da coluna de extração.[8][9] Portanto, nenhuma melhora na separação dos 5 hormônios foi obtida utilizando-se a transferência dos analitos da coluna extratora para a analítica no modo foreflush.

Figura 2.8- Sobreposição dos cromatogramas típicos da separação obtida para os 5 hormônios de interesse em: coluna cromatográfica Acclaim com extração online e eluição em backflush (preto) e em coluna cromatográfica Acclaim com extração online e eluição em foreflush (rosa). Fase móvel binária composta de acetonitrila e água utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µL/min, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 280 nm.



Autoria própria

Apesar dos esforços dedicados à otimização das condições de extração e análise no acoplamento da coluna Strata X e Acclaim C_{18}, a separação cromatográfica obtida não pode ser considerada adequada. Como se pode observar no cromatograma anteriormente mostrado (Figura 2.8), a separação entre a banda do

etinilestradiol e da estrona não é suficiente para a quantificação destes analitos com detecção por UV-Vis, nem mesmo quando utilizado o modo backflush.

A partir das informações obtidas no acoplamento entre a coluna Strata X e coluna Acclaim, decidiu-se avaliar o acoplamento das demais colunas analíticas capilares disponíveis com a coluna extratora Strata X.

3.3 Avaliação do perfil cromatográfico em colunas capilares comerciais com extração online em Strata X - arranjo multidimensional em escala capilar com detecção UV-Vis

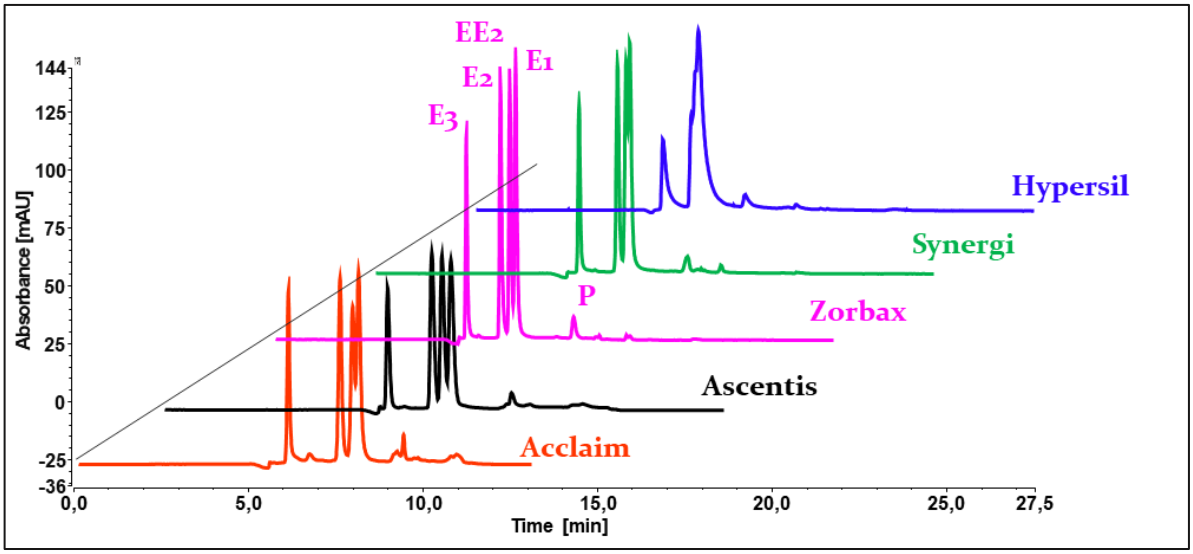
Nesta etapa do estudo objetivou-se melhorar a separação cromatográfica por meio do acoplamento da coluna extratora Strata X com as diferentes colunas analíticas capilares comerciais preenchidas com fase estacionária C_{18} disponíveis no laboratório (item 2.1.5.1, Tabela 2.3).

De modo geral, avaliou-se a resposta das diferentes colunas ante o acoplamento com a coluna Strata X, nas condições que forneceram a melhor separação na Acclaim. Eventualmente, pequenas mudanças na vazão da fase móvel responsável pela separação cromatográfica, assim como no gradiente, foram avaliadas. Os melhores resultados - para todas as colunas testadas - foram obtidos exatamente nas mesmas condições que o experimento anterior (coluna Strata X acoplada à coluna Acclaim).

Entretanto, as colunas capilares analíticas C_{18} testadas mostraram desempenhos bastante distintos, sem poderem ser considerados totalmente satisfatórias para a análise utilizando fase móvel binária. Pode-se observar na Figura 2.9 que as colunas Zorbax e Ascentis foram as que mostraram maior resolução cromatográfica para os analitos nas condições estudadas. Já as colunas Acclaim, Hypersil e Synergi apresentaram os piores resultados.

Um dos principais objetivos desta proposta consiste em desenvolver um método cromatográfico multidimensional, em escala capilar, com detecção dos hormônios por UV-Vis. Para que se tenha sucesso, faz-se mandatório que as bandas cromatográficas sejam bem resolvidas, possibilitando a quantificação desses analitos em níveis sub-ng mL^{-1}.

Figura 2.9- Cromatogramas típicos da separação obtida para os 5 hormônios de interesse nas colunas cromatográficas capilares analíticas comerciais acopladas a Strata X. Fase móvel binária composta de acetonitrila e água utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µL/min, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 280 nm.



Autoria própria

As tentativas feitas até esta etapa, com fase móvel binária composta por água e acetonitrila, não promoveram uma perfeita separação dos 5 hormônios em nenhuma das colunas C_{18} testadas. Apesar das colunas analíticas serem preparadas com a fase estacionária do tipo C_{18}, elas diferem entre si, apresentando diferentes seletividades para o conjunto de compostos, nas mesmas condições cromatográficas. Somando-se a isso o fato de não se ter alcançado uma boa separação para todos os hormônios em nenhuma das colunas avaliadas, tem-se o indicativo da necessidade de explorar outras possibilidades de modificadores orgânicos na fase móvel. Com as avaliações realizadas até o momento, foi possível ter noção da “força” da fase móvel, ou seja, da proporção de modificador orgânico necessária para eluir todos os compostos da coluna analítica. Com auxílio do normógrafo, essa força pode ser facilmente mantida, mesmo com a substituição do modificador orgânico por outro que ofereça diferentes interações com os analitos, possibilitando melhores separações.

Neste ponto do trabalho, diante dos insucessos em obter-se uma separação perfeita entre todos os analitos de interesse, durante uma busca na literatura, um trabalho em especial mereceu atenção. Em uma apresentação [10], os autores relataram a utilização de uma fase móvel ternária para alcançar a separação cromatográfica dos hormônios E1, E2 e EE2 em coluna C_{18}. A fase ternária em questão era composta por água e uma mistura de metanol e acetato de etila, na

proporção 80:20 (v/v), utilizada no modo gradiente, para a separação cromatográfica de 8 hormônios, incluindo os 5 hormônios que são objeto de estudo em nosso trabalho. O objetivo de Fayad e Sauvé era a detecção dos analitos utilizando espectrometria de massas, de forma que a utilização do acetato de etila na fase móvel afetou a intensidade do sinal e a sensibilidade do método, devido à diminuição considerável da eficiência na ionização (em APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionization), o que inviabilizou o uso desta fase ternária naquele trabalho.

Entretanto, para a quantificação dos hormônios com detecção por absorção no UV/Vis, a utilização da fase ternária água/metanol/acetato de etila mostra-se uma alternativa interessante, tendo-se decidido investir esforços para avaliar esta possibilidade.

3.4 Avaliação do desempenho cromatográfico das colunas capilares comerciais com fase móvel ternária - arranjo unidimensional em escala capilar

Diferente do que foi realizado anteriormente (em fase móvel binária, itens 4.1 e 4.2), resolveu-se avaliar a separação dos 5 hormônios em modo unidimensional, nas colunas analíticas capilares e com fase móvel ternária. No início do desenvolvimento deste projeto, acreditava-se que seria mais eficiente verificar as condições de análise diretamente com o acoplamento entre a coluna extratora e a coluna analítica. Entretanto, durante o desenvolvimento dos experimentos, ante a complexidade das variáveis envolvidas, percebeu-se que seria mais indicado avaliar as duas dimensões separadamente.

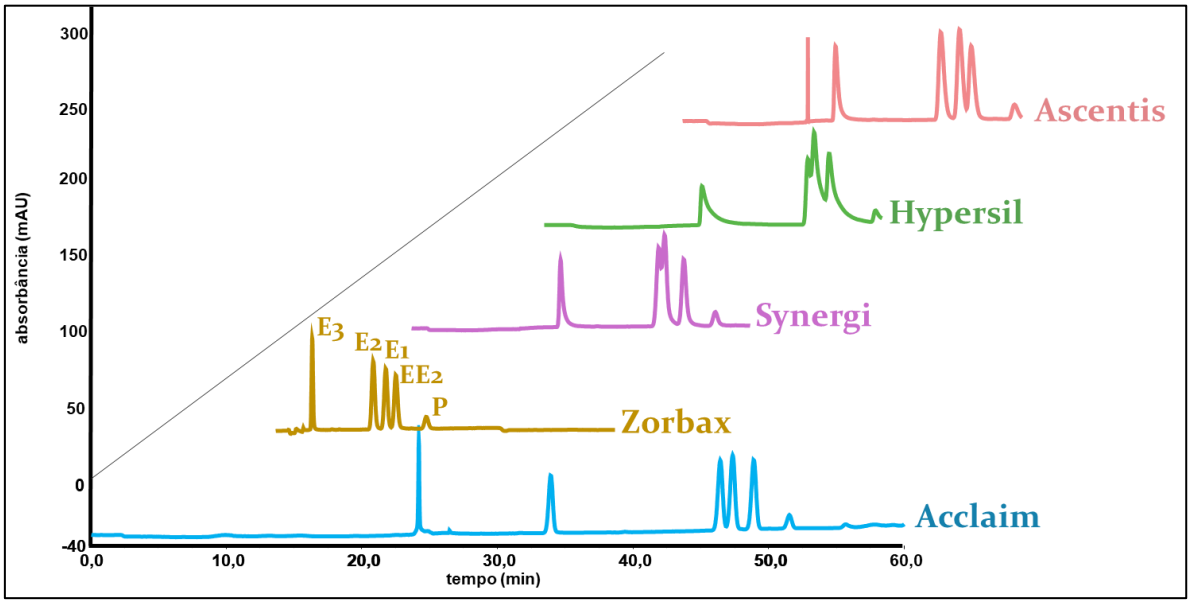
Nesta etapa objetivou-se selecionar a coluna analítica que oferecesse a melhor seletividade em fase móvel ternária, para somente depois otimizar o acoplamento com a coluna extratora, eventualmente ajustando-se a composição da fase móvel.

Com a fase móvel ternária, os resultados obtidos evidenciaram a diferença significativa na seletividade e resolução apresentadas pelas diferentes colunas cromatográficas; essa diferença já havia sido observada anteriormente, quando do acoplamento das colunas analíticas com a coluna Strata X e fase móvel binária.

A Figura 2.10 mostra os cromatogramas obtidos com as melhores separações (em fase móvel ternária) para as 5 colunas. A proporção de acetato de etila na mistura com metanol foi mantida constante (20 % de acetato de etila) em todas as condições

testadas. As diferentes composições no gradiente dizem respeito à proporção da mistura metanol/acetato de etila (80:20, v/v) em água. Como se pode observar, as separações foram muito mais eficientes em fase ternária se comparadas às separações obtidas para fase binária, com destaque para as colunas Ascentis, Acclaim e, principalmente, Zorbax. Cabe ressaltar a inversão na ordem de eluição entre a estrona e o etinilestradiol, observado quando substituímos acetonitrila por metanol; este resultado é corroborado pelo trabalho de Fayad e Sauvé [10].

Figura 2.10- Cromatogramas típicos da separação obtida para os 5 hormônios de interesse nas colunas cromatográficas capilares analíticas comerciais. Fase móvel ternária composta de água e mistura de metanol e acetato de etila (80:20, v/v), utilizando modo de eluição gradiente, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 280 nm.



Autoria própria

Com o resultado obtido com a fase ternária na separação dos 5 hormônios na coluna Zorbax, essa foi selecionada para ser utilizada no método cromatográfico em desenvolvimento.

A fim de verificar a influência da proporção de acetato de etila em metanol na separação cromatográfica, foram testados na coluna Zorbax diferentes quantidades de acetato de etila. Assim, proporções de 10 %, 15 % e 30 % de acetato de etila em metanol foram utilizadas para compor a fase móvel de eluição na separação dos hormônios com fase ternária. As condições de análise foram as mesmas que propiciaram a melhor separação na coluna Zorbax, inclusive o gradiente utilizado - simplesmente alterando a proporção de acetato de etila na mistura com metanol. Não

foram observadas diferenças na seletividade e tampouco nos tempos de retenção dos hormônios. Dessa forma, optou-se por manter a proporção de 20 % de acetato de etila em metanol.

Cabe ressaltar que um aumento considerável na pressão das colunas (backpressure) foi observado quando substituímos acetonitrila por metanol na fase móvel. Isto se deve à maior viscosidade apresentada pelo metanol (0,55 cP) quando comparado à acetonitrila (0,38 cP) [11], sobretudo nas misturas destes solventes com a fase aquosa. Como consequência, as vazões de fase móvel ternária empregadas tiveram que ser reduzidas para a coluna Acclaim, que apresentava uma pressão mais elevada que as demais colunas testadas; assim, a vazão da fase móvel precisou ser reduzida de 12 µL min^{-1} (com fase binária) para 7 µL min^{-1} (com fase ternária), o que justifica os elevados tempos de retenção observados para os hormônios nesta coluna em fase ternária (Figura 2.10, cromatograma na cor azul).

Definidas a coluna capilar analítica Zorbax e a fase móvel ternária como as melhores escolhas para a separação dos hormônios em escala capilar, o próximo passo no desenvolvimento do método foi testar o acoplamento online entre as colunas Strata X e a coluna cromatográfica capilar Zorbax com o uso de fase ternária.

Entretanto, quando foi realizado o acoplamento das colunas, houve uma perda considerável na eficiência cromatográfica. Após inúmeras tentativas de melhorar a separação, com novas variações no gradiente, na temperatura e nos tempos de carregamento, resolveu-se testar a influência do modificador orgânico na fase de carregamento. Essa hipótese foi aventada pelo fato de termos acetonitrila na primeira dimensão (coluna extratora) e metanol na segunda dimensão (coluna capilar analítica), com a possibilidade de essa troca de solventes prejudicar o comportamento no acoplamento entre as colunas.

3.5 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em coluna Strata X - fase móvel ternária e detecção UV-Vis

3.5.1 Estudo da capacidade retentiva da coluna Strata X

Antes de realizar o acoplamento propriamente dito entre a coluna extratora e a coluna analítica com o mesmo modificador orgânico na fase móvel (metanol), fez-se

um breve estudo da capacidade retentiva da coluna Strata X; para este experimento, o estriol (E3, composto menos retido) foi selecionado.

Como o interesse é ter um tempo de extração curto, porém suficiente para promover o carregamento do(s) analito(s) do loop de injeção para a coluna extratora, e sem perder o analito antes da etapa de transferência para a coluna analítica, verificamos objetivamente os pontos de interesse.

Optou-se por avaliar o comportamento retentivo em vazões relativamente altas (0,300 mL min^{-1}; 0,400 mL min^{-1} e 0,500 mL min^{-1}), já que há o interesse em se utilizar um volume de amostra de 0,5 mL, com o menor tempo possível de carregamento e extração. O estriol foi escolhido para este estudo, visto que é o composto que apresenta menor retenção dentre os analitos de interesse e será o primeiro a ser eluído.

Como pode ser observado na Tabela 2.8, mesmo em fase móvel contendo 15 % de metanol em água, em vazão de 0,500 mL min^{-1}, o estriol permanece retido na Strata X após 20 minutos de eluição (injeções feitas em duplicata, sendo relatada a média dos resultados). Brancos de água ultrapura foram injetados entre as duplicatas, e nenhum efeito de memória (carry over) foi observado.

Tabela 2.8 - Eluição do estriol em coluna extratora Strata X, em diversas vazões e composições de fase móvel de carregamento (extração).

Tempo de início da eluição da banda do estriol com o solvente de carregamento (% MeOH) em água							
Coluna extratora	**Vazão**	**0 % MeOH**	**2,5 % MeOH**	**5 % MeOH**	**7,5 % MeOH**	**10 % MeOH**	**15 % MeOH**
STRATA X (50mm x 508 µm; 85Å)	0,500 $mLmin^{-1}$	>20 min	>20 min	>20 min	>20 min	>20 min	>20 min
	0,400 $mLmin^{-1}$	>20 min	>20 min	>20 min	>20 min	>20 min	>20 min
	0,300 $mLmin^{-1}$	>20 min	>20 min	>20 min	>20 min	>20 min	>20 min

Autoria própria

A fim de verificar o comportamento retentivo da coluna Strata X ante uma matriz mais complexa, o procedimento foi repetido - desta vez com a injeção do esgoto simulado - utilizando o mesmo arranjo do experimento anterior. Este experimento demonstra a capacidade de limpeza da matriz pela coluna extratora, pois durante o carregamento da amostra é realizada a focalização do analito na coluna extratora e os interferentes são descartados (clean-up), evitando sobrecarga na coluna analítica.

A Tabela 2.9 mostra os resultados obtidos, evidenciando a seletividade da coluna preparada.

Tabela 2.9- Porcentagem de matriz eliminada na coluna Strata X, nos primeiros 4 minutos de carregamento (extração), em diversas vazões e composições de fase móvel.

Clean-up da matriz (descarte) durante 4 minutos de carregamento				
Coluna extratora	**Vazão**	**0 % MeOH**	**5 % MeOH**	**10 % MeOH**
STRATA X	0,500 $mLmin^{-1}$	93,0 %	97,9 %	-
(50mm x 508 µm; 85Å)	0,400 $mLmin^{-1}$	97,5 %	97,1 %	97,5 %

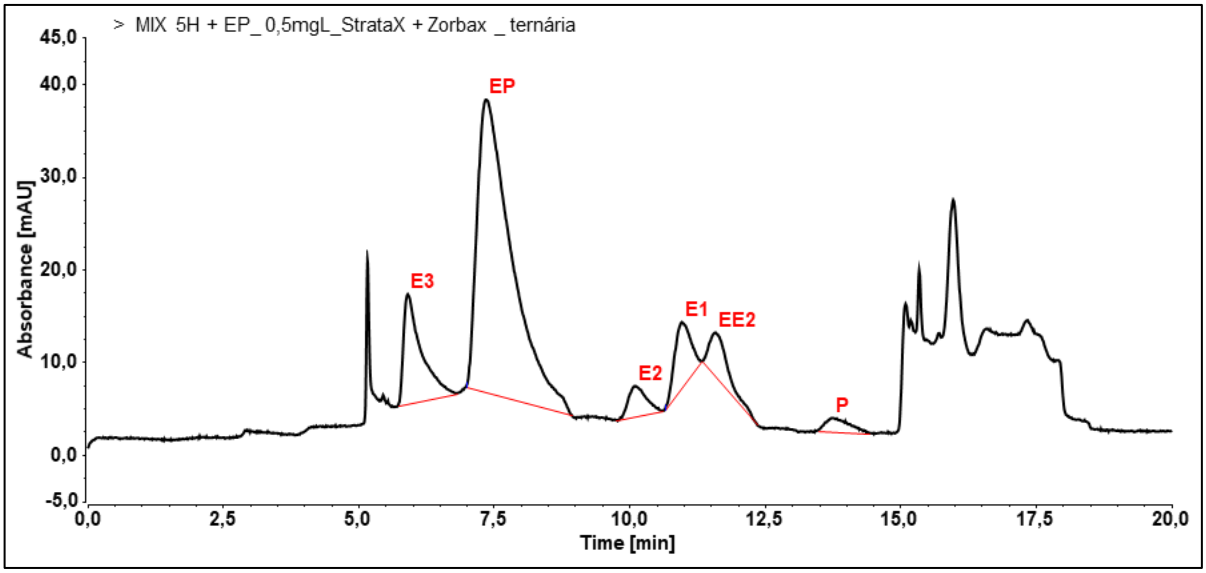
Autoria própria

A partir das informações obtidas a respeito da capacidade retentiva da coluna extratora, tanto para o analito menos retido, quanto para a matriz (esgoto simulado), fez-se necessário avaliar o tempo de transferência da fração de interesse da coluna extratora para a coluna analítica.

3.5.2 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching da coluna Strata X com a coluna Zorbax

Após a realização dos experimentos de retenção do analito menos retido (estriol) pela coluna Strata X e do teste de clean-up da matriz, avaliou-se o acoplamento da coluna Strata X com a Zorbax. O mesmo modificador orgânico (metanol) foi utilizado, tanto na fase de carregamento dos analitos na coluna extratora (extração), como na eluição dos compostos de interesse na segunda dimensão (com o metanol participando da mistura ternária já definida anteriormente). Os resultados, mais uma vez, não foram satisfatórios, como pode ser observado na Figura 2.11, continuando comprometida a eficiência da separação.

Figura 2 11- Cromatograma típico da separação obtida para solução padrão dos 5 hormônios de interesse e do etilparabeno na coluna cromatográfica Zorbax com extração online em Strata X. Fase móvel ternária utilizando modo de eluição gradiente, vazão 12 µl min^{-1}, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 280 nm.



Autoria própria

Este comprometimento na separação dos hormônios se deve, provavelmente, à maior capacidade retentiva da coluna extratora preenchida com Strata X quando comparada à fase C_{18} da coluna analítica. Assim, a fase móvel idealmente definida para a eficiente separação na coluna analítica não tem força suficiente para eluir rapidamente os compostos extremamente retidos na fase Strata X, provocando um alargamento nas bandas e prejudicando a separação cromatográfica. Um aumento na força do solvente (aumento na porcentagem de modificador orgânico) favorece a eluição imediata dos analitos da coluna extratora, porém prejudica a focalização dos analitos no topo da coluna analítica e a força ideal do solvente para eluição ao longo da coluna analítica. O resultado disso é a perda na eficiência da separação cromatográfica na segunda dimensão.

Apesar dos esforços devotados para se encontrar uma composição de fase móvel de eluição que compatibilizasse eficientemente o acoplamento entre Strata X e Zorbax, a diferença na capacidade retentiva existente entre as duas fases não permitiu o sucesso dessa tentativa. Consequentemente, a próxima etapa do trabalho envolveu o preparo e avaliação de colunas capilares extratoras preenchidas com fases C_{18} e C_8 (item 2.2.1), potencialmente mais compatíveis com a fase da coluna analítica.

3.6 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em colunas Discovery C_{18} e C_8 - fase móvel ternária e detecção UV-Vis

3.6.1 Estudo da capacidade retentiva das colunas Discovery C_{18} e C_8

Para a avaliação da capacidade retentiva das colunas extratoras Discovery C_{18} e C_8, o estriol foi o analito selecionado. A fase móvel de carregamento foi composta por água e metanol.

Como pode se observar na Tabela 2.10, em fase móvel contendo 5% de metanol em água, em vazão de 0,500 mL min^{-1}, a banda do estriol começa a eluir após 11,5 minutos na Discovery C_{18}; na Discovery C_8, a banda começa a eluir após 10 minutos de carregamento (injeções feitas em duplicata, sendo relatada a média dos resultados). Brancos de água ultrapura foram injetados entre as duplicatas, e nenhum efeito de memória (carry over) foi observado.

Ao compararmos, nas mesmas condições de vazão e porcentagem de metanol, os tempos de retenção experimentados pelo estriol nas colunas preenchidas com as fases Discovery, percebe-se uma tendência retentiva bastante similar entre as duas. A fase Discovery C_{18} apresentou capacidade retentiva um pouco superior à apresentada pela fase C_8, comportamento já esperado, devido à maior cadeia carbônica presente na fase C_{18}: o analito moderadamente hidrofóbico apresenta uma maior afinidade pela fase mais hidrofóbica (C_{18}) do que pela fase menos hidrofóbica (C_8).

Tabela 2.10-Eluição do estriol em colunas extratoras Discovery C18 e Discovery C8, em diversas vazões e composições de fase móvel de carregamento (extração).

Tempo de início da eluição da banda do estriol com o solvente de carregamento (% MeOH) em água							
Coluna extratora	**Vazão**	**0 % MeOH**	**2,5 % MeOH**	**5 % MeOH**	**7,5 % MeOH**	**10 % MeOH**	**15 % MeOH**
C_{18} DISCOVERY (50mm x 508 µm; 50 µm, 70Å)	0,500 $mLmin^{-1}$	>20 min	>20 min	>11,5 min	>5,5min	>4 min	>2,2 min
	0,400 $mLmin^{-1}$	>20 min	>20 min	>13 min	>8 min	>5 min	>2,5 min
	0,300 $mLmin^{-1}$	>20 min	>20 min	>20 min	>11,5 min	>7 min	>3,5 min
C_8 DISCOVERY (50mm x 508 µm; 50 µm, 70Å)	0,500 $mLmin^{-1}$	>20 min	>20 min	>10 min	>6 min	>3,5 min	>1 min
	0,400 $mLmin^{-1}$	>20 min	>20 min	>13 min	>8 min	>5 min	>2,5 min
	0,300 $mLmin^{-1}$	>20 min	>20 min	>17 min	>11 min	>7,5 min	>3,5 min

Autoria própria

Em seguida, o comportamento retentivo das colunas preenchidas com Discovery C_{18} e C_8 foi avaliado utilizando-se o esgoto simulado. O procedimento utilizado no experimento anterior (retenção do estriol pelas colunas extratoras Discovery) foi repetido, com injeção da matriz mais complexa.

A seletividade apresentada pelas colunas pode ser observada na Tabela 2.11, ficando evidente a capacidade de limpeza da matriz (esgoto simulado) durante o carregamento pelas colunas extratoras Discovery C_{18} e C_8.

Tabela 2.11- Porcentagem de matriz eliminada nas colunas Discovery C_{18} e Discovery C_8, nos primeiros 4 minutos de carregamento, em diversas vazões e composições de fase móvel.

