UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Desenvolvimento de novos materiais para *in-tube*
SPME acoplada *on-line* com UPLC-MS/MS e
aplicações na análise de amostras de interesse
ambiental e de alimentos**

ANA LÚCIA DE TOFFOLI

São Carlos

2018

ANA LÚCIA DE TOFFOLI

**Desenvolvimento de novos materiais para *in-tube*
SPME acoplada *on-line* com UPLC-MS/MS e
aplicações na análise de amostras de interesse
ambiental e de alimentos**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

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

2018

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: *Ana Lúcia de Toffoli*
Data: 29/05/2018

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

Toffoli, Ana Lúcia de

Desenvolvimento de novos materiais para in-tube SPME acoplada on-line com UPLC-MS/MS e aplicações na análise de amostras de interesse ambiental e de alimentos. / Ana Lúcia de Toffoli. — São Carlos, 2018.
183 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2018.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

1. Química analítica. 2. Método cromatográfico. 3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus pais Célia e Antônio que me ensinaram valores incontestáveis nessa vida e nunca mediram esforços e sacrifícios para fazer sempre o melhor para mim. Pela imensurável dedicação, amor e compreensão. Ao meu namorado Hugo pelo seu amor, carinho, zelo e companheirismo que foram essenciais para mim durante todos esses anos. Por me ajudar a superar as dificuldades e pelo constante apoio e incentivo. Dizer obrigada nunca será suficiente para expressar a gratidão que sinto por vocês.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus por sempre me abençoar e iluminar o meu caminho me dando forças, sabedoria, proteção e coragem. Obrigada meu Deus pela fé diária que me acrescenta e por acalmar meu coração com a certeza de que tudo dará certo, mesmo que seja no Seu tempo.

À Nossa Senhora Aparecida por sempre interceder por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças por todos ensinamentos e oportunidades que me proporcionou durante esses anos. Agradeço pelo privilégio de ter sido sua orientanda e por ter me recebido no grupo de Cromatografia. Obrigada pela orientação, aprendizado, incentivo, confiança, apoio e pelas inúmeras contribuições para a minha formação pessoal e acadêmica.

Aos familiares por todo carinho e ajuda durante esses anos, vocês foram muito importantes nessa minha caminhada.

À Prof^ª. Dr^ª. Eny Maria Vieira pela amizade, carinho e por todos ensinamentos transmitidos e a Dr^ª Silvia Brondi pela doação de amostras de leite. Agradeço ambas pela participação no exame de qualificação, pelas contribuições e por todo saber compartilhado.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Olímpia de Oliveira Rezende e à Prof^ª. Dr^ª. Eny Maria Vieira pelas oportunidades de realização dos estágios PAE durante o doutorado e por todo aprendizado proporcionado.

Ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto por sempre estar disposto a ajudar os alunos do grupo e contribuir com os trabalhos.

À CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP e ao CNPQ pelo apoio financeiro dos projetos do grupo.

Aos técnicos Elaine e Guilherme e a Odete pela atenção, dedicação, paciência e apoio durante esses anos para o desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas que o doutorado me deu: Amanda L., Mariane, Patrícia e Vivane, por todos os momentos que passamos juntas e pela amizade que foi estabelecida durante esses anos. A

Amanda T., Glaucia e Kamilla pela amizade, conselhos e experiências divididas durante o mestrado e doutorado.

A todos os colegas do Laboratório de Cromatografia (CROMA), que estiveram comigo durante esse anos, agradeço pelas contribuições, companhias, aprendizados, auxílios, momentos de descontração e por toda a ajuda disponibilizada com este trabalho.

À Universidade de São Paulo (USP) e ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) pela infraestrutura e auxílio durante esses anos.

Gostaria de agradecer novamente a todas as pessoas que de alguma forma tornaram a realização desse trabalho possível, que me apoiaram durante esses anos e estiveram presentes na minha vida. Sabemos que agradecimentos nunca são suficientes. O sentimento sempre é maior do que as palavras.

MUITO OBRIGADA!

“Faça o que é certo, não o que é fácil. O nome disso é ÉTICA.
Para realizar coisas grandes, comece pequeno. O nome disso é PLANEJAMENTO.
Aprenda a dizer “não”. O nome disso é FOCO.
Parou de ventar? Comece a remar. O nome disso é GARRA.
Não tenha medo de errar, nem de rir dos seus erros. O nome disso é CRIATIVIDADE.
Sua melhor desculpa não pode ser mais forte que seu desejo. O nome disso é VONTADE.
Não basta iniciativa. Também é preciso ter “acabativa”. O nome disso é EFETIVIDADE.
Se você acha que o tempo voa, trate de ser o piloto. O nome disso é PRODUTIVIDADE.
Desafie-se um pouco mais a cada dia. O nome disso é SUPERAÇÃO.
Para todo “game over”, sempre existe um “play again”. O nome disso é VIDA.”

Autor desconhecido

RESUMO

Diante da crescente necessidade de se monitorar diferentes contaminantes em matrizes complexas se faz necessário utilizar uma etapa de preparo de amostras eficiente e que esteja aliada à técnicas analíticas de elevada sensibilidade. Consequentemente, vem se aprimorando e desenvolvendo novos materiais sorventes utilizados para aumentar o desempenho do preparo de amostras. Atualmente, os materiais sorventes seletivos como líquidos iônicos, polímeros impressos molecularmente, grafeno, entre outros, vêm se destacando para extrair diferentes compostos. Diante desse contexto, este estudo teve como objetivo desenvolver diferentes materiais extratores para serem utilizados na microtécnica de extração *in-tube* SPME acoplada *on-line* com UPLC-MS/MS na análise de triazinas e sulfonamidas em matrizes complexas. O material que apresentou maior seletividade pelas classes dos compostos de interesse foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia vibracional na região do infravermelho. Tanto para as triazinas quanto para as sulfonamidas o polímero impresso molecularmente apresentou maior afinidade e foi utilizado como fase extratora para extrair e pré-concentrar os analitos utilizando a microtécnica *in-tube* SPME UPLC-MS/MS. Além disso, para as triazinas utilizou-se também como fase de extração óxido de grafeno ancorado em sílica. As metodologias desenvolvidas nessa tese foram todas otimizadas e posteriormente validadas para analisar as matrizes de interesse que foram: uva, suco de uva integral, leite e água. Após à validação, as amostras foram analisadas com seus respectivos métodos validados, sendo que nenhum dos analitos foram encontrados considerando-se os baixos limites de detecção dos três métodos desenvolvidos ($2,8-7,5 \text{ ng L}^{-1}$; $1,1-2,9 \text{ ng L}^{-1}$; $0,01-1,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), boa recuperação, rapidez e baixo volume de amostra é necessário nas análises das triazinas e sulfonamidas. Outra abordagem explorada nesse trabalho foi o desenvolvimento de colunas tubulares abertas do tipo PLOT para serem utilizadas como colunas de extração em sistemas automatizados na cromatografia líquida. Colunas de sílica fundida foram preparadas para avaliar a formação da fase e sua aderência na parede do tubo. Para as colunas PS-DVB, os melhores resultados foram obtidos com duas horas de polimerização em banho de água. No entanto, para as colunas ODS a polimerização foi feita utilizando forno, e a fase não aderiu corretamente na parede do tubo para as colunas de $250 \text{ } \mu\text{m}$ de diâmetro interno, requerendo estudos mais aprofundados para o preparo adequado destas colunas.

ABSTRACT

In view of the increasing need to monitor different contaminants in complex matrices, it is necessary to use efficient sample preparation techniques combined with highly sensitive analytical techniques. Consequently, new sorbent materials have been improved and developed to be used aiming to increase the performance of sample preparation and stationary phases for high performance liquid chromatography. Currently, selective sorbents such as ionic liquids, molecularly imprinted polymers, graphene, among others, have been emphasized to extract different contaminants. In this context, this thesis aimed to develop different extractive materials to be used in *in-tube* solid phase microextraction coupled *on-line* with UPLC-MS/MS in the analysis of triazines and sulfonamides in complex matrices. The material that presented greater selectivity for the classes of the compounds of interest was characterized by scanning electron microscopy and vibrational spectroscopy in the infrared region. For triazines and sulfonamides the molecularly imprinted polymer had higher affinity and was used as the extractive phase to extract and preconcentrate the analytes using the *in-tube* SPME UPLC-MS/MS. In addition, another extraction phase graphene oxide anchored in silica was also used. The methodologies developed in this thesis were all optimized and later validated to analyze the target compounds in the following matrices: grape, grape juice, milk and water. After the validation, the samples were analyzed with their respective validated methods and none of the analytes were found considering the low detection limits of the three methods developed (2.8-7.5 ng L⁻¹, 1.1-2.9 ng L⁻¹, 0.01-1.6 µg L⁻¹), good recovery, rapidity and low sample volume is required in the triazine and sulfonamide analyzes. Another approach explored in this work was the development of open tubular columns (PLOT) to be used as extraction columns in automated sample preparation - liquid chromatography systems. Silica columns were prepared in order to evaluate the formation of the phase and its adhesion to the tube wall. For the PS-DVB columns the best results were obtained with two hours of water-bath polymerization. However, for the ODS columns the polymerization done using an oven the phase did not adhere correctly in the tube wall the columns with 250 µm internal diameter. These results suggest that further experiments are required in order to better understand the preparation of these columns.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Processo de extração e pré-concentração dos analitos utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME) nos dois modos: (A) headspace e (B) direta.	3131
Figura 2.2: Esquema do processo de impressão molecular.	388
Figura 2.3: Esquema da síntese do líquido iônico suportado em partículas de sílica.....	4040
Figura 2.4: Esquema da síntese do grafeno a partir do grafite.	422
Figura 4.1: Resultados do teste de seletividade para as triazinas com os materiais sintetizados.	6666
Figura 4.2: Resultados do teste de seletividade para as sulfonamidas com os materiais sintetizados.	677
Figura 4.3: Espectros de absorção vibracional na região do infravermelho dos polímeros MIP e NIP para as triazinas.	688
Figura 4.4: Espectros de absorção vibracional na região do infravermelho dos polímeros MIP e NIP para as sulfonamidas.	699
Figura 4.5: Imagens da microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 10.000 vezes: A) MIP e B) NIP para as triazinas.	70
Figura 4.6: Imagens da microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 10.000 vezes: A) MIP e B) NIP para as sulfonamidas.	70
Figura 5.1: Configuração do sistema <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS.	8181
Figura 5.2: Esquema de montagem da coluna utilizada para extração dos analitos.	822
Figura 5.3: Coluna extratora já inserida na válvula de comutação.	83
Figura 6.1: Estruturas das triazinas estudadas.	899
Figura 6.2: Cromatograma do íon total do suco de uva tinto integral fortificado com os analitos na concentração de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$	977
Figura 6.3: Monitoramento de transições selecionadas (SRM) para cada analito estudado.	977
Figura 6.4: Influência do volume de injeção na concentração dos analitos estudados empregando-se o sistema <i>in-tube</i> SPME.	988
Figura 6.5: Influência do tempo de carregamento da amostra na concentração dos analitos estudados empregando-se o sistema <i>in-tube</i> SPME.	999

