Patricia Regina de Souza

Avaliação de técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas para análise de morfina em manga

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

Exemplar revisado

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

São Carlos

2016

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

Assinatura: *Patricia Regina de Souza*

Data: 10/05/2016

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Souza, Patricia Regina de

Avaliação de técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas para análise de morfina em manga. / Patricia Regina de Souza. — São Carlos, 2016.

86 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2016.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

1. Cromatografia. 2. UHPLC-MS. 3. GC-MS. 4. Espectrometria de massas. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, José Luiz e Neusa, por todo o amor e carinho ao longo desta jornada. À eles que abriram mão dos seus próprios sonhos para que o meu se tornasse realidade. Não há palavras para expressar o amor e gratidão que sinto por vocês. Esta conquista é para vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus e meu anjo da guarda, por me livrarem de todo o mal deste mundo e me permitirem sabedoria para seguir pelo melhor caminho.

Aos meus pais, José Luiz e Neusa, por sempre incentivarem os meus estudos e por não medirem esforços para que eu realizasse todos os meus sonhos. Sem este apoio, a conclusão deste trabalho não seria possível.

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças pela orientação, por acreditar no meu potencial e me permitir a oportunidade de participar do Grupo de Cromatografia.

Ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto pela amizade e ensinamentos na área de química analítica desde a época da graduação na Unifal-MG.

Aos amigos e companheiros de trabalho do CROMA: Adriel, Ana Lúcia, Anderson, Amanda, Arley, Bruno, Felipe, Letícia, Maraíssa, Mariane, Meire, Pipe, Rodrigo, Rosemeire, Scarlet, Tanare e Vivane.

À Odete Milão e Elaine Gobato pela paciência e ajuda.

Ao Dr. Guilherme Miola Titato pela paciência, inúmeras sugestões, dedicação e amizade ao longo deste trabalho.

À minha família são-carlense: Carol, Eli, Meire, Mirian, Simone e Tati, sem as quais os dias em São Carlos seriam muito mais difíceis e sem graça, pela amizade fiel e companheirismo em todos os momentos.

Às minhas caroneiras fixas Scarlett, Helo e Karine, por tornarem as idas e vindas à São Carlos muito mais rápidas e divertidas.

Ao Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro pela supervisão durante a monitoria PAE e pela oportunidade de trabalharmos juntos.

Às bibliotecárias do IQSC-USP pela dedicação e simpatia durante a correção das referências bibliográficas deste trabalho.

Ao Instituto de Química de São Carlos pela infraestrutura.

À CAPES pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho.

À FAPESP E CNPq por apoiar os projetos do grupo de pesquisa.

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para conclusão deste trabalho.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém. Quem acredita, sempre alcança.”

(Renato Russo)

RESUMO

A constante preocupação com o aumento do uso de agrotóxicos nas lavouras e os riscos gerados pelos resíduos destes compostos fazem com que os órgãos responsáveis pela fiscalização de alimentos no Brasil controlem a presença dessas substâncias nos produtos que chegam à mesa do consumidor. Atualmente, um dos grandes problemas na produção de alimentos é a utilização de substâncias proibidas em lavouras, muitas das quais não possuem estudos nem limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos, assim como a utilização de substâncias já registradas, mas em quantidades ou métodos de manejo incorretos. Ambos os casos podem resultar em sérios problemas à saúde humana. O objetivo deste estudo foi a avaliação da determinação de morfolina em amostras de manga utilizando técnicas como a Extração em Fase Sólida e a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (SPE-GC-MS), assim como a Microextração em Sorvente Empacotado e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (MEPS-GC-MS). Um segundo objetivo deste estudo consistiu em desenvolver, validar e avaliar uma metodologia analítica capaz de identificar quantitativamente a morfolina em amostras de manga por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas em tandem (UHPLC-MS/MS). Para análise por GC-MS fez-se necessária a etapa de derivatização do analito, de forma que o mesmo aumentasse sua volatilidade e diminuísse a polaridade. A comparação entre as técnicas SPE e MEPS não foi possível devido ao efeito de matriz causado pela contaminação do liner e da coluna cromatográfica. Já a metodologia validada por UHPLC-MS/MS seguiu os critérios exigidos pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). O método foi aplicado em mangas de diferentes variedades obtidas no comércio local. Não foram encontrados resíduos de morfolina em nenhuma das amostras investigadas, de acordo com a metodologia proposta. Os resultados apresentados neste trabalho estabelecem metodologias eficientes, rápidas e de baixo custo na determinação de morfolina em amostras de manga.

ABSTRACT

The recurrent increasing of the use of pesticides on crops and the consequent risks due the exposure to chemical residues have urged the food regulation agencies to control the levels of these substances in products that reach consumer's table. A major problem nowadays for the production of food is the use of banned substances in crops and the extrapolation of the limit dosages of substances, which may result in serious problems to human health. Furthermore, many of these substances commonly used in crops still lack substantial information about the maximum residue levels (MRLs). The aim of this study was the evaluation of morpholine levels in mango samples using distinct techniques such as Solid Phase Extraction followed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (SPE-GC-MS) and Microextraction by Packed Sorbent followed by Gas Chromatography Mass Spectrometry (MEPS-GC-MS). Another main goal of this work is the development, validation and evaluation of an analytical methodology to identify and quantify the presence of morpholine in mango samples, using Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS). For the analysis of samples by GC-MS, it was required an initial step of derivatization of the analyte, in order to increase its volatility and reduce polarity. The comparison between SPE and MEPS techniques could not be performed due to matrix effects caused by contamination of the liner and the chromatographic column. On the other hand, the validated methodology for UHPLC-MS/MS presented herein followed all requirements proposed by the Analytical Quality Assurance Manual, accordingly to the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply from Brazil. This method was applied in mango sample belonging to a wide variety of species found in the city of São Carlos, SP. Nevertheless, no significant levels of morpholine residues were found in any of the samples. In this work, we established a methodology efficient, fast and low cost for the determination of morpholine in mangos.

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Rendimento, em milhões de dólares, da exportação de frutas do Brasil de 2001 a 2014.....	21
Figura 2.2 - Exportação da manga em US\$ (FOB) e volume (kg) nos últimos sete anos.....	23
Figura 2.3 - Comercialização anual de agrotóxicos no período de 2000 a 2012 no Brasil.....	24
Figura 2.4 - Estrutura química da morfolina.....	27
Figura 2.5 - Estrutura química da N-nitromorfolina (N-mor).....	27
Figura 3.1 - Esquema de um sistema de GC-MS.....	35
Figura 3.2 - Etapas da Extração em Fase Sólida (SPE) para extração do analitos de interesse.....	37
Figura 3.3 - Esquema de microsseringa de MEPS, com zoom na microcoluna com material sorvente empacotado (BIN) e filtros.....	38
Figura 3.4 - Padrão Morfolina em uma concentração de 5 mg kg ⁻¹	43
Figura 3.5 - Cromatograma morfolina derivatizada com MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida com concentração de 20 mg L ⁻¹	44
Figura 3.6 - Cromatograma de morfolina derivatizada com MPTMS ((3-Mercaptopropil)trimetoxisilano) com concentração de 20 mg L ⁻¹	44
Figura 3.7 - Cromatograma de morfolina derivatizada com BSC com concentração de 2 mg L ⁻¹	45
Figura 3.8 - Reação de adição da morfolina com cloreto de benzenossulfonila (BSC).....	45
Figura 3.9 - Cromatograma da morfolina derivatizada com BSC em pH=5,5 e pH=13, além do branco.....	46
Figura 3.10 - Espectro de massas da morfolina derivatizada com BSC, em pH=13.....	46
Figura 3.11 - Comparação de diferentes volumes de derivatizante BSC (µL).....	47
Figura 3.12 - Diagrama de pareto para a morfolina derivatizada com concentração de 50 µg kg ⁻¹ para o planejamento experimental 2 ²	49

Figura 3.13 - Gráfico de desejabilidade e superfície de resposta para tipos de solvente e volume de solvente de eluição (mL).....	49
Figura 3.14 - Diferentes solventes de lavagem para a extração por SPE.....	50
Figura 3.15 - Fluxograma do procedimento de derivatização e extração por SPE, após otimização, da morfina em manga.....	50
Figura 3.16 - Curva analítica da morfina derivatizada em amostras de manga, após SPE.....	51
Figura 3.17 - Imagem dos liners após injeção no sistema GC-MS de 5 amostras.....	52
Figura 3.18 - Diferentes concentrações do padrão morfina derivatizada após extração por MEPS.....	54
Figura 3.19 - Comparação da extração da morfina derivatizada com e sem a etapa de extração MEPS, e variação do volume de injeção.....	55
Figura 4.1 - Curva de van Deemter para partículas de 10, 5, 3 e $\leq 2 \mu\text{m}$	62
Figura 4.2 - Cromatograma do Íon Total (TIC) e os cromatogramas das transições estudadas pelo modo MRM (Multiple Reaction Monitoring) para uma concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ do padrão analítico de morfina.....	70
Figura 4.3 - Cromatograma do Íon total (TIC) de três diferentes modos de extração. (A): Agitação com vórtex; (B): maceração com almofariz; (C): extração com 80:20 água:metanol (v/v) acidificado com 1% de ácido acético, agitados no vórtex.....	72
Figura 4.4 - Cromatogramas do Íon total (TIC) da morfina com concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando a fase HLB. (A): clean up (B): após etapa de eluição.....	73
Figura 4.5 - Cromatogramas do Íon total (TIC) da morfina com concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando a fase SCX. (A): clean up (B): após etapa de eluição.....	74
Figura 4.6 - Cromatogramas do Íon total (TIC) do clean up realizado com a morfina com concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando a fase C18.....	74
Figura 4.7 - Efeito do pH sob a ionização da morfina.....	75
Figura 4.8 - Cromatogramas do Íon total (TIC) da morfina basificada com NH_4OH com concentração $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando a fase HLB. (A): clean up (B): após etapa de eluição.....	76
Figura 4.9 - Cromatograma da morfina referente ao fragmento $m/z=42$ com concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ sem etapa de SPE.....	77

Figura 4.10 - Cromatograma da morfolina numa concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ sobreposto ao cromatograma de uma amostra de manga não fortificada, mostrando a seletividade do método.....	78
Figura 4.11 – Curva analítica para a morfolina em amostras de manga.....	79
Figura 4.12 – Cromatograma de uma das amostras de manga analisadas.....	82

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 - Variáveis e fatores do planejamento experimental 2 ²	48
Tabela 3.2 - Valor das áreas de diferentes concentrações de morfina derivatizada injetadas no sistema GC-MS, após extração por MEPS, em diferentes dias de análise.....	53
Tabela 4.1 - Condições utilizadas para otimização do método.....	69
Tabela 4.2 - Fragmentos monitorados pelo espectrômetro de massas para a morfina.....	69
Tabela 4.3 - Parâmetros da extração por SPE utilizando como fases extratoras HLB, C18 e SCX.....	73
Tabela 4.4 – Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ).....	77
Tabela 4.5 – Linearidade para determinação de morfina em amostras de manga.....	79
Tabela 4.6 – Dados obtidos para estudo de repetitividade e precisão intermediária.....	80
Tabela 4.7 – Dados obtidos para estudo da exatidão.....	80
Tabela 4.8 – Valores de recuperação para o método validado.....	81

Lista de Equações

(1) Equação de van Deemter.....	61
(2) Equação de uma reta.....	64
(3) Cálculo do desvio padrão.....	64
(4) Coeficiente de variação.....	64
(5) Cálculo de exatidão.....	65
(6) Cálculo do fator de recuperação.....	66

Lista de Abreviações

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIN: Barrel Insert and Needle
BSC: Cloreto de benzenossulfonila
EFSA: European Food Safety Authority
FAO: Organizações das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA: Food and Drugs Administration
GC: Cromatografia Gasosa
HILIC: Cromatografia de Interação Hidrofílica
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LC: Cromatografia Líquida
LD: Limite de Detecção
LMR: Limite Máximo de Resíduo
LQ: Limite de Quantificação
MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MEPS: Microextração por Sorvente Empacotado
MPTMS: (3-Mercaptopropil)trimetoxisilano
MRM: Multiple Reaction Monitoring
MS: Detecção por Espectrometria de Massas
MSTFA: N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
N-MOR: N-nitrosomorfolina
PARA: Programa de Análise de Resíduos em Alimentos
SECEX: Secretaria do Comércio Exterior
SPE: Extração em Fase Sólida
UE: União Europeia
UHPLC: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

Sumário

Capítulo 1: Introdução.....	18
1.1 Introdução e justificativa do estudo.....	18
1.2 Objetivos gerais.....	19
Capítulo 2: Revisão Bibliográfica.....	20
2.1 A exportação de frutas pelo Brasil.....	20
2.1.1 Exportação de manga.....	22
2.2 Agrotóxicos.....	23
2.3 Fiscalizações no uso de agrotóxicos.....	25
2.4 O uso da morfina na agricultura.....	26
2.5 Referências bibliográficas do Capítulo 2.....	29
Capítulo 3: Análise de morfina em manga utilizando SPE-GC-MS e MEPS-GC-MS.....	33
3.1 Técnicas analíticas utilizadas na identificação de agrotóxicos.....	33
3.1.1 Derivatização.....	33
3.1.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS).....	34
3.2 Apresentação e discussão das técnicas de preparo de amostra utilizadas neste trabalho.....	35
3.2.1 Extração em Fase Sólida – SPE.....	35
3.2.2 Microextração por Sorvente Empacotado - MEPS.....	37
3.3 Objetivos.....	39
3.4 Parte experimental.....	39
3.4.1 Materiais e reagentes.....	39
3.4.2 Equipamentos e instrumentação.....	39
3.4.3 Métodos.....	40
3.4.3.1 Preparo das soluções estoque e de trabalho.....	40
3.4.3.2 Preparo das amostras de manga.....	40
3.4.3.3 Derivatização da morfina.....	41
3.4.3.4 Preparo de amostra.....	41
3.4.3.5 Condições cromatográficas.....	42
3.5 Resultados e discussão.....	43