Clean-up da matriz (descarte) durante 4 minutos de carregamento				
Coluna extratora	**Vazão**	**0 % MeOH**	**5 % MeOH**	**10 % MeOH**
C_{18} DISCOVERY (50mm x 508 µm; 50 µm, 70Å)	0,500 $mLmin^{-1}$	97,7 %	97,4 %	-
	0,400 $mLmin^{-1}$	97,4 %	97,8 %	98,4 %
C_{18} DISCOVERY (50mm x 508 µm; 50 µm, 70Å)	0,500 $mLmin^{-1}$	93,4 %	94,0 %	-
	0,400 $mLmin^{-1}$	96,0 %	94,6 %	95,2 %

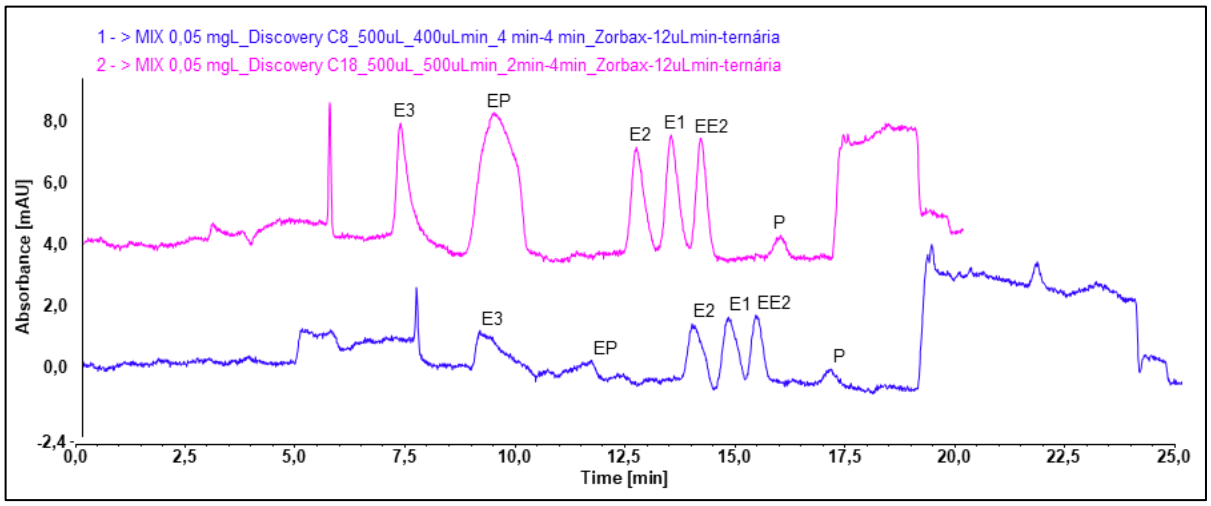
Autoria própria

3.6.2 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching das colunas Discovery com a coluna Zorbax

Tendo sido realizados os testes de retenção do estriol e de clean-up da matriz para as colunas Discovery C_{18} e C_8, seguiu-se com o acoplamento entre as colunas extratoras e a coluna Zorbax.

A Figura 2.12 ilustra os cromatogramas obtidos para a mistura dos 5 hormônios de interesse e o etilparabeno com o acoplamento das colunas extratoras Discovery C_{18} e C_8 com a coluna Zorbax.

Figura 2.12- Cromatogramas típicos da separação obtida para os 5 hormônios de interesse e para o etilparabeno na coluna cromatográfica Zorbax, com extração online em colunas Discovery C_{18} (rosa) e C_8 (azul). Fase móvel ternária utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1}, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 280 nm.



Autoria própria

A melhora observada na seletividade das bandas de E2, E1 e EE2 quando substituímos a coluna extratora com fase polimérica (Strata X) por colunas preenchidas com fase de sílica derivada (C_{18} e C_8) foi considerável, em concordância ao esperado na elaboração desta hipótese. As colunas com fase C_{18} e C_8 foram menos retentivas que a coluna Strata X e consequentemente, o gradiente da fase móvel definido para a eluição dos analitos da coluna extratora para a coluna analítica foi mais eficiente. Entretanto, ainda é possível observar alargamento nas bandas cromatográficas dos compostos menos retidos (E3 e EP), principalmente na coluna C_8.

Fundamentado pelas bases teóricas da cromatografia, pode-se aventar a hipótese de que o tamanho e formato das partículas usadas na coluna extratora teria efeito significativo na eficiência global da separação. A fim de verificar a influência do tamanho e da forma das partículas das fases de sílica derivada das colunas extratoras na resolução e separação dos analitos na segunda dimensão, decidiu-se repetir os experimentos utilizando a fase Luna C_{18} e C_8. Esta fase de sílica derivada possui partículas esféricas, de tamanho mais uniforme e menor, quando comparadas às partículas da fase Discovery previamente avaliadas.

Dessa forma, a próxima etapa do trabalho envolveu o preparo e avaliação de colunas extratoras preenchidas com fases Luna C_{18} e C_8 (item 2.2.1), ainda mais compatíveis com a fase da coluna analítica.

3.7 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em colunas Luna C_{18} e C_8 - fase móvel ternária e detecção UV-Vis

3.7.1 Estudo da capacidade retentiva das colunas Luna C_{18} e C_8

A exemplo do que foi realizado para as colunas preenchidas com fase Strata X, Discovery C_{18} e Discovery C_8, as colunas extratoras preenchidas com as fases Luna C_{18} e C_8 (item 2.2.1) foram avaliadas antes de serem acopladas à coluna analítica Zorbax C_{18}.

Os resultados obtidos neste estudo são mostrados na Tabela 2.12.

Tabela 2.12 Eluição do estriol em colunas extratoras Luna C_{18} e Luna C_8, em diversas vazões e composições de fase móvel de carregamento (extração).

Tempo de início da eluição da banda do estriol com o solvente de carregamento (% MeOH) em água							
Coluna extratora	**Vazão**	**0 % MeOH**	**2,5 % MeOH**	**5 % MeOH**	**7,5 % MeOH**	**10 % MeOH**	**15 % MeOH**
C_{18} LUNA (50mm x 508µm; 10 µm, 100Å)	0,500 mLmin^{-1}	>20 min	>15 min	>8 min	>5 min	>3 min	>1,5 min
	0,400 mLmin^{-1}	>20 min	>18 min	>9,5 min	>6 min	>4 min	>2,5 min
	0,300 mLmin^{-1}	>20 min	>20 min	>14 min	>8 min	>5 min	>3 min
C_8 LUNA (50mm x 508 µm; 10 µm, 100Å)	0,500 mLmin^{-1}	>20 min	>20 min	>12 min	>7,5 min	>5 min	>2,5 min
	0,400 mLmin^{-1}	>20 min	>20 min	>15,5 min	>9,5 min	>6,5 min	>3,5 min
	0,300 mLmin^{-1}	>20 min	>20 min	>20 min	>13 min	>9 min	>4,5 min

Autoria própria

Observa-se que em fase móvel contendo 5 % de metanol em água, em vazão de 0,500 mL min^{-1}, a banda do estriol começa a eluir após 8 minutos na Luna C_{18}; isto significa que se estas condições de carregamento forem selecionadas, o tempo de carregamento (extração) pode ser de até 8 minutos, sem o risco de perda dos analitos antes da transferência para a coluna analítica. Já na coluna Luna C_8, a banda começa a eluir após 12 minutos de carregamento. As injeções foram feitas em duplicata, sendo

relatada a média dos resultados; além disso, brancos de água ultrapura foram injetados entre as duplicatas, e nenhum efeito de memória (carry over) foi observado.

Comparando-se, nas mesmas condições de vazão e porcentagem de metanol, os tempos de retenção experimentados pelo estriol nas colunas preenchidas com as fases Luna, percebe-se que a fase Luna C_8 apresentou capacidade retentiva superior à apresentada pela fase C_{18}; este comportamento se diferencia do que fora observado nas fases Discovery, onde a C_{18} foi mais retentiva para o composto em questão (estriol).

Neste momento, uma reflexão mais aprofundada se faz necessária, uma vez que apenas o tamanho da cadeia carbônica não é suficiente para explicar a capacidade retentiva. Ao se observar as características de cada uma das fases Luna (Tabela 2.3), percebe-se que as áreas superficiais, tamanho de poro, forma e tamanho médio das partículas são idênticos. Todavia, a porcentagem de carga de carbono e a cobertura da fase ligada (em µmol m^{-2}) são distintas. Uma carga de carbono superior na fase C_{18} com relação à fase C_8 é esperada - e de fato, descrita, não somente para a fase Luna, mas também para a fase Discovery.

A Tabela 2.13 mostra as relações existentes entre as fases Luna C_{18} e Luna C_8. Estas relações auxiliam no entendimento da termodinâmica envolvida no processo de retenção dos analitos. Levando-se em consideração a carga de carbono (%) e o número de carbonos das cadeias, observa-se uma razão 1,74 vezes superior para a fase Luna C_8. Ainda é necessário levar em consideração que a fase Luna C_8 possui uma cobertura de fase ligada 1,83 vezes superior, ou seja, na fase Luna C_8 têm-se uma cobertura da área superficial com a fase ligada 83% maior que na fase Luna C_{18}. Consequentemente, a combinação de uma razão de carbonos superior e uma cobertura da fase ligada mais efetiva justifica o fato de ter sido observada uma capacidade retentiva maior na fase Luna C_8, quando comparada à fase Luna C_{18}.

Tabela 2.13- Relações existentes entre as fases estacionárias Luna C_{18} e Luna C_8.

Fase estacionária	Número de carbonos	%C	Normalização do tamanho da cadeia (%C / N carbonos)	Razão entre normalizados	Cobertura da fase ligada (µmol m^{-2})	Razão entre as coberturas da fase ligada	Aumento da cobertura de C_8 em relação a C_{18}
LUNA C_{18}	**18,0**	**17,5**	**1,0**	**1,74**	**3,0**	**1,83**	**83%**
LUNA C_8	**8,0**	**13,5**	**1,7**		**5,5**		

Autoria própria

A seguir, avaliou-se o comportamento retentivo das colunas preenchidas com Luna C_{18} e C_8 para o esgoto simulado. O procedimento utilizado no experimento anterior (retenção do estriol pelas colunas extratoras Luna) foi repetido, com injeção da matriz mais complexa. A Tabela 2.14 evidencia, mais uma vez, a seletividade apresentada pelas colunas extratoras preparadas.

Tabela 2.14- Porcentagem de matriz eliminada nas colunas Luna C_{18} e Luna C_8, nos primeiros 4 minutos de carregamento, em diversas vazões e composições de fase móvel.

Clean-up da matriz (descarte) durante 4 minutos de carregamento				
Coluna extratora	**Vazão**	**0 % MeOH**	**5 % MeOH**	**10 % MeOH**
C_{18} LUNA (50mm x 508µm; 10 µm, 100Å)	0,500 $mLmin^{-1}$	96,0 %	98,0 %	-
	0,400 $mLmin^{-1}$	95,6 %	97,0 %	97,5 %
C_8 LUNA (50mm x 508µm; 10 µm, 100Å)	0,500 $mLmin^{-1}$	98,9 %	97,2 %	-
	0,400 $mLmin^{-1}$	96,5 %	97,0 %	97,7 %

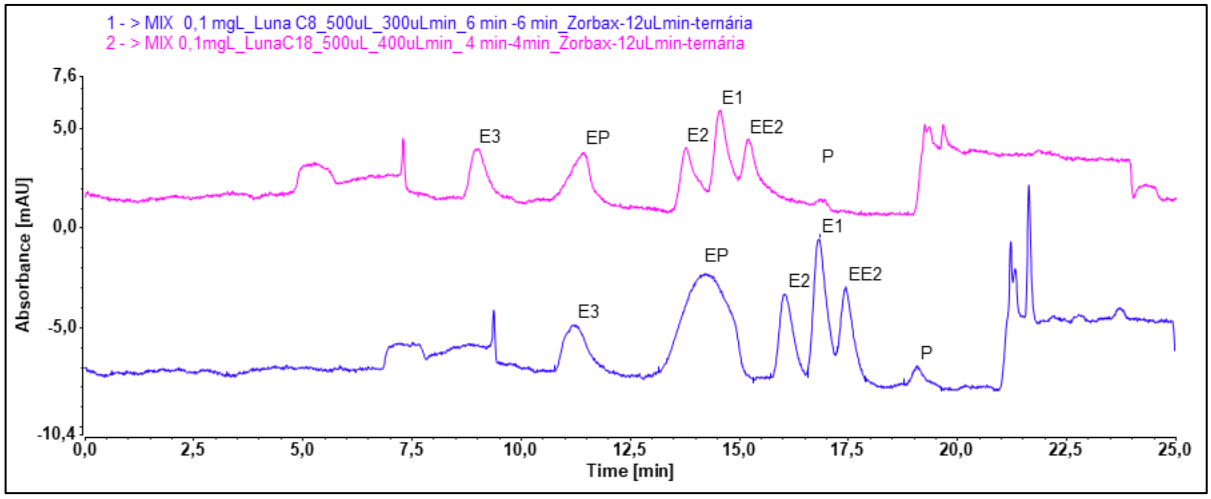
Autoria própria

3.7.2 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching das colunas Luna com a coluna Zorbax

Com a finalização dos testes de retenção do estriol e de clean-up da matriz para as colunas Luna C_{18} e C_8, realizou-se o acoplamento entre as colunas extratoras e a coluna Zorbax.

Os cromatogramas apresentados na Figura 2.13 ilustram o resultado obtido quando utilizamos colunas extratoras preenchidas com fases Luna C_{18} e C_8 acopladas à coluna analítica Zorbax. Pode-se claramente observar a diminuição no alargamento das bandas do estriol (E3) e para o etilparabeno (EP), principalmente com o acoplamento da coluna Luna C_{18}. Todavia, a separação de linha de base que havia sido alcançada no acoplamento das colunas extratoras preenchidas com a fase Discovery C_{18} e C_8 foi comprometida neste acoplamento.

Figura 2.13-Cromatogramas típicos da separação obtida para os 5 hormônios de interesse e para o etilparabeno na coluna cromatográfica Zorbax, com extração online em colunas Luna C_{18} (rosa) e C_8 (azul). Fase móvel ternária utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1}, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 280 nm.



Autoria própria

Acreditando-se que a resolução cromatográfica obtida para a separação dos compostos de interesse poderia ser melhorada com a utilização de uma coluna extratora com um diâmetro interno reduzido, investiu-se um pouco mais de tempo e trabalho nesta investigação. Assim, foram preparadas (em dias distintos, para verificação de reprodutibilidade lote-a-lote) 3 colunas de diâmetro interno reduzido (254 µm) preenchidas com fase Luna C_{18} (item 2.2.1). A fase Luna C_{18} foi selecionada pois foi a fase que proporcionou a melhor resolução no acoplamento com a coluna analítica Zorbax.

3.8 Avaliação do perfil cromatográfico em coluna capilar comercial Zorbax C_{18} com extração online em coluna Luna C_{18} (254 µm i.d.) - fase móvel ternária e detecção UV-Vis

3.8.1 Estudo da capacidade retentiva das colunas Luna C_{18} (254 µm i.d.)

As colunas extratoras de diâmetro interno 254 µm, preenchidas com a fase Luna C_{18} (triplicata), foram avaliadas quanto à capacidade retentiva para o estriol.

Os resultados obtidos neste estudo são mostrados na Tabela 2.15.

Tabela 2.15- Eluição do estriol em colunas extratoras Luna C_{18} (triplicata), em diversas vazões e composições de fase móvel de carregamento (extração).

Tempo de início da eluição da banda do estriol com o solvente de carregamento (% MeOH) em água							
Coluna extratora	**Vazão**	**0 % MeOH**	**2,5 % MeOH**	**5 % MeOH**	**7,5 % MeOH**	**10 % MeOH**	**1 5% MeOH**
C_{18} LUNA (50mm x 254µm; 10 µm, 100Å)	0,300 mLmin^{-1}	>10 min	>5 min	>3,5 min	>2,5 min	>2,2 min	>2 min
	0,200 mLmin^{-1}	>15 min	>7,5 min	>5,5 min	>4,5 min	>3,5 min	>3 min
C_{18} LUNA (50mm x 254µm; 10 µm, 100Å)	0,300 mLmin^{-1}	>10 min	>5 min	>3,5 min	>2,5 min	>2,2 min	>2 min
	0,200 mLmin^{-1}	>15 min	>7,5 min	>5,5 min	>4,5 min	>3,5 min	>3 min
C_{18} LUNA (50mm x 254 µm; 10 µm, 100Å)	0,300 mLmin^{-1}	>10 min	>5 min	>3,5 min	>2,5 min	>2,2 min	>2 min
	0,200 mLmin^{-1}	>15 min	>7,5 min	>5,5 min	>4,5 min	>3,5 min	>3 min

Autoria própria

Observando a tabela acima, pode-se perceber a reprodutibilidade lote-a-lote obtida para as 3 colunas extratoras preparadas, no que diz respeito à capacidade retentiva. Além disto, os resultados em triplicata comprovam a consistência do protocolo de empacotamento.

Destaca-se neste ponto, o uso de vazões menores que as empregadas anteriormente. Isto se deve ao aumento na pressão das colunas, provocada pela diminuição do diâmetro interno. Entretanto, apesar da vazão e do diâmetro interno reduzidos, as colunas mostraram-se suficientemente retentivas para o estriol nas condições avaliadas.

Com os dados gerados e descritos na Tabela 2.15, pode-se concluir que a coluna extratora (de diâmetro interno reduzido) preenchida com a fase Luna C_{18} permite um tempo de extração de mais de cinco minutos, quando em vazão de 200 µL min^{-1} e 5 % de metanol na fase de carregamento. Nestas condições, há a garantia da retenção dos analitos sem perda. Levando-se em conta que o loop de injeção possui capacidade para um volume de 500 µL de amostra, se o carregamento da amostra for realizado por 5 minutos, a uma vazão de 200 µL min^{-1}, o loop será preenchido duas vezes com fase móvel de carregamento; isto garante a total transferência dos analitos do loop para a coluna extratora.

Em seguida, o comportamento retentivo de uma das colunas foi testado para o esgoto simulado. O procedimento utilizado no experimento anterior foi repetido, com injeção da matriz.

A Tabela 2.16 mostra uma diminuição da capacidade de limpeza da matriz se comparada com as colunas anteriormente testadas sem, entretanto, poder ser considerada insatisfatória.

Tabela 2.16- Porcentagem de matriz eliminada na coluna Luna C18, nos primeiros 4 minutos de carregamento, nas vazões e composições de fase móvel descritas.

Clean-up da matriz (descarte) durante 4 minutos de carregamento				
Coluna extratora	**Vazão**	**0 % MeOH**	**5 % MeOH**	**10 % MeOH**
C_{18} LUNA (50mm x 254 µm; 10 µm, 100Å)	0,300 $mLmin^{-1}$	88,1 %	80,2 %	-
	0,200 $mLmin^{-1}$	88,0 %	88,6 %	86,4%

Autoria própria

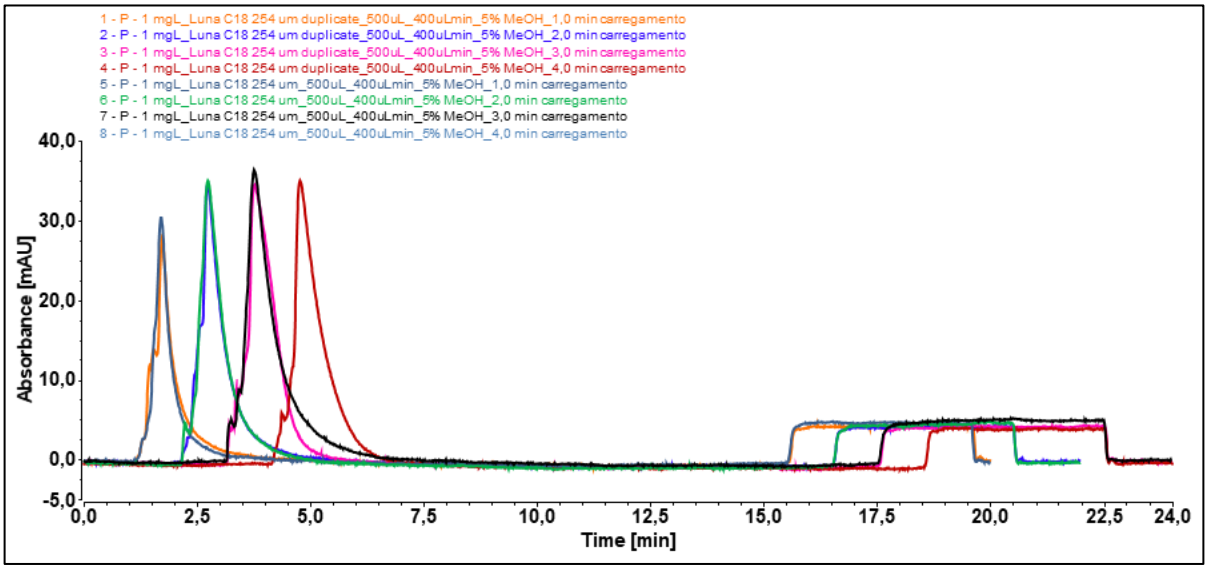
3.8.2 Avaliação das condições de transferência dos analitos da coluna extratora para a coluna analítica

Para este experimento, o composto que apresenta a maior retenção dentre os analitos de interesse (nesse caso, a progesterona) é injetado e após a etapa de carregamento na vazão desejada é eluído da coluna extratora com a fase móvel escolhida para a separação cromatográfica (respeitando-se a vazão e a composição escolhidas). Consequentemente, este estudo é realizado após a definição da coluna analítica e das condições de separação dos analitos na segunda dimensão. Como a coluna cromatográfica foi substituída por uma união (de aço inoxidável, com “zero” volume extra coluna, sem capacidade retentiva), o tempo necessário para que o analito chegue ao detector é mínimo, evitando alargamento da banda. Assim, pode-se estimar com boa precisão a transferência (completa ou não) do analito mais retido, fornecendo dados para o tempo de transferência da fração da primeira dimensão para a segunda. Em suma, neste momento é avaliado por quanto tempo as duas colunas devem permanecer em linha para que todos os compostos de interesse sejam transferidos da coluna extratora para a coluna analítica, utilizando como referência o analito mais retido.

Dessa forma, o tempo de transferência da fração de interesse das colunas extratoras de diâmetro reduzido (254 µm) para a coluna analítica foi avaliado.

A Figura 2.14 ilustra alguns resultados obtidos neste estudo, em 2 das 3 colunas extratoras de diâmetro reduzido preenchidas com Luna C_{18}. Como pode ser observado, foram testados vários tempos de carregamento da progesterona na coluna extratora e a partir do giro da válvula, monitoraram-se os tempos necessários para a completa eluição da banda cromatográfica, utilizando a fase móvel de eluição previamente definida para a separação cromatográfica. Convêm atentar-se para a excelente repetibilidade alcançada ao sobreporem-se os resultados da eluição da progesterona obtidos nas 2 colunas.

Figura 2.14- Sobreposição dos cromatogramas obtidos para a injeção da progesterona nas colunas extratoras (diâmetro 254 µm) preenchidas com fase Luna C_{18} em diferentes tempos de carregamento. Fase móvel de carregamento: 5 % de metanol em água, com vazão de 200 µL min^{-1}. Fase móvel de eluição: fase móvel ternária com eluição gradiente, com vazão de 12 µL min^{-1}. Monitoramento da eluição de progesterona por UV em comprimento de onda de 254 nm.



Autoria própria

Para melhor entendimento, como exemplo pode-se escolher a sobreposição da última banda da Figura 2.14. Ela diz respeito a uma etapa de carregamento de 4 minutos, com fase móvel contendo 5 % de metanol em água. Observa-se que a partir do giro da válvula, a banda da progesterona demora cerca de 3 minutos e meio para eluir completamente da coluna extratora. Isto significa que ao acoplar-se a coluna extratora Luna C_{18} (de diâmetro interno 254 µm) à coluna analítica, com objetivo de realizar a completa transferência da progesterona, deve-se deixar as duas colunas

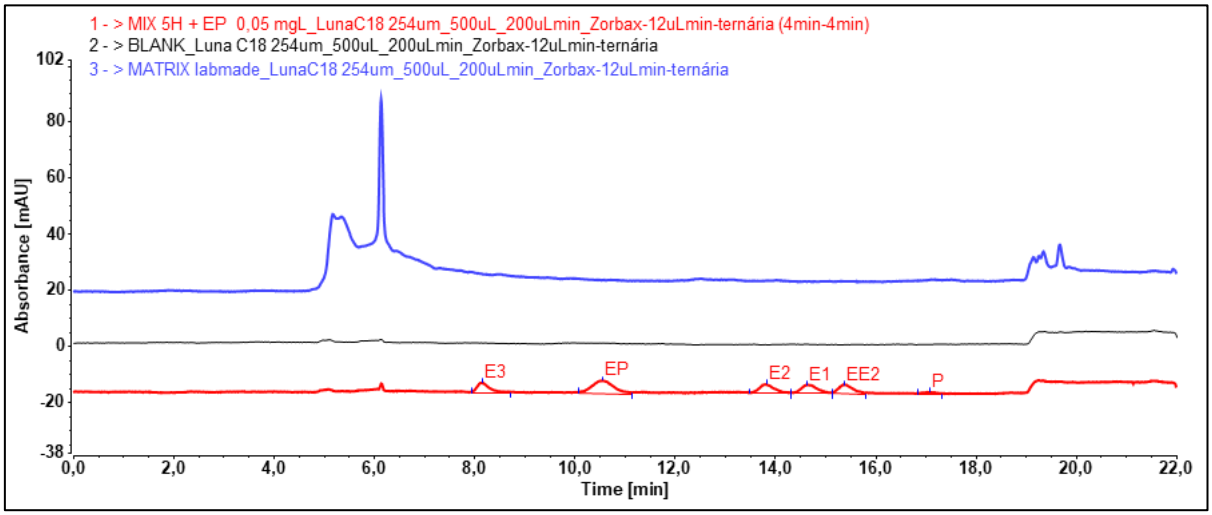
acopladas durante 3 minutos e meio, com vazão de 12 µL min^{-1} e fase móvel ternária com gradiente pré-definido. Este é o tempo de transferência dos analitos de uma coluna para outra, nas condições do experimento.