Figura 6.6: Influência da variação do fluxo de carregamento da amostra na concentração dos analitos estudados empregando-se o sistema <i>in-tube</i> SPME.....	100
Figura 6.7: Influência da porcentagem do solvente orgânico acetonitrila no carregamento da amostra na concentração dos analitos estudados empregando-se o sistema <i>in-tube</i> SPME.....	101
Figura 6.8: Comparação entre os cromatogramas do suco de uva tinto integral isento do analito e o mesmo fortificado com as triazinas na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$	102
Figura 6.9: Curva analítica da simazina em suco de uva tinto integral.	1033
Figura 6.10: Curva analítica da atrazina em suco de uva tinto integral.....	103
Figura 6.11: Curva analítica da ametrina em suco de uva tinto integral.	104
Figura 6.12: Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de suco de uva tinto integral sem contaminação e a mesma fortificada em duas concentrações diferentes....	10707
Figura 6.13: Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de uva sem contaminação e a mesma fortificada em duas concentrações diferentes.....	1088
Figura 7.1: Cromatograma do íon total da amostra de água fortificada com os analitos na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$	12020
Figura 7.2: Influência do volume de injeção na concentração dos analitos estudados empregando-se o sistema <i>in-tube</i> SPME.	12222
Figura 7.3: Influência da variação do tempo de carregamento da amostra na concentração dos analitos estudados empregando-se o sistema <i>in-tube</i> SPME.....	12323
Figura 7.4: Comparação entre os cromatogramas da amostra de água isenta do analito e a mesma fortificada com as triazinas na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$	12424
Figura 7.5: Curva analítica da simazina em amostra de água.	12525
Figura 7.6: Curva analítica da atrazina em amostra de água.	1266
Figura 7.7: Curva analítica da ametrina em amostra de água.....	1266
Figura 7.8: Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de água e a mesma fortificada com $2 \mu\text{g L}^{-1}$	13030
Figura 7.9: Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de água sem contaminação e a mesma fortificada com $4 \mu\text{g L}^{-1}$	13030
Figura 8.1: Estruturas das sulfonamidas estudadas.	14040

Figura 8.2: Cromatogramas do íon total da amostra de leite fortificada com os analitos nas concentrações de (A) 100 µg L ⁻¹ e (B) 500 µg L ⁻¹ . Sendo, 1 - SDZ; 2 - STZ; 3 - SMR; 4 - SMZ; 5 - SCP; 6 - SMX; 7 - SDM e 8 - SQX.	1488
Figura 8.3: Cromatogramas individuais do monitoramento das transições selecionadas (SRM) para cada analito estudado na concentração de 100 µg L ⁻¹	1499
Figura 8.4: Influência do volume de injeção na concentração dos analitos empregando-se o sistema <i>in-tube</i> SPME.	15050
Figura 8.5: Influência do tempo de carregamento da amostra na concentração dos analitos empregando-se o sistema <i>in-tube</i> SPME.	1511
Figura 8.6: Influência da variação do fluxo de carregamento da amostra na concentração dos analitos empregando-se o sistema <i>in-tube</i> SPME.	15252
Figura 8.7: Influência da porcentagem do solvente orgânico acetonitrila no carregamento da amostra na concentração dos analitos empregando-se o sistema <i>in-tube</i> SPME....	15252
Figura 8.8: Comparação entre os cromatogramas de leite integral isento do analito e o mesmo fortificado com as sulfonamidas na concentração de 100 µg L ⁻¹ . Sendo, 1 - SDZ; 2 - STZ; 3 - SMR; 4 - SMZ; 5 - SCP; 6 - SMX; 7 - SDM e 8 - SQX.	15353
Figura 8.9: Curva analítica da sulfadiazina em leite integral.	15555
Figura 8.10: Curva analítica da sulfatiazol em leite integral.	15555
Figura 8.11: Curva analítica da sulfamerazina em leite integral.	1566
Figura 8.12: Curva analítica da sulfametazina em leite integral.	1566
Figura 8.13: Curva analítica da sulfaclopiridazina em leite integral.	1577
Figura 8.14: Curva analítica da sulfametoxazol em leite integral.	1577
Figura 8.15: Curva analítica da sulfadimetoxina em leite integral.	1588
Figura 8.16: Curva analítica da sulfaquinoxalina em leite integral.	1588
Figura 8.17: Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de leite integral sem contaminação e a mesma fortificada na concentração de 10 µg L ⁻¹	16363
Figura 9.1 Ilustração de um corte frontal dos tipos de colunas miniaturizadas.	17070
Figura 9.2: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do capilar de sílica fundida de 250 µm pré-tratado, sem estar revestido internamente com o sorvente de interesse.	1755

Figura 9.3: Capilares de sílica fundida de 250 μm pré-tratados e com fase polimerizada em diferentes tempos: (A) 0,5; (B) 1,0 e (C) 2,0 horas de polimerização em banho de água.....	1755
Figura 9.4: Capilares de sílica fundida de 100 μm pré-tratados e com fase polimerizada em diferentes tempos: A) 0,5; B) 1,0 e C) 2,0 horas de polimerização em banho de água. As imagens A1, B1 e C1 são as ampliações para cada tubo.	1766
Figura 9.5: Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da coluna ODS-OT utilizando capilar de sílica fundida de 250 μm pré-tratado.	1777
Figura 9.6: Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das colunas ODS-OT utilizando capilar de sílica fundida de 100 μm pré-tratado sem (A) e com (B) ampliação da fase.	1788

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Condições cromatográficas na separação das triazinas e sulfonamidas por HPLC - UV/Vis.....	64
Tabela 4.2: Comparação do fator de retenção do MIP e NIP para as triazinas e sulfonamidas em relação a alguns interferentes variando a porcentagem de fase móvel pela coluna extratora.	72
Tabela 4.3: Fator de separação dos polímeros impressos molecularmente que foram sintetizados para as triazinas e sulfonamidas.	73
Tabela 4.4: Fator de impressão dos polímeros sintetizados.	74
Tabela 4.5: Índice de retenção dos polímeros sintetizados.	75
Tabela 6.1: Parâmetros otimizados no MS/MS para análise das triazinas.	93
Tabela 6.2: Etapas de extração, eluição, limpeza e condicionamento do sistema <i>in-tube</i> SPME.	93
Tabela 6.3: Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método para as triazinas. ...	102
Tabela 6.4: Resultados obtidos na validação para repetitividade e precisão intermediária.	105
Tabela 6.5: Resultados obtidos na validação para exatidão.	105
Tabela 6.6: Resultados obtidos na validação para recuperação.....	106
Tabela 6.7: Fator de concentração para os analitos simazina, atrazina e ametrina utilizando o sistema <i>in-tube</i> SPME.	106
Tabela 7.1: Etapas de extração, eluição, limpeza e condicionamento do sistema <i>in-tube</i> SPME.	117
Tabela 7.2: Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método para as triazinas. ...	124
Tabela 7.3: Resultados obtidos na validação para repetitividade e precisão intermediária.	127
Tabela 7.4: Resultados obtidos na validação para exatidão.	127
Tabela 7.5: Resultados obtidos na validação para recuperação.....	128
Tabela 7.6: Fator de concentração para os analitos simazina, atrazina e ametrina utilizando o sistema <i>in-tube</i> SPME.	129
Tabela 8.1: Parâmetros otimizados no MS/MS para análise das sulfonamidas.	144
Tabela 8.2: Etapas de extração, eluição, limpeza e condicionamento do sistema <i>in-tube</i> SPME.	145
Tabela 8.3: Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método para as sulfonamidas.	154

Tabela 8.4: Resultados obtidos na validação para repetitividade e precisão intermediária.	159
Tabela 8.5: Resultados obtidos na validação para exatidão.	160
Tabela 8.6: Resultados obtidos na validação para recuperação.....	161
Tabela 8.7: Fator de concentração para as oito sulfonamidas analisadas utilizando o sistema <i>in-tube</i> SPME.....	162

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIBN – 2,2' azobis(2-metil-propionitrila)

AM – ametrina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ar – argônio

AT – atrazina

C_0 – concentração inicial do analito

C18 – octadecilsilano

C4 – butil

C8 – octil

cLC – cromatografia líquida capilar

CO – monóxido de carbono

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente no Brasil

DCC – dicitlohexilcarbodiimida

DMF – dimetilformamida

DVB – divinilbenzeno

EGDMA – etilenoglicol dimetacrilato

ESI – ionização por electrospray

EU – *European Union*

FDA – *Food and Drug Administration*

FTIR – espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de fourier

G – grafeno

GC – cromatografia gasosa

GO – óxido de grafeno

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICH – *International Council for Harmonisation of Technical Requeriments for Pharmaceuticals for Human Use*

I_f – fator de impressão

ILs – líquidos iônicos

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

In-tube SPME – microextração em fase sólida no tubo

k – fator de retenção

K_{fs} – constante de distribuição

LC – cromatografia líquida

LLE – extração líquido-líquido

LMR – limite máximo de resíduo

LOD – limite de detecção

LOQ – limite de quantificação

MAA – ácido metacrílico

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEPS – microextração por sorvente empacotado

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MIP – polímero impresso molecularmente

SRM – monitoramento de reações selecionadas

MS – espectrometria de massas

MS/MS – espectrometria de massas sequencial ou tandem

n – massa do analito extraída

N₂ – nitrogênio

NATA – *National Association of Testing Authorities*

ODS – octadecilsilano

OT – *open tubular*

PABA – ácido p-amino-benzóico

PEEK – poliéter éter cetona

PEG – polietilenoglicol

PLOT – *porous-layer open tubular*

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes

PS-DVB – poliestireno divinilbenzeno

RI – índice de retenção

RSD – *relative standard deviation*

SAs – sulfonamidas

SBSE – extração sortiva em barra de agitação

SCP – sulfaclorpiridazina

SDM – sulfadimetoxina

SDZ – sulfadiazina

Si – aminopropil-sílica

Si-GO – óxido de grafeno ancorado em sílica

SIM – simazina

SMR – sulfamerazina

SMX – sulfametoxazol

SMZ – sulfametazina

SPE – extração em fase sólida

SPME – microextração em fase sólida

SQX – sulfaquinoxalina

STZ – sulfatiazol

TMOS – tetrametil ortosilicato

TRIM – trimetilpropano trimetacrilato

UPLC – cromatografia líquida de ultra eficiência

USA-EPA – *United States Environmental Protection Agency*

V_s – volume da amostra

WCOT – *wall-coated open tubular*

α – fator de separação

γ -MAPS – 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Introdução geral	17
1.1 Introdução geral	24
Referências bibliográficas	27
CAPÍTULO 2 – Revisão bibliográfica	29
2.1 Técnicas miniaturizadas de preparo da amostra	30
2.2 Microextração em fase sólida (SPME)	30
2.3 Microextração em fase sólida no tubo (<i>In-tube</i> SPME)	33
2.4 Fases extratoras	36
2.4.1 Polímeros impressos molecularmente (MIP)	36
2.4.2 Líquidos iônicos (ILs)	39
2.4.3 Grafeno (G).....	41
2.5 Validação de métodos analíticos	43
2.5.1 Seletividade	43
2.5.2 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	44
2.5.3 Linearidade	44
2.5.4 Precisão.....	45
2.5.5 Exatidão	46
2.5.6 Recuperação.....	46
Referências bibliográficas	47
CAPÍTULO 3 – Objetivos.....	55
3.1 Objetivo geral	56
3.2 Objetivos específicos	56
CAPÍTULO 4 – Síntese dos materiais sorventes para extração miniaturizada	57
4.1 Introdução	58
4.2 Objetivo	59
4.3 Parte experimental	59
4.3.1 Padrões analíticos e reagentes	59
4.3.2 Preparo das soluções dos padrões analíticos	60

4.3.3 Síntese dos polímeros impressos molecularmente (MIP) e não-impressos (NIP)	60
4.3.4 Síntese do líquido iônico (IL).....	61
4.3.5 Síntese do grafeno (G).....	62
4.3.6 Avaliação da seletividade dos materiais sintetizados	62
4.3.7 Avaliação da retenção do material mais seletivo.....	63
4.3.8 Caracterização do material mais seletivo	65
4.3.9 Instrumentação e condições cromatográficas para avaliação da seletividade e retenção das triazinas e sulfonamidas.....	66
4.4 Resultados e discussão	66
4.4.1 Avaliação da seletividade dos materiais sintetizados	66
4.4.2 Caracterização do material mais seletivo para o sistema <i>in-tube</i> SPME (polímeros impressos molecularmente e não-impressos)	68
4.4.2.1 Espectrometria vibracional no infravermelho (FTIR)	68
4.4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	70
4.4.3 Avaliação da retenção do material mais seletivo.....	71
4.5 Conclusão	75
Referências bibliográficas	76
CAPÍTULO 5 – Desenvolvimento do sistema <i>on-line</i> automatizado <i>in-tube</i> SPME	78
5.1 Introdução	79
5.2 Objetivo	80
5.3 Parte experimental	80
5.3.1 Montagem do sistema <i>in-tube</i> SPME	80
5.4 Resultados e discussão	83
5.5 Conclusão	83
Referências bibliográficas	84
CAPÍTULO 6 – Aplicação do sistema <i>in-tube</i> SPME na determinação de triazinas em amostra alimentícia empregando como sorvente polímero impresso molecularmente	86
6.1 Introdução	87
6.1.1 Agrotóxicos	87
6.1.2 Triazinas	88