3.4.4	Separação cromatográfica.....	43
3.4.5	Derivatização da morfolina.....	43
3.4.6	Influência do pH na etapa de derivatização.....	46
3.4.7	Otimização do volume de derivatizante.....	47
3.5.5	Planejamento experimental para otimização da técnica de Extração em Fase Sólida (SPE).....	47
3.5.6	Robustez do método pós otimização da técnica de Extração Em Fase Sólida (SPE).....	51
3.5.7	Otimização da técnica de Microextração por Sorvente Empacotado (MEPS).....	53
3.6	Conclusão.....	55
3.7	Referências bibliográficas do Capítulo 3.....	57
Capítulo 4: Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para determinação de morfolina em manga empregando UHPLC-MS-MS.....		60
4.1	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC).....	60
4.2	Validação do método analítico.....	62
4.2.1	Limite de quantificação e limite de detecção.....	63
4.2.2	Seletividade.....	63
4.2.3	Linearidade / curva de calibração.....	63
4.2.4	Precisão.....	64
4.2.5	Exatidão.....	65
4.2.6	Recuperação.....	66
4.2.7	Outros parâmetros da validação.....	66
4.3	Objetivos.....	67
4.4	Parte Experimental.....	67
4.4.1	Materiais e reagentes.....	67
4.4.2	Equipamentos e instrumentação.....	67
4.4.3	Métodos.....	68
4.4.3.1	Preparo das soluções estoque e de trabalho.....	68
4.4.3.2	Preparo das amostras de manga.....	68
4.4.3.3	Condições cromatográficas e da espectrometria de massas sequencial.....	69
4.4.3.4	Avaliação de diferentes modos de extração.....	70
4.4.3.5	Validação do método analítico.....	70

4.5 Resultados e discussão.....	71
4.5.1 Separação cromatográfica.....	71
4.5.2 Avaliação de diferentes modos de extração.....	71
4.5.3 Avaliação de diferentes fases extratoras e solventes de eluição.....	72
4.5.4 Validação do método.....	77
4.5.4.1 Limite de quantificação e limite de detecção.....	77
4.5.4.2 Seletividade.....	78
4.5.4.3 Linearidade / curva de calibração.....	78
4.5.4.4 Precisão.....	79
4.5.4.5 Exatidão.....	80
4.5.4.6 Recuperação.....	81
4.5.5 Aplicabilidade do método.....	81
4.6 Conclusão.....	82
4.7 Referências bibliográficas do Capítulo 4.....	83
Capítulo 5: Conclusão geral e perspectivas futuras.....	85
5.1 Conclusão geral.....	85
5.2 Perspectivas futuras.....	86

CAPITULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 Introdução e justificativa do estudo

A exportação de alimentos, baseada em frutas, grãos e carnes, vem apresentando grande influência na economia de diversos países, como é o caso do Brasil, que exporta para países da Europa, Ásia e América do Norte.

O uso de agrotóxicos e substâncias não permitidas tem se tornado cada vez mais comum, uma vez que há a necessidade de se produzir mais e manter a qualidade dos produtos por um maior tempo. No entanto, países importadores de alimentos têm recusado a mercadoria recebida devido a presença de substâncias acima dos limites máximos permitidos ou simplesmente em níveis de traços. É fundamental que se faça uso de técnicas analíticas seguras para qualificação e quantificação confiável desses compostos.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é um dos órgãos responsáveis pelo registro e conhecimento de novos compostos usados pelos agricultores, visando obter produtos de maior qualidade sem afetar a saúde do consumidor. Alguns desses compostos são tóxicos e prejudiciais à saúde do homem, como é o caso da morfina, que em alguns países já é proibida em qualquer concentração por ser precursora de uma N-nitrosamina, substância extremamente tóxica.

De forma geral, ainda há muitos compostos que não apresentam estudos sobre sua toxicidade, estabilidade, poder de bioacumulação e propriedades fungicidas em frutas e seus limites de resíduos máximos são inexistentes. A cromatografia é uma grande aliada em pesquisas neste fim, permitindo análises cada vez mais rápidas, capazes de determinar vários agrotóxicos de uma só vez, mesmo que em níveis de traços.

Para melhor compreensão das estratégias e metodologias utilizadas no decorrer da pesquisa essa dissertação foi dividida em capítulos.

O Capítulo 1 baseia-se na justificativa do tema e objetivo geral do trabalho.

O Capítulo 2 da dissertação aborda, de forma geral, uma revisão bibliográfica com os assuntos tratados na mesma, buscando mostrar a importância do tema para a segurança alimentar.

O Capítulo 3 apresenta os resultados obtidos envolvendo o desenvolvimento de métodos analíticos empregando derivatização, Extração em Fase Sólida (SPE), Microextração por Sorvente Empacotado (MEPS) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) na determinação de morfolina em amostras de manga.

O Capítulo 4 descreve os resultados referentes ao desenvolvimento, otimização, validação e emprego de um método utilizando Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em tandem (UHPLC-MS/MS) para determinação de morfolina em amostras de manga.

Por fim, o Capítulo 5 possui uma conclusão geral da dissertação, assim como sugestões para trabalhos futuros.

1.2 Objetivos gerais

Tendo em vista o cenário discutido, a proposta do presente trabalho foi a comparação de duas técnicas de preparo de amostras (SPE e MEPS) e duas técnicas cromatográficas acopladas à espectrometrias de massas (GC-MS e LC-MS/MS), para a determinação do composto de interesse - morfolina - em amostras de manga.

O método que apresentasse mais sucesso seria otimizado, validado e empregado na determinação de resíduos de morfolina em amostras de manga obtidas na região.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A exportação de frutas pelo Brasil

A procura por alimentos naturais tem aumentado nos dias atuais, uma vez que a população se conscientizou do grande número de conservantes que estão embutidos em alimentos industrializados, além de serem altamente calóricos. Além disso, há um aumento do processamento de frutas para obtenção de sucos, doces e outros produtos do gênero.

O crescimento contínuo da fruticultura nacional e mundial deve-se também ao fato da ampla gama de espécies cultiváveis. O Brasil, com todas as condições favoráveis que possui, é o 3º maior produtor mundial de frutas, apenas atrás da China e da Índia, produzindo principalmente maçã, banana, manga, uva, mamão e laranja. [1] A região do submédio do Vale do São Francisco, atualmente, é um dos principais polos produtores e exportadores de frutas do país, tendo uma produção significativa de uva e manga.

Mais da metade da quantia das frutas produzidas no país é comercializada na forma processada, e aproximadamente 30% desta porção é exportada.

Em 2014, a exportação de frutas no país teve uma arrecadação de aproximadamente 900 milhões de dólares e um volume de 778 mil toneladas, pouco mais que o dobro do que no início do século XXI (Figura 2.1). [2] Deste montante, destaca-se principalmente a exportação de mangas, melões e mamões frescos. [3] Toda essa movimentação na economia, de acordo com o Projeto “Brazilian Fruit”, programa com o intuito de aproximar produtores nacionais de compradores internacionais por meio de ações estratégicas, emprega cerca de 5,6 milhões de pessoas e corresponde a 34% da mão de obra agrícola. [4]

Observa-se, pela Figura 2.1, uma queda na exportação no ano de 2009, que pode ser explicada por vários fatores: valorização do real frente ao dólar, crise econômica e questões climáticas nas regiões sudeste, sul e nordeste. No ano seguinte, os principais destinos das frutas brasileiras (EUA e Europa) se recuperaram da crise e a exportação voltou a crescer novamente, tendendo a uma estabilização nos últimos 5 anos.

Figura 2.1 – Rendimento, em milhões de dólares, da exportação de frutas do Brasil de 2001 a 2014.

Fonte: AgroStat Brasil.

Para garantir ótimas safras, produtores muitas vezes optam pelo uso indiscriminado de agrotóxicos nas plantações de frutas tendo, assim, uma maior produção e lucratividade. Segundo um estudo da ANVISA, a uva e o morango são as frutas com maior teor de contaminação de agrotóxicos no Brasil. As plantações de frutas do país são contaminadas principalmente por endossulfam, acefato e metamidofós. [5]

O consumidor preocupado com a ingestão de frutas contaminadas com estas e outras substâncias têm como alternativa de precaução a lavagem adequada dos alimentos e, quando possível, retirar a casca ou parte externa do fruto, diminuindo o risco de contaminação, além de optar por produtos não contaminados por agrotóxicos e sazonais.

A manga é uma fruta de grande importância econômica no país, sendo produzida durante o ano todo para exportação e consumo nacional. Sabe-se que há a aplicação de maneira incorreta e em excesso de diversas classes de agrotóxicos na mesma, a fim de obter um aspecto saudável nesta fruta por um tempo maior.

2.1.1 Exportação de manga

A manga, fruta tropical e quinto maior fruto produzido no mundo, [6] é rica em antioxidantes, carotenoides e ácido ascórbico. O Continente Asiático se destaca na produção desta fruta, seguido pela América Central e do Sul. No Brasil, 85,8% da safra da produção de manga é proveniente de São Paulo, Bahia, Pernambuco e Minas Gerais. [3, 7]

Ao comprar uma fruta, a preferência do consumidor considera principalmente seus parâmetros físicos, como forma, tamanho, cor, defeitos externos ou manchas, além da firmeza. Uma das características mais significativas da qualidade de manga para os consumidores é a sua firmeza, pois reflete a maturação do fruto. O processo de armazenamento e secagem deve ser seguido rigorosamente para que a fruta mantenha suas características. [8]

A variedade de manga mais comercializada no mundo todo é Tommy Atkins por ter características tais como coloração intensa, bom rendimento e resistência ao transporte a longas distâncias. Contudo, devido a grande competitividade no mercado fruticultor, é importante que o Brasil diversifique as variedades exportadas, a fim de se precaver de possíveis mudanças nas preferências dos consumidores. [9]

Segundo dados das Organizações das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO, a manga é principalmente importada pelos Estados Unidos e a União Europeia, provando que o fruto tem grande potencial econômico para os mercados globalizados do mundo. [10]

Entre os meses de janeiro a novembro de 2015, o volume de manga exportado pelo Brasil foi de 138,6 mil toneladas, rendendo US\$ 163,6 milhões, de acordo com a SECEX, sendo ambos recordes nesta temporada. O principal motivo deste aumento se deve ao fato de que a fruta além de ser exportada para a União Europeia, passou a ser comercializada também desde julho/2015 nos Estados Unidos. [11]

Na Figura 2.2 pode-se ver a tendência de crescimento da exportação da manga produzida no Brasil, tanto em volume (kg) quanto o rendimento em dólares (FOB), nos últimos 7 anos.

Figura 2.2 - Exportação da manga em US\$ (FOB) e volume (kg) nos últimos sete anos.

Fonte: SECEX, com dados de AgroStat Brasil.

Estima-se que até 2025 deverá haver um crescimento de 25,9% na produção de manga, sendo que a exportação deve aumentar em 16,9% em comparação com os dados atuais, de acordo com dados do MAPA e da Embrapa. [3]

2.2 Agrotóxicos

Agrotóxicos, também conhecidos como agroquímicos ou defensivos agrícolas, de acordo com a legislação vigente, do Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, são definidos como:

“Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.” [12]

O uso de substâncias agrotóxicas tem aumentado ao longo dos últimos anos, de modo que os alimentos mantenham uma melhor aparência e um prazo de validade estendido. Segundo uma pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), de 2002 a 2012 o comércio de agrotóxicos no Brasil aumentou 155%, passando de pouco menos de 3 quilos por hectare para 7 quilos por hectare, como pode ser visto na figura 2.3. [13]

Figura 2.3 - Comercialização anual de agrotóxicos no período de 2000 a 2012 no Brasil.

Fonte: Indicadores de Desenvolvimento Sustentável, Brasil 2015 – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Segundo esta pesquisa, São Paulo, Goiás e Minas Gerais, lideram respectivamente, o ranking como os estados que mais consomem agrotóxicos no país. Um consumo maior do que o recomendado pelas legislações, além de gerar impactos ambientais, pode vir a prejudicar a saúde do consumidor devido a toxicidade aguda e crônica destes compostos.

O aumento da procura destes compostos químicos contribui para uma maior movimentação do comércio internacional de alimentos e, como consequência, as agências reguladoras e as empresas de alimentos estão mais rigorosas, realizando mais testes, especialmente para produtos de importações. Testes em laboratórios neste setor tiveram um crescimento de aproximadamente 50% nos últimos 5 anos, com um investimento de mais de 3 bilhões de dólares. [14]

Durante o cultivo e o armazenamento pós-colheita das culturas, diferentes tipos de agrotóxicos, como inseticidas, herbicidas, fungicidas e acaricidas, são amplamente aplicados. [15] O risco que um defensivo agrícola pode causar ao consumidor é um elemento crucial para a aprovação, registro ou licenciamento do mesmo. Nem sempre a ingestão de um agrotóxico acarreta algum malefício à saúde; entretanto, o uso indiscriminado destas substâncias pode causar sérios problemas.

Para um uso consciente, é de grande importância que os agricultores tenham o conhecimento dos níveis máximos de resíduos (LMR) permitidos perante a fiscalização vigente das substâncias que utilizam. [16]

Apesar da avançada e moderna instrumentação disponível, a determinação de níveis traços de agrotóxicos em matrizes complexas de alimentos tem sido desafiante para químicos analíticos. É necessário quantificar e qualificar diversos pesticidas simultaneamente em baixas concentrações (da ordem de ng L^{-1}), de modo a minimizar os custos e tempo de análise, elevando o rendimento. As principais técnicas utilizadas e de melhor eficiência são cromatografia líquida ou cromatografia gasosa, acoplada a um espectrômetro de massas. [14] Pesquisadores estudam cada vez mais técnicas com maior sensibilidade, seletivas e rápidas para análises de agrotóxicos em alimentos.