3.8.3 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching entre coluna Luna C_{18} (diâmetro 254 µm) e coluna Zorbax

Com a finalização dos testes de retenção do estriol, de clean-up da matriz e do tempo de transferência da fração de interesse para as colunas Luna C_{18} (com diâmetro interno de 254 µm), realizou-se o acoplamento entre as colunas extratoras e a coluna Zorbax.

Os cromatogramas apresentados na Figura 2.15 ilustram o resultado obtido a coluna extratora Luna C_{18} (254 µm) acoplada à coluna analítica Zorbax.

Figura 2.15- Cromatogramas típicos da separação obtida para a injeção de 500 µL da mistura dos 5 hormônios de interesse e etilparabeno em água ultrapura (vermelho) e para a matriz (esgoto simulado) (azul). Acoplamento entre coluna extratora Luna C_{18} (254 µm i.d.) e coluna cromatográfica Zorbax. Fase móvel ternária utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1}, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 254 nm.



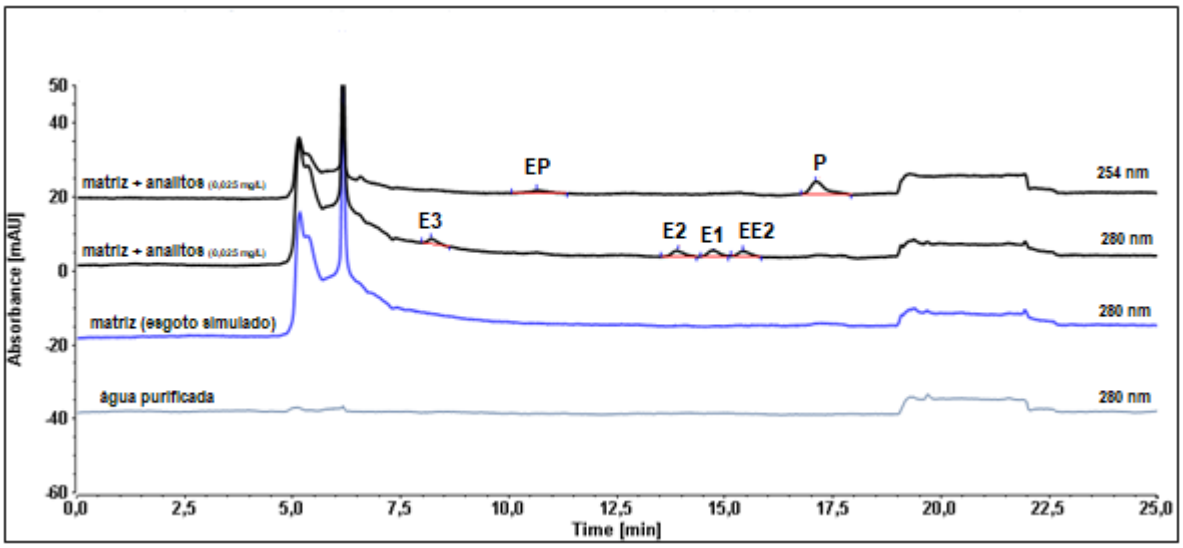
Autoria própria

Como pode ser visualizado na Figura 2.15, com a utilização de uma coluna com diâmetro interno bastante reduzido preenchida com fase Luna C_{18} foi possível alcançar a resolução desejada. Além disso, o tempo de carregamento de 4 minutos favoreceu a limpeza da matriz (esgoto simulado), uma vez que não são observados

interferentes nos tempos de retenção dos compostos de interesse, nos comprimentos de onda monitorados.

A Figura 2.16 ilustra os cromatogramas obtidos para os compostos de interesse adicionados ao esgoto simulado.

Figura 2. 16- Cromatogramas típicos da separação obtida para a injeção de 500 µL da mistura dos 5 hormônios de interesse e etilparabeno em matriz (esgoto simulado) (preto); em azul, cromatograma típico da matriz. Acoplamento entre coluna extratora Luna C_{18} (254 µm i.d.) e coluna cromatográfica Zorbax. Fase móvel ternária utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1}, temperatura do forno da coluna de 40°C e comprimento de onda 254 nm e 28 nm (conforme indicado).



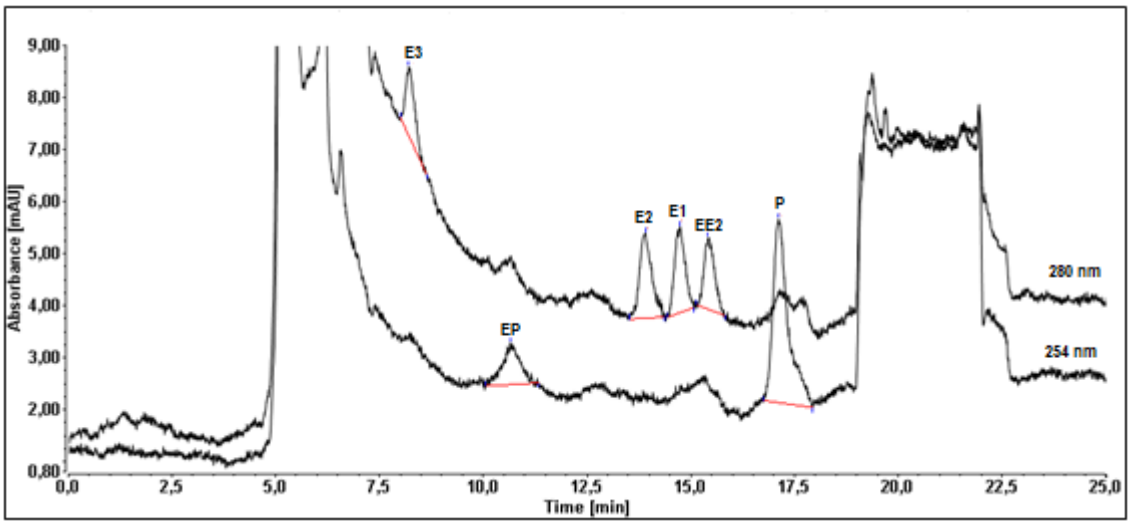
Autoria própria

A separação obtida para os compostos de interesse na matriz pode ser mais bem visualizada na Figura 2.17, onde um “zoom” foi aplicado aos cromatogramas, evidenciando as seletividades obtidas.

Com o resultado obtido no acoplamento da coluna extratora (de diâmetro 254 µm) preenchida com Luna C_{18}, fica evidenciado o impacto gerado pelo diâmetro interno do hardware utilizado para o preparo das colunas extratoras. A dispersão dos analitos na fase móvel é reduzida em diâmetros menores, favorecendo a focalização na coluna extratora e consequentemente, diminuindo o alargamento das bandas na separação analítica. Com isso, a sensibilidade é aumentada.

É importante destacar que a utilização de uma coluna capilar com diâmetro interno reduzido preenchida com fase estacionária de tamanho de partícula de 10 µm só foi viável graças às características instrumentais, que suportou as altas pressões impostas por uma vazão de carregamento compatível com o objetivo do trabalho.

Figura 2. 17- Zoom dos cromatogramas (Figura 2.16) típicos da separação obtida para a injeção de 500 µL da mistura dos 5 hormônios de interesse e etilparabeno na matriz (esgoto simulado). Acoplamento entre coluna extratora Luna C_{18} (254 µm i.d.) e coluna cromatográfica Zorbax. Fase móvel ternária utilizando modo de eluição gradiente, vazão de 12 µl min^{-1} e temperatura do forno da coluna de 40°C.

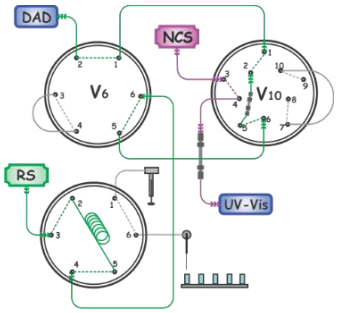
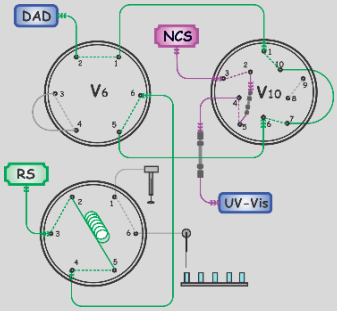
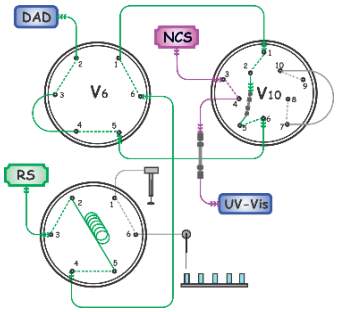
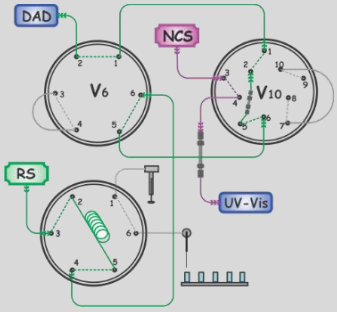


Autoria própria

Como observado nos resultados obtidos, o acoplamento da coluna de extração Luna C_{18} (254 µm i.d.) à coluna Zorbax permitiu a quantificação dos analitos de interesse em matrizes aquosas em 25 minutos por amostra, incluindo o tempo necessário para o condicionamento das colunas e equilíbrio do sistema entre as injeções. O preparo e clean-up das amostras é totalmente automatizado, exigindo somente filtração prévia à injeção, para evitar entupimento do sistema. Cada injeção consome 5 mL de fase móvel de carregamento (incluindo lavagem e condicionamento da coluna extratora) e 300 µL de fase móvel para a etapa de separação. O volume de amostra injetado é de 500 µL, uma redução significativa quando se considera que a SPE tradicional consome, no mínimo, 250 mL de amostra aquosa.

O método cromatográfico em column switching na escala capilar desenvolvido para a análise de 5 hormônios em matrizes aquosas está sumariado na Tabela 2.17.

Tabela 2.17- Tempos, posições das válvulas e eventos envolvidos em column switching da coluna extratora Luna C_{18} (254 µm i.d.) e coluna analítica Zorbax C_{18}.

Tempo (min)	V_6	V_{10}	Configuração das válvulas	Coluna Analítica / Bomba	Coluna de Extração / Bomba
0	1_2	1_2		Condicionamento / NC	Carregamento da amostra / HPG-RS
4	1_2	10_1		Transferência (recebe amostra da coluna extratora) / NC	Transferência *backflush* / NC
8	6_1	1_2		Separação analítica / NC	Lavagem *backflush* / HPG-RS
23	1_2	1_2		Separação analítica / NC	Lavagem e condicionamento *foreflush* /HPG-RS
25	Término da corrida cromatográfica				

Autoria própria

4 CONCLUSÕES

Alguns pontos podem ser destacados nessa etapa do estudo:

✓ Dentre as colunas analíticas capilares avaliadas, a coluna Zorbax mostrou o melhor desempenho na separação dos compostos de interesse;

✓ A fase ternária mostrou-se a melhor alternativa para se alcançar a seletividade necessária para a separação dos compostos E1, E2 e EE2 nas colunas analíticas C_{18} avaliadas;

✓ A transferência em backflush dos analitos da coluna extratora para a coluna analítica mostrou-se a mais eficiente para o objetivo do trabalho;

✓ Houve boa capacidade retentiva das colunas extratoras avaliadas, sendo todas suficientemente retentivas para os analitos em questão;

✓ A fase Strata X mostrou-se muito retentiva para os compostos de interesse e essa característica foi responsável pelo alargamento das bandas, com prejuízo na separação na segunda dimensão;

✓ Fases com partículas maiores e irregulares mostraram-se menos eficientes na focalização dos analitos e manutenção da baixa dispersão dessas bandas previamente focalizadas, prejudicando a resolução cromatográfica;

✓ Fases com partículas menores e mais regulares favorecem a focalização dos analitos e manutenção da baixa dispersão das bandas, tendo-se obtido melhores resultados com estas fases no acoplamento de colunas;

✓ A coluna extratora preparada em hardwares de diâmetro interno reduzido mostrou maior capacidade de focalização e prevenção da dispersão das bandas, resultando em cromatogramas com melhor resolução para os compostos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] LEWIS, K. M.; ARCHER, R. D. pKa values of estrone, 17 beta-estradiol and 2-methoxyestrone. **Steroids**, v. 34, n. 5, p. 485–99, 1979.

[2] MARQUES, R.; VAZ, F. A. S.; POLONINI, H. C.; OLIVEIRA, M. A. I. Optimized separation method for Estriol 17-β-estradiol and Progesterone by Capillary Eletrochromatography with Monolithic Column and its Application to a Transdermal Emulsion. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 3, p. 609-618, 2015.

[3] CHEMAXON. Properties viewer, Budapest. Disponível em: <http://www.chemicalize. org/>. Acesso em: 10 jan 2015.

[4] Disponível em: <http://phx.phenomenex.com/lib/br75930712_w.pdf>; Acesso em: 10.jul.2015.

[5] Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects /11300/11262.pdf>; Acesso em: 10.jul.2015.

[6] Disponível em: <https://www.che.utah.edu/department_equipment/ProjectsLab/ AHPLC/ MISLunaColumnData.pdf >; Acesso em:10.07.2015.

[7] TORRES, P. Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário sob diferentes condições de operação. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

[8] KATAOKA, H.; SAITO, K. Recent advances in column switching sample preparation in bioanalysis. **Bioanalysis**, v.4, p. 809-832, 2012.

[9] RODRIGUEZ-MOZAZ, S., LOPEZ DE ALDA, M. J., BARCELÓ, D. Advantages and limitations of online solid phase extraction coupled to liquid chromatgraphy-mass

spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **J. Chromatogr. A**, v. 1152, p. 97-115, 2007.

[10] FAYAD, P.; SAUVÉ, S. Online SPE-LC-APCI-MS/MS for the determination of steroidal hormones in drinking water. Apresentação em Powerpoint. Local de apresentação não disponível.

[11] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. I. Practical HPLC method development. New York: John Willey & Sons, Inc. 2nd ed., 1997, 765p.[12] SADEK, P. C. Illustrated pocket dictionary of chromatography. New Jersey: John Willey & sons, Inc., 2004, 227p.

CAPÍTULO 3

Otimização e desenvolvimento de métodos cromatográficos para quantificação de hormônios e parabenos em água utilizando column switching nas escalas convencional e capilar hifenadas à espectrometria de massas de alta resolução (CS-UHPLC-ESI-QToF e CS-cLC-ESI-QToF)

1 OBJETIVO

Escala convencional: Desenvolver um método cromatográfico column switching em escala convencional aplicável a análise de 5 hormônios e 5 parabenos em água, com detecção por espectrometria de massas de alta resolução (ESI-QToF). Assim, a partir das observações feitas durante o desenvolvimento dos estudos realizados e descritos no Capítulo 2, várias etapas analíticas foram planejadas com o intuito de obter-se as condições de análise mais apropriadas.

Escala capilar: Otimizar as condições anteriormente definidas para a obtenção de um método cromatográfico column switching em escala capilar aplicável à análise de 5 hormônios e 5 parabenos em água, com detecção por espectrometria de massas de alta resolução (ESI-QToF). Para tanto, foi realizado o ajuste fino das condições anteriormente encontradas, devido a diferenças sutis no sistema o qual passou a contar com a hifenação ao espectrômetro de massas.

1.1 Objetivos específicos

✓ **Para ambas escalas:**

- Obter as condições experimentais e determinação das *m/z* monoisotópicas mais intensas de cada composto (com erro de massa menor que 5 ppm) a serem extraídas
- avaliar as colunas extratoras selecionadas com relação à capacidade retentiva para os parabenos

✓ **Em escala convencional, avaliar:**

- o acoplamento da coluna extratora às colunas analíticas comerciais disponíveis, selecionando o melhor arranjo em column switching convencional
- a influência da infusão pós-coluna de hidróxido de amônio na sensibilidade do método para os analitos de interesse
- a interferência do acetato de etila presente na fase móvel no que diz respeito à ionização dos analitos

- os efeitos de matriz em amostras aquosas de diferentes fontes;
- a linearidade da faixa de trabalho e precisão do método desenvolvido

✓ **Em escala capilar, avaliar:**

- o acoplamento da coluna extratora à coluna capilar analítica BetaBasic18
- a linearidade da faixa de trabalho e precisão do método desenvolvido.

2 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Material

2.1.1 Reagentes e solventes

Da mesma forma que na etapa anterior do estudo (descrito no Capítulo 2), acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e acetato de etila (AcOEt) grau HPLC, da Tedia (Fairfield, USA) foram utilizados nesta etapa. A água purificada foi obtida de sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, USA) e membranas hidrofóbicas de 0,2 µm e hidrofílicas de 0,45 µm e 0,2 µm, adquiridas da Millipore, foram utilizadas para a filtração de solventes e amostras. Além destes reagentes, hidróxido de amônio (NH_4OH) grau PA, marca Vetec, foi usado.

2.1.2 Padrões analíticos

2.1.2.1 Hormônios esteroides

Os padrões analíticos dos hormônios esteroides utilizados neste trabalho estão listados no Capítulo 2, item 2.1.1.1.

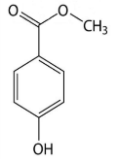
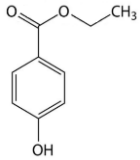
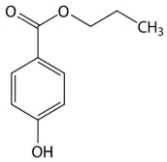
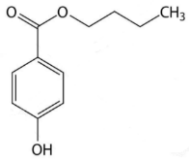
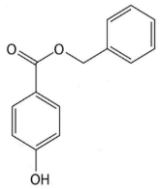
As estruturas químicas e propriedades físico-químicas mais relevantes dos hormônios utilizados são apresentadas na Tabela 2.1, Capítulo 2.

2.1.2.2 Parabenos

Os padrões analíticos dos parabenos utilizados neste trabalho foram: metilparabeno (MP), etilparabeno (EP), propilparabeno (PP), butilparabeno (BP) e benzilparabeno (BzP). Os padrões apresentando 99 % de pureza foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

As estruturas químicas e propriedades físico-químicas mais relevantes dos parabenos utilizados são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1-Estruturas químicas e propriedades físico-químicas dos parabenos utilizados nesse estudo.

Nome (Abreviação)	**Estrutura Química**	**MM (g mol^{-1})**	**Solubilidade em água (mg L^{-1} a 25ºC)**	**Log K_{OW}**	**pKa**
Metilparabeno (MP)		152,149	2,5x10^{3}	1,96	8,40
Etilparabeno (EP)		166,176	8,85x10^{2}	2,47	8,34
Propilparabeno (PP)		180,203	5,0x10^{2}	3,04	8,50
Butilparabeno (BP)		194,230	2,07x10^{2}	3,57	8,47
Benzilparabeno (BzP)		228,247	1,60x10^{2}	3,64	8,50

Autoria própria

Fonte: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

2.1.3 Colunas extratoras

As colunas extratoras utilizadas nesta etapa foram preparadas no laboratório e descritas no Capítulo 2.

2.1.3.1 Escala convencional

Em escala convencional, o desenvolvimento do método para análise de hormônios e parabenos em águas foi realizado com coluna extratora preenchida com a fase Luna C_{18} (50x 0,508 mm, 10 µm).

2.1.3.2 Escala capilar

O desenvolvimento do método para análise de hormônios e parabenos em águas em escala capilar foi realizado com coluna extratora preenchida com a fase Luna C_{18} (50 x 0,254 mm, 10 µm).

2.1.4 Colunas analíticas comerciais

2.1.4.1 Escala convencional

Durante o desenvolvimento do método em escala convencional foram avaliadas algumas colunas analíticas comerciais preenchidas com fase estacionária C_{18} (sílica modificada com grupos octadecil) disponíveis no laboratório. A Tabela 3.2 lista essas colunas, bem como algumas de suas características.

Tabela 3.2 -Colunas capilares C_{18} utilizadas e suas principais características.

Identificação da coluna C_{18}	Dimensões (L x i,d., mm)	Tamanho de partícula (µm)	Tamanho do poro (Å)	Fornecedor
ACCLAIM (Acclaim RSLC 120 C_{18})	100 x 2,1	2,2	120	Thermo Scientific, USA
KINETEX 2,6µ (Kinetex 2,6µ XB-C_{18})	100 x 2,1	2,6*	100	Phenomenex, USA
KINETEX 1,7µ (Kinetex 1,7µ XB-C_{18})	100 x 2,1	1,7*	100	Phenomenex, USA
KINETEX EVO (Kinetex 5µ EVO-C_{18})	150 x 2,1	5*	100	Phenomenex, USA

*partícula de sílica superficialmente porosa
Autoria própria

2.1.4.2 Escala capilar

Para o desenvolvimento do método em escala capilar para a quantificação de hormônios e parabenos em água foi utilizada a coluna analítica comercial BetaBasic$_{18}$ (100 x 0,32 mm, 5 µm; Thermo Scientific, USA), preenchida com fase estacionária C_{18}.

2.1.5 Equipamentos, softwares e sistemas

Para as medidas de massa foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo, modelo AG285. As medições de pH foram realizadas em um potenciômetro Qualxtron, modelo 8010.

O sistema cromatográfico utilizado nessa etapa (tanto para a escala convencional quanto para a capilar) foi anteriormente apresentado e descrito (item 2.1.6.2., Capítulo 2). Para infusão pós-coluna de hidróxido de amônia foi utilizada uma bomba modelo LC-10AD*VP* da Shimadzu.

O espectrômetro de massas utilizado nessa etapa foi do tipo híbrido - quadrupolo/tempo-de-voo, modelo MicrOToF-QII, da marca Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha).

A aquisição de dados do acoplamento do cromatógrafo UltiMate ao espectrômetro de massas MicrOToF-QII foi realizada software HYSTAR (versão 3.2, da Bruker), através do plug-in DCMSLink, (Thermo Scientific).

Para o tratamento e descrição dos dados foi utilizado o pacote Microsoft® Office™ e para tratamento das figuras o CorelDraw™. O software Chromeleon™ 7.1 foi usado para aquisição e tratamento dos dados cromatográficos obtidos com detecção por espectrometria na região do ultravioleta (UV).

2.1.6 Amostras ambientais

Amostras de esgoto simulado, além de amostras aquosas de diversas fontes e complexidades foram utilizadas nessa etapa do estudo, como segue:

- Amostra A: água do córrego Santa Maria Madalena, próximo à nascente
- Amostra B: água do córrego Gregório (em frente à entrada da USP)
- Amostra C: água de poço artesiano (“água dura”)
- Amostra D: água de poço artesiano (chácara na cidade de Araras)

- Amostra E: água de poço artesiano (condomínio Eldorado – São Carlos)
- Amostra F: água do córrego do Tijuco Preto
- Amostra G: água do córrego Santa Maria Madalena
- Amostra H: água da “bica” (SAAE São Carlos)
- Amostra I: esgoto simulado (diluído em água, 25:75, v/v)
- Amostra J: esgoto simulado (diluído em água, 50:750, v/v)
- Amostra K: esgoto simulado (sem diluição)
- Amostra L: água do rio Monjolinho (próximo ao Shopping Iguatemi)

Antes da injeção no sistema cromatográfico, as amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm.

2.2 Métodos

2.2.1 Escala convencional e capilar

Todas as análises feitas em column switching (neste Capítulo) tiveram a injeção de 500 µL de amostra, no modo full loop, independentemente da escala.

2.2.1.1 Determinação das *m/z* a serem extraídas dos cromatogramas de íons totais

Previamente à hifenação do cromatógrafo ao espectrômetro de massas, foram determinadas as *m/z* a serem extraídas dos cromatogramas de íons totais (TIC) para obtenção dos cromatogramas de íons extraídos (EIC). Para tanto, infundiu-se diretamente na fonte do QToF uma mistura dos analitos em concentração 2 µg mL^{-1}, preparada em água/acetonitrila na proporção 1:1 (v/v). Foram avaliadas as intensidades no modo positivo e negativo, e variações em alguns parâmetros instrumentais foram testadas, como transfer time, voltagem do capilar, temperatura da fonte de íons, pressão do gás nebulizador e vazão do gás secante. Posteriormente à hifenação, foi feita a adequação dos parâmetros instrumentais conforme as características de cada uma das escalas.

2.2.2 Escala convencional

2.2.2.1 Estudo da capacidade retentiva da coluna extratora Luna C_{18} (508 µm i.d.) para parabenos (UV/Vis)

Para este experimento, tanto o arranjo quanto o procedimento descritos em 2.2.5.1 (Capítulo 2) foram utilizados; o metilparabeno foi o analito selecionado para a avaliação da capacidade retentiva dessa coluna.

A coluna de extração preenchida com Luna C_{18} e de dimensões 50 x 0,508 mm, preparada conforme item 2.2.1, Capítulo 2, foi avaliada com relação à capacidade retentiva para o metilparabeno.

2.2.2.2 Investigação quanto à natureza do fluxo gerado na coluna extratora durante a etapa de carregamento da coluna Luna C18 (508 µm i.d.)

Para a escala convencional utilizou-se a coluna extratora Luna C_{18} com dimensões 50 mm x 0,508 µm, arranjo descrito em 2.2.5.1 (Capítulo 2), apenas monitorando os incrementos na pressão a cada incremento de vazão.

2.2.2.3 Avaliação do perfil cromatográfico em escala convencional - column switching entre coluna Luna C_{18} (diâmetro 508 µm) e diversas colunas comerciais – MicrOToF-QII

A avaliação do perfil cromatográfico da separação de hormônios e parabenos em colunas convencionais comerciais (Tabela 3.1 desse Capítulo), utilizou o sistema UltiMate™ 3000 RSLCnano no modo multimensional.

Para a avaliação da separação cromatográfica dos analitos nas colunas comercias disponíveis (item 2.1.4.1), o sistema UltiMate™ 3000 RSLCnano no modo multidimensional e em escala convencional foi montado. O sistema injetor foi arranjado de modo a capacitar a injeção de 500 µL de amostra (soluções padrão dos hormônios e parabenos na forma de mistura, em água ultrapura). Neste arranjo, a bomba LP foi responsável pelo carregamento da amostra do sistema injetor até a coluna extratora (Luna C_{18} – 508 µm diâmetro interno); já a bomba HPG-RS (UHPLC) fez a transferência dos analitos da coluna de extração para a coluna analítica, bem como a separação dos compostos nessa coluna.