6.1.3 Uva e suco de uva integral.....	89
6.2 Objetivo	91
6.3 Parte experimental	91
6.3.1 Padrões analíticos e reagentes	91
6.3.2 Preparo das soluções contendo os padrões analíticos.....	91
6.3.3 Instrumentação e condições cromatográficas para separação das triazinas no sistema <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS.....	92
6.3.4 Otimização do sistema <i>in-tube</i> SPME	94
6.3.5 Validação do método no sistema <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS	94
6.3.6 Amostras	95
6.4 Resultados e discussão	96
6.4.1 Sistema <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS.....	96
6.4.2 Otimização do sistema <i>in-tube</i> SPME	98
6.4.3 Validação do método <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS	101
6.4.4 Análise das amostras de suco de uva integral e uva	107
6.5 Conclusão	108
Referências bibliográficas	109
CAPÍTULO 7 – Aplicação do sistema <i>in-tube</i> SPME na determinação de triazinas em amostra ambiental empregando como sorvente óxido de grafeno ancorado em sílica (Si-GO)	112
7.1 Introdução	113
7.2 Objetivo	115
7.3 Parte experimental	115
7.3.1 Padrões analíticos e reagentes	115
7.3.2 Preparo das soluções contendo os padrões analíticos.....	115
7.3.3 Síntese do óxido de grafeno ancorado a aminopropil sílica (Si-GO)	115
7.3.4 Instrumentação e condições cromatográficas para separação das triazinas no sistema <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS.....	116
7.3.5 Otimização do sistema <i>in-tube</i> SPME.....	117
7.3.6 Validação do método no sistema <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS	118

7.3.7 Amostras	119
7.4 Resultados e discussão	119
7.4.1 Caracterização do óxido de grafeno ancorado a aminopropil-sílica.....	119
7.4.2 Sistema <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS.....	120
7.4.3 Otimização do sistema <i>in-tube</i> SPME.....	121
7.4.4 Validação do método <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS	123
7.4.5 Amostras	129
7.5 Conclusão	131
Referências bibliográficas	131
CAPÍTULO 8 – Aplicação do sistema <i>in-tube</i> SPME na determinação de sulfonamidas em amostra alimentícia empregando como sorvente polímero impresso molecularmente	137
8.1 Introdução	138
8.1.1 Antibióticos	138
8.1.2 Sulfonamidas	139
8.1.3 Leite	140
8.2 Objetivo	142
8.3 Parte experimental	142
8.3.1 Padrões analíticos e reagentes	142
8.3.2 Preparo das soluções contendo os padrões analíticos.....	142
8.3.3 Instrumentação e condições cromatográficas para separação das triazinas no sistema <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS.....	143
8.3.4 Otimização do sistema <i>in-tube</i> SPME.....	145
8.3.5 Validação do método no sistema <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS	145
8.3.6 Amostras	147
8.4 Resultados e discussão	147
8.4.1 Sistema <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS.....	147
8.4.2 Otimização do sistema <i>in-tube</i> SPME.....	149
8.4.3 Validação do método <i>in-tube</i> SPME LC-MS/MS	153
8.4.4 Amostras	162
8.5 Conclusão	163

Referências bibliográficas	164
CAPÍTULO 9 – Desenvolvimento de colunas tubulares abertas do tipo PLOT	168
9.1 Introdução	169
9.1.1 Colunas tubulares abertas	170
9.2 Objetivo	171
9.3 Parte experimental	171
9.3.1 Padrões analíticos e reagentes	171
9.3.2 Tratamento do tubo de sílica	172
9.3.3 Preparação das colunas	173
9.3.3.1 Preparação das colunas PS-DVB-OT	173
9.3.3.2 Preparação das colunas ODS-OT	173
9.3.4 Microscopia eletrônica de varredura	174
9.4 Resultados e discussão	174
9.4.1 Morfologia e avaliação das colunas PS-DVB-OT	174
9.4.2 Morfologia e avaliação das colunas ODS-OT	177
9.5 Conclusão	178
Referências bibliográficas	179
CAPÍTULO 10 – Conclusão geral e perspectivas futuras	181
10.1 Conclusão geral	182
10.2 Perspectivas futuras	182

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1.1 Introdução geral

Com o passar dos anos, a química analítica vem sendo constantemente aprimorada para tornar os métodos analíticos mais sensíveis para que seja possível determinar a presença de analitos em baixos níveis de concentração em matrizes de elevada complexidade, como alimentícias, ambientais e biológicas. Um bom exemplo disso foram os avanços já obtidos com as técnicas de separação cromatográficas aliadas à espectrometria de massas tornando, assim, as análises mais rápidas e com elevada sensibilidade, seletividade e detectabilidade dos compostos alvos.

Porém, mesmo com todos esses avanços, em algumas situações grandes dificuldades para se obter resultados confiáveis são encontradas como, por exemplo, na detecção de analitos que estão presentes em algumas matrizes que apresentam muitos compostos interferentes. Quanto menor forem as concentrações que se pretende detectar, e maior for a complexidade da matriz que esse analito está inserido, mais complexa e difícil se torna a análise.

Diante disso, o adequado preparo da amostra é de extrema importância para isolar os analitos de interesse dos interferentes presentes na matriz e, conseqüentemente, obter-se resultados confiáveis com elevada exatidão, precisão e sensibilidade. A determinação dos compostos em concentrações muito baixas, requer procedimentos analíticos precisos que consigam concentrar os compostos alvos antes da etapa de identificação e quantificação.^{1,2}

Aproximadamente 80% do tempo de uma análise é gasto com o preparo da amostra, dentro de um procedimento o qual inclui amostragem, preparação da amostra, detecção e processamento de dados.³ No entanto, é de grande importância o pré-tratamento das amostras antes das análises cromatográficas, já que com isso é possível eliminar interferentes e aumentar a sensibilidade e seletividade analítica.⁴ As técnicas convencionais de preparo da amostra mais utilizadas em análises químicas para diferentes aplicações são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), as quais vêm sendo substituídas por técnicas modernas de análise.⁵⁻⁷

Neste contexto, destacam-se as modificações efetuadas na extração em fase sólida que geraram técnicas mais adequadas ambientalmente e que melhor preservam a saúde dos analistas, as quais são conhecidas como técnicas miniaturizadas. Essas técnicas vêm ganhando destaque em relação aos métodos convencionais, já que minimizam o consumo de solventes orgânicos e o volume de amostra a ser utilizado permitindo, também, a reutilização das fases extratoras, pré-

concentração dos analitos e a possibilidade do acoplamento *on-line* (totalmente automatizado) com os sistemas cromatográficos.⁸⁻¹⁰

Dentre essas técnicas, destaca-se a microextração em fase sólida (SPME), a qual utiliza pequenas quantidades de solventes, amostras e apresenta poucas etapas em seu procedimento de extração.⁸ Estas técnicas combinam a extração e concentração do analito em única etapa e permitem a introdução do analito extraído no sistema cromatográfico utilizando o mesmo dispositivo empregado na extração, reduzindo a perda e o tempo da análise. Além disso, o acoplamento das técnicas de microextração com um cromatógrafo permitiu um grande avanço nessa área, diminuindo o preparo da amostra, a quantidade de etapas a serem desenvolvidas e a determinação de compostos em níveis de traços em diversas matrizes complexas. Esses acoplamentos geram sistemas analíticos automatizados que resultam em análises exatas, rápidas, com alta sensibilidade e reprodutibilidade.⁹⁻¹²

A utilização de microtécnicas de extração requer fases extratoras específicas e altamente seletivas para que se possa extrair com sucesso a classe de compostos desejada, já que essas técnicas empregam poucas quantidades de material extrator. Além disso, a baixa eficiência, seletividade e estabilidade de extração dos materiais convencionais é uma grande limitação, bem como o elevado custo comercial dessas fases. Desta forma, recentes estudos vêm desenvolvendo novos materiais sorventes para que possam ser utilizados como fase extratora no preparo de amostras, já que as comerciais apresentam relevantes limitações.¹³

Dentre esses materiais destacam-se alguns que foram avaliados nessa tese como os polímeros impressos molecularmente (MIP), líquidos iônicos (ILs), grafeno e derivados, os quais devem apresentar como principais funções a capacidade de extrair, isolar e pré-concentrar os analitos de interesse, bem como aprimorar a eficiência de extração e aumentar a seletividade e sensibilidade analítica devido a sua capacidade de reter os compostos mais desejados e eliminar em sua maioria os possíveis interferentes da matriz. A seleção ideal da fase extratora é uma etapa crucial para o avanço da qualidade dos resultados analíticos visando a miniaturização e automação de toda a metodologia, porém muito trabalho ainda será necessário para aprimorar e inovar no desenvolvimento de novos materiais sorventes respeitando o meio ambiente e mantendo a qualidade analítica para que possam ser aplicados em diferentes campos.^{14,15}

Desta maneira, tendências recentes da química verde, aliada a química analítica moderna se tornam promissoras para o desenvolvimento totalmente miniaturizado das técnicas analíticas através da miniaturização do preparo da amostra, desenvolvimento de novas materiais seletivos, técnicas cromatográficas completamente automatizadas e o seu acoplamento com a espectrometria de massas.

Para maior clareza e compreensão das estratégias e metodologias utilizadas, esta tese foi dividida em capítulos.

O Capítulo 1 apresenta uma introdução geral sobre os principais assuntos que serão abordados na tese.

O Capítulo 2 aborda uma revisão bibliográfica da literatura com informações sobre os temas abordados nesta tese.

O Capítulo 3 descreve o objetivo geral e os específicos desse trabalho.

O Capítulo 4 aborda as sínteses e caracterizações dos materiais sorventes para serem utilizados como fase extratora em sistemas de extração miniaturizada.

O Capítulo 5 apresenta o desenvolvimento do sistema *on-line* automatizado *in-tube* SPME, o qual foi utilizado como para extração de diferentes classes de analitos em matrizes ambientais e alimentícias.

Os Capítulos 6, 7 e 8 apresentam respectivamente a aplicação dos sistema *in-tube* SPME UPLC-MS/MS na determinação de herbicidas em amostras de alimentos; de herbicidas em amostras ambientais e de antibióticos em amostras de alimentos.

O Capítulo 9 aborda o desenvolvimento de colunas tubulares abertas do tipo PLOT para serem utilizadas futuramente como colunas extratoras e analíticas.

O Capítulo 10 apresenta as conclusões gerais desta tese e algumas perspectivas futuras.