2.3 Fiscalizações no uso de agrotóxicos

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos devido as condições de clima e solo favoráveis e extensão territorial cultivável. Em 2014 o país foi considerado o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, além do que, atualmente, exporta alimentos para mais de 180 países, tendo como principais compradores a China, União Europeia e Estados Unidos, além dos países do Mercosul. [17]

Como consequência do aumento da produção e o consumo de defensivos agrícolas no decorrer dos anos, a fiscalização destes resíduos acima dos níveis permitidos tem sido realizada por diversos órgãos do governo nacional e internacional. Segundo o Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, há três órgãos responsáveis no registro dos agrotóxicos no Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). [12]

A fim de obter um produto de alta qualidade e de aspecto diferenciado, o produtor brasileiro deve atender os requisitos de qualidade exigidos pelos importadores. No entanto, cada mercado importador tem sua especificidade, o que acaba diferindo do padrão de consumo brasileiro. Assim, vale ressaltar que as leis e os parâmetros estabelecidos por um órgão de fiscalização em uma determinada localidade pode não ser o mesmo em território diferente.

No Brasil, a fiscalização federal de agrotóxicos é coordenada pela Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins, um programa criado pelo MAPA. A fiscalização abrange estabelecimentos de produção/importação/exportação, produtos, coleta de amostras,

estações credenciadas de pesquisa, entre outras atividades. [18] A ANVISA estabeleceu no ano de 2001 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) com o intuito de monitorar os níveis de resíduos de agrotóxicos dos alimentos que chegam à mesa do consumidor e adotar medidas de controle, visando prevenir a saúde da população com intoxicações agudas ou crônicas decorrentes pela exposição de agrotóxicos através dos alimentos. [19] É responsabilidade do PARA determinar se os resíduos presentes nos alimentos comercializados no varejo estão dentro dos limites máximos (LMR) permitidos pela ANVISA. [20]

Na União Europeia, a European Food Safety Authority (EFSA), criada em 2002, apresenta relatórios anuais sobre o uso de agrotóxicos em alimentos em atividades dos estados-membros da UE. Este relatório inclui os resultados dos controles dos resíduos de defensivos agrícolas, as eventuais razões pelas quais determinados LMR foram excedidos, juntamente com quaisquer observações adequadas sobre as opções de gestão de risco e, também, uma análise dos riscos crônicos e agudos para a saúde dos consumidores de resíduos de pesticidas. [21, 22] Já os EUA, fazem uso de um relatório anual realizado pela Food and Drug Administration (FDA), agência responsável pela segurança dos alimentos que chegam ao consumidor, abordando aspectos semelhantes aos da EFSA. [23]

Mesmo com tantos órgãos responsáveis para este tipo de fiscalização, o sistema ainda é falho. No ano de 2014, um relatório entregue pela ANVISA mostra o monitoramento de 3293 amostras de apenas 13 tipos de frutas, número que representa apenas 5% do montante que é analisado nos EUA e Europa. [24]

2.4 O uso da morfolina na agricultura

A morfolina (Figura 2.4) é uma amina secundária cíclica com um grupo éter na posição para-. Em condições normais de temperatura e pressão, é um líquido incolor, higroscópico, totalmente miscível a água e com odor característico de aminas. É um fungicida sistêmico com grande aplicação na indústria, sendo utilizada principalmente em agentes clareadores óticos, adesivos, inibidores de corrosão, produção de papéis e também como um agente de proteção de revestimentos em frutas e vegetais frescos. [25,26]

Figura 2.4 - Estrutura química da morfolina

A utilização de morfolina como componente de revestimento nos alimentos ocorre na forma de vapor durante o processamento e embalagem dos mesmos.

Embora a morfolina não apresente um risco tóxico para humanos nos níveis de exposição de costume, atualmente o uso da mesma não é permitido na União Europeia e Reino Unido e não há um LMR estabelecido, devido ao fato da mesma ser uma precursora da N-nitrosomorfolina (N-mor), uma substância extremamente carcinogênica (Figura 2.5). A N-mor é uma substância pertencente a classe das N-nitrosaminas, ou seja, compostos N-nitrosos, que podem ser facilmente encontrados em fluidos biológicos, alimentos e bebidas, cosméticos, agrotóxicos, medicamentos, produtos de higiene e água e solo contaminados. [27,28]

A liberação deste composto para a atmosfera pode ocasionar, por meio de diferentes processos químicos, reações com OH, Cl, moléculas de ozônio e NO.

As reações 1 a 3 mostram o mecanismo envolvido nas reações que ocorrem para a formação de N-nitrosaminas, a partir de uma amina secundária (morfolina). [28]

A velocidade da reação de nitrosação de amins secundárias pode ser acelerada na presença de tiocianatos, cloretos e brometos. O agente nitrosante, N_2O_3 , é formado pela reação de decomposição de duas moléculas de ácido nitroso. A formação da N-nitrosamina depende do pH do meio.

Figura 2.5 - Estrutura química da N-nitrosomorfolina (N-mor).

Nos EUA, Canadá e Austrália o uso de morfolina como agente de revestimento ainda é aceito. Contudo, atualmente, estes países tem evitado o uso desta substância devido ao fato de serem grandes exportadores de frutas e precisarem respeitar o LMR do país importador. No entanto, traços de resíduos de morfolina ainda podem estar presentes em frutas e vegetais. [26,27]

A exportação de frutas, muitas vezes, envolve o transporte para países de longas distâncias, e a aplicação de agentes de revestimento se torna uma ferramenta valiosa para preservá-las com uma boa aparência até seu ponto de chegada, minimizando as perdas na produção. Estas substâncias são utilizadas desde meados de 1930. No entanto, ainda há poucos estudos para determinação e quantificação de resíduos de morfolina em alimentos sendo, muitas vezes, necessário uma etapa da derivatização para a análise da mesma.

De acordo com a pesquisa bibliográfica realizada neste trabalho, até o presente momento, não foram encontrados métodos analíticos para determinação de resíduos de morfolina em amostras de mangas.

2.5 Referências bibliográficas do Capítulo 2

- [1] SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO (SEAB). **Análise da conjuntura agropecuária**. 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2012_13.pdf> Acesso em: 29 jul. 2014.
- [2] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Oportunidades no comércio internacional de frutas**. 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fruticultura/41RO/APP_Oportunidades_41RO_Frutas.pdf> Acesso em: 01 dez. 2015.
- [3] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Projeção de agronegócios - Brasil 2014/15 a 2024/2025**. Projeções de longo prazo. Brasília, jul. 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/PROJECOES_DO_AGRONEGOCIO_2025_WEB.pdf> Acesso em: 01 dez. 2015.
- [4] INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS (IBRAF). **Brazilian fruit**. 2015. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp> Acesso em: 02 dez. 2015.
- [5] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Nota técnica de esclarecimento sobre o risco de consumo de frutas e hortaliças cultivadas com agrotóxicos**. 2007. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d0c9f980474575dd83f3d73fbc4c6735/nota+tecnica+risco+consumo+frutas+e+hortalicas.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 01 set. 2015.
- [6] INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS (IHC). **Mango**. 2014. Disponível em: <http://www.ihc2014.org/symposium_39.html> Acesso em: 29 jul. 2014.
- [7] FERRAZ, M. S. Perspectivas de mercado - produção e consumo de manga. In: Simpósio de Manga do Vale São Francisco, 1., 2005, Juazeiro. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2005. 12 p.
- [8] GALLI, J. A.; ARRUDA- PALHARIN, M. C.; FISCHER, I. H.; MARTINS, A. L. M. Características físico-químicas de variedades de manga cultivadas em sistema orgânico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 7., 2011, Fortaleza. **Livro de resumos...** Fortaleza: Cadernos de Agroecologia, 2011. v. 06, n.02, p. 01-05.

[9] EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Cultivo da Mangueira**: Mercado e comercialização da manga. 2004. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/mercado.htm>> Acesso em: 29 jul. 2014.

[10] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Tropical fruits**. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/006/y5143e/y5143e1a.htm>> Acesso em: 29 jul. 2014.

[11] PACHECO, A. L. A. Manga. **Hortifruti Brasil**, v. 14, n. 151, p. 31, 2015.

[12] BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei n. 7.802, de 11 de julho de 1989. Brasília, 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074compilado.htm> Acesso em: 30 jul. 2014.

[13] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Indicadores de desenvolvimento sustentável**. 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/defaulttab.shtm>> Acesso em: 10 nov. 2015.

[14] GONZÁLEZ-CURBELOA, M. A.; LEHOTAY, S. J., HERNÁNDEZ-BORGESB, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Use of ammonium formate in QuEChERS for high-throughput analysis of pesticides in food by fast, low-pressure gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1358, p. 75 - 84, 2014.

[15] CHOWDHURY, M. A. Z.; FAKHRUDDIN, A. N. M.; ISLAM, Md. N.; MONIRUZZAMAN, M.; GAN, S. H.; ALAM, Md K. Detection of the residues of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography-mass spectrometry. **Food Control**, v. 34, p. 457- 465, 2013.

[16] HAMILTON, D.; AMBRUS, A.; DIETERLE, R.; FELSOT, A.; HARRIS, C.; PETERSEN, B.; RACKE, K.; WONG, S.; GONZALEZ, R.; TANAKA, K.; EARL, M.; ROBERTS, G.; BHULA, R. Pesticide residues in food — acute dietary exposure. **Pest Management Science**, v. 60, p. 311 – 339, 2004.

[17] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Alimentos**. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/exportacao/alimentos>> Acesso em: 28 jul. 2014.

[18] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Fiscalização**. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/agrotoxicos/fiscalizacao>> Acesso em: 28 jul. 2014.

[19] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – PARA. **Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008**. Brasília, 15 abr. 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/pdf/150409_para.pdf> Acesso em: 28 jul. 2014.

[20] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012**. Brasília, out. 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d67107004634368583a5bfec1b28f937/Relat%C3%B3rio+PARA+2012+2%C2%AA+Etapa+-+17_10_14-Final.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 07 dez. 2015.

[21] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Guidance of EFSA: Use of the EFSA Standard Sample Description (SSD) for the reporting of data on the control of pesticide residues in food and feed according to Regulation (EC) No 396/20051**. Parma, 2014. 60 p. (Relatório técnico).

[22] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Plano estratégico da autoridade europeia para a segurança dos alimentos para 2009-2013**. Parma, 2008. 52 p. (Relatório técnico) Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/stratplan09pt,0.pdf> Acesso em: 28 jul. 2014.

[23] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **FSMA proposed rule for preventive controls for human food**. 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/ucm334115.htm>> Acesso em: 28 jul. 2014.

[24] O GLOBO. Economia. **Brasil fiscaliza agrotóxico só em 13 alimentos, enquanto EUA e Europa analisam 300**. 2014. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/economia/defesa-do-consumidor/brasil-fiscaliza-agrotoxico-so-em-13-alimentos-enquanto-eua-europa-analisam-300-11446519>> Acesso em 07 dez. 2015.

[25] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). International agency for research on cancer (IARC). **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: morpholine**. Lyon: IARC, 1999. v. 71, p.1511-1514.

[26] NORTHWEST HORTICULTURAL COUNCIL. **Morpholine issues in the United Kingdom**. 2010. Disponível em: <<http://www.nwhort.org/UKCountryAlert.html>>. Acesso em: 04 ago. 2014.

[27] HENGEL, M. J.; JORDAN, R.; MAGUIRE, W. Development and validation of a standardized method for the determination of morpholine residues in fruit commodities by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 3697–3701, 2014.

[28] RATH, S.; CANAES, L. S. Contaminação de produtos de higiene e cosméticos por n-nitrosaminas. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2159-2168, 2009.

[29] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). AGROSTAT. **Estatísticas do comércio exterior do agronegócio brasileiro**. 2015. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/AGROSTAT.html>>, Acesso em: 27 nov. 2015.

CAPÍTULO 3: ANÁLISE DE MORFOLINA EM MANGA UTILIZANDO SPE-GC-MS E MEPS-GC-MS

3.1 Técnicas analíticas utilizadas na identificação de agrotóxicos

3.1.1 Derivatização

O processo de derivatização consiste em alterar alguma propriedade do analito, de forma que se facilite a separação cromatográfica. O produto derivatizado pode ter estrutura similar a molécula de partida, mas nunca igual. [1]

A derivatização de aminas para análise em GC muitas vezes é necessária, devido a propriedades físico-químicas características destes compostos, tais como, alta polaridade, alta solubilidade em água e caráter básico. Estas características, associadas a baixa volatilidade que estes compostos geralmente apresentam, dificultam muito a análise direta por cromatografia gasosa. É comum se observar a adsorção ou decomposição (total ou parcial) da amostra na coluna do sistema cromatográfico, configurando picos cromatográficos mal definidos e assimétricos. [2,3,4]

O uso de um reagente adequado e eficiente para a derivatização proporciona uma detecção mais sensível e de maior seletividade. Na escolha de um bom reagente de derivatização deve-se levar em conta que 95% ou mais da amostra deve ser derivatizada, não deve haver contribuição para perda da amostra durante a reação, o produto gerado não deve interagir com a coluna cromatográfica (amostras polares tendem a adsorver na superfície da coluna), além de ser estável em relação ao tempo. [1]

A principal razão do uso de reagentes derivatizantes em análises por cromatografia gasosa é a baixa volatilidade de alguns compostos. Um dos fatores que influenciam na baixa volatilidade é o pequeno tamanho da molécula e as atrações intermoleculares que a mesma pode sofrer com grupos polares. A derivatização também pode ser usada como forma de auxiliar na separação dos picos da amostra com os picos de solvente.

Os modos de derivatização mais utilizados em GC são: acilação, sililação, formação de base de Schiff, formação de carbamatos e formação de amidas. [3]

A acilação, procedimento muito popular para derivatização de aminas, consiste na introdução de um grupo acil em uma molécula que contém um átomo de hidrogênio disponível. As reações que ocorrem através deste procedimento possuem condições suaves e proporcionam uma maior estabilidade ao analito.

A sililação, atualmente o método mais utilizado, confere volatilidade à amostra rapidamente com a substituição de um hidrogênio reativo de um grupo polar por um grupo alquilsilil. É indicada para detecção por espectrometria de massas, uma vez que os padrões de fragmentação formados facilitam a determinação das estruturas.

A reação de derivatização através da formação de carbamatos baseia-se na adição de um grupo alquil ao átomo de nitrogênio da amina. Pode ser aplicada para aminas primárias, secundárias e terciárias.

Já a derivatização por Base de Schiff, é realizada rapidamente com soluções aquosas de aldeídos e cetonas, é uma técnica seletiva para aminas primárias.