Os eventos de column switching nos experimentos foram possíveis graças à presença das duas válvulas atuadoras (V_6 e V_{10}), que neste arranjo específico proporcionaram a transferência dos analitos da coluna extratora para a analítica em backflush. O caminho cromatográfico foi escolhido para tornar o volume extra coluna no sistema o menor possível.

O detector utilizado nessa etapa foi o MicrOToF-QII.

2.2.2.4 Desenvolvimento do método - column switching entre coluna extratora Luna C_{18} (diâmetro 508 µm) e coluna Acclaim (CS-UHPLC-ESI-QToF)

Para o acoplamento entre as colunas Luna C_{18} de diâmetro interno 508 µm e a coluna Acclaim foi utilizado o mesmo arranjo multidimensional descrito no item 2.2.2.3.

Uma série de variáveis foram avaliadas durante o desenvolvimento do método, dentre elas: composição e vazão da fase móvel; temperatura, tempo e vazão de carregamento da amostra para a coluna extratora; vazão, composição da fase móvel e tempo necessário para transferência dos analitos para a coluna analítica; temperatura de análise, além de vazão e composição da fase móvel de análise.

2.2.2.4.1 Avaliação qualitativa dos efeitos de matriz apresentados por diversas matrizes aquosas

A avaliação qualitativa dos efeitos produzidos pela matriz na ionização dos parabenos e hormônios consistiu em injetar a matriz (amostras aquosas de diversas fontes e complexidades) utilizando column switching nas condições de análise previamente definidas para o acoplamento entre Luna C_{18} e Acclaim. Paralelamente, uma solução padrão dos analitos em água foi infundida que, por intermédio de uma conexão em T, se misturou ao efluente pós-coluna analítica, sendo ambos direcionados à fonte de ionização. Os efeitos de supressão ou incremento na ionização podem ser visualmente observados nos cromatogramas registrados.

Adicionalmente, a fim de estudar a influência da complexidade da matriz na resposta do sistema analítico para os diversos analitos, curvas analíticas em amostras aquosas de diferentes fontes e complexidades foram construídas e visualmente comparadas. Para possibilitar a comparação, as mesmas condições analíticas e

instrumentais foram empregadas, bem como as concentrações das soluções padrão utilizadas.

2.2.2.4.2 Avaliação prévia da linearidade da faixa de trabalho, exatidão e precisão em água ultrapura

A linearidade da faixa de trabalho foi investigada em seis níveis de concentração da mistura dos hormônios e parabenos em água ultrapura. Cada nível de concentração (pontos 1 a 6 – P1 a P6) foi avaliado em triplicata. Amostras branco (água ultrapura sem adição de padrão) foram injetadas aleatoriamente no intervalo da curva para a verificação de efeito de memória no sistema analítico.

Os pontos P1, P3 e P6 foram utilizados para a checagem da precisão inter e intra-dia, além da exatidão do método desenvolvido.

2.2.3 Escala capilar

2.2.3.1 Estudo da capacidade retentiva da coluna extratora Luna C_{18} (254 µm i.d.) para parabenos (UV/Vis)

Para este experimento, tanto o arranjo quanto o procedimento descritos em 2.2.5.1 (Capítulo 2) foram utilizados. A coluna de extração preenchida com Luna C_{18} e de dimensões 50 x 0,254 mm, preparada conforme descrito item 2.2.1 e listada na Tabela 2.5 (Capítulo 2), foi avaliada com relação à capacidade retentiva para o metilparabeno (composto menos retido entre os parabenos).

2.2.3.2 Investigação quanto à natureza do fluxo gerado na coluna extratora durante a etapa de carregamento da coluna Luna C_{18} (254 µm i.d.)

Para a escala capilar utilizou-se a coluna extratora Luna C_{18} com dimensões 50 mm x 0,254 µm, arranjo descrito em 2.2.5.1 (Capítulo 2), apenas monitorando os incrementos na pressão a cada incremento de vazão.

2.2.3.3 Avaliação do perfil cromatográfico - column switching entre coluna extratora Luna C18 (diâmetro 254 µm) e coluna BetaBasic18

Para o acoplamento entre as colunas Luna C_{18} de diâmetro interno 254 µm e a coluna $BetaBasic_{18}$ foi utilizado o arranjo multidimensional apresentado no item 2.2.2, Capítulo 2. Entretanto, nesta etapa do estudo, o detector utilizado foi o QToF, e não UV/Vis.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Escala convencional e capilar

3.1.1 Determinação das *m/z* a serem extraídas dos cromatogramas de íons totais

As *m/z* a serem extraídas dos cromatogramas de íons totais (TIC) para obtenção dos cromatogramas de íons extraídos (EIC) foram determinadas por infusão direta dos analitos. Concomitantemente, foram ajustados alguns parâmetros instrumentais no espectrômetro de massas a fim de se obter as respostas mais adequadas para o conjunto dos analitos.

A Tabela 3.3 mostra a relação das *m/z* extraídas dos cromatogramas de íons totais. Por estarmos trabalhando com um equipamento de alta resolução, foi escolhido o íon monoisotópico mais intenso de cada composto estudado, referente a espécie $[M-H]^-$ (para todos os analitos), ou $[M+H]^+$ para a progesterona. Os íons foram extraídos com exatidão de 5 ppm (com erro na segunda casa decimal).

Tabela 3.3- Relação *m/z* extraídas dos cromatogramas de íons totais.

Analito	Fórmula molecular	m/z	Modo de aquisição
Metilparabeno (MP)	$C_8H_8O_3$	$[M-H]^-$ = 151,04	negativo
Etilparabeno (EP)	$C_9H_{10}O_3$	$[M-H]^-$ = 165,06	negativo
Propilparabeno (PP)	$C_{10}H_{12}O_3$	$[M-H]^-$ = 179,07	negativo
Butilparabeno (BP)	$C_{11}H_{14}O_3$	$[M-H]^-$ = 193,09	negativo
Benzilparabeno (BzP)	$C_{14}H_{12}O_3$	$[M-H]^-$ = 227,07	negativo
Estriol (E3)	$C_{18}H_{24}O_3$	$[M-H]^-$ = 287,17	negativo
Estradiol (E2)	$C_{18}H_{24}O_2$	$[M-H]^-$ = 271,17	negativo
Etinilestradiol (EE2)	$C_{20}H_{24}O_2$	$[M-H]^-$ = 295,17	negativo
Estrona (E1)	$C_{18}H_{22}O_2$	$[M-H]^-$ = 269,15	negativo
Progesterona (P)	$C_{21}H_{30}O_2$	$[M+H]^+$ = 315,23	positivo

Autoria própria

Após a hifenação e com o sistema cromatográfico operando em cada uma das escalas, foi realizado o ajuste fino de alguns parâmetros, dadas as diferentes

características instrumentais de cada escala. Assim, após otimização, foram definidas as condições experimentais utilizadas no espectrômetro de massas para ambas escalas. Essas condições são listadas na Tabela 3.4 .

Tabela 3.4- Condições experimentais utilizadas no espectrômetro de massas MicrOToF-QII para as escalas convencional e capilar.

MicrOToF-QII		
Parâmetro	**Escala convencional**	**Escala capilar**
Software	Compass (via HyStar)	Compass (via HyStar)
Plug-in	DCMSLink	DCMSLink
Fonte de ionização	ESI	ESI
Voltagem do capilar	4500 V	4500 V
Pressão do gás nebulizador	4 bar	1 bar
Vazão do gás de secagem	8 L min^{-1}	4 L min^{-1}
Temperatura do gás de secagem	200 °C	180 °C
Intervalo de m/z monitorado	50 a 3000 Da	50 a 3000 Da
Taxa de aquisição de espectros	2 Hz	2 Hz
Modo de aquisição de m/z	Full MS	Full MS
Transfer time	35 s	35 s

Autoria própria

Dos dez analitos de interesse nesse estudo, apenas a progesterona sofre ionização em modo positivo, gerando íons $[M+H]^+$ no electrospray. Todos os demais hormônios e os parabenos sofrem ionização negativa, graças ao hidrogênio ácido presente em suas estruturas químicas.

Uma limitação técnica da fonte ESI do MicrOToF-QII é a dificuldade de rápida estabilização após inversão da polaridade. A recomendação técnica é que sejam aguardados 30 minutos para estabilização.

Entretanto, para demonstrar que o método desenvolvido pode ser utilizado para analisar também a progesterona, dada a presença desse hormônio desde o início do desenvolvimento desse estudo, algumas injeções de interesse qualitativo foram feitas com inversão de polaridade durante a corrida analítica. Assim, durante os primeiros minutos da corrida analítica, a aquisição foi feita em modo negativo; após a eluição dos analitos ionizados negativamente, houve a inversão de polaridade, promovendo

a ionização da progesterona. Após a eluição da progesterona (último analito a ser eluído nas condições estudadas), a polaridade foi invertida novamente.

Posteriormente, quando análises quantitativas passaram a ser o foco da etapa de desenvolvimento, o modo negativo foi utilizado durante toda a corrida cromatográfica e a progesterona, consequentemente, não foi ionizada e observada nos cromatogramas.

3.2 Escala convencional

3.2.1 Estudo da capacidade retentiva da coluna extratora Luna C_{18} (508 µm i.d.) para parabenos (UV/Vis)

Com base nos resultados descritos no Capítulo 2, optou-se por utilizar uma coluna extratora preenchida com fase Luna C_{18}. Essa fase mostrou-se adequada no que diz respeito a capacidade retentiva, além de boa compatibilidade com a fase das colunas analíticas (C_{18}). Ainda, uma vez que o intuito maior desse trabalho é comparar as duas escalas em uma série de quesitos, quanto maior a semelhança entre os sistemas como um todo, melhor. O diâmetro interno da coluna extratora utilizada na escala convencional foi de 508 µm, mantendo-se o comprimento da coluna em 50 mm.

Portanto, as colunas utilizadas para extração dos analitos em ambas escalas (capilar e convencional) possuem as mesmas características, exceto pelo diâmetro interno. Essa característica favorece a compatibilidade com o diâmetro interno da coluna analítica, além de apresentar uma menor pressão de retorno, o que pode ser positivo para a durabilidade da coluna.

A exemplo do que foi realizado para avaliar a capacidade retentiva do analito menos retido dentre os hormônios (estriol), fez-se necessária a avaliação para o analito menos retido dentre os parabenos (metilparabeno).

Assim sendo, a coluna extratora selecionada para o desenvolvimento do método em escala convencional (preenchida com fase Luna C_{18} e com diâmetro interno de 508µm) foi avaliada antes de ser acoplada à coluna analítica. Os resultados obtidos nesse estudo são mostrados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5- Eluição do metilparabeno em coluna extratora Luna C_{18} de 508 µm de diâmetro interno.

Tempo de início da eluição da banda do metilparabeno com o solvente de carregamento (% MeOH) em água			
Coluna extratora	**Vazão**	**0 % MeOH**	**2,5 % MeOH**
C_{18} LUNA (50mm x 508µm; 10 µm, 100Å)	0,400 mLmin^{-1}	> 1,5 min	> 0,5 min
	0,300 mLmin^{-1}	> 2,5 min	> 0,5 min
	0,200 mLmin^{-1}	> 3,5 min	> 1 min

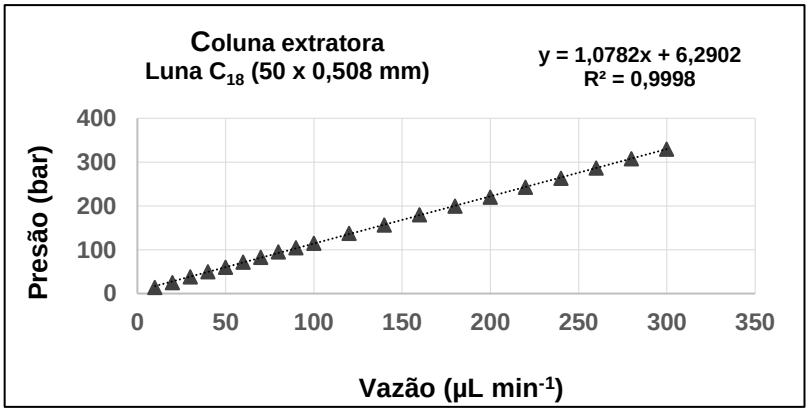
Autoria própria

Em fase móvel contendo 100 % água, em vazão de 0,200 mL min^{-1}, a banda do metilparabeno começa a eluir após 3,5 minutos na coluna contendo fase Luna C_{18}; isto significa que se estas condições de carregamento forem selecionadas, o tempo de carregamento (extração) não deve ser maior que 3,5 minutos, pois a partir deste tempo inicia-se a perda do analito. As injeções foram feitas em duplicata, sendo relatada a média dos resultados; além disso, brancos de água purificada foram injetados entre as duplicatas, sem nenhum efeito de memória (carry-over) observado.

3.2.2 Investigação quanto à natureza do fluxo gerado na coluna extratora durante a etapa de carregamento da coluna Luna C_{18} (508 µm i.d.)

A fim de estimar a natureza do fluxo gerado durante a etapa de carregamento da amostra para a coluna de extração, registrou-se o comportamento da contrapressão (backpressure) versus o aumento da vazão da fase móvel usada no experimento (água).

Figura 3.1- Gráfico da pressão em função da vazão de água em coluna extratora Luna C_{18} de 508 µm de diâmetro interno.



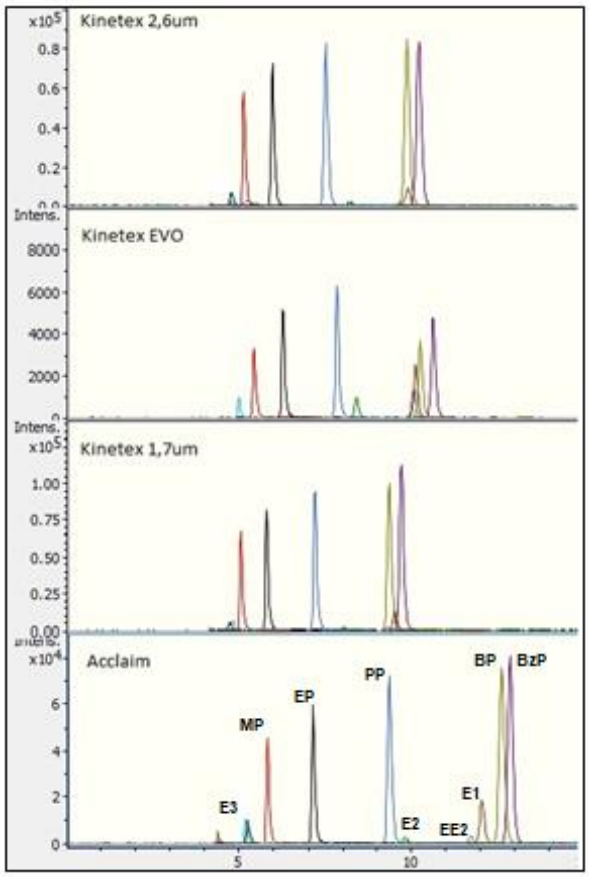
Autoria própria

O gráfico de pressão versus vazão plotado (Figura 3.1) demonstra que, para a coluna avaliada, as vazões empregadas geram incrementos lineares na pressão, caracterizando assim um fluxo de natureza laminar. Desvios da linearidade, após determinada vazão, caracterizariam a transição para um fluxo turbulento.[1]

3.2.3 Avaliação do perfil cromatográfico em escala convencional - column switching entre coluna Luna C_{18} (diâmetro 508 µm) e diversas colunas comerciais – MicrOToF-QII

Para investigar o desempenho de cada uma das 4 colunas analíticas comerciais descritas anteriormente (Item 2.1.4.1, Tabela 3.2) quando acopladas à coluna extratora Luna C_{18}, injetou-se 500 µL de solução padrão da mistura dos hormônios e parabenos em água purificada. A concentração da solução foi a mesma para as 4 colunas avaliadas, assim como as demais condições de análise (método cromatográfico e parâmetros instrumentais).

Figura 3.2- Cromatogramas ilustrando o perfil cromatográfico em CS-UHPLC-ESI-QToF, obtido para as colunas disponíveis.



Autoria própria

Observando os cromatogramas, é possível notar que a ordem de eluição dos analitos é a mesma em cada uma das colunas, e que o perfil cromatográfico exibido pela coluna Acclaim é o mais adequado, pois essa coluna promoveu a melhor separação cromatográfica, principalmente para os compostos mais retidos.

Assim sendo, a coluna Acclaim foi escolhida devido ao perfil apresentado, além de apresentar a menor pressão de retorno nas condições avaliadas.

3.2.4 Desenvolvimento do método - column switching entre coluna extratora Luna C_{18} (diâmetro 508 µm) e coluna Acclaim (CS-UHPLC-ESI-QToF)

Após o estudo dos perfis cromatográficos obtidos para column switching em cada uma das colunas comerciais disponíveis (item 3.2.3 desse Capítulo) acopladas à coluna extratora Luna, optou-se por utilizar a coluna Acclaim C_{18} no desenvolvimento do método em escala convencional. A partir do perfil obtido nas condições cromatográficas aplicadas, várias modificações foram testadas no intuito de promover ganhos em sensibilidade, resolução e tempo na análise dos hormônios e parabenos selecionados. A síntese das principais variáveis investigadas, bem como as observações dessa avaliação, encontra-se brevemente descrita na Tabela 3.6.

Tabela 3.6- Síntese das principais variáveis investigadas no desenvolvimento do método column switching em escala convencional (CS-UHPLC-ESI-QToF).

Variável	Condição	Variações	Observações
Composição da fase móvel (*)	Fase ternária composta de água, metanol e acetato de etila	Diferentes proporções de acetato de etila (20,10 e 5 % em metanol)	Pouca influência na separação cromatográfica.
	Fase ternária composta de água, acetonitrila e acetato de etila	Diferentes proporções de acetato de etila (20,10 e 5 % em acetonitrila)	
	Fase binária composta de água e metanol	Mesmo gradiente utilizado para fase ternária	Perfil cromatográfico semelhante ao obtido com fase ternária.
	Fase binária composta de água e acetonitrila	Mesmo gradiente utilizado para fase ternária	
	Fase binária composta de água e acetonitrila	Mesmo gradiente utilizado para fase ternária	A presença de acetato de etila não afetou a ionização dos analitos na fonte.
Vazão da fase móvel (*) (+)	Fase ternária composta de água, acetonitrila e acetato de etila	Testados 150, 200 e 250 μL min^{-1}	200 μL min^{-1} mostrou melhores resultados referentes ao perfil cromatográfico e transferência dos analitos da 1ª para a 2ª dimensão.
	Fase binária composta de água e acetonitrila	Testados 150, 200 e 250 μL min^{-1}	
Tempo (*) (+)	Tempo em que ocorre o carregamento dos analitos do injetor para a coluna extratora	Testados 2,5 min, 3,0 min, 3,5 min, 4,0 min, 4,5 min e 5 min	O tempo de carregamento está intrinsicamente ligado à vazão de carregamento, sendo importante verificar possíveis perdas dos analitos menos retidos caso alguma dessas condições seja alterada. Havendo a possibilidade, o uso de um detector auxiliar que faça o monitoramento do efluente da coluna extratora durante o período de carregamento auxilia nessa observação. Esse artifício foi utilizado nesse estudo, onde o detector DAD possibilitou o monitoramento em tempo real de possíveis perdas na coluna de extração.
Vazão (*) (+)	Vazão de fase móvel durante o carregamento dos analitos do injetor para a coluna extratora	Testados 200 e 150 μL min^{-1} (fase móvel de carregamento 100 % água)	
Temperatura (*) (+)	Temperatura do forno da coluna	Testados 30, 35, 40, 45 e 50 °C	Quanto maior a temperatura, menor a retenção, o que é crítico principalmente para os compostos menos retidos, especialmente durante a etapa de carregamento na coluna extratora. Entretanto, maiores temperaturas geram pressões de retorno menores.
Modificador de pH (*)	Infusão de solução aquosa de hidróxido de amônia (pós-coluna analítica)	Avaliada a resposta na ionização dos analitos em presença e ausência de solução aquosa de hidróxido de amônia (10 % v/v).	Em presença de hidróxido de amônia foi observada uma melhora sutil (em torno de 20 % em área) do sinal analítico para os hormônios. Entretanto, para os parabenos, houve diminuição no sinal analítico (aproximadamente 30%). Nota: observou-se que a infusão de NH_4OH provocou, a médio prazo, aumento do ruído (provavelmente devido ao depósito de impurezas na fonte (reagente grau PA).

(*) Variável estudada em solução padrão em água ultrapura.
(+) Variável estudada em matriz branca (água de rio) adicionada de solução padrão.
Autoria própria

Após avaliação das observações feitas, as condições que propiciaram perfil cromatográfico adequado e maior sensibilidade foram selecionadas. A Tabela 3.7 relaciona as condições de análise otimizadas para column switching entre coluna Luna C_{18} e coluna Acclaim na escala convencional com detecção pelo QToF.

Tabela 3.7- Condições de análise otimizadas para column switching entre coluna Luna C_{18} e coluna Acclaim em CS-UHPLC-ESI-QToF.

	Coluna extratora **Luna C_{18} (50 x 0,508 mm; 10 μm)**	**Coluna analítica** **Acclaim C_{18} (100 x 2,1 mm; 2,6 μm)**
Fase móvel	H_2O/ACN	H_2O/ACN
Vazão da fase móvel	200 μL min^{-1}	200 μL min^{-1}
Gradiente de eluição da fase móvel	início – 100 % H_2O	início – 35 % ACN
	9,5 min – 100 % H_2O	3,5 min – 35 % ACN
	9,501 min – 90 % ACN	15,5 min – 45 % ACN
	22 min– 90 % ACN	15,501 min – 90 % ACN
	22,001 min – 100 % H_2O	22 min – 90 % ACN
	25 min – 100 % H_2O	22,001 min – 35 % ACN
	25 min – fim	25 min – fim
Temperatura do forno	40°C	40°C
Eventos de column switching	Início: V_6 (1_2) e V_{10} (1_2)	
	3,5min: V_6 (1_2) e V_{10} (10_1)	
	9,5min: V_6 (6_1) e V_{10} (1_2)	
	22min: V_6 (1_2) e V_{10} (1_2)	

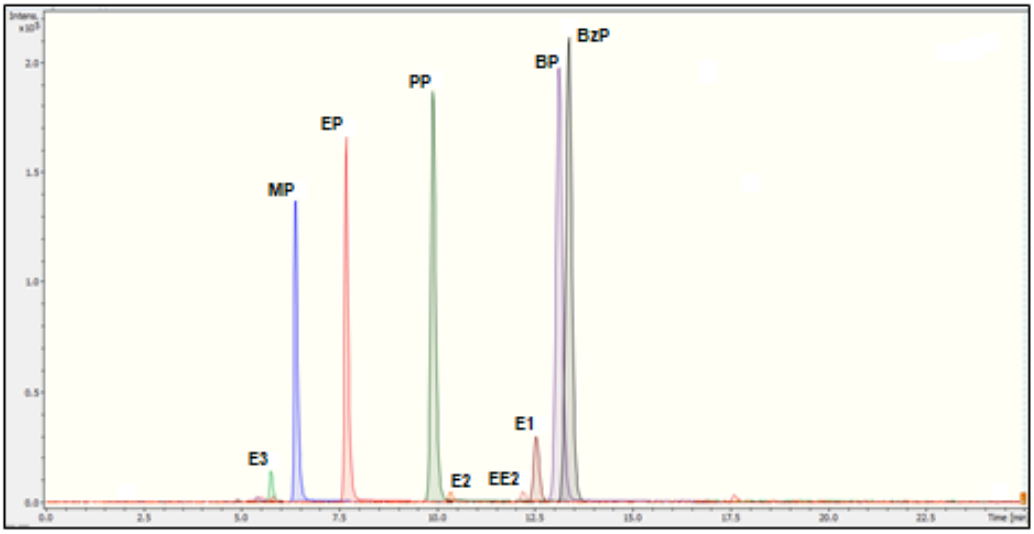
Autoria própria

Observando os cromatogramas, é possível notar que a ordem de eluição dos analitos é a mesma em cada uma das colunas e que o perfil cromatográfico é bastante semelhante.

A coluna Acclaim foi escolhida devido ao perfil apresentado, além de apresentar a menor contrapressão, sob as condições avaliadas.

A Figura 3.3 ilustra o perfil cromatográfico obtido com a otimização das condições de análise para os parabenos e hormônios estudados.

Figura 3.3- Cromatograma típico da separação cromatográfica dos 4 hormônios e 5 parabenos em CS-UHPLC-ESI-QToF nas condições anteriormente descritas (Tabela 3.7).



Autoria própria.

3.2.4.1 Avaliação qualitativa dos efeitos de matriz apresentados por diversas matrizes aquosas

Diversas matrizes aquosas de diferentes complexidades foram injetadas no arranjo column switching em escala convencional, nas condições de análise definidas anteriormente. Concomitantemente, uma infusão em “T” do padrão analítico (mistura dos hormônios e parabenos em concentração 1 μg mL^{-1} em água ultrapura) foi realizada. Assim, tanto o efluente proveniente do sistema cromatográfico quanto a solução padrão chegam à fonte do espectrômetro de massas ao mesmo tempo, sofrendo ionização.

Uma vez que a infusão do padrão é constante (vazão, concentração e proporção da mistura de analitos), as alterações no perfil de ionização são geradas unicamente pela composição do efluente proveniente da coluna cromatográfica. O efluente, por sua vez, é resultado da dessorção dos componentes (interferentes) da matriz eluídos pelo gradiente da fase móvel analítica ao longo do leito cromatográfico. Alterações no perfil de ionização são percebidos observando-se a linha de base no cromatogramas adquiridos.