Referências bibliográficas

- 1 PAWLISZYN, J. **Sampling and sample preparation for field and laboratory: fundamentals and new directions in sample preparation**. Amsterdam: Elsevier, 2002. 1166 p. (Comprehensive Analytical Chemistry, v.37).
- 2 PLOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPANSKA, N.; GUARDIA, M. D. L.; NAMIESNIK, J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 73, p. 19-38, 2015.
- 3 PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction: theory and practice**. New York: Wiley-VCH, 1997. 247 p.
- 4 KATAOKA, H.; ISHIZAKI, A.; NONAKA, Y.; SAITO, K. Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 655, p. 8-29, 2009.
- 5 KATAOKA, H. News trends in sample preparation for clinical and pharmacological analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 232-244, 2003.
- 6 DENG, C.; LIU, N.; GAO, M.; ZHANG, X. Recent developments in sample preparation techniques for chromatography analysis of traditional Chinese medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 90-96, 2007.
- 7 FONTANALS, N.; MARCE, R. M.; BORRULL, F. New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 14-31, 2007.
- 8 ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.
- 9 KATAOKA, H. Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application – a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 31-45, 2002.
- 10 QUEIROZ, M. E. C. Microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME) para automação das análises de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 1-9, 2009

- 11 MIZUNO, K.; KATAOKA, H. Analysis of urinary 8-isoprostane as an oxidative stress biomarker by stable isotope dilution using automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 112, p. 36-42, 2015.
- 12 AHMADI, S. H.; MANBOHI, A.; HEYDAR, K. T. Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction of naproxen from urine samples using an experimental design. **Analyst**, v. 140, p. 497-505, 2015.
- 13 QUEIROZ, M. E. C.; MELO, L. P. Recentes avanços da in-tube SPME-LC para bioanálises. **Scientia Chromatographica**, v. 5, p. 167-179, 2013.
- 14 BELTRAN, A.; BORRULL, F.; CORMACK, P.A.G.; MARCE, R.M. Molecularly imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 1363-1375, 2010.
- 15 LIN, Z.; LIN, Y.; SUN, X.; YANG, H.; ZHANG, L.; CHEN, G. One-pot preparation of a molecularly imprinted hybrid monolithic capillary column for selective recognition and capture of lysozyme. **Journal of Chromatography A**, v. 1284, p. 8-16, 2013.

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Técnicas miniaturizadas de preparo da amostra

O preparo da amostra sempre foi e ainda continua sendo uma das etapas mais importantes para o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis e com elevada sensibilidade. Diversas técnicas podem ser utilizadas para o preparo da amostras como, por exemplo, a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), as quais são consideradas técnicas clássicas e já consolidadas há muitos anos. Com essas técnicas foi possível alcançar grandes avanços na área da química e conseguir resultados importantes e confiáveis.

Porém, com o tempo essas técnicas foram apresentando algumas desvantagens e novas técnicas de preparo da amostra foram surgindo para superar esses problemas, incluindo a elevada quantidade de solventes orgânicos e amostras empregados, bem como os resíduos gerados.

Atualmente, as técnicas miniaturizadas como a microextração em fase sólida (SPME), a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) e a microextração por sorvente empacotado (MEPS) vêm se destacando já que não necessitam de grandes quantidades de solventes orgânicos e amostras, apresentam baixo custo, rapidez, simplicidade e confiabilidade.

Dentre essas, a SPME é a técnica que apresenta maior variedade de configurações e possibilidade de acoplamentos *on-line* com equipamentos de alta resolução como, por exemplo, a *in-tube* SPME. O sistema *on-line in-tube* SPME tem sido amplamente aplicado em análises biológicas, apresentando menor número de trabalhos na área ambiental e alimentícia, até o presente momento.

2.2 Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida foi introduzida por Arthur e Pawlitzyn¹ em 1990, e pode ser considerada uma miniaturização da SPE (Extração em Fase Sólida). É considerada uma microtécnica de extração, onde os processos de extração e pré-concentração dos analitos ocorrem em micro escala. A SPME apresenta diversas vantagens quando comparada a técnicas convencionais, permitindo a automatização das análises, concentração dos analitos, reutilização das fibras de extração e simplificação da instrumentação analítica.²⁻⁵ Essa técnica vem sendo

utilizada para extrair diferentes analitos, com aplicações em diversos campos da pesquisa como química forense, ambiental, área farmacêutica, alimentícia, entre outras.⁵⁻⁹

O dispositivo básico empregado em SPME consiste na utilização de um bastão de fibra óptica de sílica fundida com sua extremidade recoberta por um filme fino. A extração e concentração do soluto ocorrem através dos processos de sorção (absorção ou adsorção) do soluto em uma fina camada de fase extratora, polímero ou sólido adsorvente, que reveste a superfície externa de uma fibra de sílica fundida (usualmente de 10 mm de comprimento e 110 a 160 µm de diâmetro).^{2,3,5}

A SPME baseia-se em um processo de equilíbrio entre fases, onde o sistema de extração consiste das fases aquosas (amostra homogênea), polimérica extratora (fibra SPME) e gasosa (*headspace* do frasco).^{5,4,10} Durante a extração em um sistema trifásico considerado ideal, os solutos migram entre as três fases até que o equilíbrio de partição seja atingido. Desta forma, a massa extraída do soluto está relacionada ao equilíbrio de massas nas fases do sistema. No modo *headspace* a fibra é colocada na fase volátil (*headspace*) da amostra para que os componentes voláteis sejam extraídos. No modo extração direta a fibra é colocada dentro da matriz líquida, ocorrendo à partição dos analitos entre o recobrimento e a matriz. Já para as amostras que possuem analitos não voláteis e com interferentes de alta massa molecular, utiliza-se a extração protegida por membrana ou por materiais de acesso restrito,^{2-5,10,11} ilustrada na Figura 2.1.

Figura 2.1: Processo de extração e pré-concentração dos analitos utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME) nos dois modos: (A) *headspace* e (B) direta.

Fonte: Adaptado da referência 12.

Outras configurações da SPME estão disponíveis tais como barras de agitação, recipientes com paredes internas revestidas, revestimento no tubo, partículas suspensas e discos/membranas extratoras.

Esta técnica, quando acoplada à sistemas analíticos, fornece análises rápidas com baixo consumo de solventes tóxicos e maior precisão analítica. No acoplamento com a cromatografia gasosa (SPME/GC) a fibra é inserida diretamente no injetor já aquecido após o processo de extração, onde os analitos serão termicamente desorvidos para a coluna analítica. Desta maneira, não há necessidade de utilizar solventes orgânicos. Outra maneira de se utilizar a SPME é acoplando-a com a cromatografia líquida (SPME/LC); nesse caso há necessidade de uma interface apropriada na forma de um T, onde a fibra é inserida na parte superior e na parte lateral e inferior conecta-se a válvula de seis pórticos do HPLC.¹²⁻¹⁴ Como nesse caso a dessorção não é direta, há algumas limitações tais como dificuldade no acoplamento da interface, poucas fibras adequadas e com baixa estabilidade, dessorção não eficaz dos analitos, entre outras.^{5,13-16}

Em razão das vantagens das técnicas SPME/GC para as análises de solutos voláteis e semivoláteis, o número de aplicações empregando as técnicas SPME/LC tem sido bem menor.¹⁶ No entanto, a maior parte das aplicações de SPME/LC tem sido desenvolvida nos últimos anos, indicando claramente o aumento de interesse na técnica. Estes acoplamentos da técnica SPME com GC ou LC vêm sendo amplamente utilizados na extração de várias classes de compostos em diferentes matrizes. No geral, a SPME apresenta algumas desvantagens, independentemente do modo de acoplamento, como baixa estabilidade das fases extratoras, número limitado de fases comercialmente disponíveis, alta fragilidade das fibras e baixa capacidade de sorção. A escolha do recobrimento da fibra de SPME é de extrema importância para garantir uma eficiente extração dos analitos diante dos interferentes presentes na matriz.^{5,16}

Imediatamente após a inserção da fibra na amostra inicia-se o transporte dos analitos da matriz para a fase extratora. Neste caso, a extração por SPME se completa quando a concentração do analito atinge o equilíbrio de partição entre a matriz e a fase de extração significando, assim, que a quantidade de analito extraída se mantém constante mesmo que se aumente o tempo de extração. Por consequência, o analito é transferido para a fase extratora de forma quantitativa e não exaustiva. Quando o equilíbrio é atingido encontra-se uma relação diretamente proporcional entre a quantidade de analito extraída e a concentração do analito na amostra.^{5,11,17}

Fases poliméricas do tipo polidimetilsiloxano apresentam a condição de equilíbrio de acordo com a Equação 2.1.

$$m = \frac{(K_{fs} V_f V_s C_0)}{(K_{fs} V_f + V_s)}$$

Equação 2.1

Sendo m a massa de analito extraída pelo recobrimento, K_{fs} a constante de distribuição entre o recobrimento e a matriz, V_f o volume do recobrimento, V_s o volume da amostra e C_0 a concentração inicial do analito estudado na amostra.^{5,11,17}

Se o volume de amostra for grande, a Equação 2.1 pode ser simplificada, originando a Equação 2.2. Com isso, a quantidade de analito extraída corresponde diretamente a sua concentração na matriz, independente do volume da amostra.

$$m = K_{fs} V_f C_0$$

Equação 2.2

2.3 Microextração em fase sólida no tubo (*In-tube* SPME)

Denominada *in-tube* SPME, a microextração em fase sólida no tubo foi desenvolvida com o objetivo de extrair e pré-concentrar solutos menos voláteis e/ou termicamente instáveis permitindo com maior facilidade seu acoplamento à cromatografia líquida. É uma técnica de preparo de amostra eficiente que, geralmente, utiliza um tubo capilar de sílica fundida aberto, comumente empregado como coluna em cromatografia gasosa, revestido internamente com fase estacionária ou polimérica.^{5,18-20} Essa técnica foi desenvolvida com o propósito de superar as desvantagens da SPME convencional, como baixa capacidade de sorção e elevada fragilidade, apresentando como vantagem a extração direta dos analitos de interesse da matriz aquosa e a concentração deles na fase estacionária ou polimérica que recobre internamente o capilar.¹⁸⁻²¹ Além

disso, essa técnica apresenta algumas vantagens como permitir o uso de pequenas quantidades de amostra e solvente, simples operação, e fácil automação.^{5,19,21-26}

Atualmente, esse sistema permite o uso de uma coluna de extração (capilar ou convencional) para realizar a microextração em fase sólida no tubo, a qual é acoplada em linha com um sistema de HPLC (*in-tube* SPME-LC). Este arranjo favorece a automatização do processo de extração, uma maior precisão do método analítico, menor tempo de análise, não requer interface específica para a dessorção dos analitos, diminui a exposição dos analistas com as amostras e reduz a perda dos analitos na extração quando comparado com as extrações *off-line*.^{5,19-24,27}

Essas colunas podem ser produzidas em capilares abertos de sílica fundida, internamente revestidos com diferentes fases extratoras, da mesma maneira que as colunas capilares de cromatografia gasosa permitindo, assim, analisar uma ampla gama de compostos. Além disso, outros tipos de colunas vêm sendo amplamente utilizadas como as de poli-éter-éter-cetona, material conhecido como PEEK, e as colunas de aço inoxidável. Ambas são empacotadas com partículas sólidas sorventes altamente seletivas para a classe de compostos que se deseja extrair. Diante disso, novos materiais vêm sendo explorados para melhorar a seletividade e sensibilidade dos métodos analíticos que utilizam o sistema *in-tube* SPME.^{5,19-22,28,29} A grande disponibilidade de diferentes colunas capilares de cromatografia gasosa, com variados comprimentos e tamanhos, utilizadas como mecanismo de extração, aumenta as áreas de aplicação da técnica permitindo, assim, analisar diferentes classes de compostos.