A formação de amidas é uma técnica de derivatização de aminas que apresenta várias vantagens, como baixo custo, alta sensibilidade, não faz uso de solventes e é facilmente automatizada com GC. Como o próprio nome sugere, promove reações para a formação de amidas. [5]

3.1.2 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

A cromatografia é uma técnica utilizada em diversos segmentos ao redor de todo o mundo. A cromatografia gasosa (GC) e a líquida (LC) são técnicas complementares, porém em determinadas situações uma é preferível ao invés da outra, devido às limitações que cada uma apresenta. Elas também competem entre si, pois diversas aplicações podem ser resolvidas com alto desempenho por ambas. [6]

O interesse em descobrir a concentração de aminas através do uso da cromatografia é relatado desde 1960, onde os métodos foram dificultados pelos sistemas de injeção e pelos materiais inadequados utilizados nas colunas. Também já se discutia a dificuldade na etapa de derivatização de aminas em matrizes aquosas. [7]

A junção da cromatografia gasosa a um espectrômetro de massas (GC-MS), duas técnicas analíticas muito conhecidas, é relativamente simples, uma vez que ambas possuem características de funcionamento compatíveis. O processo baseia-se na separação das moléculas conforme a amostra percorre o comprimento da coluna cromatográfica. (Figura 3.1)

Figura 3.1 - Esquema de um sistema de GC-MS.

Fonte: Adaptado de FERREIRA, C., 2011, p.19.

As diferentes propriedades físico-químicas de cada analito resultam em diferentes tempos de retenção. Desta forma, o espectrômetro de massas captura, ioniza, acelera e detecta cada molécula individualmente, dividindo-as em fragmentos ionizados, que serão detectados pela razão massa/carga. [8,9]

É possível identificar um composto pelo espectrômetro de massas através do auxílio de bibliotecas digitais e/ou pela injeção de padrões analíticos de elevado grau de pureza.

Através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas é possível analisar misturas complexas, em que os analitos podem ser separados, identificados e quantificados, mesmo em concentrações baixíssimas.

Os compostos adequados para esta técnica devem ser voláteis e termicamente estáveis, ou então torna-se necessário uma etapa de derivatização. [10]

3.2 Apresentação e discussão das técnicas de preparo de amostra utilizadas neste trabalho

3.2.1 Extração em Fase Sólida – SPE

Uma das principais etapas no desenvolvimento de um método analítico é o preparo da amostra. A mesma tem como objetivo extrair e concentrar os analitos de interesse, além de remover possíveis interferentes.

A Extração em Fase Sólida (SPE) é uma técnica popular muito utilizada por cromatografistas em que, na maioria dos casos, alcança-se o objetivo proposto com

sucesso. É utilizada desde 1976 e apresenta vantagens entre as técnicas de preparo de amostra clássicas (como a Extração Líquido-Líquido) como, por exemplo, um menor consumo de solvente orgânico, menor tempo de análise, altos fatores de concentração, automação e ótimas recuperações. [12,13]

A Figura 3.2 ilustra o princípio de funcionamento desta técnica. Primeiramente, toda extração por SPE necessita da etapa de condicionamento. Esta primeira etapa tem como objetivo preparar ou ativar a fase sólida do cartucho de SPE para a interação com o analito. A segunda etapa é a introdução da amostra, onde pode haver retenção dos analitos e interferentes. Em seguida pode ou não ocorrer uma etapa de lavagem, se necessário, utilizando um solvente adequado para retirar os interferentes que possuem menor interação com o sorvente do cartucho do que os analitos. Por fim, ocorre a eluição dos analitos, utilizando um volume pequeno de eluente com baixa vazão. Deve-se ressaltar que o solvente utilizado para eluição deve interagir apenas com os analitos de interesse e não com os interferentes que não foram removidos na etapa anterior. [14, 15]

Os sorventes mais utilizados em SPE são C18, C8, C2, ciclohexil, fenil, cianopropil, aminopropil, além das fases poliméricas. [12]

Parâmetros como a escolha e a quantidade de sorvente contido no cartucho, o volume de amostra e os solventes utilizados tanto para condicionamento quanto na eluição devem ser otimizados a fim de minimizar custos e tempo de análise, além de obter resultados mais favoráveis.

A Extração em Fase Sólida é uma técnica exaustiva, facilmente reprodutível e acoplável no modo online. Porém, geralmente, para cada análise realizada no modo off-line, o cartucho utilizado deve ser descartado.

Figura 3.2 - Etapas da Extração em Fase Sólida (SPE) para extração do analitos de interesse.

Fonte: Adaptado de CALDAS, S. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

3.2.2 Microextração por Sorvente Empacotado - MEPS

As técnicas de preparo de amostra, além de facilitarem a recuperação do analito da matriz, se tornam ainda mais úteis quando utilizam pouco solventes e/ou reagentes, são rápidas e de fácil manuseio. [16]

A Microextração por Sorvente Empacotado (MEPS) é a miniaturização da SPE. Esta técnica analítica foi desenvolvida em 2004, por Abdel-Rehim e consiste na redução do número de fases do método analítico, redução ou eliminação do solvente necessário para a extração, menor quantidade de amostra para a análise, adaptação no campo de amostragem e possibilidade de automação. [17]

Tanto na SPE convencional quanto em MEPS são utilizados os mesmos tipos de sorventes; ambas tem se mostrado muito atrativas para análises em amostras biológicas como urina, sangue e plasma. No entanto, em MEPS é necessário, apenas, cerca de 1 a 10 mg de material, bastante inferior ao utilizado em SPE.

Em MEPS, diferente da SPE, o processo ocorre em uma microseringa (100 a 250 μL), em que um material sorvente seletivo está empacotado em uma microcoluna (denominada BIN: *Barrel Insert and Needle*) e conectado a uma agulha.

Uma grande vantagem da técnica é a capacidade de eluir completamente o analito de interesse com volumes menores de 10 μL através da agulha da seringa. É possível acoplá-la a LC, GC ou eletroforese capilar. [18] As microcolunas de MEPS, dependendo da complexidade da amostra, podem ser reutilizadas de 50 a 100 vezes.

O material adsorvente utilizado pode ser qualquer material baseado em sílica (C2, C8, C18), troca catiônica forte (SCX), material de acesso restrito (RAM), carbono, copolímero de poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) ou polímeros impressos molecularmente (MIPs). [19,20].

As etapas utilizadas em SPE são também necessárias em MEPS: condicionamento do BIN, aspiração da amostra, lavagem (quando necessário) e eluição dos analitos com solvente, e em seguida injeção no equipamento de análise. [22]

As análises que utilizam MEPS podem ou não ser automatizadas. No processo automatizado a extração e injeção ocorrem em um autosampler; no entanto, embora mais rápido, ainda é menos utilizado que o modo “off-line” devido a seu custo de aquisição.

A Figura 3.3 ilustra uma microseringa utilizada para MEPS.

Figura 3.3 - Esquema de microseringa de MEPS, com zoom na microcoluna com material sorvente empacotado (BIN) e filtros.

Fonte: Adaptado de LAHOUTIFARD, N. SGE – analytical science.

O interesse de pesquisas com esta técnica em análises em alimentos e bebidas tem surgido desde 2006, e descreve o uso de MEPS em análises de vinho tinto, extrato de chá, gorduras, leite e produtos lácteos, cereais, ovos e carne. [20,21,23]

3.3 Objetivos

Foi-se objetivo no presente estudo a avaliação da determinação de morfolina empregando-se SPE e MEPS como técnicas de preparo de amostras, seguidas de separação por cromatografia em fase gasosa e da identificação e quantificação por espectrometria de massas (GC-MS). Para tanto, foi necessária a derivatização do analito, de modo que diminua sua polaridade e se torne volátil, tornando-se adequado para a cromatografia gasosa.

3.4 Parte experimental

3.4.1 Materiais e reagentes

O padrão analítico de morfolina e os derivatizantes cloreto de benzenossulfonila (BSC), N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) e (3-Mercaptopropil)trimetoxisilano (MPTMS) foram adquiridos de Sigma-Aldrich com grau de pureza $\geq 99\%$. Os reagentes utilizados para derivatização e extração foram: hidróxido de sódio (Mallinckrodt), ácido clorídrico (Fluka), metanol (Tedia), acetonitrila (Tedia) e acetato de etila (Tedia). A água utilizada foi purificada pelo sistema Milli-Q, da Milipore. Os cartuchos extratores utilizados Supel-Select HLB SPE Tube, 200mg, 6 mL foram adquiridos de Supelco.

3.4.2 Equipamentos e instrumentação

Foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu, GC-MS QP 5050) com uma coluna Agilent Technologies DB-5MS (30m x 0,25mm, 0,25 μ m), 5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano.

Para a execução deste trabalho usou-se também:

- Balança analítica modelo Mettler Toledo / Ag285;
- pHmetro Qualxtron modelo 8010;

- Agitador magnético com aquecimento Fisatom, modelo 752A;
- Agitador IKA VXR basic Vibrax®;
- Vórtex IKA MS 3 basic;
- Termômetro (-10 a 150°C);
- Lavadora ultra-sônica Unique;
- Balões volumétricos de 10 mL e 50 mL Pyrex®;
- Béquer 50 mL Pyrex®;
- Manifold SUPELCO Visipred™ 24;
- Dispositivos para MEPS *home-made* acoplados a uma seringa Hamilton de 250µL;
- Micropipetas Eppendorf Research® (0,5-10 µL; 10-100 µL; 100-1000 µL).

3.4.3 Métodos

3.4.3.1 Preparo das soluções estoque e de trabalho

A solução estoque da amina foi preparada em metanol, com concentração de 1000 mg L⁻¹. Essa solução foi armazenada sob refrigeração a -4°C, em frasco âmbar.

As soluções de trabalho foram obtidas por meio da diluição das soluções estoque, também em metanol. Desta forma foi realizada a fortificação das amostras de frutas para a otimização do método analítico.

3.4.3.2 Preparo das amostras de manga

As amostras de frutas foram obtidas diretamente com produtores locais da cidade de Iracemápolis/SP. Tais amostras isentas de analitos foram fortificadas com morfina para desenvolver e otimizar o método analítico, além também de verificar o efeito de matriz. A escolha da fruta manga baseou-se em um estudo prévio da literatura, bem como das informações fornecidas por comitês regulamentadores que controlam a presença de tais substâncias.

As frutas foram cortadas em pequenos pedaços aleatoriamente, retirando apenas o caroço, e armazenadas a -20°C. Em dias de análise, pesava-se 5 g da fruta em um tubo fálcon de 50 mL e adicionava-se 5 mL de água milli-Q. Agitou-se a mistura em um vórtex por 1 minuto, e em seguida foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado a vácuo, a fim de eliminar possíveis sólidos ainda contidos na amostra.

3.4.3.3 Derivatização da morfolina

Vários métodos de derivatização foram avaliados, cada qual com um reagente derivatizante diferente. Dentre eles avaliou-se cloreto de benzenossulfonila (BSC), N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) e (3-Mercaptopropil)trimetoxisilano (MPTMS).

Todos estes processos foram primeiramente testados com água ao invés de frutas, a fim de facilitar o desenvolvimento das etapas de derivatização e extração.

O procedimento com os derivatizantes MSTFA e MPTMS [24] consiste na mesma metodologia. Adicionou-se 50 µL da amostra fortificada em metanol e 50 µL do respectivo derivatizante. Agitou-se bem a mistura e aqueceu-se por 1 hora a 60°C. Injetou-se 1 µL no sistema GC-MS.

Já para a derivatização com BSC [25], fortificou 5 mL de amostra com morfolina em um tubo fálcon. Então, adicionou-se 0,5 mL de NaOH 10 M e 0,2 mL de BSC. Agitou-se a mistura por 60 minutos a 110°C, de modo a hidrolisar o excesso do reagente derivatizante. A solução foi colocada em um banho de gelo e acidificada com HCl até obter pH=5,5. Em seguida filtrou-se com filtros de seringa de 0,2 µm de celulose regenerada. Após, realizou o preparo de amostra por SPE ou MEPS.

3.4.3.4 Preparo de amostra

Para a realização da etapa de Extração em Fase Sólida (SPE), empregou-se cartuchos Supel-Select HLB, 200 mg, 6 mL, Supelco. Utilizou-se 3 mL de metanol e 3 mL de água milli-Q para condicionamento do cartucho, 5 mL de extrato derivatizado, além de 3 mL de metanol para eluição dos analitos. Secou-se toda a amostra com gás N₂ e ressuspendeu-a em 100 µL de metanol. Injetou-se 0,5 µL desta alíquota no sistema GC-MS.

Para a extração utilizando a Microextração em Sorvente Empacotado (MEPS), utilizou-se a mesma fase e os mesmos solventes utilizados em SPE, contudo em menores proporções: 250 µL de metanol e 250 µL de água milli-Q para condicionamento do cartucho, 250 µL de extrato derivatizado, e 250 µL de metanol

para eluição dos analitos. Secou-se toda a amostra com gás N₂ e ressuspendeu-a em 50 µL de metanol. Injetou-se 0,5 µL desta alíquota no sistema GC-MS.

3.4.3.5 Condições cromatográficas

Para a análise da morfolina, estabeleceu-se os seguintes parâmetros no GC-MS QP5050:

- Injetor: Split/splitless
- Modo de injeção: splitless (1 minuto de amostragem)
- Temperatura do injetor: 290°C
- Temperatura da interface: 290°C
- Coluna: Agilent Technologies DB-5MS (30m x 0,25mm, 0,25µm), 5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano.
- Temperatura programada da coluna: iniciou-se com 120°C (mantida por 3 min), aumentou-se até 220°C a 5°C/min (mantida por 5 min), e depois até 290°C a 10°C/min (manteve-se a 290°C por 5 min)
- Gás de arraste: Hélio
- Pressão da coluna: 92,3 kPa
- Velocidade linear: 40,1 cm/s
- Fluxo total: 19,2 mL/min
- Fluxo na coluna: 1,1 mL/min
- Modo de ionização: Impacto eletrônico
- Modo de aquisição: SIM
- *Solvent cut time*: 2 min

Injetou-se 0,5 µL do extrato no sistema GC-MS após a extração da amostra.