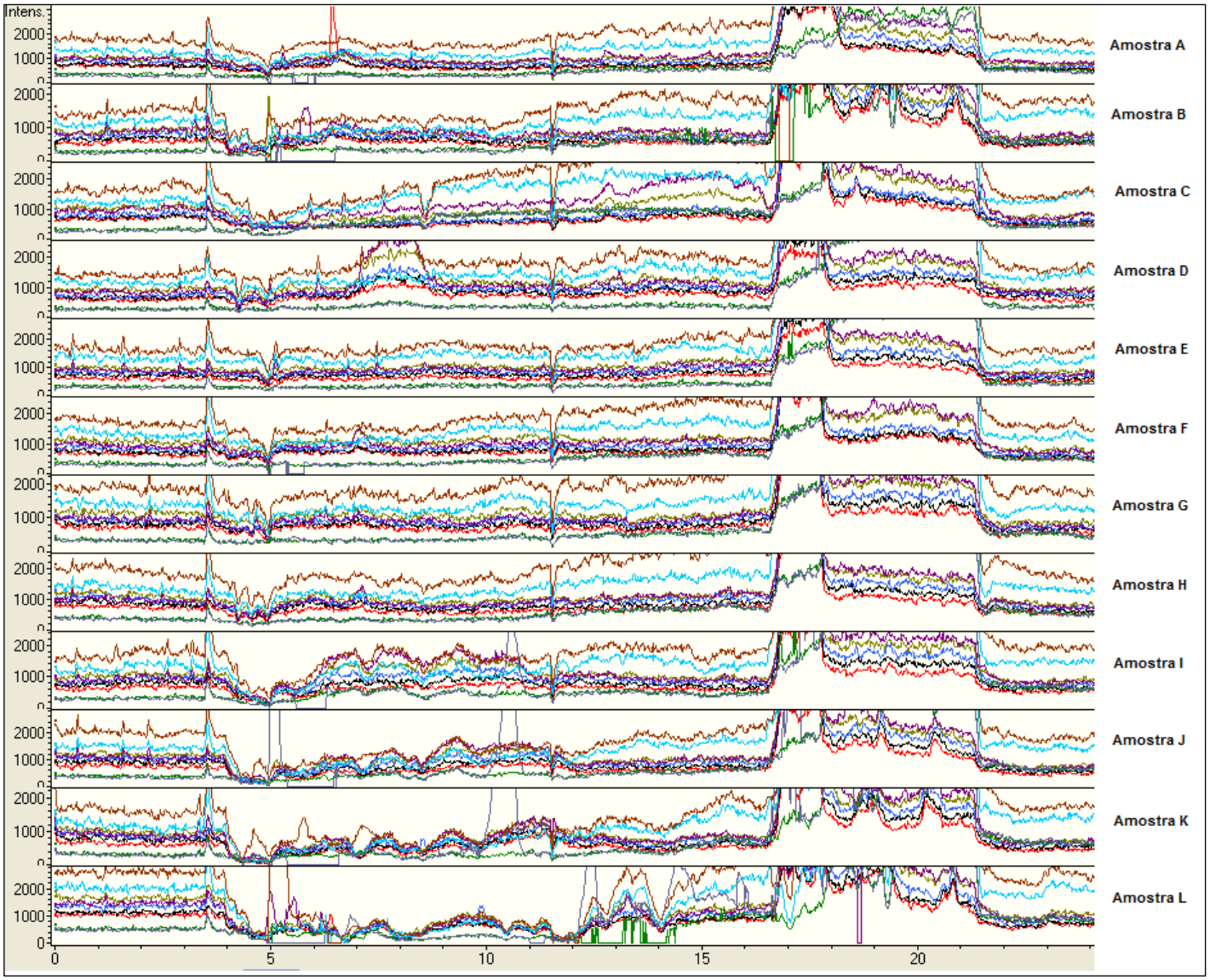
Os efeitos de supressão ou de incremento na ionização causado pela matriz (efluente proveniente da coluna analítica) para cada analito podem ser visualmente observados nos cromatogramas adquiridos. Especial atenção deve ser dada à região

do cromatograma referente ao tempo de retenção de cada analito. Assim, uma alteração (depressão/ queda) na linha de base reflete uma ionização menos eficiente (supressão); da mesma forma, um aumento (elevação) da linha de base é resultado de uma ionização mais efetiva. Ambas situações são indesejadas e devem ser evitadas ao máximo, pois podem conduzir a resultados errôneos (falsos negativos, sub ou superestimação quantitativa). Essa é uma forte razão para justificar todo o esforço científico empregado na busca de maior eficiência e sem comprometimento da frequência analítica do preparo de amostras.

Na Figura 3.4 podem ser observados cromatogramas de diversas matrizes aquosas, submetidas às mesmas condições analíticas, e os efeitos causados na ionização devido às diferenças existentes na composição dessas matrizes.

Analisando os cromatogramas da figura é possível identificar regiões onde o perfil da linha de base é bastante estável e semelhante para todas as matrizes aquosas estudadas.

Figura 3.4- Cromatogramas de diversas matrizes aquosas[a] para visualização dos efeitos de matriz causados por cada uma.



[a]Amostras descritas no item 2.1.6.

Autoria própria

As regiões de estabilidade do perfil da linha de base referem-se a:

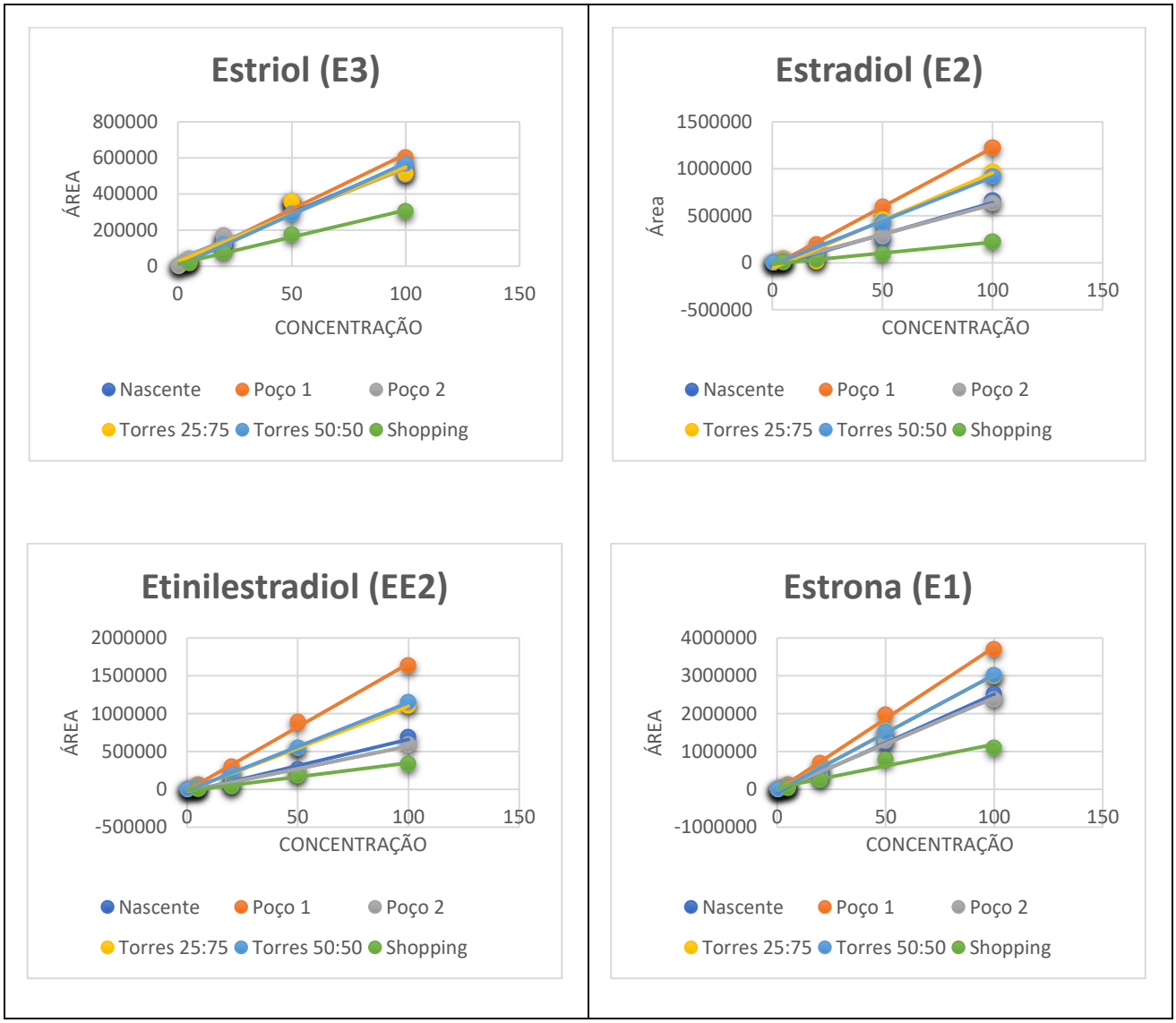
- 0 a 4 minutos: composição constante de fase móvel (efluente da coluna analítica) e de padrão infundido atingindo a fonte de ionização,
- aproximadamente aos 4 minutos também aos 17 minutos: deflexão ocasionada pelo giro da válvula,
- de 17 a 21 minutos: aumento significativo na proporção de solvente orgânico na fase móvel (90% de acetonitrila),
- de 21 a 25 minutos: condicionamento da coluna analítica (mesma composição da fase móvel do início da corrida cromatográfica).

Também é possível identificar a região onde os efeitos supressores ou amplificadores da ionização são mais percebidos. As diferenças relativas à composição das diversas matrizes ficam evidentes na região do cromatograma entre 4 e 17 minutos; é nesse intervalo de tempo que ocorre a transferência do que ficou retido na coluna extratora (nesse caso, os interferentes da matriz) pelo gradiente de fase móvel aplicado. Portanto, é nesse período que chegam à fonte de ionização os compostos responsáveis pela perturbação na ionização dos analitos, causando supressão ou aumento de sensibilidade.

Comparando os cromatogramas apresentados na Figura 3.4, pode-se destacar, por exemplo, a constância nas linhas de base obtidas para as matrizes Poço 3 (E) e córrego Tijuco Preto (F), indicando que praticamente não há efeito desestabilizador na ionização. Em contrapartida, as matrizes de esgoto simulado e suas diluições (esgoto simulado - K, esgoto simulado 50:50 – J- e esgoto simulado 25:75 - I) e Monjolinho (córrego próximo ao Shopping Iguatemi) – L, apresentaram linhas de base bastante inconstantes, resultado de efeitos supressores da ionização. É possível inferir que as matrizes Poço 3 (E) e córrego Tijuco Preto (F), possuem uma composição menos complexa que as matrizes que geraram maiores perturbações na ionização. Outra possibilidade é que as matrizes com menores efeitos tenham interferentes com caráter hidrofílico mais acentuado que as demais; nesse caso, os interferentes não retidos na fase C_{18} são descartados na etapa de carregamento da amostra na coluna extratora (clean-up).

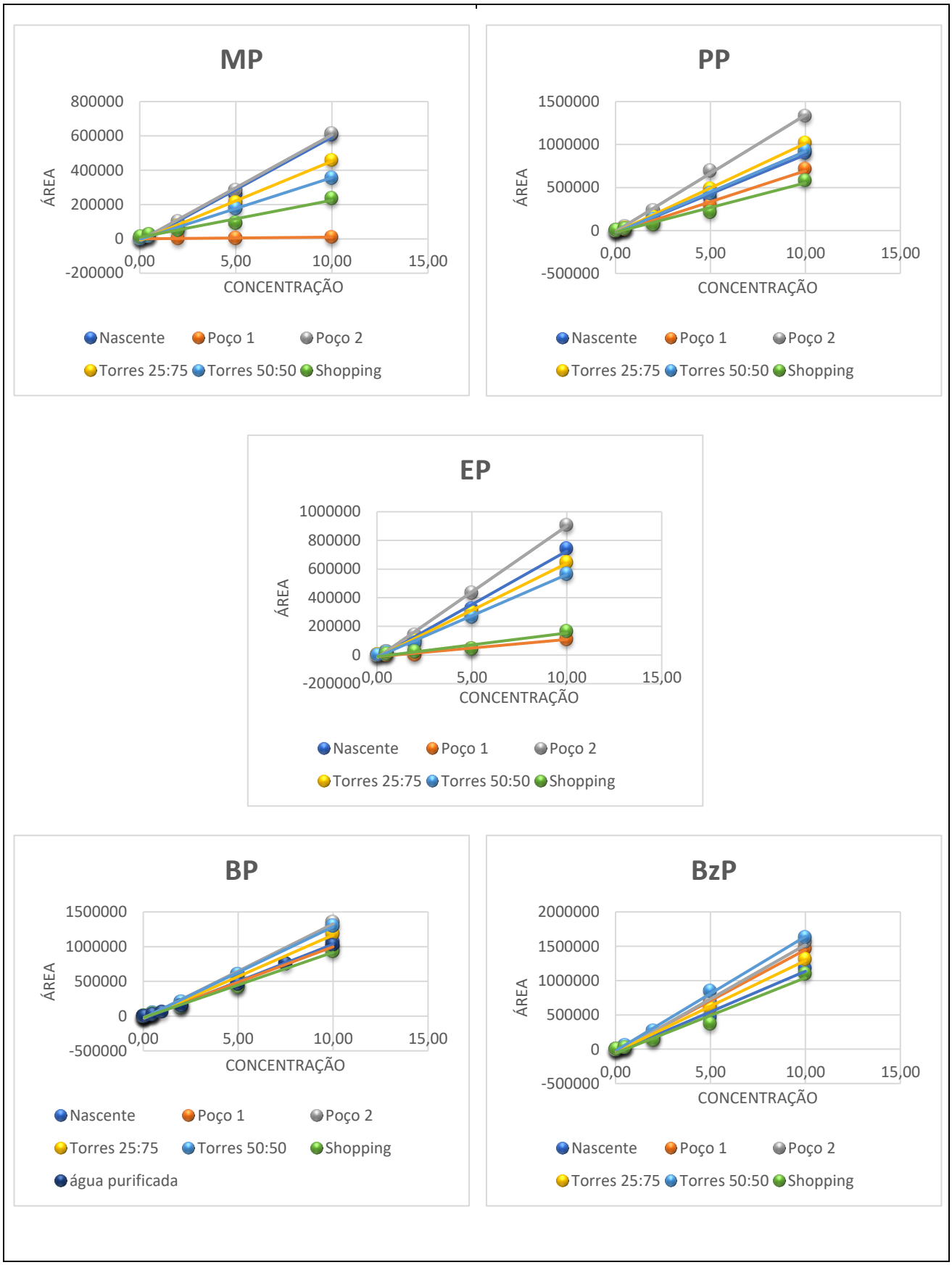
Adicionalmente, a fim de estudar a influência da complexidade da matriz na resposta do sistema analítico para os diversos analitos, curvas analíticas em amostras aquosas de diferentes fontes e complexidades foram construídas e visualmente comparadas.

Figura 3.5- Curvas analíticas para hormônios em diferentes matrizes construídas para comparação da sensibilidade dos analitos em cada matriz.



Autoria própria

Figura 3. 6 -Curvas analíticas para parabenos em diferentes matrizes construídas para comparação da sensibilidade dos analitos em cada matriz.



Autoria própria.

A avaliação visual e comparativa dessas curvas (Figura 3.5 para hormônios e Figura 3.6 para parabenos) foi indicativa da sensibilidade do sistema analítico para cada um dos analitos. Percebe-se claramente que cada analito responde diferentemente ante as diversas matrizes avaliadas, apresentando sensibilidades diferentes.

3.2.4.2 Avaliação prévia da linearidade da faixa de trabalho, exatidão e precisão em água ultrapura

A Tabela 3.8 mostra as concentrações para os pontos da faixa de trabalho usada para a avaliação prévia da linearidade, exatidão e precisão do método desenvolvido.

Tabela 3.8– Concentrações da linearidade da faixa de trabalho.

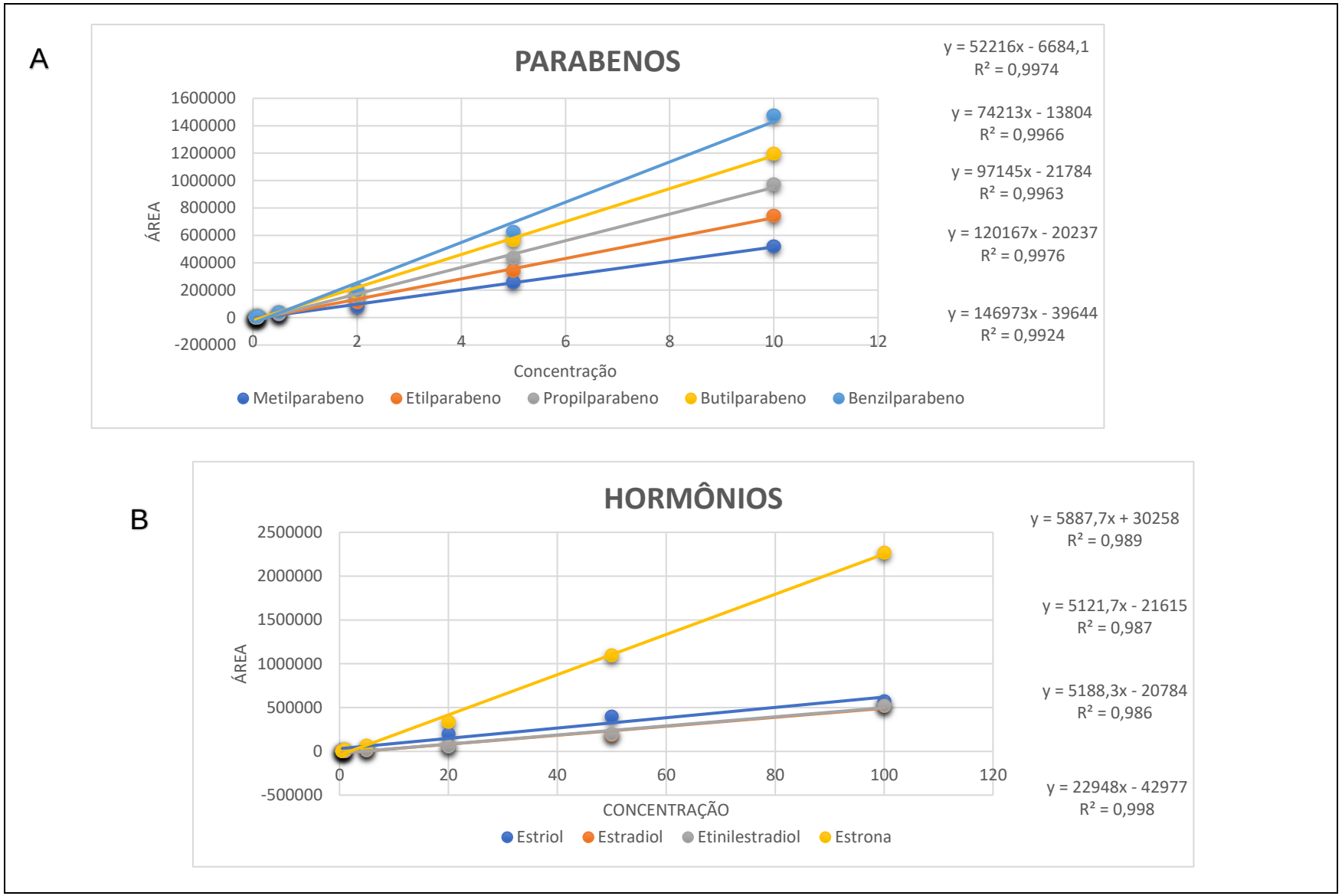
Ponto da curva	Concentração do padrão de hormônios em água ultrapura (ng mL^{-1})	Concentração do padrão de parabenos em água ultrapura (ng mL^{-1})
P1	0,5	0,05
P2	1	0,1
P3	5	0,5
P4	20	2
P5	50	5
P6	100	10

Autoria própria

Cada nível de concentração (P1 a P6) foi avaliado em triplicata. Para a verificação da existência de efeito de memória no sistema analítico, amostras de branco (água ultrapura sem adição de padrão) foram injetadas aleatoriamente no intervalo da curva, não tendo sido observado carry over nesse intervalo de concentrações.

As curvas analíticas apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração estudadas para as duas classes de compostos, como pode ser observado na Figura 3.7.

Figura 3.7 - Curvas analíticas obtidas por column switching para A) parabenos em água ultrapura e B) hormônios em água ultrapura.



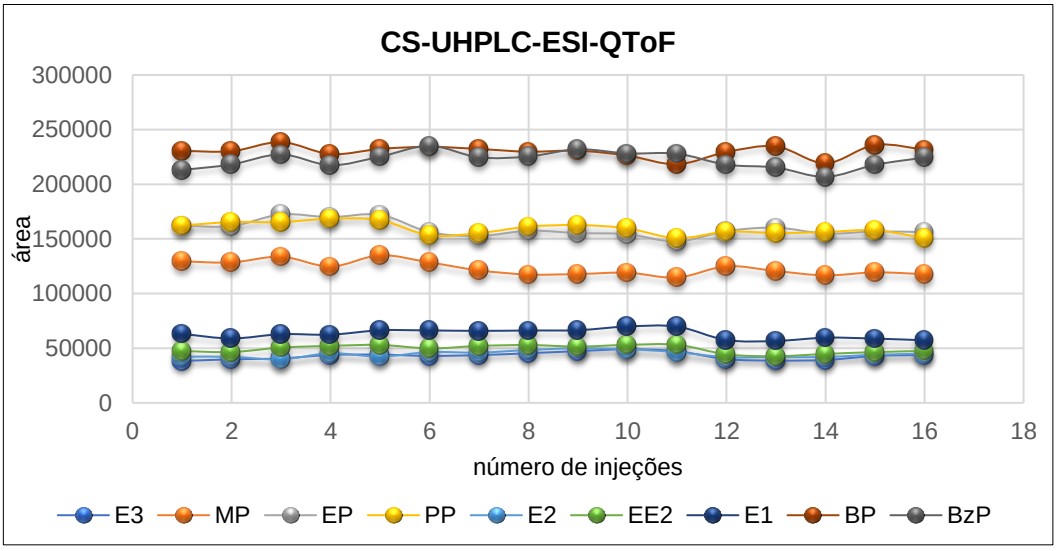
Autoria Própria

Os pontos P1, P3 e P6 foram utilizados para a checagem da precisão inter e intra-dias, além da exatidão do método desenvolvido. Entretanto, apesar da linearidade da faixa de trabalho estar adequada, os resultados obtidos para a precisão inter-dias geraram valores de DPR bastante elevados, em torno de 25 %.

Para avaliar a repetibilidade do sinal analítico obtido por CS-UHPLC-ESI-QToF, uma série de injeções da mesma solução padrão da mistura dos analitos em água ultrapura foi realizada.

Inicialmente, as injeções foram realizadas sequencialmente, em um mesmo dia. A Figura 3.8 mostra o gráfico gerado com a plotagem da área de cada analito obtida a cada injeção, com o total de dezesseis injeções realizadas em um intervalo de aproximadamente 10 horas consecutivas. Injeções do branco foram realizadas após a segunda e a oitava injeção de padrão, a fim de descartar efeito de memória.

Figura 3.8- Gráfico das áreas obtidas para cada analito, a cada injeção (500 μL), dentro do intervalo de 10 horas consecutivas.



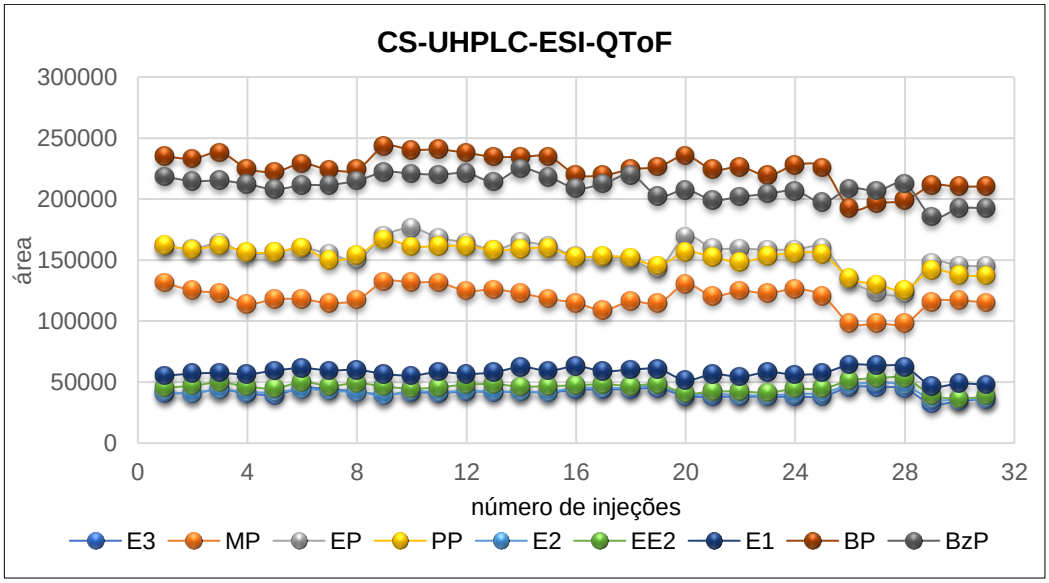
Concentrações de cada analito na solução padrão: E3: 10 ng mL^{-1}; MP: 0,30 ng mL^{-1}; EP: 0,25 ng mL^{-1}; PP: 0,20 ng mL^{-1}; E2: 5 ng mL^{-1}; EE2: 2,5 ng mL^{-1}; E1: 1,25 ng mL^{-1}; BP: 0,18 ng mL^{-1}; BzP: 0,18 ng mL^{-1}.
Autoria própria.

Observando o gráfico, é possível verificar a repetibilidade do sinal analítico no intervalo de tempo estudado. De fato, o desvio padrão relativo calculado para todas as réplicas variou de 2,34 % (BP) a 7,63 % (E3).