O equipamento empregado na técnica *in-tube* SPME, ainda não disponível comercialmente, pode ser montado utilizando-se um injetor *on-line* e um dispositivo de comutação de coluna conhecido como *column switching*. Nessa modalidade o injetor *on-line* consiste na utilização de uma válvula rotatória de seis pórticos e um *loop* (alça) para amostra. A amostra depois de um pré-tratamento, se necessário, é encaminhada para o *loop* com a válvula na posição de extração. Após a injeção dos analitos, a válvula é alterada para a posição de eluição e os analitos extraídos são direcionados para a coluna analítica pela fase móvel. Esse acoplamento requer compatibilidade entre os solventes da fase móvel e da amostra.^{5,29,30}

Esse tipo de montagem apresenta, como parte importante, uma coluna de extração para retenção dos analitos de interesse. Quando a válvula permanece na posição de extração a amostra é percolada na coluna extratora e, com isso, os analitos de interesse são aprisionados na fase,

enquanto que os interferentes da matriz são eluídos e direcionados para o resíduo. Colocando-se a válvula na posição de eluição, os analitos são eluídos da coluna extratora e transferidos para a coluna analítica.^{5,22} Esse tipo de montagem do sistema *in-tube* SPME, a qual vem sendo amplamente utilizada, permite duas opções de direção do fluxo para a eluição dos analitos retidos na coluna de extração: o modo *straight-flush* e *back-flush*. A eluição no modo *straight-flush* ocorre na mesma direção do fluxo de carregamento da amostra; enquanto que no modo *back-flush* a direção é contrária à do fluxo de carregamento da amostra. O modo de eluição *back-flush* é, frequentemente, o mais utilizado já que permite aos analitos retidos no início da coluna de extração serem rapidamente transferidos para a coluna analítica o que, conseqüentemente, minimiza o alargamento da banda cromatográfica já que evita a dispersão dos analitos na coluna de extração.^{5,20,29,30}

Do ponto de vista operacional, o sistema *in-tube* SPME também permite a operação em dois modos *on-line* de extração. O modo *flow through extraction*, de extração única, no qual a amostra passa continuamente em uma única direção na coluna de extração, e o modo *draw/eject extraction*, com ciclos aspirar e dispensar, onde a amostra é aspirada e dispensada várias vezes, de acordo com a programação efetuada no injetor automático.^{1,4,5} Esse último modo de operação do sistema é o mais utilizado, sendo mais indicado quando se utiliza colunas de extração de baixa permeabilidade como as colunas tubulares abertas com parede recoberta (*Wall Coated Open Tubular - WCOT*), já o modo de extração única utiliza na maioria das vezes colunas empacotadas ou monolíticas.^{29,30}

No tubo capilar ou na coluna de extração, ocorre o processo de partição do analito com a fase extratora. No decorrer do processo de extração, a válvula do injetor deve estar na posição de extração. O capilar deve ser lavado e condicionado previamente ao processo de extração, com a solução mais adequada para limpeza da fase extratora ou com a fase móvel. Logo que atingido o equilíbrio de sorção, os analitos pré-concentrados são dessorvidos rapidamente da fase extratora do capilar por meio da percolação da fase móvel, após posicionar a válvula do injetor do HPLC na posição de eluição.^{5,20,29-31}

Os analitos dessorvidos são deslocados para a coluna analítica do HPLC para separação e posterior quantificação. Detectores a base de radiação ultravioleta, fluorescência, arranjo de diodos e espectrometria de massas vêm sendo largamente utilizados em linha com o sistema *in-tube*

SPME. Assim, a técnica se torna um processo automático que não necessita de uma interface especial para dessorção dos analitos, como é o caso nas análises de SPME convencional.^{5,20,29-31}

2.4 Fases extratoras

Há uma grande variedade de materiais comercialmente disponíveis utilizados como sorventes em técnicas de preparo de amostras. Entre eles, temos a sílica ligada a grupos alquílicos como, por exemplo, C₄, C₈, C₁₈, trocadores iônicos, fase poliméricas hidrofílicas e lipofílicas, entre outros. Porém, em alguns casos, esses materiais podem não apresentar seletividade e eficiência de extração adequada para os analitos que se deseja extrair. Além disso, muitas dessas fases além de reter o analito de interesse retêm também vários interferentes presentes na matriz.

Diante desse contexto, o desenvolvimento de materiais mais seletivos para que sejam utilizados como fases extratoras que serão empregadas para extrair diferentes analitos em matrizes complexas se torna extremamente importante. Como consequência, recentes estudos vêm desenvolvendo materiais mais eficientes e seletivos para que possam ser utilizados como sorventes em colunas extratoras aumentando o desempenho das microtécnicas de extração baseadas em sorventes.

Esses materiais que incluem polímeros impressos molecularmente, materiais de acesso restrito, monolitos, grafeno e líquidos iônicos, entre outros, têm como objetivo melhorar a eficiência de extração, seletividade e sensibilidade dos métodos analíticos.

2.4.1 Polímeros impressos molecularmente (MIP)

A impressão molecular é considerada simples, rápida e possui capacidade de produzir polímeros com sítios específicos de reconhecimento e estereoquimicamente moldados a partir da molécula molde de interesse promovendo, assim, uma extração mais seletiva de um composto ou de uma classe de compostos.³²

Os polímeros impressos molecularmente são materiais sintéticos, seletivos, rígidos e tridimensionais sintetizados ao redor de uma molécula molde. São formados pela copolimerização de monômeros funcionais empregando agentes de ligação cruzada e iniciador radicalar na presença da molécula molde (*template*). Após a síntese, a molécula é retirada por métodos químicos ou

físicos formando no polímero os sítios de reconhecimento molecular. Desta maneira, a cavidade impressa no polímero o torna seletivo para um tipo de analito ou classe. A utilização de polímeros impressos molecularmente vêm crescendo significativamente e apresentando muitas vantagens como fases extratoras seletivas devido a capacidade de reconhecer e identificar os analitos de interesse, diminuindo ou até mesmo eliminando os interferentes de matrizes complexas.³²⁻³⁴

Diferentes estratégias são utilizadas para que os materiais sintetizados com solventes porogênicos orgânicos apresentem boa recuperação. Assim o MIP pode ser sintetizado por diversas metodologias como a polimerização em *bulk*, polimerização por precipitação (*precipitation polymerization*) e polimerização por suspensão (*suspension polymerization*).^{34,35}

O método inicial e o mais utilizado é a polimerização em *bulk* devido a sua facilidade. Esse método consiste, principalmente, na mistura de todos os componentes, porém depois de sintetizado o polímero deve ser triturado; e com isso parte dos sítios ativos podem ser perdidos, além de formar partículas irregulares. Em decorrência, outros métodos de polimerização estão sendo empregados, entre os quais, a polimerização por precipitação, por suspensão, emulsão, em multi-etapas, utilizando sílica modificada e sol-gel para sintetizar partículas com estrutura mais regulares e sem necessidade da etapa de trituração.^{36,37}

A seletividade dos MIPs está relacionada ao reconhecimento pelo polímero da molécula molde de interesse, a qual foi utilizada inicialmente no processo. A escolha e combinação dos reagentes devem ser minuciosamente avaliadas para cada molécula molde, de forma a minimizar as características indesejáveis e aumentar a seletividade. Dentre as variáveis envolvidas no processo destacam-se as proporções molares entre a molécula molde, o monômero funcional, tipo e quantidade de solvente, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar.^{36,37}

O solvente utilizado na síntese possui a função de agregar todas as substâncias envolvidas em somente uma fase, permitindo as interações entre a molécula molde e o monômero funcional. A molécula molde é o analito, o qual molda estereoquimicamente os sítios de ligação. Os monômeros determinam o tipo de ligação nos sítios impressos do polímero onde suas interações devem ser fortes o suficiente para realizar a formação dos sítios e fracas para permitir a retirada do molde sem destruir as cavidades de reconhecimento que foram formadas. O agente de ligação cruzada tem como papel realizar a união dos monômeros funcionais. O iniciador radicalar fornece radicais livres, os quais são responsáveis pela rigidez do polímero, já que promovem a interligação

das cadeias poliméricas formadas pelo monômeros.^{38,39} Um esquema do processo de síntese é ilustrado na Figura 2.2.

As fases estacionárias e extratoras baseadas em MIPs podem ser particuladas (irregulares ou esféricas) ou monolíticas.⁴⁰⁻⁴² Os MIPs possuem vantagens como baixo custo, preparação simples, estabilidade no armazenamento, elevada resistência mecânica, durabilidade ao calor e pressão. Porém, apresentam como desvantagens a dificuldade em alguns casos de remover o *template*, sítios de ligação não-específico, entre outras. Diante disso os MIPs estão se destacando com sucesso como fases estacionárias de afinidade.

Recentemente, alguns trabalhos vêm empregando os MIPs como matrizes em sistema de liberação controlada de fármacos.^{43,44}

Figura 2.2: Esquema do processo de impressão molecular.

Fonte: Autoria própria.

2.4.2 Líquidos iônicos (ILs)

Os líquidos iônicos são formados por um cátion orgânico com um contra-íon de natureza inorgânica ou orgânica. Esse tipo de material é formado por íons que são líquidos em baixas temperaturas de fusão, igual ou inferior à 100 °C.^{46,47}

Podem ser utilizados em diversas aplicações por apresentarem propriedades únicas como baixa pressão de vapor, alta estabilidade química e térmica, alta viscosidade, múltiplas interações de solvatação (hidrofóbica, eletrostática e pontes de hidrogênio), entre outras, as quais podem variar de um líquido iônico para outro, dependendo da combinação de cátions e ânions que for utilizada.^{46,47}

Diante disso, os líquidos iônicos se tornam compostos únicos que vêm sendo aplicados em diversas áreas da química como, por exemplo, em catálise, como “solventes verdes” substituindo os solventes orgânicos, em eletroquímica e células a combustíveis. Apresentam também comportamento ideal para serem utilizados em técnicas de extração e separação em química analítica, inclusive como fases estacionárias para cromatografia gasosa, já que suas propriedades físicas e químicas podem ser reguladas através de ajustes estruturais. Estudos recentes já demonstram sua utilização como fase estacionária em HPLC.⁴⁸

Os líquidos iônicos são também aplicados em várias técnicas de extração no preparo de amostras como extração líquido-líquido, líquido-líquido dispersiva, microextração em fase sólida e suas configurações e microextração de gota única para pré-concentrar os analitos de alguns tipos de amostras aquosas.⁴⁶

Atualmente, o interesse em se utilizar fases suportadas com líquidos iônicos vem crescendo, já que esses materiais combinam as propriedades dos IL com as vantagens do suporte sólido. Partículas de sílica, polímeros, nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas, grafeno e derivados são alguns dos suportes que estão sendo utilizados.^{49,50}

A sílica é o material mais utilizado como suporte devido à dificuldade de imobilizar os ILs em materiais inertes e vem apresentando resultados satisfatórios juntamente com os ILs como material sorvente em técnicas de preparo de amostras. Alguns trabalhos descritos na literatura demonstram que o IL suportado em sílica apresenta melhores resultados de recuperação e seletividade quando comparado com a sílica pura.⁵⁰ Publicações recentes vem demonstrando sua

utilização suportado em diferentes materiais como novas fases para técnicas de extração como SPME e SPE.⁵¹⁻⁵³

Diferentes métodos são descritos para a síntese dos ILs modificados com sílica, entre eles têm-se os ILs zwitteriônicos que são utilizados como fase estacionária em LC e extratora no preparo de amostra por apresentarem cargas positivas e negativas localizadas em um mesmo grupo funcional.⁵⁰ A imobilização dos ILs nas superfícies de diferentes materiais vem demonstrando resultados satisfatórios na literatura, já que apresentam elevada flexibilidade favorecendo inúmeras interações com esses materiais. A Figura 2.3 apresenta um esquema da síntese do líquido iônico suportado em sílica.

Figura 2.3: Esquema da síntese do líquido iônico suportado em partículas de sílica.

Fonte: Adaptado da referência 54.