3.5 Resultados e discussão

3.5.1 Separação cromatográfica

Inicialmente, injetou-se padrões de morfolina no sistema GC-MS sem a etapa de derivatização, efetuando-se a aquisição dos dados no modo SCAN, a fim de verificar a retenção do analito no método proposto. A Figura 3.4 ilustra o resultado típico de uma dessas injeções.

Figura 3.4 - Padrão Morfolina em uma concentração de 5 mg kg⁻¹.

Pode-se observar que não há pico referente a morfolina no cromatograma, fato comprovado pelo espectro de massas. Portanto, fez-se necessária a etapa da derivatização do analito.

3.5.2 Derivatização da morfolina

Dentre os três derivatizantes testados, quando a morfolina reagiu com MSTFA e MPTMS nenhum resultado satisfatório foi obtido, uma vez que em ambos os casos o perfil cromatográfico é idêntico ao branco (amostra sem o analito de interesse), como pode ser visto nas Figuras 3.5 e 3.6.

Figura 3.5 - Cromatograma de morfolina derivatizada com MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida com concentração de 20 mg L⁻¹.

Figura 3.6 - Cromatograma de morfolina derivatizada com MPTMS ((3-Mercaptopropil)trimetoxisilano) com concentração de 20 mg L⁻¹.

No entanto, o teste que resultou em melhor resposta foi com o derivatizante cloreto de benzenossulfonila (BSC). A derivatização da morfolina mostrou-se eficiente para análise no GC-MS (figura 3.7).

Figura 3.7 - Cromatograma de morfolina derivatizada com BSC com concentração de 2 mg L⁻¹.

Aminas primárias e secundárias podem ser facilmente convertidas a derivados de N-alquilbenzenosulfonamidas quando reagem com o derivatizante cloreto de benzenossulfonila (BSC), de acordo com a reação na Figura 3.8. [25]

Os fragmentos de massas (m/z) monitorados correspondentes a morfolina derivatizada, cujo nome da nova estrutura química obtida é 4-(fenilsulfonil)morfolina, são 77, 86, 141, 184, 196, 227, em que o fragmento $m/z = 184$ foi utilizado para quantificação.

Figura 3.8 - Reação de adição da morfolina com cloreto de benzenossulfonila (BSC).

3.5.3 Influência do pH na etapa de derivatização

Realizou-se também experimentos a fim de verificar a influência do pH na reação de derivatização. Constata-se que a morfolina em meio ácido (pH = 5,5) e em solução básica (pH = 13), ou seja, sem ajuste do pH com HCl, possui picos de intensidade muito próximas, como pode ser visto na Figura 3.9.

Desta forma, conclui-se que é mais viável não realizar a alteração do pH do meio durante a etapa de derivatização, de modo a facilitar a etapa de extração (MEPS e SPE). O espectro esperado para a morfolina derivatizada, sem adição de ácido, foi obtido com êxito (Figura 3.10).

Figura 3.9 - Cromatograma da morfolina derivatizada com BSC em pH=5,5 e pH=13, além do branco.

Figura 3.10 - Espectro de massas da morfolina derivatizada com BSC, em pH=13.

O íon molecular, destacado em vermelho, possui razão $m/z = 227$, que corresponde a massa molecular da estrutura da morfolina derivatizada. Todos estes íons mostrados foram monitorados efetuando a aquisição de dados no modo SIM, em que o íon $m/z = 184$ foi utilizado para quantificação e os demais para confirmação da analito.

3.5.4 Otimização do volume de derivatizante

Após a escolha do BSC como melhor derivatizante para a derivatização da morfolina, analisou-se 3 diferentes volumes do mesmo, de forma que obtivesse máxima eficiência, ou seja, não utilizasse derivatizante em excesso, nem limitasse a derivatização do analito de interesse no meio. As injeções foram realizadas em triplicatas. (Figura 3.11)

Figura 3.11 - Comparação de diferentes volumes de derivatizante BSC (μL).

Desta forma, de acordo com os resultados mostrados no gráfico de barras, optou-se por utilizar, em cada extração, um volume de 200 μL de derivatizante BSC.

3.5.5 Planejamento experimental para otimização da técnica de Extração em Fase Sólida (SPE)

Como são muitas as variáveis que podem afetar a eficiência da extração, aplicou-se um planejamento experimental completo 2^2 , com quatro experimentos independentes e três réplicas cada, de forma que avaliou-se as variáveis volume de

solvente de eluição e o tipo de solvente de eluição. Os solventes de eluição dos analitos de interesse testados foram acetato de etila e metanol, em volumes de 1,5 e 3,0 mL, respectivamente. (Tabela 3.1)

O tipo de solvente de eluição influencia na eficiência do processo, uma vez que analitos mais polares tendem a ser removidos da fase extratora mais facilmente com solventes polares, e vice-versa. O volume do solvente também é de extrema importância para extrair a quantidade máxima de analitos de interesse da fase extratora, utilizando-se o mínimo de solvente necessário, de modo a oferecer uma menor toxicidade para o analista e também um menor impacto ambiental.

Tabela 3.1 - Variáveis e fatores do planejamento experimental ²².

Fatores			-1	+1
Volume Solvente Eluição (V)			1,5 mL	3,0 mL
Tipo de Solvente (T)			Acetato de Etila	Metanol
Ensaios	C	T	Área	
1	1	1	3318528	
2	1	1	2775336	
3	1	1	2948325	
4	-1	-1	235696	
5	-1	-1	266836	
6	-1	-1	240940	
7	1	-1	2681614	
8	1	-1	2948762	
9	1	-1	3203537	
10	-1	1	784664	
11	-1	1	654755	
12	-1	1	575144	

O tratamento estatístico foi realizado com auxílio do software Statistica 10.0, obtendo um gráfico de Pareto (Figura 3.12), para obter-se as melhores condições de análise.

Figura 3.12 - Diagrama de pareto para a morfolina derivatizada com concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o planejamento experimental 2^2 .

De acordo com o Diagrama de Pareto, a única variável significativa para a extração da morfolina derivatizada neste planejamento experimental é o volume do solvente de eluição. Também pode-se observar que a interação entre as duas variáveis não foi significativa com significância de 95%.

Na Figura 3.13 é mostrada a superfície de resposta da desejabilidade para o método desenvolvido, onde se vê a relação entre as variáveis estudadas. Pode-se ver que o método independe do tipo do solvente de eluição; no entanto, tem-se uma melhor eficiência quando se utiliza um volume de 3,0 mL para eluição dos analitos.

Figura 3.13 - Gráfico de desejabilidade e superfície de resposta para tipos de solvente e volume de solvente de eluição (mL)

Também avaliou-se a eficiência na etapa de lavagem, durante a extração por SPE. Na Figura 3.14, observa-se que esta etapa não é necessária, de forma que é mais viável não executá-la, tendo como principal vantagem minimizar o tempo de análise.

Figura 3.14 - Diferentes solventes de lavagem para a extração por SPE.

De acordo com os resultados obtidos é apresentado, na Figura 3.15, um fluxograma ilustrando o procedimento realizado de derivatização e extração por SPE.

Figura 3.15 - Fluxograma do procedimento de derivatização e extração por SPE, após otimização, da morfina em manga.

3.5.6 Robustez do método pós otimização da técnica de Extração em Fase Sólida (SPE)

Segundo o procedimento descrito anteriormente (seção 3.4.3.4), o preparo de amostra, utilizando a técnica SPE, proporciona um fator de concentração da amostra referente a 50 vezes em relação a concentração inicial. É muito comum utilizar SPE para determinação qualitativa e quantitativa de amostras muito diluídas ou em nível de traços, devido ao alto fator de concentração que esta técnica permite.

Para observar a linearidade do método, plotou-se uma curva de calibração da morfina derivatizada, em diferentes concentrações, após análise com SPE. O resultado observado é visto na Figura 3.16.

As concentrações estudadas foram: 10, 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As injeções foram realizadas em triplicata em um injetor automático (AOC – 20i *Auto injector* Shimadzu). O coeficiente de correlação (r) foi igual a 0,9899 e o coeficiente de determinação (r^2) a 0,9800, com regressão linear correspondente a $y=a+bx$, em que a é o coeficiente linear e b é o coeficiente angular. No dia seguinte a estas injeções, novamente algumas concentrações foram re-injetadas, com o auxílio de um injetor automático. No entanto, as novas áreas obtidas não foram reproduzidas quando comparadas com as do dia anterior, já que para algumas injeções de uma mesma amostra obteve-se uma maior área e em outras observava-se um decréscimo da intensidade do pico cromatográfico.

Figura 3.16 - Curva analítica da morfina derivatizada em amostras de manga, após SPE.

Preparou-se novas soluções e realizou-se a injeção de todos os níveis de forma manual; no entanto as áreas obtidas para uma mesma amostra não apresentavam coerência, oscilando os valores.

Estes novos ensaios foram realizados com o intuito de se validar a metodologia desenvolvida, após a otimização do método. Contudo, limitações causadas pelo efeito de matriz provaram que o método não é robusto. Cerca de 5 injeções de amostras de manga fortificadas com morfolina derivatizada eram o suficiente para “sujar” o liner do cromatógrafo à gás (Figura 3.17), tornando os resultados obtidos imprecisos. As áreas obtidas de uma mesma amostra, após algumas injeções, perdiam a repetitividade e uma limpeza do equipamento era necessária. Isso tornou a metodologia inviável, uma vez que, em todos os dias de análise era necessário interromper o vácuo do equipamento e realizar a limpeza do liner com solução ácida. A fonte de ionização do espectrômetro de massas também necessitava de limpeza em períodos curtos além do que, após algum tempo, a coluna cromatográfica passou a apresentar sangria durante as injeções das amostras.

Provavelmente, a grande quantidade de açúcares presentes na manga, em altas temperaturas, caramelizava na superfície do liner, e mesmo com o auxílio de lãs de vidro para evitar que resíduos contaminantes atingissem a coluna cromatográfica, era inevitável a contaminação.

Outros solventes de eluição durante a SPE foram testados, além da filtração com filtros de seringa de 0,2 μm de celulose regenerada, de modo a tornar a amostra mais limpa, porém sem sucesso.

Figura 3.17 - Imagem dos liners após injeção no sistema GC-MS de 5 amostras.

3.5.7 Otimização da técnica de Microextração por Sorvente Empacotado (MEPS)

Durante o desenvolvimento da etapa de preparo de amostra utilizando a Microextração por Sorvente Empacotado (MEPS) verificou-se que o fator de concentração da amostra seria de 5 vezes em relação ao valor inicial (dez vezes menos que em SPE). Embora MEPS apresente muitas vantagens, esta técnica possui um fator de concentração inferior quando comparada a SPE. O procedimento utilizado para extração está descrito na seção 3.4.3.4.

Para efeito de comparação entre as duas técnicas, utilizou-se as seguintes concentrações para obtenção de uma curva analítica utilizando MEPS como preparo de amostra: 0,1; 0,5; 1; 2,5 e 5 mg kg⁻¹. Assim, considerando o fator de concentração de ambas as técnicas, esperava-se resultados semelhantes. No entanto, MEPS não se mostrou reprodutível e nem sequer obteve-se cromatogramas com áreas próximas ao esperado para comparação com SPE. Além disso, as injeções realizadas em triplicata não mostraram precisão nos valores das áreas, como é mostrado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Valor das áreas de diferentes concentrações de morfina derivatizada injetadas no sistema GC-MS, após extração por MEPS, em diferentes dias de análise.

Áreas		Concentrações (mg kg⁻¹)				
<i>Dia 01</i>		0,100	0,500	1,0	2,5	5,0
	Injeção 1	-	55419	87228	97217	335573
	Injeção 2	-	59753	73430	128379	362743
	Injeção 3	-	60610	93379	130696	382757
	Média	-	58594	84679	118764	360358
	RSD	-	4,749	12,064	15,742	6,572
<i>Dia 02</i>						
	Injeção 1	-	23537	50129	99765	-
	Injeção 2	-	45380	29338	85080	-
	Injeção 3	-	53571	55248	103653	-
	Média	-	40829	44905	96166	-
	RSD	-	38,026	30,558	10,186	-

Nas concentrações de 0,100 mg kg⁻¹, de ambos os dias e de 5,0 mg kg⁻¹ no dia 2, não foi possível observar pico cromatográfico referente a morfina.

Devido a incoerência dos resultados obtidos, mais uma vez avaliou-se o padrão de morfina, realizando as etapas de derivatização e extração conforme já descritas. Novamente, os dados obtidos se mostraram inconsistentes, em que a concentração de 15 µg kg⁻¹ foi praticamente igual a de 30 µg kg⁻¹ e, 65 µg kg⁻¹ apresentava maior

área do que $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Observa-se, na Figura 3.18, que a maior área obtida (referente a concentração de $65 \mu\text{g kg}^{-1}$) é aproximadamente o dobro da anteriormente obtida para 5 mg kg^{-1} (concentração praticamente 8 vezes maior).

A extração por MEPS além de não se mostrar reprodutível, também não estava pré-concentrando a amostra analisada, o qual era o propósito inicial. Comparou-se extrações com e sem o preparo de amostra, além de variar o volume de injeção. Assim como pela extração por SPE, o melhor volume de injeção da amostra corresponde a $0,5 \mu\text{L}$. Entretanto, obteve-se picos mais intensos, ou seja, de maior área, ao não se utilizar nenhum preparo de amostra, conforme é mostrado na Figura 3.19. As injeções foram realizadas em triplicata.

O objetivo de utilizar MEPS como técnica de preparo de amostra era alcançar uma melhor faixa de trabalho devido ao seu fator de concentração, no entanto o mesmo não foi alcançado. Dessa forma, não deu-se continuidade nas extrações de morfina derivatizada com a técnica de preparo de amostra MEPS.

Figura 3.18 - Diferentes concentrações do padrão morfina derivatizada após extração por MEPS.

Figura 3.19 - Comparação da extração da morfolina derivatizada com e sem a etapa de extração MEPS, e variação do volume de injeção.

3.6 Conclusão

A etapa de derivatização da morfolina com o derivatizante Cloreto de Benzenossulfonila foi alcançada com êxito, e o método proposto é capaz de identificar e quantificar a nova estrutura química formada.