Em um segundo momento, o estudo para avaliar a precisão do sinal analítico foi repetido. As condições de análise foram mantidas, assim como as concentrações

dos analitos na solução padrão. Porém, nesse momento, os intervalos entre duas injeções de padrão foram aumentados consideravelmente; na sequência de cada injeção de padrão, 3 injeções de branco (água ultrapura) eram realizadas, totalizando 3 dias consecutivos de análise (mais precisamente 74 horas de análise nas mesmas condições). Assim, as áreas referentes a trinta e uma injeções do padrão de hormônios e parabenos foram plotadas, e o gráfico obtido pode ser observado na Figura 3.9

Figura 3. 9- Gráfico das áreas obtidas para cada analito, a cada injeção (500 μL), dentro do intervalo de 74 horas consecutivas.

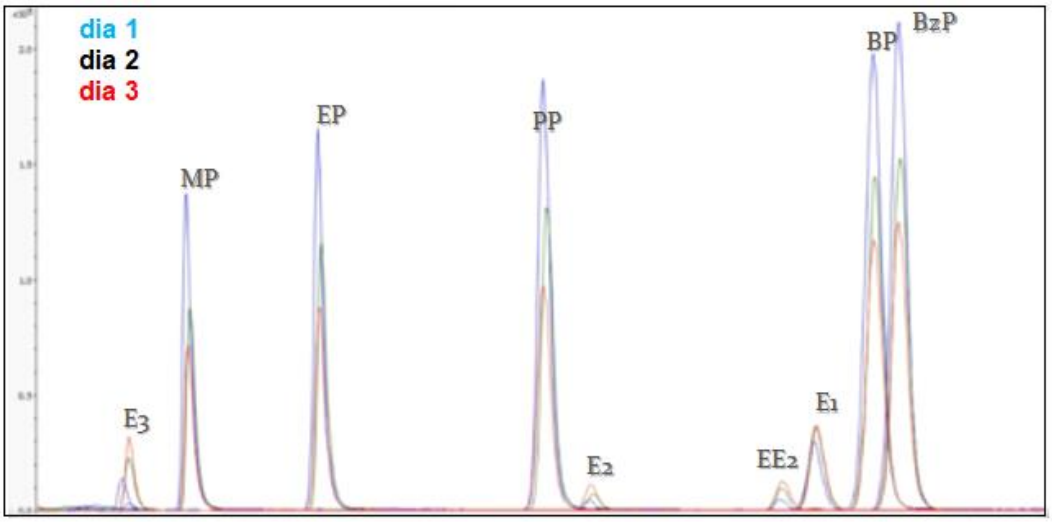


Concentrações de cada analito na solução padrão: E3: 10 ng mL^{-1}; MP: 0,30 ng mL^{-1}; EP: 0,25 ng mL^{-1}; PP: 0,20 ng mL^{-1}; E2: 5 ng mL^{-1}; EE2: 2,5 ng mL^{-1}; E1: 1,25 ng mL^{-1}; BP: 0,18 ng mL^{-1}; BzP: 0,18 ng mL^{-1}.
Autoria própria.

Diferente do que fora observado para as injeções realizadas em um mesmo dia, observa-se uma oscilação considerável na repetibilidade do sinal analítico no intervalo de 3 dias. Os parabenos mostraram variações significativas ao longo do período, indicando tendências de diminuição das áreas ao longo do tempo; já as áreas dos hormônios mostraram-se mais estáveis, e com leve tendência a aumentar.

As tendências de diminuição e aumento das áreas para parabenos e hormônios, respectivamente, podem ser melhor visualizadas quando 3 cromatogramas, obtidos em dias diferentes, são sobrepostos (Figura 3.10).

Figura 3.10- Sobreposição de cromatogramas obtidos nas mesmas condições, em 3 dias distintos, ilustrando a baixa precisão inter-dias do método desenvolvido.



Concentrações de cada analito na solução padrão: E3: 10 ng mL^{-1}; MP: 0,30 ng mL^{-1}; EP: 0,25 ng mL^{-1}; PP: 0,20 ng mL^{-1}; E2: 5 ng mL^{-1}; EE2: 2,5 ng mL^{-1}; E1: 1,25 ng mL^{-1}; BP: 0,18 ng mL^{-1}; BzP: 0,18 ng mL^{-1}.
Autoria própria.

Ante os resultados demonstrando a baixa repetibilidade do método a médio prazo, várias hipóteses foram apontadas e avaliadas. Assim, foram testados:

- substituição da coluna extratora, para verificar perda da capacidade retentiva;
- substituição da coluna analítica;
- limpeza da fonte de ionização;
- variação de alguns parâmetros instrumentais (QToF);
- revisão do sistema injetor;
- verificação da vazão das bombas cromatográficas;
- verificação da precisão em uma só dimensão (somente coluna analítica).

Apesar de todas as tentativas feitas buscando a origem da precisão inadequada, mesmo contando com a reconhecida vivência técnica em cromatografia e espectrometria de massas de vários membros do Grupo, não foi possível sanar o problema. Nem mesmo a manutenção e limpeza realizadas pelo técnico da Bruker foram eficazes nesse sentido.

Numa última tentativa de encontrar a origem do problema, e buscar resolvê-lo, optou-se por realizar a verificação da precisão em escala capilar.

3.3 Escala capilar

Para avaliar a precisão em escala capilar (CS-cLC-ESI-QToF) foi necessário adaptar o método anteriormente desenvolvido (Capítulo 2).

Uma das justificativas para essa adaptação foi a possibilidade de substituição da coluna analítica Zorbax C_{18} pela coluna BetaBasic$_{18}$; durante o desenvolvimento do método em escala convencional, a coluna capilar Zorbax foi direcionada para uso em outro projeto do grupo. Além disso, foi disponibilizada uma coluna que ainda não havia sido usada para hormônios e parabenos (BetaBasic$_{18}$), e quando testada mostrou-se adequada.

Adicionalmente, a inclusão da determinação de parabenos (além dos hormônios) está condicionada a realização de novos estudos e adaptações ao método já desenvolvido.

3.3.1 Estudo da capacidade retentiva da coluna Luna C_{18} (254 µm i.d.) para parabenos (UV/VIS)

Conforme apresentado e discutido no Capítulo 2, dentre as colunas de SPE avaliadas, a que se mostrou mais adequada para a análise dos hormônios estudados foi a coluna preenchida com a fase Luna C_{18} (50 x 0,254 mm, 10µm). Entretanto, a exemplo do que foi realizado para a escala convencional, houve a necessidade de avaliar a capacidade retentiva dessa coluna extratora para parabenos.

Assim, o procedimento descrito no Capítulo 2, item 2.2.5.1 foi empregado, utilizando o analito menos retido dentre os parabenos (metilparabeno). Os resultados desse estudo são apresentados na Tabela 3.9.

Tabela 3.9- Eluição do metilparabeno em coluna extratora Luna C_{18} de 254 µm de diâmetro interno.

Tempo de início da eluição da banda do metilparabeno com o solvente de carregamento (% MeOH) em água			
Coluna extratora	**Vazão**	**0 % MeOH**	**2,5 % MeOH**
C_{18} LUNA (50mm x 254µm; 10 µm, 100Å)	0,400 mLmin^{-1}	> 1,5 min	> 0,5 min
	0,300 mLmin^{-1}	> 3,0 min	> 0,5 min
	0,200 mLmin^{-1}	> 3,5 min	> 1 min

Autoria própria

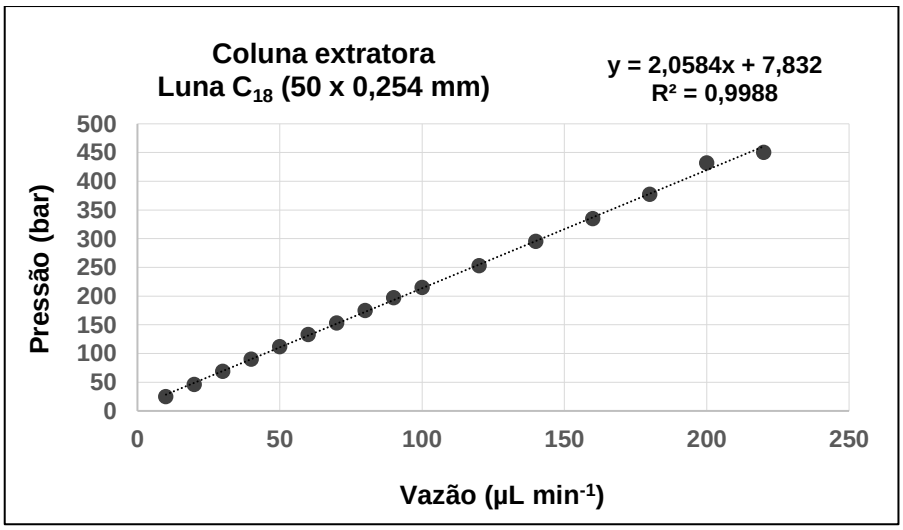
Pode-se observar que em fase móvel contendo 100 % água, em vazão de 0,200 mL min^{-1}, a banda do metilparabeno começa a eluir após 3,5 minutos na coluna Luna C_{18}; isto significa que se estas condições de carregamento forem selecionadas, o tempo de carregamento (extração) não deve ser maior que 3,5 minutos, pois a partir daí há risco de perda do analito. As injeções foram feitas em duplicata, sendo relatada a média dos resultados; além disso, brancos de água ultrapura foram injetados entre as duplicatas, e nenhum efeito de memória (carry over) foi observado.

Portanto, após avaliação do desempenho retentivo dessa coluna para os parabenos incluídos nessa etapa do trabalho, o desenvolvimento do método para análise de hormônios e parabenos em águas na escala miniaturizada foi realizado com coluna extratora Luna C_{18} (50 x 0,254 mm, 10µm).

3.3.2 Investigação a respeito da presença ou ausência de fluxo turbulento durante a etapa de carregamento da coluna Luna C_{18} (254 µm i.d.)

Da mesma forma que havia sido realizado para a coluna de extração com diâmetro interno de 508 µm, investigou-se a natureza do fluxo gerado durante a etapa de carregamento da amostra para a coluna com diâmetro interno de 254 µm.

Figura 3.11– Gráfico da pressão em função da vazão de água em coluna extratora Luna C_{18} de 254 µm de diâmetro interno.



Autoria própria

Conforme apresentado na Figura 3.10, o observado, mais uma vez, foi a resposta linear e crescente da pressão com aumento da vazão.

3.3.3 Avaliação do perfil cromatográfico – column switching entre coluna Luna C_{18} (diâmetro 254 µm) e coluna BetaBasic$_{18}$

Ainda no Capítulo 2, foram discutidos e apresentados os resultados das avaliações realizadas para as colunas capilares comerciais disponíveis. Entretanto, a disponibilização para uso de uma coluna capilar comercial ainda não testada para os analitos de interesse desse estudo motivou seu uso.

O acoplamento entre as colunas foi realizado aplicando-se os conhecimentos adquiridos ao longo do desenvolvimento de todo o projeto, de maneira objetiva e direta.

As condições cromatográficas resultantes da otimização do método em escala capilar estão dispostos na Tabela 3.10.

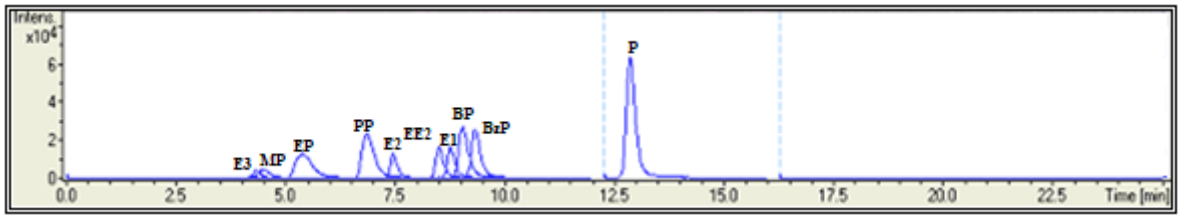
Tabela 3.10 - Condições cromatográficas resultantes da otimização do método CS-cLC-ESI-QToF

	Coluna extratora **Luna C_{18} (50 x 0,254mm; 10 µm)**	**Coluna analítica** **BetaBasic$_{18}$ (100 x 0,32 mm, 5µm)**
Fase móvel	H_2O/ACN	H_2O/ACN
Vazão da fase móvel	200 µL min^{-1}	12 µL min^{-1}
Gradiente de eluição da fase móvel	início – 100 % H_2O	início – 25 % ACN
	9,0 min – 100 % H_2O	2,5 min – 25 % ACN
	9,001 min – 90 % ACN	14, 5min – 40 % ACN
	22 min– 90 % ACN	15,5 min – 90 % ACN
	22,001 min – 100 % H_2O	21 min – 90 % ACN
	25 min – 100 % H_2O	21,001 min – 25 % ACN
	25 min – fim	25 min – fim
Temperatura do forno	40°C	40°C
Eventos de column switching	Início: V_6 (1_2) e V_{10} (1_2)	
	2,5min: V_6 (1_2) e V_{10} (10_1)	
	6,5min: V_6 (6_1) e V_{10} (1_2)	
	20min: V_6 (1_2) e V_{10} (1_2)	

Autoria própria

O perfil cromatográfico resultante da otimização das condições de análise e detecção está exemplificado na Figura 3.12.

Figura 3.12- Cromatograma típico da separação cromatográfica dos 5 hormônios e 5 parabenos em CS-cLC-ESI-QToF nas condições anteriormente descritas (Tabela 3.10).

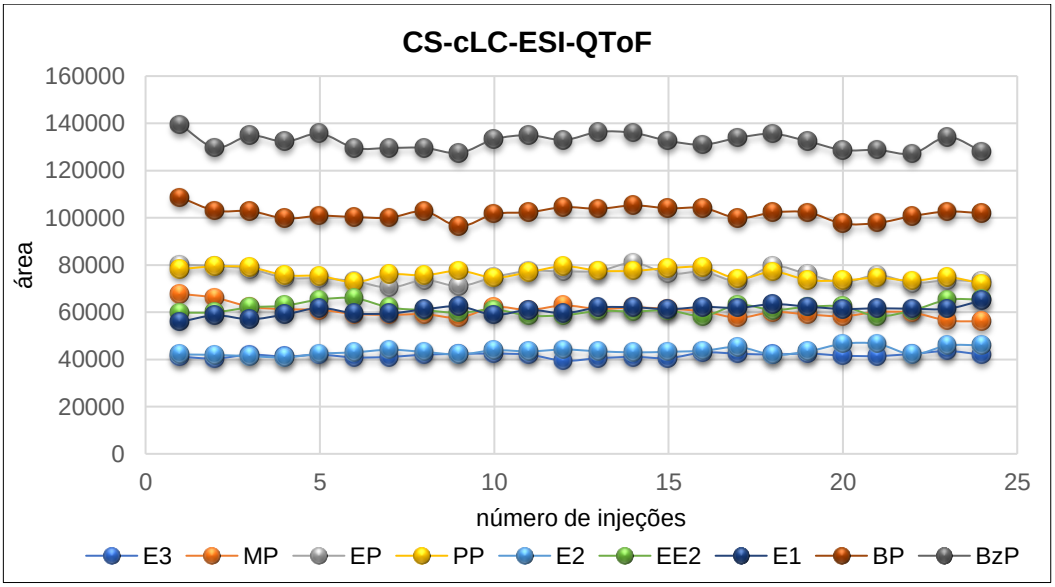


Autoria própria

3.3.4 Avaliação da precisão inter-dias

Com o intuito de verificar se a falta de repetibilidade do sinal analítico a médio prazo acontecia também na escala capilar, o estudo da precisão inter-dias para hormônios e parabenos em CS-cLC-ESI-QToF foi realizado. As condições de análise foram as mesmas durante todo o período, mantidas, assim como as concentrações dos analitos na solução padrão. Nos intervalos entre duas injeções de padrão foram realizadas 3 injeções de branco (água ultrapura), tal qual feito em escala convencional. As áreas referentes a vinte e quatro injeções do padrão de hormônios e parabenos foram plotadas, e o gráfico obtido pode ser visto na Figura 3.13.

Figura 3.13- Gráfico da área obtida para cada analito, a cada injeção (500 μL), dentro do intervalo de 57 horas consecutivas (aproximadamente dois dias e meio).



Concentrações de cada analito na solução padrão: E3: 10 ng mL^{-1}; MP: 0,30 ng mL^{-1}; EP: 0,25 ng mL^{-1}; PP: 0,20 ng mL^{-1}; E2: 5 ng mL^{-1}; EE2: 2,5 ng mL^{-1}; E1: 1,25 ng mL^{-1}; BP: 0,18 ng mL^{-1}; Bz P: 0,18 ng mL^{-1}.
Autoria própria.

Pode-se visualizar claramente uma homogeneidade no sinal analítico para column switching em escala miniaturizada no intervalo de tempo estudado. Os baixos valores obtidos para o desvio padrão relativo calculado reforça essa observação, tendo variado de 2,48 % (BP) a 4,44 % (MP). Portanto, para a escala capilar, o sistema mostrou-se preciso, tanto a curto quanto a médio prazo.

Optou-se por não validar nenhum dos métodos utilizando o QTOF como detector, visto que somente em escala capilar o método apresentou precisão adequada aos propósitos analíticos.

Assim, para que os métodos pudessem ser validados e a avaliação de figuras de mérito pudesse ser realizada em ambas escalas, partiu-se para a hifenação do cromatógrafo UltiMate com o espectrômetro de massas sequencial XEVO TQ MS, da Waters.

4 CONCLUSÕES

Pontos que podem ser destacados nessa etapa do estudo:

- ✓ As colunas extratoras preenchidas com fase Luna C_{18} se mostraram menos retentivas para os parabenos, especialmente para o metilparabeno, em comparação com os hormônios;
- ✓ Fases móveis binárias, composta de água e metanol ou água e acetonitrila proporcionaram seletividade suficiente para a determinação dos analitos quando se utilizou o QToF como detector;
- ✓ A coluna $BetaBasic_{18}$ mostrou-se eficiente para o objetivo do trabalho;
- ✓ As colunas extratoras operaram em fluxo laminar;
- ✓ A coluna Acclaim foi, dentre as investigadas, a que apresentou melhor seletividade especialmente para os analitos mais retidos;
- ✓ Foi observada a instabilidade do sinal analítico em escala convencional, nas condições estudadas, inviabilizando a validação do método;
- ✓ Em escala capilar, o sinal analítico se mostrou estável nas condições estudadas;
- ✓ Foi observado que os efeitos provocados pelas diferentes características de cada uma das amostras aquosas variaram conforme o analito, nas condições investigadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] VINTILOIU, A.; MULLETT, W. M.; PAPP, R.; LUBDA, D.; KWONG, E. Combining restricted access material (RAM) and turbulent flow for the rapid online extraction of the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, n. 2, p. 150–157, 2005.

CAPÍTULO 4

Quantificação de hormônios e parabenos em água: avaliação de figuras de mérito do método cromatográfico em column switching convencional e capilar hifenados à espectrometria de massas sequencial (CS-cLC-ESI-MS/MS) e (CS-UHPLC-ESI-MS/MS)

1 OBJETIVO

Nesta etapa do estudo, o objetivo foi a avaliação de algumas figuras de mérito da validação dos métodos cromatográficos baseados em column switching nas escalas capilar e convencional, ambos aplicados à análise de 4 hormônios e 5 parabenos em água, com detecção por espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Para isso, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

1.1 Objetivos específicos

- realizar a otimização das condições de ionização e fragmentação para os hormônios e parabenos;
- promover a adequação dos métodos cromatográficos baseados em column switching em escala capilar e convencional (desenvolvidos no Capítulo 3) à hifenação ao espectrômetro de massas sequencial;
- avaliar as principais figuras de mérito de validação dos métodos;
- investigar os efeitos de matriz em amostras aquosas de diferentes fontes de diversas procedências da cidade de São Carlos, SP.
- demonstrar a aplicabilidade dos métodos cromatográficos column switching desenvolvidos em amostra aquosa.

2 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Material

2.1.1 Padrões analíticos de hormônios esteroides e parabenos

Os padrões analíticos dos hormônios esteroides e dos parabenos utilizados nesse estudo foram listados nos itens 2.1.1.1 do Capítulo 2 e 2.1.2.2 do Capítulo 3. As estruturas químicas e propriedades físico-químicas mais relevantes dos hormônios foram apresentadas na Tabela 2.1 do Capítulo 2; os parabenos tiveram suas estruturas e propriedades descritas na Tabela 2.1 do Capítulo 3.

2.1.2 Reagentes e solventes

Acetonitrila (ACN) grau HPLC, da Tedia (Fairfield, USA) foi utilizada nessa etapa. A água purificada foi obtida de sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, USA) e membranas hidrofóbicas de 0,2 µm e hidrofílicas de 0,45 µm e 0,2 µm, adquiridas da Millipore, foram utilizadas para a filtração de solventes e amostras.

2.1.3 Colunas extratoras

As colunas extratoras utilizadas nesta etapa foram preparadas no laboratório e descritas no Capítulo 2 (item 2.1.4).

2.1.3.1 Escala capilar

Em escala capilar, o método para análise de hormônios e parabenos em água foi desenvolvido com coluna extratora preenchida com a fase Luna C_{18} (50 x 0,254 mm, 10 µm).

2.1.3.2 Escala convencional

O desenvolvimento do método para análise de hormônios e parabenos em água foi realizado com coluna extratora preenchida com a fase Luna C_{18} (50 x 0,508 mm, 10 µm).

2.1.4 Colunas analíticas comerciais

2.1.4.1 Escala capilar

Para o desenvolvimento do método em escala capilar para a quantificação de hormônios e parabenos em água foi utilizada a coluna analítica comercial BetaBasic$_{18}$ (100 x 0,320 mm, 5 µm; Thermo Scientific, USA), preenchida com fase estacionária C_{18}.

2.1.4.2 Escala convencional

Para o desenvolvimento do método em escala convencional para a quantificação de hormônios e parabenos em água foi utilizada a coluna analítica comercial Acclaim (100 x 2,1 mm, 2,2 µm; Thermo Scientific, USA), preenchida com fase estacionária C_{18}.

2.1.5 Equipamentos, softwares e sistemas

Para as medidas de massa foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo, modelo AG285. As medições de pH foram realizadas em um potenciômetro Qualxtron, modelo 8010.

Para o tratamento e descrição dos dados foi utilizado o pacote Microsoft® Office™ e para tratamento das figuras o CorelDraw™. O software *Chromeleon*™ 7.1 foi usado para aquisição e tratamento dos dados cromatográficos obtidos com detecção por espectrometria na região do ultravioleta (UV); para aquisição e tratamento dos dados cromatográficos obtidos com detecção por espectrometria de massas sequencial foi utilizado o software MassLynx, da Waters.

Além dos equipamentos e sistemas já anteriormente utilizados e descritos no Capítulo 2, foi utilizado o detector da Waters, XEVO TQ MS (espectrômetro de massas sequencial do tipo triplo quadrupolo), com ionização por electrospray negativo (ESI -) e operando no modo MRM (monitoramento de reações múltiplas). Foi utilizada a probe LowFlow para a escala capilar. O cromatógrafo UltiMate foi acoplado ao XEVO TQ MS por meio de uma porta (relay); nesse caso, o controle do processo cromatográfico foi executado pelo software Chromeleon do UltiMate, cabendo ao espectrômetro de massas o monitoramento das transições de *m/z* selecionadas, aquisição e tratamento dos dados gerados, via MassLynx.

Nessa etapa do estudo, um dos cabeçotes da bomba capilar apresentou um dano mecânico que não pode ser reparado sem troca de peças (importadas). Para que todo o estudo realizado até esse momento não fosse perdido, utilizou-se a bomba HPG-RS (UHPLC) em vazão reduzida de 15 µL min^{-1} (capilar). Adicionalmente para o processo de extração e pré-concentração dos analitos na coluna extratora foi utilizada a bomba de carregamento (LP). Por fim, a configuração utilizada para a validação em escala capilar foi a mesma descrita anteriormente para column switching em escala convencional.

2.1.6 Amostras ambientais

A amostra utilizada na validação dos métodos foi água do córrego Gregório, coletada em novembro de 2018 (pós chuva).

Amostras aquosas de diversas fontes e complexidades foram utilizadas nessa etapa do estudo, como segue:

- Amostra a: água do córrego Gregório (em frente à entrada da USP, coletado durante estiagem)
- Amostra b: água do córrego Gregório (em frente à entrada da USP, coletado em período chuvoso)
- Amostra c: água do córrego Gregório (em frente à entrada da USP, coletado durante estiagem)
- Amostra d: água da represa do Broa (coletado durante estiagem)
- Amostra e: água do córrego do Tijuco Preto (coletado durante estiagem)
- Amostra f: água do córrego Santa Maria Madalena
- Amostra g: água do rio Monjolinho (próximo ao Shopping Iguatemi)
- Amostra h: água Santa Maria Madalena (próximo à nascente)
- Amostra i: água de poço (condomínio Eldorado)
- Amostra j: água de torneira

Antes da injeção no sistema cromatográfico, todas as amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm.

2.2 Métodos

2.2.1 Escalas capilar e convencional

Todas as análises realizadas em column switching reportadas neste Capítulo foram realizadas com a injeção de 500 µL de amostra, no modo full loop, independente da escala.

2.2.1.1 Otimização das condições de ionização e fragmentação

A otimização das condições de ionização e fragmentação no modo negativo foi realizada via IntelliStart, ferramenta do espectrômetro de massas XEVO TQ MS. Para tanto, uma mistura dos analitos em concentração 2 µg mL^{-1}, preparada em água/acetonitrila na proporção 1:1 (v/v), foi infundida.

2.2.2 Adequação do método cromatográfico desenvolvido

2.2.2.1 Escala capilar

A adequação do método cromatográfico em escala capilar utilizando column switching (cujo desenvolvimento foi descrito e discutido no capítulo anterior) iniciou com a verificação das condições de análise utilizando a bomba HPG-RS em substituição à bomba NCS. Assim, uma mistura dos analitos de interesse em água ultrapura foi injetada, respeitando-se as condições anteriormente definidas. Verificou-se a precisão na resposta de área e de tempo de retenção de um conjunto de réplicas de 6 injeções, utilizando o detector UV/VIS.

O próximo passo consistiu em acoplar o cromatógrafo UltiMate ao XEVO TQ MS e em seguida, reavaliar as condições cromatográficas que haviam sido consideradas as mais adequadas, tais como vazão e composição de fase móvel e temperatura do forno das colunas.