2.4.3 Grafeno (G)

Materiais baseados em carbono demonstram grande potencial de aplicação em inúmeros campos devido a sua estrutura única. Dentre esses materiais o grafeno é um dos alótropos do carbono. Suas propriedades estão relacionadas a sua estrutura eletrônica que consiste em átomos arranjados em uma monocamada de duas dimensões onde para formar as “folhas” de grafeno, os átomos organizam-se em uma estrutura semelhante a um favo de mel.⁵⁵ Atualmente, o grafeno vem se destacando em diversos trabalhos relatados na literatura já que apresenta muitas características importantes para um material como boa estabilidade térmica, química e mecânica, baixo custo no preparo e elevada área superficial.⁵⁵

Sua elevada área superficial o torna um material promissor para extrair e remover compostos de interesse de matrizes ambientais, alimentícias e até mesmo biológicas, já que na sua estrutura ambos os lados do material ficam disponíveis para interagir. Além disso, o sistema de elétrons- π deslocalizados permite uma forte interação com estruturas que apresentam anéis benzênicos como, por exemplo, fármacos, contaminantes emergentes e agrotóxicos.^{54,56} Além de ser um material flexível e, portanto, conseguir aderir melhor a suportes, apresenta baixo custo na síntese já que não é necessário aparelhagem sofisticada.

Diferentes rotas para obtenção do grafeno são utilizadas como, por exemplo, deposição química de vapor, crescimento epitaxial em substrato isolante, redução de CO, descarga por arco elétrico e esfoliação do grafite. Dentre essas, destaca-se a esfoliação química do grafite a grafeno que tem sido considerada como uma estratégia capaz de produzir grafeno em grandes quantidades e a partir de um material de baixo custo como o grafite.⁵⁷

Essa rota sintética pode ser realizada pelo métodos de Brodie, Staudenmaier, Hummers e Offeman, os quais conseguem oxidar o grafite.⁵⁰ Atualmente o método de Hummers e Offeman é o mais utilizado. Nesse método, inicialmente, o grafite é oxidado e, posteriormente, o óxido de grafite é convertido em óxido de grafeno através de um processo físico (sonicação) o qual é responsável por modificar a estrutura do material. Por último, o óxido de grafeno é reduzido a grafeno. A Figura 2.4 mostra a representação da síntese do grafeno.

Figura 2.4: Esquema da síntese do grafeno a partir do grafite.

Fonte: Adaptado da referência 58.

Materiais similares ao grafeno, como é o caso do óxido de grafeno (GO), estão sendo extensivamente estudados em diversas áreas pois possuem propriedades únicas e podem ser combinados com outros nanomateriais. Como descrito, o grafeno oxidado pode ser produzido através do grafite, o qual pode ser produzido através da sua dispersão em diferentes solventes e ser utilizado como um suporte promissor no preparo da amostra. A principal diferença entre o grafeno e o óxido de grafeno está na polaridade, pois GO apresenta mais grupos hidroxilas e carboxilas os quais podem ser utilizados para unir o GO com outros materiais, como por exemplo a aminopropil-sílica. Aplicações com G e GO no preparo de amostra vêm crescendo consideravelmente, já que esses materiais apresentam elevado potencial de aplicação em matrizes complexas como ambiental, alimentícia e biológica.^{50,59,60}

Por apresentar várias características promissoras, os materiais baseados em grafeno vêm sendo amplamente empregados como materias sorventes em diferentes técnicas e microtécnicas de extração para extrair uma grande variedade de compostos.

2.5 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos deve ser realizada para certificar que os resultados obtidos são confiáveis e interpretáveis através da avaliação de alguns parâmetros (figuras de mérito). No Brasil, os principais órgãos responsáveis pelo estabelecimento das exigências de validação são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁶¹, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)⁶² e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO)⁶³. Internacionalmente os mais usados são os guias *da International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*⁶⁴, a *Eurachem*⁶⁵, *U. S. Food and Drug Administration (FDA)*⁶⁶ e a *National Association of Testing Authorities (NATA)*⁶⁷. Quando comparados, os guias ou regulamentações fornecidas pelas agências de controle nacionais e internacionais para validação de métodos analíticos apresentam algumas diferenças; porém, no que se refere aos testes necessários para validação, contemplam basicamente os mesmos parâmetros, sendo os principais: seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão e recuperação. A seguir, apresentam-se os principais parâmetros avaliados nesta tese.

2.5.1 Seletividade

Corresponde à capacidade que o método possui de medir exatamente um determinado composto na presença de interferentes como impurezas, metabólitos e outros componentes presentes na matriz, já que o sinal analítico pode sofrer variações (aumento ou diminuição) na presença desses.

Primeiramente, deve-se comparar a matriz isenta com a mesma fortificada com os analitos para que se possa verificar se há coeluição com outros compostos da matriz. A utilização de

detectores sensíveis e seletivos, como um espectrômetro de massas, permite comparar o espectro de massas do pico obtido na amostra com o espectro do padrão puro.

2.5.2 Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ)

O limite de detecção do método refere-se à menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente precisa ser quantificada. Já o limite de quantificação corresponde à menor concentração que se pode medir com precisão para quantificar.

Entre os métodos mais populares utilizados para determinar os limites, destaca-se o método da relação sinal/ruído, o qual é aplicado em métodos analíticos que permitem estabelecer-se uma linha de base. Nesse método se faz a comparação da medição dos sinais dos analitos com concentrações mínimas conhecidas, sendo que para o limite de detecção a concentração do analito deve ser capaz de gerar um sinal três vezes maior que a amplitude do ruído e para o limite de quantificação o sinal dever ser dez vezes.

2.5.3 Linearidade

É a capacidade que o método possui de produzir resultados diretamente proporcionais a concentração dos analitos estudados dentro de uma determinada faixa. Os guias de validação sugerem que a curva analítica deve ser construída com no mínimo 5 ou 6 pontos em ordem crescente de concentração, injetando-se no mínimo três vezes cada ponto da curva.

A curva analítica corresponde à regressão linear conforme mostrado na Equação 2.3, onde y é uma variável dependente e corresponde ao sinal analítico gerado pelas diferentes concentrações, x é uma variável independente e se refere as concentrações das soluções padrão, a é o coeficiente angular da reta, e b o coeficiente linear da reta.

$$y = a + bx$$

Equação 2.3

2.5.4 Precisão

Permite estimar os erros e variações do método. A precisão deve ser determinada em três níveis de concentração e em triplicata por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade expressa a concordância entre os resultados de sucessivas medições efetuadas nas mesmas condições e em tempos curtos. A precisão intermediária deve ser avaliada sobre a mesma amostra, amostras iguais ou padrões utilizando o mesmo método e laboratório mas variando algumas condições como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade de um procedimento analítico somente pode ser estimada mediante participação de um ensaio interlaboratorial.

A precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), o qual pode ser calculado pelas Equações 2.4 e 2.5.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(Xi - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Equação 2.4

Sendo:

X o valor individual de cada medição;

$\bar{X}$ a média aritmética do número de medições;

n o número de medições.

$$RSD (\%) = \frac{(s)}{(\bar{X})} \times 100$$

Equação 2.5

Sendo:

s o desvio padrão das amostras;

$\bar{X}$ a média das réplicas avaliadas.

2.5.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é definida como a concordância entre a média de vários resultados de um ensaio e o valor de referência que é aceito como verdadeiro. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica (Equação 2.6).

$$Exatidão = \frac{C1}{C2} \times 100$$

Equação 2.6

Sendo:

C1 a concentração média experimental na amostra fortificada;

C2 a concentração teórica.

2.5.6 Recuperação

A recuperação pode ser definida como a eficiência de extração de um método de preparo de amostra, ou seja, sua capacidade em extrair os analitos da matriz. É expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida pela comparação das amostras isentas dos analitos que foram fortificadas com padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas, injetadas diretamente na coluna analítica. A recuperação do método para este trabalho foi calculada pela Equação 2.7.

$$Recuperação = \frac{Co}{Cd} \times 100$$

Equação 2.7

Sendo:

Co a concentração obtida pela extração *on-line* no sistema;

Cd a concentração direta sem extração pelo sistema.

Referências bibliográficas

- 1 ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.
- 2 KATAOKA, SAITO, K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 926-950, 2011.
- 3 QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, p. 880-886, 2005.
- 4 QUEIROZ, M. E. C.; MELO, L. P. Selective capillary coating material for in-tube solid phase microextraction coupled to liquid chromatography to determine drugs and biomarkers in biological samples: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 826, p. 1-11, 2014.
- 5 TOFFOLI, A. L.; LANÇAS, F. M. Recentes avanços da microextração em fase sólida no tubo (in-tube SPME) e sua aplicação em analyses ambientais e alimentícias. **Scientia Chromatographica**, v. 7, p. 297-315, 2015.
- 6 CONTI, R.; FABBRI, D.; TORRI, C.; HORNUNG, A. At-line characterization of compounds evolved during biomass pyrolysis by solid-phase microextraction SPME-GC-MS. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 36-44, 2015.
- 7 SILVA, G. C.; SILVA, A. A. S.; SILVA, L. S. N.; GODOY, R. L. O.; NOGUEIRA, L. C.; QUITÉRIO, S. L.; RAICES, R. S. L. Method development by GC-ECD and HS-SPME-GC-MS for beer volatile analysis. **Food Chemistry**, v. 167, p. 71-77, 2015.
- 8 BENET, L.; GUÀRDIA, M. D.; IBAÑEZ, C.; SOLÀ, J.; ARNAU, J.; ROURA, E. Analysis of SPME or SBSE extracted volatile compounds from cooked cured pork ham differing in intramuscular fat profiles. **Food Science and Technology**, v. 60, p. 393-399, 2015.
- 9 ROMERO, I.; GARCÍA-GONZÁLEZ, D. L.; APARICIO-RUIZ, R.; MORALES, M. T. Validation of SPME-GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defect. **Talanta**, v. 134, p. 394-401, 2015.

- 10 BOYACI, E.; GORYNSKI, K.; RODRIGUEZ-LAFUENTE, A.; BOJKO, B.; PAWLISZYN, J. Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in laboratory analysis of prohibited substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 809, p. 69-81, 2011.
- 11 VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, p. 523-530, 2000.
- 12 PAN, J.; ZHANG, C.; ZHANG, Z.; LI, G. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 815, p. 1-15, 2014.
- 13 PAWLISZYN, J. Theory of solid-phase microextraction. **Journal of Chromatographic Science**, v. 38, p. 270-278, 2000.
- 14 COELHO, E.; FERREIRA, C.; ALMEIDA, C. M. M. Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons by SPME-GC-FID in environmental an tap water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 1084-1097, 2008.
- 15 KNOW, T. Y.; PARK, J. S.; JUNG, M. Y. Headspace-solid phase microextraction gas chromatography-tandem mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS2) Method for the determination of pyrazines in perilla seed soils: impact of roasting on the pyrazines in perilla seed oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8514-8523, 2013.
- 16 MOREIRA, M. A.; ANDRÉ, L. C.; CARDEAL, Z. L. Analysis of plasticizer migration to meat roasted in plastic bags by SPME-GC/MS. **Food Chemistry**, v. 178, p. 195-200, 2015.
- 17 LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 153-193, 2000.
- 18 MIZUNO, K.; KATAOKA, H. Analysis of urinary 8-isoprostane as an oxidative stress biomarker by stable isotope dilution using automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 112, p. 36-42, 2015.

19 YING, L. L.; MA, Y. C.; XU, B.; WANG, X. H.; DONG, L.Y.; WANG, D. M.; LIU, K.; XU, L. Poly(glycidyl methacrylate) nanoparticle-coated capillary with oriented antibody immobilization for immunoaffinity in-tube solid phase microextraction: Preparation and characterization. **Journal of Chromatography A**, v. 1509, p. 1-8, 2017.

20 QUEIROZ, M. E. C.; MELO, L.P. Recentes avanços da in-tube SPME-LC para bioanálises. **Scientia Chromatographica**, v. 5, p. 167-179, 2013.

21 KATAOKA, H.; ISHIZAKI, A.; NONAKA, Y.; SAITO, K. Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 655, p. 8-29, 2009.