Havia o intuito de comparar as técnicas de preparo de amostra SPE e MEPS, no entanto não foram obtidos os resultados satisfatórios com a técnica MEPS. Embora seja comprovado pelo espectro de massas que houve a formação do analito derivatizado, os dados obtidos não tinham repetitividade e coerência. O sistema de dispositivo para MEPS “*home-made*” é extremamente delicado e requer experiência do analista no momento de empacotamento do BIN. É possível que o uso de uma seringa MEPS comercial acoplada a uma agulha com BIN de fase polar obtivesse resultados mais precisos para a comparação com SPE. Já a SPE se mostrou uma ótima técnica para concentração de analitos, podendo identificar e quantificar amostras em baixíssimas concentrações. Embora necessite de uma maior quantidade de solventes e amostra, além do cartucho com fase extratora ser descartado após uma única vez de uso, a SPE é uma técnica reprodutível, de fácil manuseio, rápida (afinal, várias amostras são preparadas simultaneamente) e seletiva.

Devido aos problemas que surgiram com a matriz manga, que necessitava de uma limpeza diária no liner do equipamento GC-MS, o método proposto para determinação

de morfolina por SPE-GC-MS não se mostrou robusto. É muito provável que a grande quantidade de açúcares presentes nesta fruta influenciava na eficiência das análises. Dessa forma, não era viável continuar com esta metodologia, por questões de tempo de análise e manutenção do equipamento. Uma alternativa seria utilizar uma outra técnica de preparo de amostra, como QuEChERS por exemplo. No entanto, decidiu-se não avaliar uma nova técnica de preparo de amostra, uma vez que além dos problemas de matriz, as análises de morfolina no GC-MS tinham também o desafio da etapa de derivatização. Assim, optou-se pela avaliação do uso da Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (LC-MS/MS), na qual a etapa de derivatização da amostra não seria necessária.

3.7 Referências bibliográficas do Capítulo 3

- [1] ORATA, F. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. In: **ALI MOHD, M. (Ed.) Advanced gas chromatography: progress in agricultural, biomedical and industrial applications**. Quênia: InTech, 2012. p. 83 – 108.
- [2] LOPES, M. R. M. **Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação de aminas biogénicas em licores**. 2014. 117 f. Dissertação (Mestrado em em Controlo de Qualidade na Especialidade de Água e Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2014.
- [3] FARAJZADEH, M. A.; NOURI, N.; KHORRAM, P. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 55, p. 14 - 23, 2014.
- [4] COTUGNO, P.; MONOPOLI, A.; NACCI, A.; ZAMBONIN, C. G.; CALVANO, C. D. MALDI-MS and HILIC ESI-MS/MS as versatile tools for detection of monoethanolamine degradation products in a real postcombustion carbon dioxide capture plant. **Energy&Fuels**, v. 28, p. 1295 – 1303, 2014.
- [5] LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 185 p.
- [6] SILVA, M. R. **Desenvolvimento, avaliação e aplicação de um sistema de cromatografia gasosa de alta pressão**. 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- [7] SMITHS DETECTION. **Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**. 2015. Disponível em <<http://www.smithsdetection.com/pt/tecnologias/gc-ms.html>> Acesso em: 20 fev. 2015.
- [8] CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, 2008.
- [9] UNIVERSITY OF BRISTOL - **Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS)**. 2015. Disponível em <<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>> Acesso em: 20 fev. 2015.

- [10] SACHET, F.; LENZ, S.; BRAUCH, H. Analysis of primary and secondary aliphatic amines in waste water and surface water by gas chromatography – mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene or benzenesulfonylchloride. **Journal of Chromatography A**, v. 764, p. 85-93, 1997.
- [11] FERREIRA, C. **Caracterização por GC-MS de Glícidios Derivatização assistida por microondas**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química Forense) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.
- [12] JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**. v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.
- [13] GONÇALVES, F. F.; MATOS, F. S.; ZANELLA, R. Determinação de resíduos de herbicidas em águas de lavoura de arroz irrigado empregando extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por Arranjo de Diodos. **Scientia Chromatographica**. v. 5, n. 2, p. 89-100, 2013.
- [14] TOFFOLI, A. L. **Fipronil e produtos de degradação: Adaptação de método analítico e caracterização de amostras de água, solo e sedimento da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2014.
- [15] CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.
- [16] ORLANDO, R. M.; CORDEIRO, D. D.; MATHIAS, A. E. B.; REZENDE, K. R.; GIL, E. S. Pré-Tratamento de Amostras. **Vita et Sanitas**, v. 3, n. 3, p.122-139, 2009.
- [17] PÁLENÍKOVÁ, A.; HROUZKOVA, S. Microextraction in packed syringe: solvent-minimized sample preparation technique. **Monatsh Chem**, v. 145, p. 537–549, 2014.
- [18] CATAI, A. P. F. **Avaliação de técnicas de microextração e eletroforese capilar em meio não aquoso para determinação de antidepressivos em amostras de plasmas para fins de monitorização terapêutica**. 2012. 163 f. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

[19] ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, p. 119-128, 2011.

[20] ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v.1217, n. 16, p. 2569-80, 2010.

[21] LAHOUTIFARD, N.; DAWES, P.; WYNNE, P. **Micro extraction packed sorbent (meps):** analysis of food and beverages. Ringwood: SGE – analytical science, [2010?]. 1 v.

[22] MENDONÇA, R. Q. **Avaliação de métodos multirresíduos de preparo de amostra para determinação de antimicrobianos em alimentos: QueChERS e MEPS.** 2012. 140 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

[23] SALAMI, F. H.; QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in Packed Sorbent for Determination of Sulfonamides in Egg Samples by Liquid Chromatography and Spectrophotometric Detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 9, p. 1656-1661, 2011.

[24] OHSAWA, I.; SETO, Y. Determination of nitrogen mustard hydrolysis products, ethanolamines by gas chromatography–mass spectrometry after tertbutyldimethylsilyl derivatization. **Journal of Chromatography A**. v. 1122, p. 242-248, 2006.

[25] SACHET, F.; LENZ, S.; BRAUCH, H. Analysis of primary and secondary aliphatic amines in waste water and surface water by gas chromatography – mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene or benzenesulfonylchloride. **Journal of Chromatography A**, v. 764, p. 85-93, 1997.

CAPÍTULO 4: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE MORFOLINA EM MANGA EMPREGANDO UHPLC-MS-MS

4.1 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC)

A cromatografia líquida é empregada há muitas décadas, e atualmente é uma técnica consolidada para análises em diversos ramos: química, farmacêutica, forense, ambiental e toxicológica. [1] Somente após mais de cinquenta anos de estudos e aprimoramento da técnica, surgiu a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC), que permite análises mais rápidas com maior resolução, utilizando partículas esféricas porosas menores das que se utilizava nos primórdios da técnica. [1,2] No entanto, se fez necessário uma instrumentação mais sofisticada para suportar pressões mais elevadas ocasionadas por essas partículas. O avanço das pesquisas com HPLC se fez necessário devido ao grande número de compostos que não eram possíveis de analisar por cromatografia gasosa. [3]

Recentemente, muitas melhorias tem sido realizadas nesta técnica, a fim de minimizar o tempo de análise e aumentar a eficiência do método analítico. A Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês *Ultra-High Pressure Liquid Chromatography* ou *Ultra-High Performance Liquid Chromatography* - UHPLC) faz uso de partículas porosas menores ou iguais a 2 µm de diâmetro. Os princípios de separação da UHPLC e a HPLC são muito semelhantes, no entanto diferem, principalmente, no tamanho das partículas utilizadas na fase estacionária, comprimento da coluna e vazão da fase móvel. [2,4]

A UHPLC necessita de uma instrumentação que opere a altas pressões (maiores que 1000 bar), o que aumenta o custo de aquisição de tal equipamento para o laboratório. No entanto, tem vantagens como maior resolução e detectabilidade a um menor tempo de análise, menor quantidade de fase estacionária e menores volumes de amostra e fase móvel, gerando menos resíduos, além de fácil adaptação do método desenvolvido por HPLC para UHPLC. [2,4,5]

A evolução da cromatografia líquida, utilizando cada vez mais partículas porosas menores, pode ser discutida empregando-se a equação de van Deemter. Esta equação, nos mostra os fatores responsáveis pela eficiência de uma coluna

cromatográfica, em termos de altura de prato (H , μm), relacionada com a velocidade linear da fase móvel (μ , mm/s) e tamanho da partícula (d_p):

$$H = Ad_p + \frac{BD_m}{\mu} + \frac{Cd_p^2 \mu}{D_m} \quad (1)$$

onde d_p = tamanho da partícula; μ = velocidade linear da fase móvel; D_M = coeficiente de difusão do analito e A, B e C são constantes.

O termo A refere-se aos efeitos dos múltiplos caminhos seguidos pelas moléculas do analito, e estão diretamente ligados ao alargamento dos picos. Para amenizar este problema, pode-se utilizar partículas com diâmetros menores ($<d_p$) e uniformes para o preenchimento das colunas. Partículas menores estão diretamente ligadas a redução da altura do prato, ou seja, maior eficiência. O termo B relaciona-se à difusão do soluto na fase móvel. Ao se utilizar maiores velocidades lineares da fase móvel, este fator é minimizado. Por fim, o termo C refere-se a transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária. [1,6]

Assim, com todos os termos alinhados para se obter uma maior eficiência da coluna cromatográfica (menor H), observa-se que o mínimo da curva de van Deemter representa a melhor vazão da fase móvel para o método, como pode ser visto na Figura 4.1. Quando se utiliza partículas menores ou iguais a $2 \mu\text{m}$, pode-se alcançar separações muito rápidas sem perder a eficiência, utilizando colunas curtas e com altas velocidades lineares de fase móvel. [1]

Novas fases estacionárias vem sendo pesquisadas devido ao grande aceite que a UHPLC vem tendo no campo analítico. Entre elas, destaca-se a fase estacionária HILIC, Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (do inglês, *Hydrophilic Interaction Chromatography*), que nada mais é que uma junção de elementos da fase normal com os da fase reversa da HPLC. A fase estacionária utilizada é hidrofílica (característica de fase normal) com uma fase móvel que varia entre água, tampão ou um solvente orgânico miscível com água em altas concentrações (característicos de fase reversa). Desta forma, a ordem de eluição dos analitos num sistema HILIC é proporcional à polaridade da fase estacionária, e inversamente proporcional à polaridade da fase móvel. [2,7]

Figura 4.1 - Curva de van Deemter para partículas de 10, 5, 3 e $\leq 2 \mu\text{m}$.

Fonte: Maldaner, L. v.32, n.1, p. 214-222, São Paulo, 2009.

Dentre todos os possíveis detectores acopláveis ao HPLC ou UHPLC, no presente destaca-se a espectrometria de massas sequencial (MS/MS). A espectrometria de massas nos fornece informações estruturais necessárias para quantificar os analitos em análise. Assim, o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas, se torna cada vez mais comum em análises para determinação de resíduos em alimentos. [3,5] A fonte de ionização mais utilizada para o acoplamento LC-MS é a de Electrospray (ESI), uma vez que os sistemas de ionização utilizáveis no GC-MS (impacto de elétrons e ionização química) não são adequados para LC. [8]

Pode-se dizer então, que a UHPLC já está bem estabelecida e cada vez mais utilizada em análises de rotina nos laboratórios, devido ao grande número de vantagens que apresenta. Contudo, como qualquer técnica, deve-se atentar também as limitações presentes, principalmente pelo fato de necessitar de altas pressões e um cuidado maior com a limpeza do sistema cromatográfico, quando comparada ao HPLC.

4.2 Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico, segundo a ANVISA, é imprescindível para garantir a confiança e reprodutibilidade dos resultados seguindo os parâmetros exigidos de acordo com a legislação dos órgãos responsáveis. [4,9] Os tipos de amostras e a faixa de trabalho devem ser adequados às exigências regulatórias para que o resultado seja eficiente.

As figuras de méritos mais frequentemente avaliadas em uma validação analítica são: seletividade, linearidade, curva de calibração, precisão, exatidão, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD) e recuperação. [9,10]

4.2.1 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração que se é possível quantificar com precisão e exatidão. O limite de quantificação deve ser o primeiro ponto da curva analítica, e deve ser pelo menos dez vezes maior que o ruído da linha de base.

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade detectável confiavelmente que difere-se do ruído, não precisando ser quantificada. Segundo a ANVISA, o LD deve ser pelo menos três vezes maior que o ruído da linha de base. [9,11]

4.2.2 Seletividade

É a capacidade de comprovar a presença do analito de interesse sem que haja interferência de algum outro componente de comportamento semelhante. [10,11]

Para verificar se um método analítico é seletivo, deve-se comparar uma amostra fortificada com o analito de interesse com uma amostra similar isenta de analitos. Desta forma verifica-se se há compostos interferentes da matriz que coeluem juntamente com o analito de interesse. Outra forma ainda seria a comparação dos espectros de massas de uma amostra fortificada com o analito de interesse com o espectro de um padrão puro. [12]

A importância desta etapa durante o procedimento analítico é, principalmente, de diferenciar entre a substância de interesse e substâncias semelhantes (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, componentes da matriz, entre outras). [10]

4.2.3 Linearidade / Curva de calibração

Este parâmetro permite avaliar a concentração do analito em uma dada faixa de trabalho, de modo as mesmas sejam proporcionais (lineares) ao resultado experimental (área do pico cromatográfico). A linearidade é verificada por meio de curvas analíticas, as quais devem conter, no mínimo, cinco pontos distintos, em ordem

crescente de concentração. Após a injeção das amostras nestas concentrações, é possível plotar a curva analítica, que será ajustada pela equação de uma reta (função afim):

$$y = a + bx \quad (2)$$

onde, y corresponde ao sinal analítico obtido pelo equipamento (área dos picos cromatográficos), x refere-se a concentração preparada da solução padrão, a é o coeficiente angular da reta e b o coeficiente linear da reta. [13]

Segundo o Manual de Garantia Analítica do MAPA, há três maneiras de se construir a curva analítica: curva de calibração do analito em solução (caso não exista efeito de matriz significativo), curva de calibração da matriz branca fortificada (matriz branca é fortificada) e curva de calibração do extrato de matriz branca fortificado (apenas o extrato da matriz branco é fortificado). [10]

De acordo com a maioria das normas vigentes, é aceitável um coeficiente de variação menor ou igual a 20% entre as injeções para o primeiro ponto da curva, e menor ou igual a 15% para os demais pontos. É exigido também que o coeficiente de correlação linear (r) seja maior ou igual a 0,98. [11]

4.2.4 Precisão

A precisão tende a estimar erros aleatórios dos resultados obtidos a partir das injeções de ensaios independentes entre uma mesma amostra ou amostras semelhantes. Este parâmetro é de extrema importância para definir se o método analítico é ou não confiável.