2.2.2.2 Escala convencional

A adequação do método cromatográfico em escala convencional desenvolvido no capítulo anterior foi realizada após o acoplamento do cromatógrafo UltiMate ao espectrômetro de massas XEVO TQ MS. Foram reavaliadas as condições cromatográficas mais adequadas, tal como realizado para a escala capilar (item 3.2.2.1 desse Capítulo).

2.2.3 Avaliação de figuras de mérito para as escalas capilar e convencional

Há uma variedade de guias de validação disponíveis, tanto nacionais quanto internacionais. No Brasil, destacam-se os guias da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) [1][2]. Internacionalmente, os guias do ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [3] e do FDA (Food and Drug Administration) [4] são os mais reconhecidos.

Esses guias estabelecem os critérios a serem avaliados para que um método analítico desenvolvido seja comprovadamente confiável e aplicável aos fins a que se destina. Via de regra, há uma certa unanimidade entre eles no que diz respeito às figuras de mérito que devem ser avaliadas, divergindo em alguns casos nos critérios de aceitação estabelecidos.

As figuras de mérito avaliadas para os métodos cromatográficos desenvolvidos encontram-se listadas e descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Figuras de mérito avaliadas, procedimento adotado e critério de aceitação.

Parâmetro	Procedimento	Critério de aceitação
Seletividade	Análise em sextuplicata da matriz branca (3 coletas independentes no mesmo ponto de amostragem, data e horário) e 2 injeções de cada amostra.	A presença de interferentes com tempo de retenção igual ao do analito na matriz branca somente é aceita se em concentração menor ou igual a 20 % da concentração do analito no limite de quantificação.
Linearidade	Análise em triplicata da matriz branca adicionada do analito em 6 níveis de concentração, partindo do limite de quantificação. Construção da curva analítica utilizando o método dos mínimos quadrados, com avaliação da homocedasticidade dos dados analíticos.	A linearidade da faixa de trabalho é considerada adequada quando apresentar coeficiente de determinação maior ou igual a 0,98 ($R^2 \geq 0,98$); deve ser avaliada a homocedasticidade e aplicada ponderação, quando pertinente, para obtenção do modelo matemático mais adequado (baseado na somatória dos resíduos relativos).
Limite de detecção (LD)	Análise em triplicata da matriz branca adicionada do analito na menor concentração detectável com precisão adequada.	A concentração do analito na matriz deve gerar uma resposta de, no mínimo, 3 vezes a resposta do ruído observado (relação sinal/ruído $\geq$ 3).
Limite de quantificação (LQ)	Análise em triplicata da matriz branca adicionada do analito na menor concentração quantificável com precisão adequada.	A concentração do analito na matriz deve gerar uma resposta de, no mínimo, 10 vezes a resposta do ruído observado (relação sinal/ruído $\geq$ 10) e com a devida precisão, conforme indicado a seguir nessa tabela.
Exatidão	Análise em triplicata da matriz branca adicionada do analito em 3 níveis de concentração ao longo da faixa linear de trabalho (nível baixo, médio e alto).	Desvios de até 20 % entre a concentração calculada e a concentração adicionada em cada nível são aceitos.
Precisão (intra-dia e inter-dia)	Intra-dia: análise em triplicata da matriz branca adicionada do analito em 3 níveis de concentração ao longo da faixa linear de trabalho (nível baixo, médio e alto) realizada em um mesmo dia; Inter-dias: análise em triplicata da matriz branca adicionada do analito em 3 níveis de concentração ao longo da faixa linear de trabalho (nível baixo, médio e alto) realizada em dias diferentes.	O desvio padrão relativo da resposta das réplicas deve ser menor ou igual a 20 % no nível do LQ (DPR $\leq$ 20 %); para os demais níveis, deve ser menor ou igual a 1 5%. (DPR $\leq$ 15 %).

Autoria própria

2.2.4 Avaliação qualitativa dos efeitos de matriz apresentados por diversas matrizes aquosas para as escalas capilar e convencional

A avaliação qualitativa dos efeitos produzidos pela matriz na ionização dos parabenos e hormônios consistiu em injetar a matriz (amostras aquosas de diversas fontes e complexidades) utilizando column switching nas condições de análise previamente definidas para o acoplamento entre a coluna extratora e a coluna analítica. Paralelamente, uma solução padrão dos analitos em água foi infundida, por intermédio de uma conexão em T, se misturando ao efluente pós-coluna analítica, sendo ambos direcionados à fonte de ionização. Assim, efeitos de supressão ou incremento na ionização puderam ser visualmente observados nos cromatogramas registrados.

2.2.5 Aplicação dos métodos em amostra de água para as escalas capilar e convencional

Após a adequação e validação dos métodos cromatográficos column switching nas escalas capilar e convencional, a aplicabilidade desses métodos foi avaliada. Uma amostra do córrego Santa Maria Madalena, coletada próximo à nascente em novembro de 2018 (em período chuvoso) foi submetida à análise pelos métodos propostos e a presença dos 4 hormônios e 5 parabenos foi investigada.

Previamente à injeção, a amostra aquosa foi filtrada em membrana de 0,2 µm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização das condições de ionização e fragmentação – escalas capilar e convencional

A otimização das condições de ionização e fragmentação dos hormônios e parabenos em ESI negativo foi realizada por infusão direta dos analitos, via IntelliStart, ferramenta disponível no XEVO TQ MS que ajusta os parâmetros instrumentais de maneira automática, buscando as respostas analíticas mais adequadas para o conjunto dos compostos de interesse.

A Tabela 4.2 mostra a relação das condições experimentas obtidas para a ionização e fragmentação em ESI negativo para os hormônios e parabenos estudados.

Tabela 4.2- Condições experimentas em ESI (-) obtidas para a análise de hormônios e parabenos via IntelliStart.

Analito	Íon precursor (*m/z*)	Transições MRM (*m/z*)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (V)	Dwell time (s)
Metilparabeno (MP)	150,9515	92,0231 [a] 135,9972 [b]	26 26	20 14	0,105
Etilparabeno (EP)	164,9672	92,2210 [a] 136,8694 [b]	26 26	18 12	0,105
Propilparabeno (PP)	179,0467	92,0875 [a] 136,6619 [b]	24 24	22 12	0,105
Butilparabeno (BP)	193,0624	92,0778 [a] 136,2656 [b]	30 30	22 18	0,105
Benzilparabeno (BzP)	226,9828	92,0079 [a] 136,0339 [b]	26 26	22 14	0,105
Estriol (E3)	287,1406	145,0843 [a] 171,0337 [b]	50 50	38 42	0,105
Estradiol (E2)	271,0818	145,1408 [a] 183,0705 [b]	54 54	32 42	0,105
Etinilestradiol (EE2)	295,2096	145,0237 [a] 267,1570 [b]	52 52	42 22	0,105
Estrona (E1)	269,1300	145,0240 [a] 145,6667 [b]	50 50	38 58	0,105

[a] Transição de quantificação; [b] Transição de confirmação

Autoria própria.

As condições definidas para o electrospray no modo negativo (ESI -) foram:

- Voltagem do capilar: 3,00 kV
- Voltagem do cone: 30 V
- Temperatura da fonte: 150 °C
- Temperatura do gás de dessolvatação (N_2): 350 °C
- Vazão do gás de dessolvatação (N_2): 900 L/h

3.2 Adequação do método cromatográfico desenvolvido

3.2.1 Escala capilar

A Tabela 4.3 relaciona as condições de análise otimizadas para column switching entre a coluna Luna C_{18} e coluna BetaBasic$_{18}$ na escala capilar com detecção pelo XEVO TQ MS.

Tabela 4.3 - Condições cromatográficas resultantes da otimização do método CS-cLC-ESI-MS/MS.

	Coluna extratora Luna C_{18} (50 x 0,254 mm; 10 μm)	**Coluna analítica BetaBasic$_{18}$ (100 x 0,32 mm, 5 μm)**
Fase móvel	H_2O/ACN	H_2O/ACN
Vazão da fase móvel	150 μL min^{-1}	15 μL min^{-1}
Gradiente de eluição da fase móvel	início – 100 % H_2O	início – 20 % ACN
	12,1 min – 100 % H_2O	4 min – 20 % ACN
	13,1 min – 90 % ACN	18 min – 60 % ACN
	21 min– 90 % ACN	18,01 min – 90 % ACN
	21,1 min – 100 % H_2O	22 min – 90 % ACN
	25 min – 100 % H_2O	22,1 min – 20 % ACN
	25 min – fim	25 min – fim
Temperatura do forno	40°C	40°C
Eventos de column switching	Início: V_6 (1_2) e V_{10} (1_2)	
	4min: V_6 (1_2) e V_{10} (10_1)	
	18min: V_6 (6_1) e V_{10} (1_2)	
	20min: V_6 (1_2) e V_{10} (1_2)	

Autoria própria

3.2.2 Escala convencional

As condições de análise otimizadas para column switching entre a coluna Luna C_{18} e coluna Acclaim C_{18} na escala convencional com detecção pelo XEVO TQ MS estão descritas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4- Condições cromatográficas resultantes da otimização do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS.

	Coluna extratora Luna C_{18} (50 x 0,508 mm; 10 μm)	**Coluna analítica Acclaim C_{18} (100 x 2,1 mm; 2,6 μm)**
Fase móvel	H_2O/ACN	H_2O/ACN
Vazão da fase móvel	150 μL min^{-1}	200 μL min^{-1}
Gradiente de eluição da fase móvel	início – 100 % H_2O	início – 35 % ACN
	12,1 min – 100 % H_2O	4 min – 35 % ACN
	13,1 min – 90 % ACN	18 min – 50 % ACN
	21 min– 90 % ACN	18,01 min – 90 % ACN
	21,1 min – 100 % H_2O	22 min – 90 % ACN
	25 min – 100 % H_2O	22,1 min – 35 % ACN
	25 min – fim	25 min – fim
Temperatura do forno	40°C	40°C
Eventos de column switching	Início: V_6 (1_2) e V_{10} (1_2)	
	4min: V_6 (1_2) e V_{10} (10_1)	
	18min: V_6 (6_1) e V_{10} (1_2)	
	20min: V_6 (1_2) e V_{10} (1_2)	

Autoria própria

3.3 Avaliação de figuras de mérito

A qualidade de um método desenvolvido é atestada por meio da avaliação crítica de uma série de parâmetros estabelecidos por regulamentações ou guias fornecidos pelas agências de controle. Esses parâmetros em conjunto compõe o processo de validação de um método, responsável pela comprovação de que o método é reprodutível, exato e aplicável.

Os métodos cromatográficos column switching desenvolvidos foram validados e a avaliação de parâmetros como linearidade na faixa de trabalho,

limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão evidenciaram a adequação dos métodos à finalidade proposta.

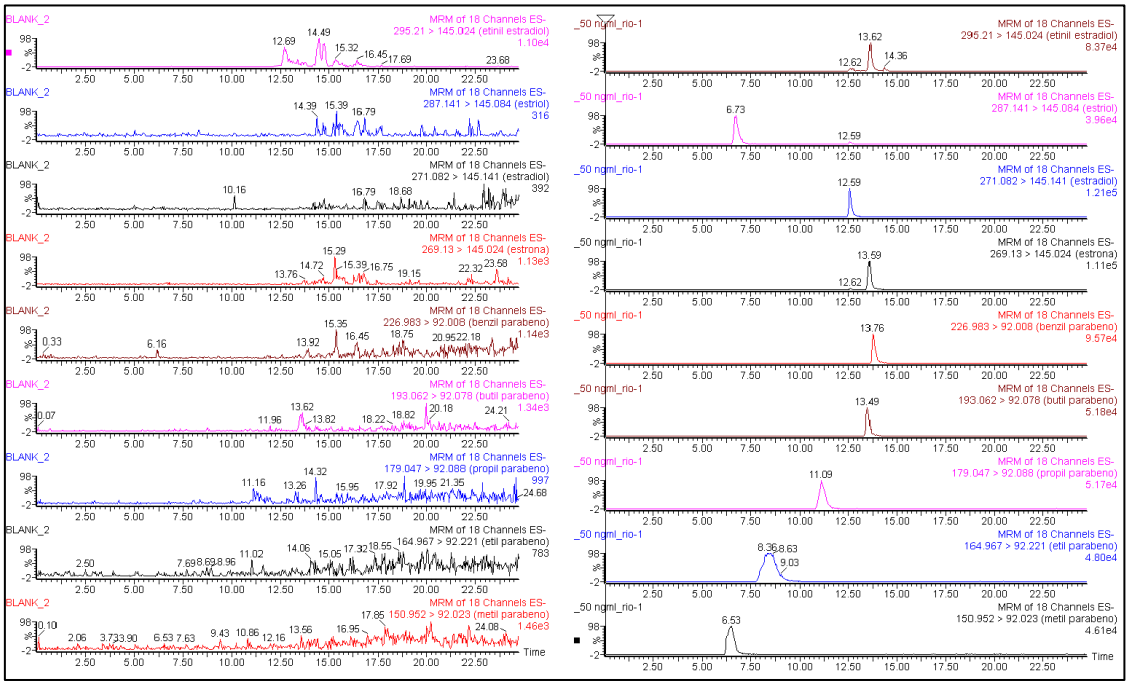
3.3.1 Escala capilar

3.3.1.1 Seletividade

Para investigar a seletividade do método, foram analisadas 3 amostras de água superficial (córrego do Gregório, em frente à entrada da USP, coletadas em novembro de 2018), provenientes de coletas independentes (porém, realizadas no mesmo ponto de amostragem, dia e horário). As amostras brancas, como foram denominadas, foram injetadas em duplicata, perfazendo um total de 6 réplicas.

Não foi detectado nenhum interferente nos tempos de retenção dos analitos estudados, demonstrando a seletividade do método (Figura 4.1).

Figura 4.1- Cromatogramas evidenciando a seletividade do método CS-cLC-ESI-MS/MS.



Autoria própria.

3.3.1.2 Linearidade

A faixa de trabalho para avaliação da linearidade do método CS-cLC-ESI-MS/MS foi construída em 6 níveis de concentração da matriz branca adicionada dos analitos, preparados em triplicata, partindo do LQ.

A Tabela 4.5 mostra as concentrações dos pontos utilizados na construção das curvas para cada analito estudado.

Tabela 4.5 - Níveis de concentração da faixa linear de trabalho para CS-cLC-ESI-MS/MS.

Analito	LD (ng mL^{-1})	P1 (ng mL^{-1})	P2 (ng mL^{-1})	P3 (ng mL^{-1})	P4 (ng mL^{-1})	P5 (ng mL^{-1})	P6 (ng mL^{-1})
MP	0,075	0,2	0,375	1,25	3,75	7,5	25
EP	0,045	0,12	0,225	0,750	2,25	4,5	15
PP	0,0075	0,02	0,0375	0,125	0,375	0,75	2,5
BP	0,003	0,008	0,015	0,05	0,15	0,3	1
BzP	0,003	0,008	0,015	0,05	0,15	0,3	1
E3	0,3	0,8	1,5	5	15	30	100
E2	0,3	0,8	1,5	5	15	30	100
EE2	0,4	0,8	1,5	5	15	30	100
E1	0,03	0,08	0,15	0,5	1,5	3,0	10

Autoria própria.

Foram avaliados alguns modelos matemáticos de calibração ponderada e também o modelo sem ponderação. Para a escolha do modelo mais adequado foram considerados o coeficiente de determinação (R^2), a soma dos valores absolutos dos resíduos relativos ($\sum$%RE) e a análise gráfica da distribuição dos resíduos para cada analito.

A Tabela 4.6 apresenta os valores obtidos para os modelos de ponderação avaliados; estão destacados, em negrito, os modelos selecionados.

Tabela 4.6 -Modelos de ponderação e respectivos parâmetros avaliados.

Analito	Ponderação	R^2	∑%RE	a	b
MP	1	0,999	361,48	-293,03	1552,8
	$1/x^2$	**0,995**	**75,84**	**-77,53**	**1485,9**
	$1/x^1$	0,998	88,68	-102,34	1522,7
	$1/y^2$	0,994	78,83	-75,42	1473,1
	$1/y^1$	0,997	86,54	-99,90	1519,1
EP	1	0,999	213,48	-524,97	5072,8
	$1/x^2$	**0,997**	**57,70**	**-288,52**	**4061,3**
	$1/x^1$	0,999	63,99	-310,88	5016,6
	$1/y^2$	0,997	58,44	-281,84	4935,8
	$1/y^1$	0,999	62,15	-305,90	5009,9
PP	1	0,999	55,69	8,07	14275.,6
	$1/x^2$	**0,997**	**52,94**	**4,96**	**14167,4**
	$1/x^1$	0,999	56,24	-3,56	14293,9
	$1/y^2$	0,997	53,79	3,49	14147,9
	$1/y^1$	0,999	56,69	-4,45	14285,6
BP	1	0,996	374,39	157,40	18997,3
	$1/x^2$	0,994	84,53	265,17	18273,8
	$1/x^1$	0,997	90,97	256,16	18608,3
	$1/y^2$	**0,997**	**83,88**	**266,74**	**18155,9**
	$1/y^1$	0,997	99,53	249,50	18588,2
BzP	1	0,999	320,49	138,44	35981,2
	$1/x^2$	0,994	96,92	-60,33	38064,9
	$1/x^1$	0,998	99,92	-21,12	36609,8
	$1/y^2$	**0,993**	**95,75**	**-65,97**	**37963,2**
	$1/y^1$	0,998	100,60	-28,48	36582,5
E3	1	0,999	97,67	-72,78	216,2
	$1/x^2$	0,999	34,86	-45,58	215,0
	$1/x^1$	0,999	34,70	-45,83	215,1
	$1/y^2$	0,999	34,78	-45,42	214,7
	$1/y^1$	**0,999**	**34,66**	**-45,77**	**214,9**
E2	1	0,999	174,19	14,76	299,5
	$1/x^2$	0,999	36,92	-67,00	305,5
	$1/x^1$	0,999	43,05	-58,56	302,3
	$1/y^2$	**0,999**	**36,70**	**-66.,36**	**304,8**
	$1/y^1$	0,999	40,55	-59,85	302,3
EE2	1	0,999	170,17	360,27	265,8
	$1/x^2$	**0,998**	**49,45**	**287,16**	**273,2**
	$1/x^1$	0,999	61,12	300,72	261,1
	$1/y^2$	0,998	51,03	292,26	271,1
	$1/y^1$	0,999	70,06	306.,78	267,7
E1	1	0,999	134,32	-219,70	3576,3
	$1/x^2$	**0,999**	**35,83**	**-141,25**	**3507,8**
	$1/x^1$	0,999	40,95	-152,59	3549,9
	$1/y^2$	0,998	36,79	-141,33	3501,4
	$1/y^1$	0,999	39,77	-149,77	3547,3

Autoria própria.

Observando com atenção os valores da soma dos resíduos relativos (∑%RE) apresentados na tabela acima, percebe-se claramente a necessidade de ponderação. Para todos os analitos a falta de ajuste é evidente no modelo sem ponderação.

A Tabela 4.7 mostra de forma mais objetiva os modelos matemáticos selecionados e valores obtidos para a intercepção da reta (a), inclinação da reta (b) e coeficiente de determinação (R^2) para cada analito.

Tabela 4.7- Modelos matemáticos selecionados para o método CS-cLC-ESI-MS/MS.

Analito	a	b	R^2	Ponderação
MP	-77,53	1485,9	0,995	$1/x^2$
EP	-288,52	4061,3	0,997	$1/x^2$
PP	4,96	14167,4	0,997	$1/x^2$
BP	266,74	18155,9	0,997	$1/y^2$
BzP	-65,97	37963,2	0,993	$1/y^2$
E3	-45,77	214,9	0,999	$1/y^1$
E2	-66,36	304,8	0,999	$1/y^2$
EE2	287,16	273,2	0,998	$1/x^2$
E1	-141,25	3507,8	0,999	$1/x^2$

Autoria própria.

3.3.1.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação do método CS-cLC-ESI-MS/MS para hormônios e parabenos são apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Limites de detecção do método CS-cLC-ESI-MS/MS para hormônios e parabenos

Analito	LD ($ng\ mL^{-1}$)	LQ ($ng\ mL^{-1}$)
MP	0,075	0,2
EP	0,045	0,12
PP	0,0075	0,02
BP	0,003	0,008
BzP	0,003	0,008
E3	0,3	0,8
E2	0,3	0,8
EE2	0,4	0,8
E1	0,03	0,08

Autoria própria.

3.3.1.4 Exatidão

A Tabela 4.9 apresenta os valores de exatidão obtidos para os pontos baixo, médio e alto no método CS-cLC-ESI-MS/MS.

Tabela 4.9- Valores de exatidão obtidos para as concentrações referentes aos pontos baixo, médio e alto do método CS-cLC-ESI-MS/MS.

Analito	Concentração			Exatidão		
	P_{baixo} (ng mL^{-1})	$P_{médio}$ (ng mL^{-1})	P_{alto} (ng mL^{-1})	P_{baixo} (%)	$P_{médio}$ (%)	P_{alto} (%)
MP	0,25	2,5	12,5	108,63	98,71	94,69
EP	0,15	1,5	7,5	103,45	100.45	101,81
PP	0,025	0,25	1,25	107,30	99,27	103,93
BP	0,01	0,1	0,5	108,28	90,40	108,93
BzP	0,01	0,1	0,5	93,59	89,98	91,60
E3	1	10	50	106,73	100,23	108,55
E2	1	10	50	109,57	110,83	104,69
EE2	1	10	50	96,34	103,71	102,90
E1	0,1	1	5	100,61	104,82	110,28

Autoria própria

Como pode ser observado na tabela acima, os valores de exatidão mostraram-se adequados, não apresentando em nenhum caso, desvios superiores a 20 % (diferença entre a concentração de analito calculada e a concentração de analito adicionada).

3.3.1.5 Precisão intra-dia e inter-dias

Os desvios padrão relativos (DPR) obtidos para os pontos baixo, médio e alto para os hormônios e parabenos são mostrados na Tabela 4.10 (precisão intra-dia) e na Tabela 4.11 (precisão inter-dias). As concentrações dos pontos baixo, médio e alto são as mesmas concentrações utilizadas para o cálculo da exatidão (e podem ser vistas na Tabela 4.9, item 3.3.1.4).

Tabela 4.10- Resultados obtidos para a precisão intra -dia para o método CS-cLC-ESI-MS/MS

Analito	Precisão intra-dia Dia 1 (n=3)			Precisão intra-dia Dia 2 (n=3)		
	P_{baixo} (DPR %)	$P_{médio}$ (DPR %)	P_{alto} (DPR %)	P_{baixo} (DPR %)	$P_{médio}$ (DPR %)	P_{alto} (DPR %)
MP	2,20	11,77	5,37	3,01	7,75	2,26
EP	5,55	4,01	2,24	3,45	3,55	4,43
PP	6,06	8,41	6,65	5,26	2,50	8,43
BP	13,86	8,15	3,06	6,56	4,99	2,75
BzP	3,94	1,66	4,64	3,49	5,43	3,07
E3	3,21	2,33	4,62	5,93	2,02	0,64
E2	4,53	0,96	5,75	3,96	1,98	6,49
EE2	3,51	3,50	4,82	5,34	1,45	6,73
E1	2,85	8,20	4,37	2,32	7,42	4,28

Autoria própria

Tabela 4.11- Resultados obtidos para a precisão inter-dias para o método CS-cLC-ESI-MS/MS

Analito	Precisão inter-dias (n=6)		
	P_{baixo} (DPR %)	$P_{médio}$ (DPR %)	P_{alto} (DPR %)
MP	2,66	9,02	5,97
EP	4,23	3,49	3,62
PP	6,70	6,55	7,01
BP	9,78	6,27	2,97
BzP	3,94	5,31	4,42
E3	4,87	2,25	4,35
E2	3,88	2,20	6,05
EE2	8,15	2,55	5,37
E1	2,60	7,48	3,89

Autoria própria

Tanto os valores de precisão intra-dia quando os valores de precisão inter-dias do método CS-cLC-ESI-MS/MS mostraram-se adequados, não tendo sido observado nenhum valor de DPR acima de 15 %.

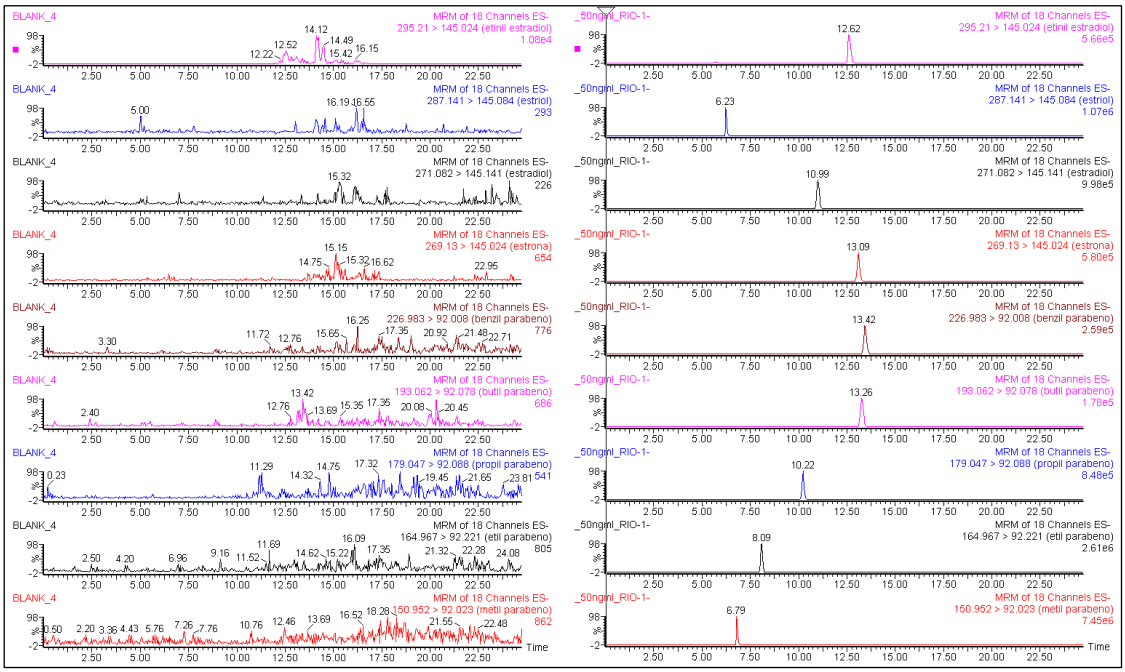
3.3.2 Escala convencional

3.3.2.1 Seletividade

Três amostras de água superficial (córrego do Gregório, em frente à entrada da USP, coletadas em novembro de 2018), provenientes de coletas independentes (mas realizadas no mesmo ponto de amostragem, dia e horário) foram analisadas a fim de avaliar a seletividade do método. As amostras brancas foram injetadas em duplicata, perfazendo um total de 6 réplicas.