22 WANG, J.; JIANG, N.; CAI, Z.; LI, W.; LI, J.; LIN, X.; XIE, Z.; YOU, L.; ZHANG, Q. Selective capillary coating material for in-tube solid phase microextraction coupled to liquid chromatography to determine drugs and biomarkers in biological samples: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 826, p. 1-11, 2014.

23 WANG, J.; ZHAO, Q.; JIANG, N.; LI, W.; CHEN, L.; LIN, X.; XIE, Z.; YOU, L.; ZHANG, Q. Urea-formaldehyde monolithic column for hydrophilic in-tube solid-phase microextraction of aminoglycosides. **Journal of Chromatography A**, v. 1485, p. 24-31, 2017.

24 MEI, M.; HUANG, X. Online analysis of five organic ultraviolet filters in environmental water samples using magnetism-enhanced monolith-based in-tube solid phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1525, p. 1-9, 2017.

25 YANG, X.; HU, Y.; LI, G.; ZHANG, Z. Acrylamide-functionalized graphene micro-solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for the online analysis of trace monoamine acidic metabolites in biological samples. **Journal of Separation Science**, v. 38, p. 1380-1387, 2015.

26 AHMADI, S. H.; MANBOHI, A.; HEYDAR, K. T. Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction. **Analytica Chimica Acta** v. 853, p. 335-341, 2015.

27 BU, Y.; FENG, J.; TIAN, Y.; WANG, X.; SUN, M.; LUO, C. An organically modified silica aerogel for online in-tube solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1517 p. 203-208, 2017.

- 28 FENG, J.; WANG, X.; TIAN, Y.; BU, Y.; LUO, C.; SUN, M. Electrophoretic deposition of graphene oxide onto carbon fibers for in-tube solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1517, p. 209-214, 2017.
- 29 PAN, J.; ZHANG, C.; ZHANG, Z.; LI, G. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 815, p. 1-15, 2014.
- 30 MOLINER-MARTINEZ, Y.; HERRAEZ-HERNANDEZ, R.; VERDU-ANDRES, J.; MOLINS-LEGUA, C.; CAMPINS-FALCO, P. Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 205-213, 2015.
- 31 QUEIROZ, M. E. C. Microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME) para automação das análises de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 1-9, 2009.
- 32 OLIVEIRA, D.; GOMES, C. P.; DIAS, R. C. S.; COSTA, M. R. P. F. N. Molecular imprinting of 5-fluorouracil in particles with surface RAFT grafted functional brushes. **Reactive and Functional Polymers**, v. 107, p. 35-45, 2016.
- 33 ASFARAM, A.; GHAEDI, M.; DASHTIAN, K. Ultrasound assisted combined molecular imprinted polymer for selective extraction of nicotinamide in human urine and milk samples: Spectrophotometric determination and optimization study. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 640-650, 2017.
- 34 GONG, C. B.; YANG, Y. Z.; YANG, Y. H.; ZHENG, A. X.; LIU, S.; TANG, Q. Photoresponsive hollow molecular imprinted polymer for the determination of trace bisphenol A in water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 481, p. 236-244, 2016.
- 35 TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Molecularly-imprinted solid phase extraction of catechol from aqueous effluents for its selective determination by differential pulse voltammetry. **Analytical Chimica Acta**, v.548, p. 11-19, 2005.
- 36 SELLERGREN, B. Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 9, p. 1578-1582, 1994.

- 37 SARAFRAZ-YAZDI, A.; RAZAVI, N. Application of molecular-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 731, p. 81-90, 2015.
- 38 KUBO, T.; OTSUKA, K. Recent progress in molecularly imprinted media by new preparation concepts and methodological approaches for selective separation of targeting compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 81, p. 102-109, 2016.
- 39 PANAGIOTOPOULOU, M.; BEYAZIT, S.; NESTORA, S.; HAUPT, K.; BUI, B. T. S. Initiator-free synthesis of molecular imprinted polymers by polymerization of self-initiated monomers. **Polymer**, v. 66, p. 43-51, 2015.
- 40 ZHOU, J.; MA, C.; ZHOU, S.; MA, P.; CHEN, F.; QI, Y.; CHEN, H. Preparation, evaluation and application of molecularly imprinted solid-phase microextraction monolith for selective extraction of pirimicarb in tomato and pear. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7478-7483, 2010.
- 41 FU, Q.; FANG, Q.; FENG, B.; SUN, S.; DU, W.; AMUT, E.; XIAO, A.; CHANG, C. Matrine-imprinted monolithic stationary phase for extraction and purification of matrine from *Sophorae flavescens* Ait. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 894-900, 2011.
- 42 SHAO, H.; ZHAO, L.; CHEN, J.; ZHOU, H.; HUANG, S.; LI, K. Preparation, characterization and application of molecularly imprinted monolithic column for 58 hesperetin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 241-247, 2015.
- 43 SHARMA, P. S.; D'SOUZA, F.; WLODZIMIERZ, K. Molecular imprinting for selective chemical sensing of hazardous compounds and drugs of abuse. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 59-77, 2012.
- 44 SANAGI, M. M.; SALLEH, S.; IBRAHIM, W. A. W.; NAIM, A. A., HERMAWAN, D.; MISKAM, M.; HUSSAIN, I.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the analysis of organophosphorus pesticides in fruit samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 32, p. 155-161, 2013.
- 45 FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 361-375, 2008.

- 46 JOSHI, M. D.; ANDERSON, J. L. Recent advances of ionic liquids in separation science and mass spectrometry. **Royal Society of Chemistry**, v. 2, p. 5470-5484, 2012.
- 47 WLAZLO, M.; ALEVIZOU, E. I.; VOUTSAS, E. C.; DOMANSKA, U. Prediction of ionic liquids phase equilibrium with the COSMO-RS model. **Fluid Phase Equilibria**, v. 424, p. 16-31, 2016.
- 48 VERMA, Y. L.; GUPTA, A. K.; SINGH, R. K.; CHANDRA, S. Preparation and characterization of ionic liquid confined hybrid porous silica derived from ultrasonic assisted non-hydrolytic sol-gel process. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 195, p. 143-153, 2014.
- 49 QIU, H.; MALLIK, A. K.; SAWADA, T.; TAKAFUJI, M.; IHARA, H. New surface-confined ionic liquid stationary phases with enhanced chromatographic selectivity and stability by c-immobilization of polymerizable anion and cation pairs. **Chemical Communication**, v. 48, p. 1299-1301, 2012.
- 50 FUMES, B. H.; SILVA, M. R.; ANDRADE, F. N.; NAZARIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Recents advances and future trends in new materials for sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 9-25, 2015.
- 51 ABUJABER, F.; ZOUGAGH, M.; JODEH, S.; RÍOS, A.; BERNARDO, F.J.G.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R.C.R. Magnetic cellulose nanoparticles coated with ionic liquid as a new material for the simple and fast monitoring of emerging pollutants in waters by magnetic solid phase extraction. **Microchemical Journal**, v. 137, p. 490-495, 2018.
- 52 FONTANALS, N.; BORRULL, F.; MARCÉ, R.M. Ionic liquids in solid-phase extraction. . **Trends in Analytical Chemistry**, v. 41, p. 15-26, 2012.
- 53 HOU, X.; LU, X.; TANG, S.; WANG, L.; GUO, Y. Graphene oxide reinforced ionic liquid-functionalized adsorbent for solid-phase extraction of phenolic acids. **Journal of Chromatography B**, v. 1072, p. 123-129, 2018.
- 54 QIAO, L.; DOU, A.; SHI, X.; LI, H.; SHAN, Y.; LU, X.; XU, G. Development and evaluation of new imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 19, p. 137-145, 2013.

- 55 WANG, F.; LIU, S.; YANG, H.; ZHENG, J.; QIU, J.; XU, J.; TONG, Y.; ZHU, F.; OUYANG, G. Hierarchical graphene coating for highly sensitive solid phase microextraction of organochlorine pesticides. **Talanta**, v. 160, p. 217-224, 2016.
- 56 KOUSHIK, D.; GUPTA, S. S.; MALIYEKKAL, S. M.; PRADEEP, T. Rapid dehalogenation of pesticides and organics at the interface of reduce graphene oxide-silver nanocomposite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 308, p. 192-198, 2016.
- 57 ILLAKKIYA, J. T.; RAJALAKSHMI, P. U.; OOMMEN, R. Nebulized spray pyrolysis: a new method for synthesis of graphene film and their characteristics. **Surface & Coatings Technology**, v. 307, p. 65-72, 2016.
- 58 TOFFOLI, A. L.; MACIEL, E. V. S.; FUMES, B. H.; LANÇAS, F. M. The role of graphene-based sorbents in modern sample preparation techniques. **Journal of Separation Science**, v. 41, p. 288-302, 2018.
- 59 AMIRI, A.; GHAEMI, F. Graphene grown on stainless steel mesh as a highly efficient sorbent for sorptive microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 994, p. 29-37, 2017.
- 60 DIZAJI, A. K.; MORTAHEB, H. R.; MOKHTARANI, B. Preparation of supported catalyst by adsorption of polyoxometalate on graphene oxide/reduced graphene oxide. **Materials Chemistry and Physics**, v. 199, p. 424-434, 2017.
- 61 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 166 de 24 de julho 2017. **Diário oficial da União**, Brasília, 2017.
- 62 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Secretaria de defesa agropecuária. **Diário oficial da União**, Brasília, 2011.
- 63 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). Disponível em: < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf>. Acesso em: 15 set. 2016.

64 INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical procedures:** text and methodology – Q2(R1). 2005. 17 p. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf> Acesso em: 15 set. 2016.

65 EURACHEM. Disponível em: <<https://www.eurachem.org/>>. Acesso em: 15 set. 2016.

66 UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em: <<https://www.eurachem.org/>>. Acesso em: 15 set. 2016.

67 NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES (NATA). Disponível em: <<https://www.nata.com.au/>>. Acesso em: 15 set. 2016.

CAPÍTULO 3

Objetivos

3.1 Objetivo geral

Esta tese teve como objetivo geral a síntese de novos materiais para extrair triazinas e sulfonamidas de amostras ambientais e alimentícias, utilizando a microtécnica de extração *in-tube* SPME seguida de LC-MS/MS. Adicionalmente, desenvolver colunas tubulares abertas do tipo PLOT para serem utilizadas como colunas extratoras.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar novos materiais como polímeros impressos molecularmente e não-impressos, líquido iônico e grafeno;
- Avaliar a seletividade dos materiais sintetizados e caracterizar o mais seletivo para cada aplicação;
- Montar e avaliar o desempenho de um sistema *in-tube* SPME acoplado a um equipamento LC-MS/MS e empacotar as colunas extratoras com o material mais seletivo;
- Otimizar as condições de análise da microtécnica *in-tube* SPME acoplada à LC-MS/MS;
- Validar o método desenvolvido utilizando como fase extratora a mais seletiva para os analitos de interesse e aplicar na análise de amostras ambientais e alimentícias.
- Desenvolver colunas tubulares abertas do tipo PLOT para serem utilizadas como colunas extratoras.

CAPÍTULO 4

Síntese dos materiais sorventes para extração miniaturizada

4.1 Introdução

A baixa eficiência, seletividade e estabilidade dos materiais convencionais são algumas das limitações para extrair os analitos de interesse de matrizes complexas, bem como o elevado custo comercial dessas fases extratoras. Desta forma, recentes estudos descrevem o desenvolvimento de novos materiais, mais seletivos, os quais possam ser utilizados como fase extratora em técnicas de preparo de amostras baseadas em sorventes.¹

Esses materiais devem apresentar como principais funções a capacidade de extrair, isolar e pré-concentrar os analitos de interesse. Além disso, devem aprimorar a eficiência de extração e aumentar a seletividade e sensibilidade analítica devido a sua capacidade de reter os compostos mais desejados e eliminar em sua maioria os possíveis interferentes da matriz. Apresentam, assim, características promissoras para utilização como fases extratoras em sistemas miniaturizados de preparo de amostras, e para a identificação e quantificação de diversos analitos em níveis de traços em amostras complexas.^{1,2}

A seleção ideal da fase extratora é uma etapa crucial para o avanço da qualidade dos resultados analíticos e aumento da seletividade para se extrair os compostos de interesse. Porém, muito trabalho ainda será necessário para aprimorar e inovar no desenvolvimento de novos materiais sorventes, respeitando o meio ambiente e mantendo a qualidade analítica para que possam ser aplicados envolvendo diferentes matrizes e analitos no preparo de amostras.²⁻⁴

Desta maneira, vem se buscando inovações visando o desenvolvimento de novos materiais e de estratégias para o contínuo melhoramento dessas fases extratoras, as quais apresentam características promissoras para serem utilizadas em técnicas miniaturizadas de preparo de amostras. Dentre esses materiais destacam-se atualmente os polímeros impressos molecularmente (MIP), os líquidos iônicos (ILs) e o grafeno e seus derivados.