A medida da precisão é realizada calculando o desvio padrão e o desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação) de uma série de repetições da mesma amostra, preparada diversas vezes (Equações 3 e 4).

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (3)$$

$$CV (\%) \text{ ou } DPR (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (4)$$

onde s é desvio padrão, x_i é o valor individual de uma determinação, $\bar{X}$ é a média aritmética das determinações e N é o número de determinações. [11]

A precisão pode ser expressa de três maneiras distintas: repetibilidade (precisão intra-dia), precisão intermediária (precisão inter-dias) e reprodutibilidade (inter-laboratorial).

A repetibilidade ou precisão intra-dia expressa resultado de repetidas medições de uma amostra realizadas em um curto intervalo de tempo. Deve-se utilizar o mesmo analista, mesmo equipamento e mesmo procedimento de extração.

Já a precisão intermediária ou precisão inter-dias mostra a capacidade do método de repetir os mesmos resultados, no mesmo laboratório, podendo diferir o analista ou equipamento, em dias diferentes. Recomenda-se realizar a precisão intermediária com no mínimo dois dias de diferença de quando foi realizado a repetibilidade.

Por fim, a reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios diferentes, medindo-se um mesmo analito. [10]

4.2.5 Exatidão

O intuito de se verificar a exatidão de um método analítico é que haja uma concordância entre os resultados obtidos no método com os valores de referência (nominais), os quais são tidos como verdadeiros.

Após verificar a linearidade, curva de calibração e seletividade, determina-se a exatidão do método realizando a medição de três concentrações dentro da faixa de trabalho, com três réplicas cada, ou seja, nove determinações. [9]

Segundo a ANVISA, as três concentrações escolhidas devem abranger níveis de concentrações baixa, média e alta. O nível de concentração baixa deve ser igual a três vezes o valor do limite de quantificação, já nível de concentração média deve ser a média entre o primeiro e último ponto utilizados na curva analítica. O nível de concentração alta deve representar 75 a 90% do maior valor da curva de calibração. [11]

A exatidão pode ser calculada pela Equação 5:

$$Exatidão (\%) = \frac{(conc. \text{ média experimental} - conc. \text{ teórica})}{concentração \text{ teórica}} \times 100 \quad (5)$$

4.2.5 Recuperação

Recuperação pode ser definida como “o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência”. A recuperação está relacionada com a veracidade dos resultados, um vez que considera análise como um todo (etapa de extração, cleanup, derivatização...)

Assim como para a exatidão, deve-se escolher três concentrações para abranger níveis de concentrações baixa, média e alta. Se a fortificação ocorreu em uma matriz branca, a recuperação é calculada pela equação 6:

$$f_{rec} = \frac{c_f - c_{nf}}{c_{ad}} \times 100 \quad (6)$$

onde f_{rec} = fator de recuperação; c_f = teor medido após fortificação da matriz branca; c_{nf} = teor medido na matriz branca não fortificada; c_{ad} = teor do analito puro adicionado à matriz branca.

Segundo o Guia de Validação do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, o intervalo de aceitação deste parâmetro varia de acordo com a faixa de trabalho utilizada. Por exemplo, para concentrações de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, o intervalo aceito de recuperação varia de -30 abaixo de 100% a +10 acima de 100%. [10]

4.2.6 Outros parâmetros de validação

Dependendo do objetivo do estudo, outros parâmetros podem ser incluídos no processo de validação. Por exemplo, no caso de fármacos estuda-se ainda, entre outros parâmetros, a estabilidade a curto e a longo prazo. [9]

No presente estudo, seguindo os exigências do Manual de Garantia da Qualidade Analítica, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento estuda-se os seguintes parâmetros: seletividade, precisão, exatidão, linearidade, recuperação, limite de quantificação e limite de detecção.

4.3 Objetivos

Esta parte do trabalho tinha como objetivo o desenvolvimento, validação e avaliação de uma metodologia analítica, de modo que fosse possível qualificar e quantificar a morfina em manga, empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (UHPLC-MS/MS).

4.4 Parte experimental

4.4.1 *Materiais e reagentes*

O padrão analítico de morfina foi adquirido de Sigma-Aldrich com grau de pureza $\geq 99\%$. Os reagentes utilizados para a extração foram: formiato de amônio (Vetec), ácido fórmico 85% PA (Synth), hidróxido de amônio PA (Quemis), ácido acético glacial PA (Panreac), metanol (Tedia), acetonitrila (Tedia) e acetato de etila (Tedia). A água utilizada foi purificada pelo sistema Milli-Q, da Milipore. Os cartuchos extratores utilizados foram Supel-Select HLB SPE Tube, 200mg, 6 mL; Discovery DSC-C18, 3 mL e Discovery DSC-SCX, 3 mL, todos adquiridos de Supelco.

4.4.2 *Equipamentos e instrumentação*

Empregou-se um sistema ACQUITY UPLC – Xevo TQ MS LC/MS/MS, consistindo de auto injetor modelo Sample Manager, Bomba de UPLC, modelo Binary Solvent Manager, forno cromatográfico, High-Temp Column Heater, todos da Waters. A coluna utilizada foi Acquity UPLC BEH HILIC (1,7 μ m x 2,1mm x 100mm), também da Waters.

Para a execução deste trabalho usou-se também:

- Balança analítica modelo Mettler Toledo / Ag285;
- pHmetro Qualxtron modelo 8010;
- Agitador magnético com aquecimento Fisatom, modelo 752A;
- Vórtex IKA MS 3 basic;
- Lavadora ultra-sônica Unique;
- Balões volumétricos de 10 mL e 50 mL Pyrex®;
- Béquer 50 mL Pyrex®;
- Micropipetas Eppendorf Research® (0,5-10 μ L; 10-100 μ L; 100-1000 μ L);

- Manifold SUPELCO Visipred™ 24;
- Tubos falcon de 50 mL.

4.4.3 Métodos

4.4.3.1 Preparo das soluções estoque e de trabalho

A solução estoque de morfina foi preparada em acetonitrila, com concentração de 1000 mg L⁻¹. Essa solução foi armazenada sob refrigeração a - 4°C, em frasco âmbar.

As soluções de trabalho foram obtidas por meio da diluição das soluções estoque, também com acetonitrila. Desta forma foi realizada a fortificação das amostras de frutas para a otimização do método cromatográfico.

4.4.3.2 Preparo das amostras de manga

As amostras de frutas isentas de morfina, assim como na primeira parte do trabalho, também foram obtidas diretamente com produtores locais da cidade de Iracemápolis/SP. Tais amostras foram fortificadas com o analito de interesse para verificar o efeito de matriz e para o desenvolvimento e otimização do método analítico.

As frutas foram cortadas em pequenos pedaços aleatoriamente, retirando apenas o caroço, e armazenadas a -20°C. Em dias de análise, pesava-se 15 g da fruta em um tubo fálcon de 50 mL e adicionava-se 2 mL de água milli-Q. As amostras foram fortificadas neste momento. A adição de água auxilia na extração de morfina. Em seguida, adicionou-se 15 mL de 1% de ácido acético em metanol e aguardou 30 minutos. A mistura foi agitada em um vórtex por 1 minuto, e em seguida foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado. O extrato obtido foi guardado sob refrigeração por, no máximo, dois dias. Deste extrato, retirou-se 1 mL e secou-o totalmente com N₂, e então, ressuspendeu-se com 200 µL de metanol. A esta alíquota, adicionou-se 800 µL de uma solução 20mM de formiato de amônio em 90:10 H₂O/ACN (ajustados em pH = 3,5 com ácido fórmico) de forma que houvesse uma diluição 1:5 (v/v). Em seguida filtrou-se com filtros de seringa de 0,2 µm de celulose regenerada. Logo após, injetou-se 5 µL no sistema LC-MS/MS. [14]

4.4.3.3 Condições cromatográficas e da espectrometria de massas sequencial

Primeiramente, houve a otimização do método MRM (Multiple Reaction Monitoring), onde foi realizada uma infusão combinada no espectrômetro de massas. Esta infusão combinada é realizada na entrada do capilar combinando o composto de interesse (morfolina) diluída na fase móvel, que se pretende usar na separação cromatográfica. Desta forma, a morfolina é submetida a fonte de ionização em condições muito semelhantes das que serão utilizadas durante as análises.

A separação cromatográfica foi desenvolvida em modo isocrático, utilizando uma vazão de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, com fase móvel igual a 20 mM de formiato de amônio em 90:10 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (v/v, ajustados em $\text{pH} = 3,5$ com ácido fórmico), com análise num tempo de 5 minutos. O forno foi ajustado para 40°C e temperatura das amostras igual a 15°C . Monitorou-se duas transições para a morfolina, sendo uma de quantificação e outra de confirmação. O sistema ACQUITY UPLC – Xevo TQ MS LC/MS/MS foi operado no modo positivo (ES^+) nas condições mostradas na Tabela 4.1, e as transições monitoradas são mostradas na Tabela 4.2.

Tabela 4.1 - Condições utilizadas para otimização do método.

Voltagem no cone	26 mV
Tensão no capilar	3,50 kV
Temperatura da fonte	100°C
Temperatura de dessolvatação	250°C
Fluxo do gás de dessolvatação	550 L/Hr
Fluxo do gás de colisão	0,15 mL/min

Tabela 4.2 - Fragmentos monitorados pelo espectrômetro de massas para a morfolina.

Íon pai (m/z)	Fragmento (m/z)
87,90	70,02
87,90	42,04

4.4.3.4 Avaliação de diferentes modos de extração

Avaliou-se diferentes modos de extração para testar a maior eficiência do método analítico:

- (A) Os pequenos pedaços de manga foram depositados em um tubo fálcon de 50 mL, onde adicionou-se 2 mL de água, 15 mL de metanol acidificado com 1% de ácido acético e o analito de interesse. Agitou-se a mistura em vórtex por 1 minuto e aguardou 30 minutos para a centrifugação;
- (B) Os pequenos pedaços de manga foram depositados em um almofariz de porcelana, onde adicionou-se 2 mL de água, 15 mL de metanol acidificado com 1% de ácido acético e o analito de interesse. Macerou-se a mistura por 1 minuto, com auxílio de um pistilo de porcelana, e aguardou 30 minutos para a centrifugação;
- (C) Os pequenos pedaços de manga foram depositados em um tubo fálcon de 50 mL, onde adicionou-se 2 mL de água, 15 mL de 80:20 água:metanol (v/v) acidificado com 1% de ácido acético e o analito de interesse. Agitou-se a mistura em vórtex por 1 minuto e aguardou 30 minutos para a centrifugação.

Após a centrifugação, nos três casos, retirou-se uma alíquota do sobrenadante e diluiu-se numa proporção de 1:5 com 20mM de formiato de amônio em 90:10 H₂O/ACN (v/v, ajustados em pH = 3,5 com fórmico).

4.4.3.5 Validação do método analítico

A validação do método foi realizada baseando-se no Manual de Garantia da Qualidade Analítica, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Os parâmetros avaliados foram: linearidade e curva de calibração, seletividade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação. [10]

4.5 Resultados e discussão

4.5.1 Separação cromatográfica

Para a separação cromatográfica da morfolina, buscou-se desenvolver análises mais rápidas. A corrida cromatográfica teve uma duração de cinco minutos.

Na Figura 4.2, pode-se ver o Cromatograma do Íon Total (TIC) e os cromatogramas das transições estudadas pelo modo MRM (Multiple Reaction Monitoring) para uma concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de morfolina.

Figura 4.2 - Cromatograma do Íon Total (TIC) e os cromatogramas das transições estudadas pelo modo MRM (Multiple Reaction Monitoring) para uma concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ do padrão analítico de morfolina.

Ao realizar testes na matriz manga, observa-se um aumento significativo no ruído no cromatograma da primeira transição ($m/z = 70$). Desta forma, a segunda transição ($m/z = 42$) foi escolhida para quantificação dos picos cromatográficos.

4.5.2 Avaliação de diferentes modos de extração

Os resultados obtidos após a injeção no sistema cromatográfico são mostrados na Figura 4.3. De acordo com os cromatogramas obtidos, conclui-se que o melhor modo

de extração, o qual garante a maior eficiência do método com pico cromatográfico de maior resolução, é o que se refere ao item (A).

Figura 4.3 – Cromatograma do Íon total (TIC) obtido após três diferentes modos de extração. (A): Agitação com vórtex; (B): Maceração com almofariz; (C): Extração com 80:20 água:metanol (v/v) acidificado com 1% de ácido acético, agitados no vórtex.

4.5.3 Avaliação de diferentes fases extratoras e solventes de eluição

Avaliou-se também a hipótese de se utilizar a Extração em Fase Sólida (SPE) como preparo de amostra durante a otimização do método. Fez-se uso de três diferentes fases extratoras: Supel-Select HLB, 200mg, 6 mL; Discovery DSC-C18, 3 mL e Discovery DSC-SCX, 3 mL, adquiridas de Supelco, a fim de compará-las no quesito de pré-concentração da morfolina e eliminação dos interferentes da matriz.

Para as fases HLB E SCX utilizadas, coletou-se uma alíquota de amostra após passar pelo cartucho com fase extratora (cleanup) e uma outra alíquota após a eluição, a fim de compará-las.

Para os testes com as fase extratoras, os solventes e volumes utilizados nas etapas de condicionamento, lavagem e eluição são mostrados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Parâmetros da extração por SPE utilizando como fases extratoras HLB, C18 e SCX.