Nenhum interferente foi detectado nos tempos de retenção dos analitos estudados, fato que demonstra a seletividade do método (Figura 4.2).

Figura 4. 2 - Cromatogramas evidenciando a seletividade do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS.



Autoria própria

3.3.2.2 Linearidade

A linearidade do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS foi avaliada em uma faixa de trabalho em 6 níveis de concentração da matriz branca adicionada dos analitos, preparados em triplicata, partindo do LQ.

A Tabela 4.12 mostra as concentrações dos pontos utilizados na construção das curvas para cada analito estudado.

Tabela 4. 12 -Níveis de concentração da faixa de trabalho do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS.

Analito	LD (ng mL^{-1})	P1 (ng mL^{-1})	P2 (ng mL^{-1})	P3 (ng mL^{-1})	P4 (ng mL^{-1})	P5 (ng mL^{-1})	P6 (ng mL^{-1})
MP	0,01	0,025	0,2	0,375	1,25	3,75	25
EP	0,006	0,015	0,12	0,225	0,75	2,25	15
PP	0,001	0,0025	0,02	0,0375	0,125	0,375	2,5
BP	0,0004	0,001	0,008	0,015	0,05	0,15	1,0
BzP	0,0004	0,001	0,008	0,015	0,05	0,15	1,0
E3	0,04	0,1	0,8	1,5	5	15	100
E2	0,04	0,1	0,8	1,5	5	15	100
EE2	0,04	0,1	0,8	1,5	5	15	100
E1	0,004	0,01	0,08	0,15	0,5	1,5	10

Autoria própria.

Para a escala convencional, alguns modelos matemáticos de calibração ponderada e sem ponderação foram avaliados, assim como havia sido feito em escala capilar. Da mesma forma, para a escolha do modelo mais adequado foram considerados o coeficiente de determinação (R^2), a soma dos valores absolutos dos resíduos relativos ($\sum$%RE) e a análise gráfica da distribuição dos resíduos para cada analito.

Tabela 4.13 - Modelos de ponderação e respectivos parâmetros avaliados para CS-UHPLC-ESI-MS/MS.

Analito	Ponderação	R^2	∑%RE	a	b
MP	1	0,999	357,34	-601,82	50681,7
	$1/x^2$	**0,998**	**56,80**	**754,78**	**48997,9**
	$1/x^1$	0,999	85,82	566,83	50452,5
	$1/y^2$	0,998	57,52	733,68	48957,7
	$1/y^1$	0,999	99,01	501,74	50425,6
EP	1	0,999	341,01	757,52	39612,7
	$1/x^2$	**0,999**	**33,16**	**179,31**	**40358,7**
	$1/x^1$	0,999	47,73	221,44	39787,9
	$1/y^2$	0,999	33,23	179,72	40316,2
	$1/y^1$	0,999	50,91	228,17	39777,8
PP	1	0,999	760,54	369,25	92100,6
	$1/x^2$	**0,998**	**52,94**	**882,92**	**87232,0**
	$1/x^1$	0,999	112,55	834,24	91188,8
	$1/y^2$	0,998	65,22	868,22	87647,9
	$1/y^1$	0,999	199,05	758,66	91268,7
BP	1	0,999	1086,31	627,28	68480,0
	$1/x^2$	**0,994**	**107,04**	**425,36**	**72705,1**
	$1/x^1$	0,998	150,25	440,7	69397,4
	$1/y^2$	0,996	143,02	439,24	70617,8
	$1/y^1$	0,999	219,68	461,89	69200,4
BzP	1	0,998	509,65	-58,41	114939,2
	$1/x^2$	**0,996**	**84,36**	**75,57**	**116177,1**
	$1/x^1$	0,998	89,27	84,56	114236,6
	$1/y^2$	0,996	85,60	77,62	115174,5
	$1/y^1$	0,998	93,57	86,59	114051,7
E3	1	0,999	281,00	211,51	1869,5
	$1/x^2$	**0,999**	**40,70**	**53,86**	**1921,8**
	$1/x^1$	0,999	66,21	76,32	1876,1
	$1/y^2$	0,999	40,78	57,07	1918,9
	$1/y^1$	0,999	70,70	79,74	1875,5
E2	1	0,999	314,02	333,21	3159,1
	$1/x^2$	0,996	80,98	20,34	3298,6
	$1/x^1$	0,999	114,34	82,95	3171,4
	$1/y^2$	**0,997**	**79,35**	**20,34**	**3281,7**
	$1/y^1$	0,999	113,78	81,78	3169,9
EE2	1	0,999	980,53	602,64	1929,7
	$1/x^2$	**0,997**	**62,24**	**52,17**	**2052,8**
	$1/x^1$	0,999	127,71	100,68	1954,3
	$1/y^2$	0,997	62,80	52,67	2044,9
	$1/y^1$	0,999	136,46	107,23	1952,4
E1	1	0,999	923,49	573,31	18947,3
	$1/x^2$	**0,997**	**69,09**	**97,67**	**19453,9**
	$1/x^1$	0,999	74,80	111,46	19173,7
	$1/y^2$	0,997	69,16	96,38	19407,2
	$1/y^1$	0,999	80,28	114,65	19153,9

Autoria própria.

A Tabela 4.13 apresenta os valores obtidos para os modelos de ponderação avaliados; estão destacados, em negrito, os modelos selecionados. Observando os valores da soma dos resíduos relativos (∑%RE) apresentados na tabela acima, percebe-se claramente a necessidade de ponderação. Para todos os analitos a falta de ajuste é evidente no modelo sem ponderação.

A Tabela 4.14 mostra de forma mais objetiva os modelos matemáticos selecionados e valores obtidos para a intercepção da reta (a), inclinação da reta (b) e coeficiente de determinação (R^2) para cada analito.

Tabela 4.14- Modelos matemáticos selecionados para o método CS-UHPLC-ESI-MS/MS.

Analito	a	b	R^2	Ponderação
MP	754,78	48997,9	0,998	$1/x^2$
EP	179,31	40358,7	0,999	$1/x^2$
PP	882,92	87232,0	0,998	$1/x^2$
BP	425,36	72705,1	0,994	$1/x^2$
BzP	75,57	116177,1	0,996	$1/x^2$
E3	53,86	1921,8	0,999	$1/x^2$
E2	20,34	3281,7	0,997	$1/y^2$
EE2	52,17	2052,8	0,997	$1/x^2$
E1	97,67	19453,9	0,997	$1/x^2$

Autoria própria.

3.3.2.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS para hormônios e parabenos são apresentados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15- Limites de detecção do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS para hormônios e parabenos.

Analito	LD (ng mL^{-1})	LQ (ng mL^{-1})
MP	0,01	0,025
EP	0,006	0,015
PP	0,001	0,0025
BP	0,0004	0,001
BzP	0,0004	0,001
E3	0,04	0,1
E2	0,04	0,1
EE2	0,04	0,1
E1	0,004	0,01

Autoria própria

3.3.2.4 Exatidão

A Tabela 4.16 apresenta os valores de exatidão obtidos para os pontos baixo, médio e alto no método CS-UHPLC-ESI-MS/MS.

Tabela 4.16– Valores de exatidão obtidos para as concentrações referentes aos pontos baixo, médio e alto do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS.

Analito	Concentração			Exatidão		
	P_{baixo} (ng mL^{-1})	$P_{médio}$ (ng mL^{-1})	P_{alto} (ng mL^{-1})	P_{baixo} (%)	$P_{médio}$ (%)	P_{alto} (%)
MP	0,075	0,75	12,5	103,65	98,62	99,59
EP	0,045	0,45	7,5	104,66	100,59	98,90
PP	0,0075	0,075	1,25	96,56	101,38	108,63
BP	0,003	0,03	0,5	96,88	93,88	90,22
BzP	0,003	0,03	0,5	112,31	90,81	89,07
E3	0,3	3	50	104,50	99,19	94,26
E2	0,3	3	50	96,83	108,90	98,41
EE2	0,3	3	50	103,90	105,99	98,01
E1	0,03	0,3	5	95,40	100,75	101,18

Autoria própria

Como anteriormente para escala capilar, para a escala convencional os valores de exatidão mostraram-se adequados, não apresentando em nenhum caso, desvios superiores a 20 % (diferença entre a concentração de analito calculada e a concentração de analito adicionada).

3.3.2.5 Precisão intra-dia e inter-dias

Os desvios padrão relativos (DPR) obtidos para os pontos baixo, médio e alto para os hormônios e parabenos são mostrados na Tabela 4.17 (precisão intra-dia) e na Tabela 4.18 (precisão intrer-dias). As concentrações dos pontos baixo, médio e alto são as mesmas concentrações utilizadas para o cálculo da exatidão (e podem ser vistas na Tabela 4.16, item 3.3.2.4).

Tabela 4.17– Resultados obtidos para a precisão intra-dia para o método CS-UHPLC-ESI-MS/MS.

Analito	Precisão intra-dia Dia 1 (n=3)			Precisão intra-dia Dia 2 (n=3)		
	P_{baixo} (DPR %)	$P_{médio}$ (DPR %)	P_{alto} (DPR %)	P_{baixo} (DPR %)	$P_{médio}$ (DPR %)	P_{alto} (DPR %)
MP	4,63	2,19	2,02	1,86	1,98	1,29
EP	1,98	6,73	5,62	5,13	1,27	3,45
PP	6,05	3,83	3,61	4,67	1,29	4,75
BP	4,97	5,36	1,68	8,16	2,63	1,83
BzP	2,67	3,73	1,84	3,45	1,68	4,90
E3	1,32	4,90	1,70	2,14	5,60	0,20
E2	3,04	5,53	3,69	6,01	5,75	2,40
EE2	1,14	0,81	1,93	0,94	0,98	0,38
E1	3,85	3,15	4,58	2,51	2,97	0,42

Autoria própria

Tabela 4.18 – Resultados obtidos para a precisão inter-dias para o método CS-UHPLC-ESI-MS/MS.

Analito	Precisão inter-dias (n=6)		
	P_{baixo} (DPR %)	$P_{médio}$ (DPR %)	P_{alto} (DPR %)
MP	3,88	4,45	3,38
EP	3,76	4,52	4,18
PP	5,02	2,66	3,80
BP	6,58	3,80	2,40
BzP	4,90	4,28	5,98
E3	5,27	5,17	0,75
E2	5,84	5,66	3,49
EE2	1,79	2,45	1,45
E1	2,92	3,13	3,09

Autoria própria

A exemplo do que foi observado na escala capilar, tanto os valores de precisão intra-dia quando os valores de precisão inter-dias do método CS-UHPLC-ESI-MS/MS mostraram-se adequados, não tendo sido observado nenhum valor de DPR acima de 15 %.

3.4 Avaliação qualitativa dos efeitos de matriz apresentados por diversas matrizes aquosas

A avaliação qualitativa dos efeitos produzidos pela matriz na ionização dos parabenos e hormônios, tanto em escala capilar quanto em escala convencional, consistiu em injetar a matriz (amostras aquosas de diversas fontes e complexidades) utilizando column switching nas condições de análise previamente definidas para o acoplamento entre a coluna extratora e a coluna analítica. Paralelamente, uma solução padrão dos analitos em água foi infundida, por intermédio de uma conexão em T, se misturando ao efluente pós-coluna analítica, sendo ambos direcionados à fonte de ionização. Assim, efeitos de supressão ou incremento na ionização puderam ser visualmente observados nos cromatogramas registrados.

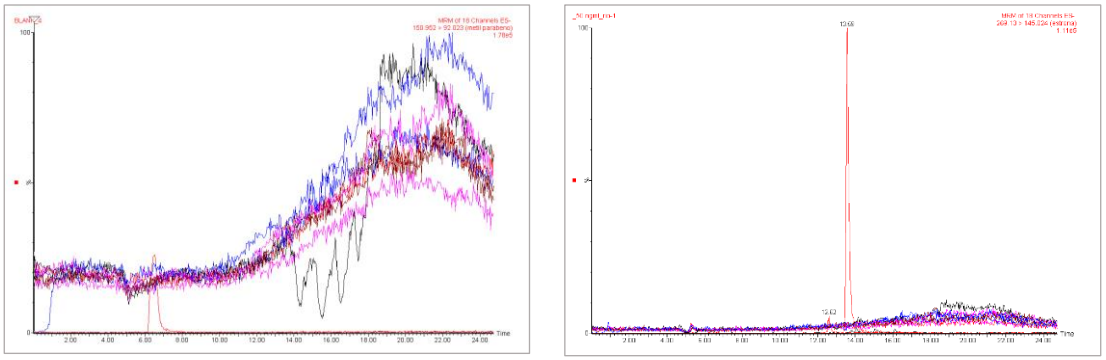
3.4.1 Escala capilar

A investigação qualitativa dos efeitos de matriz foi realizada para cada um dos 9 analitos. Os cromatogramas das diferentes amostras de água foram comparados entre si e com um cromatograma da solução padrão em água ultrapura.

Os efeitos de supressão ou incremento do sinal analítico causados por essas matrizes em CS-cLC-ESI-MS/MS foram, no geral, menores que os observados em CS-cLC-ESI-QToF.

A Figura 4.3 apresenta um exemplo do que foi realizado para cada um dos analitos.

Figura 4.3– Cromatogramas representativos da avaliação do efeito de matriz experimentado pelo metilparabeno (esquerda) e estrona (direita) em cada uma das amostras analisadas pelo método CS-cLC-ESI-MS/MS.

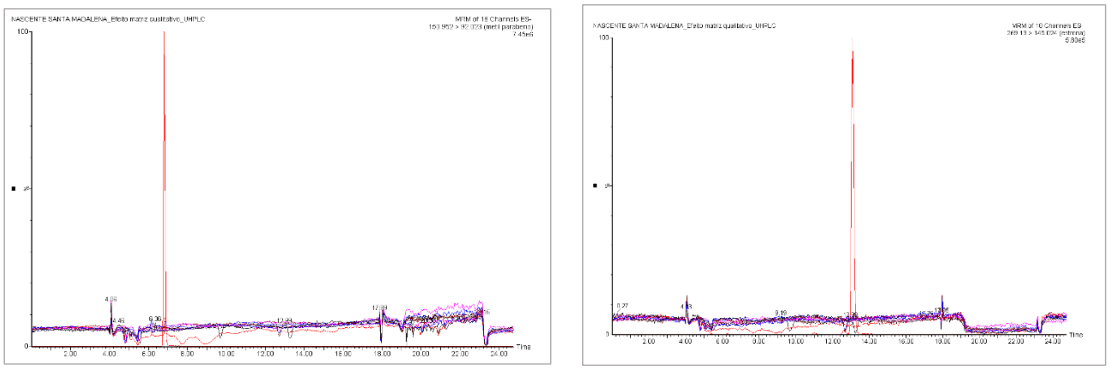


Autoria própria.

3.4.2 Escala convencional

A exemplo do que foi realizado para a escala capilar, os efeitos de matriz para cada um dos analitos de interesse foram avaliados também para o método em CS-UHPLC-ESI-MS/MS. Um exemplo pode ser visualizado na Figura 4.4.

Figura 4.4 – Cromatogramas representativos da avaliação do efeito de matriz experimentado pelo metilparabeno (esquerda) e estrona (direita) em cada uma das amostras analisadas pelo método CS-UHPLC-ESI-MS/MS.



Autoria própria.

3.5 Aplicação dos métodos em amostras ambientais

Após a adequação e validação dos métodos cromatográficos column switching nas escalas capilar e convencional, a aplicabilidade desses métodos foi avaliada.

Diversas amostras ambientais aquosas coletadas na cidade de São Carlos foram submetidas à análise pelos métodos propostos e a presença dos 4 hormônios e 5 parabenos foi investigada em cada uma delas.

3.5.1 Escala capilar

A Tabela 4.19 relaciona as diversas amostras ambientais analisadas em CS-cLC-ESI-MS/MS, bem como os níveis dos 4 hormônios e 5 parabenos encontrados nessas amostras.

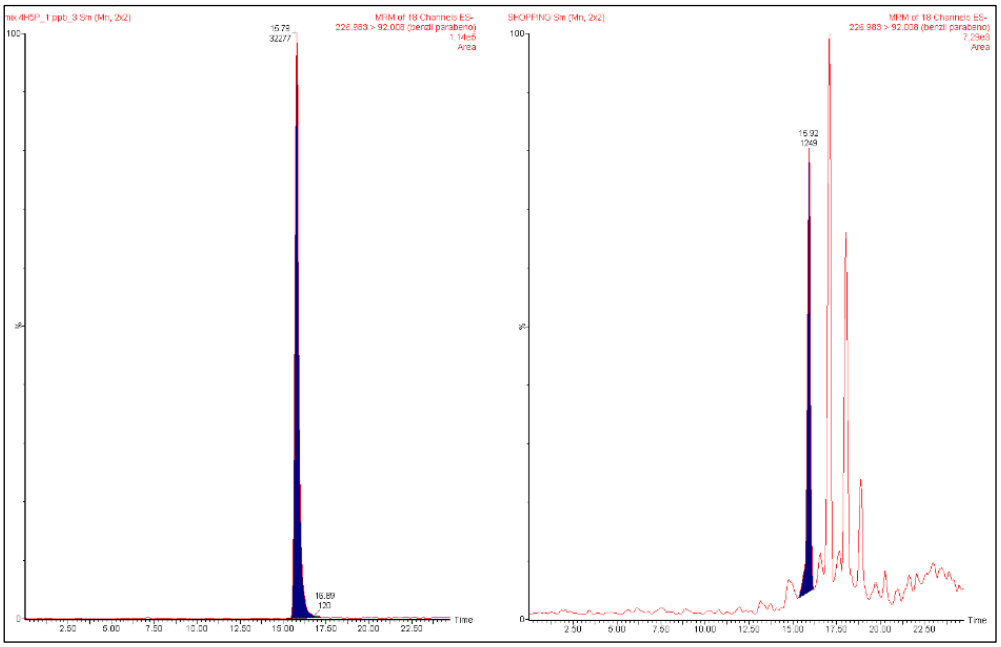
Tabela 4.19 - Amostras ambientais aquosas analisadas em CS-cLC-ESI-MS/MS.

Amostra *	MP (ng mL^{-1})	EP (ng mL^{-1})	PP (ng mL^{-1})	BP (ng mL^{-1})	BzP (ng mL^{-1})	E1 (ng mL^{-1})	E2 (ng mL^{-1})	E3 (ng mL^{-1})	EE2 (ng mL^{-1})
a	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
b	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
c	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
d	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
e	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
f	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
g	< LD	< LD	< LD	< LD	**0,0346**	< LD	< LD	< LD	< LD
h	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
i	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
j	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

* Conforme descritas no item 2.1.6.
Autoria própria

Um cromatograma representativo da análise de uma das amostras (água do Rio Monjolinho, próximo ao Shopping Iguatemi) é apresentado na Figura 4.5.

Figura 4.5 - Cromatogramas típicos da análise de hormônios e parabenos em CS-cLC-ESI-MS/MS para o padrão em água ultrapura (à esquerda) e para a amostra de água do Rio Monjolinho, próximo ao Shopping Iguatemi (à direita).



Autoria própria.

3.5.2 Escala convencional

A Tabela 4.20 relaciona as diversas amostras ambientais analisadas em CS-UHPLC-ESI-MS/MS, bem como os níveis dos 4 hormônios e 5 parabenos encontrados nessas amostras.

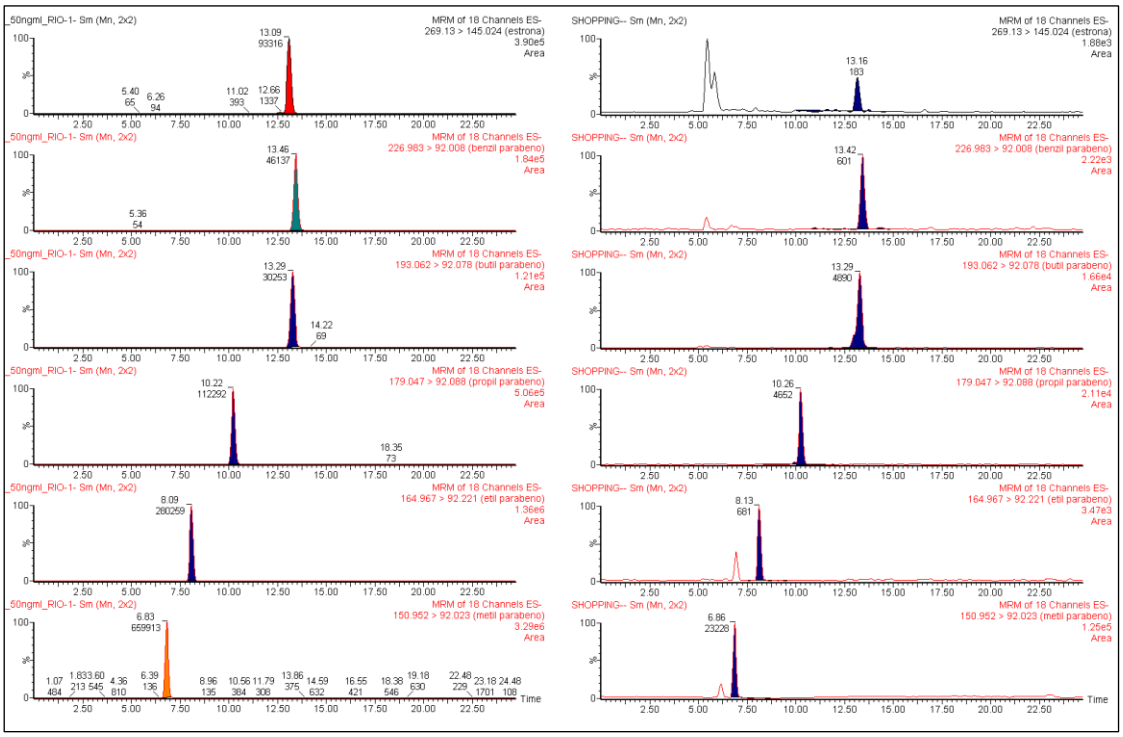
Tabela 4. 20 - Amostras ambientais aquosas analisadas em CS-UHPLC-ESI-MS/MS

Amostra *	MP (ng mL^{-1})	EP (ng mL^{-1})	PP (ng mL^{-1})	BP (ng mL^{-1})	BzP (ng mL^{-1})	E1 (ng mL^{-1})	E2 (ng mL^{-1})	E3 (ng mL^{-1})	EE2 (ng mL^{-1})
a	0,2194	0,0090	0,0212	0,0036	0,0121	<LD	< LD	< LD	< LD
b	<LQ	<LD	0,0318	0,0039	0,0033	<LD	< LD	< LD	< LD
c	0,0326	< LD	< LD	< LD	0,0034	<LD	< LD	< LD	< LD
d	0,0970	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LD	< LD	< LD
e	<LQ	<LD	<LD	<LQ	0,0074	< LD	< LD	< LD	< LD
f	0,8788	0,0227	0,1328	0,0133	0,0038	< LD	< LD	< LD	< LD
g	0,4724	< LQ	0,0423	0,0601	0,0043	<LQ	< LD	< LD	< LD
h	< LD	< LD	< LD	< LD	0,0017	< LD	< LD	< LD	< LD
i	0,1640	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LD	< LD	< LD
j	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

* Conforme descritas no item 2.1.6.
Autoria própria

Uma amostra representativa (água do Rio Monjolinho, próximo ao Shopping Iguatemi) é apresentado na Figura 4.6.

Figura 4.6 -Cromatogramas típicos da análise de hormônios e parabenos em CS-UHPLC-ESI-MS/MS para o padrão em água ultrapura (à esquerda) e para a amostra de água do Rio Monjolinho, próximo ao Shopping Iguatemi (à direita).



Autoria própria

4 CONCLUSÃO

Nessa etapa do estudo, alguns pontos que podem ser destacados:

- ✓ A hifenação do cromatógrafo ao XEVO TQ MS foi feita com sucesso;
- ✓ Os métodos cromatográficos baseados em column switching em escala capilar e convencional foram adequados à nova configuração e validados;
- ✓ As figuras de mérito avaliadas comprovaram a especificidade, linearidade, exatidão e precisão dos métodos, em ambas as escalas;
- ✓ O método CS-UHPLC-ESI-MS/MS mostrou detectabilidade aproximadamente 10 vezes maior quando comparado ao método CS-cLC-ESI-MS/MS para hormônios e parabenos;
- ✓ Os efeitos de matriz foram investigados para todos os compostos, em uma variedade de amostras aquosas de fontes diversas, tendo sido menores que os apresentados com hifenação ao QToF.
- ✓ A análise de diversas amostras ambientais aquosas demonstrou a aplicabilidade do método, tendo sido possível a quantificação de diversos parabenos e estrona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ANVISA, Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos**. Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em:< http://www.anvisa.org.br>. Acesso em: 14 jun. 2018.

[2] ANVISA, Resolução nº 27, de 27 de maio de 2012. **Guia para validação de métodos analíticos**. Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em:< http://www.anvisa.org.br>. Acesso em: 14 jun. 2018.

[3] PROCEDURES, A. Food and Drug Administration:Guidance for Industry: Validation of Analytical Procedures and Methodology, Topic Q2B. Centre for Drug Evaluation and Research (CDER)., n. November, p. 301–827, 1996.

[4] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA Foods Program Guidelines for Chemical Methods US Food and Drug Administration Office of Foods Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program. **U.S. Department of Health and Human Services**, , n. March, 2012.