	HLB	C18	SCX
Condicionamento	3mL de MeOH + 3 mL de água	3mL de MeOH + 3 mL de água	3mL de MeOH + 3 mL de água
Amostra	5 mL de extrato	5 mL de extrato	5 mL de extrato
Lavagem	4 mL de água	4 mL de água	4 mL de água
Eluição	4 mL de MeOH	4 mL de MeOH	4 mL de 5% de ácido acético em MeOH

Os cromatogramas obtidos são ilustrados nas Figuras 4.4 a 4.6.

Figura 4.4 - Cromatogramas do Íon total (TIC) da morfina com concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando a fase HLB. (A): clean up (B): após etapa de eluição.

Figura 4.5 - Cromatogramas do Íon total (TIC) da morfolina com concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando a fase SCX. (A): clean up (B): após etapa de eluição.

Figura 4.6 - Cromatogramas do Íon total (TIC) do clean up realizado com a morfolina com concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando a fase C18.

Na extração com C18, devido a alta polaridade da morfolina, apenas realizou-se o cleanup, uma vez que a fase extratora tem caráter apolar e, portanto, a maior parte da concentração do analito não deveria ficar retida no cartucho.

Observa-se em todos os cromatogramas que a intensidade do pico referente a morfolina é baixa, sendo menor do que quando não utiliza-se SPE. Constata-se que, muito provavelmente, não houve grande interação do analito com as fases extratoras.

De acordo com a Figura 4.7, em meio fortemente básico, a morfolina está numa maior proporção em sua forma neutra. Uma vez que a fase extratora HLB está isenta de cargas, a mesma deve interagir de forma mais eficiente quando analisada com analitos que estão neutros também.

Desta forma, realizou-se mais uma tentativa de análise utilizando SPE. Durante a extração da morfolina é importante a acidificação com 1% de ácido acético em metanol; no entanto, é necessário neutralizar esta solução para que a morfolina esteja neutra ao entrar em contato com a fase extratora HLB. Sendo assim, adicionou-se NH_4OH após o procedimento de extração descrito na seção 4.4.3.2, até que o meio atingisse $\text{pH}=12$ (99,97% de morfolina está em forma neutra), e realizou-se então mais uma vez a SPE com a fase extratora HLB. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 4.8.

Figura 4.7 - Efeito do pH sob a ionização da morfolina.

Fonte: Chemilaze.org. Disponível em:

<<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=morpholine&source=calculate>>

Figura 4.8 - Cromatogramas do Íon total (TIC) da morfolina basificada com NH_4OH com concentração $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando a fase HLB. (A): clean up (B): após etapa de eluição.

Novamente, houve baixa interação da fase extratora com o analito. Testou-se outros solventes de eluição (acetato de etila e acetonitrila) para efeito de comparação com metanol, nestas mesmas fases já citadas, contudo, a área obtida referente ao pico cromatográfico da morfolina não obteve um aumento significativo dentre os cromatogramas já mostrados acima. A utilização da SPE como técnica de preparo de amostra, deveria retirar possíveis interferentes da matriz e, desta forma, possibilitar a obtenção de cromatogramas com menor ruído na linha de base e com picos mais intensos. No entanto, a área do pico da morfolina referente a injeção da alíquota do extrato ressuspendido em metanol e diluído em fase móvel (proporção 1:5 v/v, conforme descrito em 4.4.3.2) é superior do que quando utiliza-se SPE. Assim, torna-se mais viável não utilizar esta técnica de preparo de amostra, garantindo um processo de extração mais rápido e de menor custo. (Figura 4.9)

Figura 4.9 – Cromatograma da morfina referente ao fragmento $m/z=42$ com concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, sem etapa de SPE.

4.5.4 Validação do método analítico

4.5.4.1 Limite de quantificação e limite de detecção

A Tabela 4.4 mostra o Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) para o método desenvolvido.

Tabela 4.4 – Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ).

Limite de detecção	$3 \mu\text{g kg}^{-1}$
Limite de quantificação	$10 \mu\text{g kg}^{-1}$

O Limite de Quantificação igual a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ foi baseado em agências reguladoras da União Europeia que sugerem este valor como LQ para substâncias que não possuem um limite de resíduo permitido. [14]

4.5.4.2 Seletividade

O método analítico desenvolvido mostrou-se seletivo para a morfina. Pode-se ver pela Figura 4.10 o cromatograma da morfina numa concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (menor concentração quantificável) sobreposto ao cromatograma de uma amostra de manga isenta de analitos (branco), mostrando que não se observa a presença de compostos da matriz no tempo de retenção da morfina.

Figura 4.10 - Cromatograma da morfina numa concentração de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ sobreposto ao cromatograma de uma amostra de manga isenta de analitos, mostrando a seletividade do método.

4.5.4.3 Linearidade / Curva de calibração

A curva analítica foi construída com seis diferentes níveis, sendo eles: 10, 25, 50, 100, 150 e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$. Na Tabela 4.5 é mostrada a faixa de trabalho, a equação da reta, o coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (r^2).

Tabela 4.5 – Linearidade para determinação de morfolina em amostras de manga.

Faixa linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	10 - 200
Coeficiente de correlação (r)	0,99551
Coeficiente de determinação (r^2)	0,99104
Equação da reta	$y = 353,48752 + 29,21945x$

Nota-se que o r^2 possui valor acima de 0,99, atendendo as exigências descritas no Manual de Garantia da Qualidade Analítica, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. A Figura 4.11 mostra a curva analítica obtida para a morfolina.

Figura 4.11 – Curva analítica para a morfolina em amostras de manga.

4.5.4.4 Precisão

A medida de precisão foi realizada calculando o desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação) dos mesmos seis níveis de concentração utilizados na curva analítica. Para cada nível, preparou-se triplicatas. Analisou-se a repetitividade (intra-dias) e a precisão intermediária (inter-dias). A precisão intermediária foi analisada em dois diferentes dias. Os dados obtidos estão apresentados de maneira resumida na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Dados obtidos para estudo de repetitividade e precisão intermediária.

Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Repetitividade (RSD)	Precisão intermediária - dia 01 (RSD)	Precisão intermediária - dia 02 (RSD)
10	7,66	9,33	18,55
25	8,91	6,10	6,93
50	12,31	11,71	9,24
100	13,49	14,44	7,94
150	6,46	12,56	2,43
200	14,29	10,86	14,39

Pode-se observar que os desvios relativos são menores que 15% para a precisão intra-dias e inter-dias, com exceção do nível $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ no dia 02. No entanto, por se tratar do primeiro ponto da curva analítica, é aceitável um desvio relativo menor ou igual a 20%, segundo as exigências do Manual de Garantia da Qualidade Analítica, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

4.5.4.5 Exatidão

A medida de exatidão foi realizada por meio de cálculos do desvio padrão relativo e seguindo a equação (5) mostrada na seção 4.2.4. Contudo, para a exatidão apenas três níveis foram analisados: alto, médio e baixo. A escolha dos níveis foi baseada nos critérios exigidos pela ANVISA. Cada nível foi preparado em triplicata.

Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.7. Uma vez que os valores obtidos são menores que 15% (exigência das agências reguladoras), o método desenvolvido mostrou-se exato.

Tabela 4.7 – Dados obtidos para estudo da exatidão.

Concentração	RSD (%)	Exatidão (%)
30	9,79	13,37
110	2,33	6,80
160	1,68	-0,92

4.5.4.6 Recuperação

A recuperação do método foi calculada pela equação (6) de acordo com os critérios exigidos pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Três níveis distintos, assim como na exatidão, foram escolhidos para avaliar este parâmetro. Seguindo a equação descrita na seção 4.2.7, os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.8. Os resultados estão dentro dos critérios de aceitabilidade exigidos pela norma, uma vez que, são aceitáveis recuperações do analito, em cada nível de fortificação, dentro do intervalo de 70 – 120%.

Tabela 4.8 – Valores de recuperação para o método validado.

Concentração	Recuperação (%)
30	113,30
110	106,80
160	99,07

4.5.4 Aplicabilidade do método

A aplicabilidade do método ocorreu através de análises de amostras de mangas de diferentes supermercados da cidade de São Carlos – SP. Analisou-se 5 diferentes variedades de mangas: Palmer, Tommy Atkins, Rosa, Haden e Pele de Moça. As análises foram realizadas em triplicata e a corrida cromatográfica consistia na injeção de padrões controle entre as amostras de manga, de forma a assegurar a precisão do equipamento.

No entanto, não foi observada a presença da morfina para as amostras analisadas. Na Figura 4.12 é possível observar que não há pico cromatográfico referente ao analito de interesse em nenhum dos fragmentos monitorados.

Figura 4.12 – Exemplo de cromatograma de uma das amostras de manga analisadas.

4.6 Conclusão

O método desenvolvido por UHPLC-MS/MS permitiu a análise de morfina em amostras de manga, sendo possível identificar e quantificar o analito de interesse. A validação provou que o método é preciso e exato, além de possuir uma ótima recuperação, com resultados dentro dos critérios de aceitabilidade exigidos pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

A metodologia desenvolvida mostrou-se simples, rápida e eficiente, uma vez que mesmo com a complexidade da matriz e sem nenhuma técnica de preparo de amostra foi possível determinar um limite de quantificação consideravelmente pequeno e aceitável para substâncias não permitidas.

O método foi aplicado na análise de amostras de mangas de diferentes variedades obtidas na cidade de São Carlos-SP. No entanto, as amostras analisadas não estavam contaminadas com o analito em questão.

4.7 Referências bibliográficas do Capítulo 4

- [1] MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, p. 214-222, 2009.
- [2] MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**. v. 4, p. 197-207, 2012.
- [3] MENDONÇA, R. Q. **Avaliação de métodos multirresíduos de preparo de amostra para determinação de antimicrobianos em alimentos: QueChERS e MEPS**. 2012. 140 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- [4] MATUMOTO, P. Y.; ALCÂNTARA, F. C. Estudo comparativo entre técnicas de cromatografia líquida utilizadas para otimização de metodologia analítica de citrato de sildenafil. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, v. 01, n. 02, p. 01-09, 2014.
- [5] PORTO, H. S. M. **HPLC versus UPLC: avaliação de aspectos críticos à transferência e validação de métodos analíticos**. 2014. 118 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica) - Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.
- [6] LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. São Carlos. Editora Átomo. 2009. 382 p.
- [7] LANÇAS, F. M. Cromatografia líquida com interação hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica**. v. 2, n.1, p. 49-57, 2010.
- [8] IGLESIAS, A. H. Introdução ao acoplamento cromatografia líquida – espectrometria de massas. **Waters Technologies do Brasil**. Barueri, [2010?]. 13 p. (Relatório técnico). Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20ao%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20-%20espectrometria%20de%20massas.pdf>> Acesso em: 02 fev. 2016.
- [9] Brasil. Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 20 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 02 fev 2016.

- [10] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de garantia da qualidade Analítica**. Brasília: MAPA/ACS, 2011. 227p.
- [11] CASSIANO, N. M.; BARREIRO J. C.; MARTINS, L. R. R. M.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.
- [12] TOFFOLI, A. L. **Fipronil e produtos de degradação: Adaptação de método analítico e caracterização de amostras de água, solo e sedimento da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2014.
- [13] LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análises**. São Carlos, SP: Editora Rima, 2004. 46 p.
- [14] HENGEL, M. J.; JORDAN, R.; MAGUIRE, W. Development and validation of a standardized method for the determination of morpholine residues in fruit commodities by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 62, p. 3697–3701, 2014.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1 Conclusão geral

O desenvolvimento deste trabalho mostrou a possibilidade de identificar morfolina em amostras de mangas através de duas diferentes técnicas cromatográficas: gasosa e líquida.

Para a identificação do composto alvo através de um sistema GC-MS foi necessária a inclusão de uma etapa de derivatização; a dificuldade do acréscimo de mais uma etapa foi superada e o método desenvolvido se mostrou seletivo. As limitações da matriz manga para o método proposto, nos mostram a importância do preparo de amostras em análises. O método desenvolvido por SPE-GC-MS mostrou-se eficiente para o analito derivatizado, no entanto, não foi considerado robusto devido ao efeito de matriz. A metodologia MEPS-GC-MS permite utilizar menor quantidade de fase extratora e solventes, além de ser mais rápida do que quando comparada a SPE. Contudo, o sistema “*home-made*” desenvolvido para MEPS é extremamente delicado e requer prática do analista para o empacotamento do BIN com fase extratora.

Outro fator que merece comentário é a dificuldade para se trabalhar com compostos de baixa massa molecular e alta polaridade através da cromatografia, seja líquida ou gasosa. Adicionalmente, há ainda poucas pesquisas utilizando MEPS na área de alimentos, o que dificulta obter-se informações sobre efeito de matriz e outras nesta técnica. Vale a pena ressaltar também que, sempre que possível, a etapa da derivatização deve ser evitada, por se tratar de uma etapa que aumenta o tempo de análise, introduz impurezas do agente derivatizante e seus produtos de degradação e pode vir a ser fonte de erros para o restante da pesquisa.

Já a cromatografia líquida se mostrou capaz de identificar e quantificar a morfolina em baixas concentrações sem nenhum preparo de amostra. A alta polaridade do analito exigiram cuidados na escolha da coluna e fase móvel, porém a metodologia desenvolvida foi validada seguindo critérios aceitabilidade do MAPA: precisão, exatidão, seletividade, curva analítica, limite de detecção e quantificação e recuperação.

5.2 Perspectivas futuras

Pretende-se avaliar a eficiência de outras técnicas de preparo de amostra para a metodologia GC-MS como, por exemplo, QuEChERS, com o intuito de evitar a contaminação do liner e da coluna cromatográfica e, conseqüentemente ter resultados coerentes, viabilizando a validação desta metodologia.

Para o desenvolvimento da metodologia para identificação de morfina por UHPLC-MS/MS, a limitação do tempo não permitiu a realização de um planejamento experimental, o que teria sido desejado e poderia contribuir para a otimização do método. Além disso, a eficiência de outras técnicas de preparo de amostra, como SPME, SBSE e “in tube SPME”, devem ser avaliadas a fim de obter-se um método ainda mais sensível e rápido.

Ambos os métodos desenvolvidos neste trabalho podem ser aprimorados e usados como base para o desenvolvimento de outros.