Esse capítulo descreve a síntese de todos materiais citados acima e a posterior avaliação da seletividade e retenção dos mesmos, utilizando duas classes de compostos que foram estudadas nessa tese.

4.2 Objetivo

Esse capítulo teve como objetivo descrever a síntese dos seguintes materiais: polímeros impressos molecularmente (MIP) e não-impressos (NIP), líquidos iônicos (ILs) e grafeno. Posteriormente avaliou-se, dentre esses materiais, qual seria o mais seletivo para analisar triazinas e sulfonamidas. O material mais seletivo foi então caracterizado e, finalmente, avaliou-se a capacidade de retenção desse material para os compostos de interesse.

4.3 Parte experimental

4.3.1 Padrões analíticos e reagentes

Padrões analíticos da simazina (99%), atrazina (98,8%) ametrina (98,5%), sulfadiazina (99%), sulfametoxazol (99%), sulfatiazol (99%), sulfamerazina (99%), sulfametazina (99%), sulfaclorpiridazina (99%), sulfaquinoxalina (95%) e sulfadimetoxina (99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Espanha, Itália e Alemanha). Os solventes utilizados foram acetonitrila, tolueno, acetato de etila e metanol grau HPLC da Tedia (Fairfield, EUA), acetona grau HPLC da Panreac Applichem (Darmstadt, Alemanha) e água deionizada de sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, EUA). Para a síntese do polímero impresso molecularmente e do não impresso utilizou-se 2,2' - azobisisobutironitrila da Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, França), ácido metacrílico da Sigma-Aldrich (Zwijndrecht, Holanda) e trimetilpropanotrimetacrilato da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). Para a síntese do líquido iônico utilizou-se os reagentes 1,4-butano-sultona e 1-vinil imidazol da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), 3-mercaptopropil trimetoxisilano da Sigma-Aldrich (Irvine KA128NB, Reino Unido), 2,2' - azobisisobutironitrila da Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, França) e sílica gel 60 da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Para a síntese do grafeno foi utilizado nitrato de sódio, permanganato de potássio e p-fenileno diamina todos Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) e N,N – dimetilformamina da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), grafite em pó da Sigma-Aldrich (Switzerland, Suíça), ácido sulfúrico da Tedia (Fairfield, USA), ácido clorídrico da Qhemis (Indaiatuba, Brasil) e peróxido de hidrogênio da Synth (Diadema,

Brasil). Para a avaliação da seletividade foi utilizada a fase octadecilsilano (C18) com partículas entre 35 e 75 μm da Alltech (Deerfield – Illinois, EUA).

4.3.2 Preparo das soluções dos padrões analíticos

Soluções estoques individuais das triazinas e sulfonamidas foram preparadas na concentração de 100 mg L^{-1} em acetonitrila e armazenadas a aproximadamente $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Padrões mistos de triazinas e sulfonamidas foram preparados em diferentes concentrações no decorrer do estudo, conforme necessidade.

4.3.3 Síntese dos polímeros impressos molecularmente (MIP) e não-impressos (NIP)

A síntese do polímero impresso molecularmente foi realizada separadamente para as duas classes de compostos estudadas nesse trabalho (triazinas e sulfonamidas) empregando-se o método de precipitação. Para a síntese do MIP-triazinas foram solubilizados em 90 mL de acetonitrila 0,5 mmol do *template* atrazina e 2 mmol do monômero ácido metacrílico (MAA) em um balão de fundo redondo de 100 mL com duas bocas. Para melhor solubilização do *template* a solução foi colocada em ultrassom por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 3 mL do agente de ligação cruzada trimetilpropanotrimetacrilato (TRIM) e 25 mg do iniciador radicalar 2,2' – azobisisobutironitrila (AIBN). A solução foi colocada por mais 10 minutos em ultrassom, posteriormente selada e purgada por 10 minutos em fluxo de nitrogênio antes de ser colocada em contato com o óleo. O balão foi então colocado em um sistema de refluxo sob agitação magnética por 24 horas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.⁵

Para a síntese do MIP-sulfonamidas o procedimento geral anteriormente descrito foi mantido, porém alguns reagentes e quantidades mudaram. Solubilizou-se em 90 mL de acetonitrila 1,0 mmol do *template* sulfadimetoxina e 4 mmol do monômero ácido metacrílico em um balão de fundo redondo de 100 mL com duas bocas. Para melhor solubilização do *template* a solução foi colocada em ultrassom por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 5 mL do agente de ligação cruzada etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e 120 mg do iniciador radicalar 2,2' – azobisisobutironitrila (AIBN).⁶

Ao final da síntese do MIP-triazinas e sulfonamidas preparou-se outros dois polímeros (NIP) pelo mesmo procedimento descrito para cada um, porém sem adição da molécula *template* para que fosse possível avaliar o efeito da impressão molecular.

Tanto o MIP quanto o NIP foram filtrados em papel de filtro e em seguida foram secos em estufa a 40 °C. Os polímeros foram peneirados (peneiras Granutest) e separados no tamanho de 74 a 125 µm. Adicionou-se acetona ao material para que o particulado fino fosse retirado com a precipitação das partículas maiores repetindo-se o procedimento até o sobrenadante ficar limpo.

Após todo o particulado ter sido removido, o material (previamente seco) foi empacotado no modo *dry packing* em colunas de tubo de aço inoxidável de 40 mm de comprimento, 2,0 mm de diâmetro interno e *frit* de 2 µm para a retirada da molécula molde com uma mistura de metanol/ácido acético (9:1) para a atrazina e metanol/acetonitrila (1:1) com 10% de ácido fórmico para retirada da sulfadimetoxina. Os polímeros foram lavados até que os analitos não fossem mais detectados. Para que os dois polímeros ficassem em condições similares utilizou-se o mesmo procedimento para lavagem do NIP. Finalmente, as partículas foram secas em estufa a uma temperatura aproximada de 40 °C para então serem utilizadas.

4.3.4 Síntese do líquido iônico (IL)

A síntese do líquido iônico utilizado neste trabalho foi efetuada em três etapas de forma a obter-se um IL zwitteriônico a base de imidazol seguindo-se em linhas gerais a sugestão de Qiao et al.⁷ Inicialmente uma mistura de 1-vinil imidazol e 1,4-butano-sultona (1:1) foi agitada sem solvente em temperatura ambiente até que a mistura líquida se transformasse em um sólido branco. Esse sólido foi lavado três vezes com acetato de etila para remoção dos reagentes da síntese que não reagiram. O precipitado final foi então seco a vácuo a 60 °C por 24 horas. A segunda etapa da síntese consistiu na secagem a vácuo a 100 °C durante uma noite 2,6 g de sílica (0,2-0,5 mm), as quais foram suspensas em 50 mL de tolueno anidro em um balão de 100 mL de fundo redondo. Adicionou-se então gota a gota 1 mL de uma solução de 3-mercaptopropil trimetoxisilano enquanto agitava-se em uma atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente. Posteriormente, o sistema foi aquecido a 110 °C com refluxo por 24 horas. A suspensão de sílica resultante foi centrifugada e lavada várias vezes com tolueno e metanol. Em seguida, foi seca a vácuo a 60 °C. Finalmente,

juntaram-se os produtos formados na primeira e segunda etapas para reagirem com 0,045 g de 2,2' – azobisisobutironitrila em acetonitrila por 24 horas a 60 °C. A mistura reacional foi centrifugada e lavada diversas vezes com acetonitrila, água e metanol. Finalmente, o material resultante foi seco a vácuo a aproximadamente 60 °C para ser utilizado.

4.3.5 Síntese do grafeno (G)

O método escolhido para sintetizar o grafeno (G) envolve primeiramente a obtenção do óxido de grafite proposta por Hummers e Offeman⁸, o qual, em seguida, passou por um processo de esfoliação para obtenção do óxido de grafeno que finalmente foi reduzido a grafeno. Colocou-se no balão de fundo redondo 0,5 g de grafite em pó, 0,5 g de nitrato de sódio e 23 mL de ácido sulfúrico (96%), os quais foram agitados em banho de gelo por 1 hora. Em seguida, lentamente, foram adicionados 3,0 g de permanganato de potássio. Removeu-se o banho de gelo e agitou-se a mistura em temperatura ambiente por 2 horas. Adicionou-se então lentamente 46 mL de água utilizando um conta gotas e a solução foi novamente aquecida em banho de óleo a 98 °C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se mais 100 mL de água e 10 mL de peróxido de hidrogênio 30%. A mistura foi então centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos e lavada seis vezes com solução de ácido clorídrico 10% (v/v) para remoção de íons metálicos e depois com água deionizada para remover o ácido. O precipitado final (óxido de grafite) foi então seco a 40 °C por 72 horas e disperso em 100 mL de água por uma hora em ultrassom para se preparar uma solução de 1 mg mL⁻¹ de óxido de grafeno (GO). Para redução de óxido de grafeno a grafeno 1,2 g de p-fenilenodiamina (agente redutor) foram dissolvidas em 100 mL de N,N - dimetilformamida e adicionado na solução de 100 mL de óxido de grafeno; em seguida levou-se no ultrassom para completa dispersão. A mistura foi colocada em refluxo por 36 horas no banho de óleo a 98 °C. A solução final foi então lavada com acetona para remoção de toda p-fenilenodiamina e seca em estufa a aproximadamente 40 °C para posterior utilização.

4.3.6 Avaliação da seletividade dos materiais sintetizados

Para avaliar qual dos materiais desenvolvidos seria o mais seletivo para as triazinas foi realizado um estudo da seletividade dos materiais incluindo o polímero impresso molecularmente

e não-impresso, líquido iônico, grafeno e uma fase C18 comercial. O experimento consistiu na pesagem de uma massa de 5,0 mg em duplicata de cada material em um tubo tipo *eppendorf* de 2 mL. Em seguida foi adicionado 1,0 mL de uma solução fortificada com as triazinas na concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. O tubo *eppendorf* contendo o material e a solução foi colocado em uma mesa agitadora (Marca IKA® e Modelo VXR Basic Vibrax) por 1 hora a 1000 rpm. Posteriormente, foi realizada a centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm em uma microcentrífuga (Marca *Eppendorf*, modelo MiniSpin Plus) e retirado o sobrenadante o qual foi transferido para outro tubo *eppendorf* e centrifugado várias vezes até não haver mais precipitação dos materiais. Antes da injeção no HPLC-UV/Vis o sobrenadante foi filtrado em filtro de celulose regenerada 0,22 μm . Para as sulfonamidas realizou-se o mesmo procedimento em dia diferente utilizando os polímeros sintetizados para essa classe de compostos e novas pesagens de líquido iônico, grafeno e C18.

4.3.7 Avaliação do material mais seletivo

Após avaliar todos os materiais com o teste de seletividade foram realizados testes adicionais com o material mais seletivo. As colunas de tubo de aço inoxidável (40 mm de comprimento, 2,0 mm de diâmetro interno e *frit* de 2 μm) foram empacotadas com o material de interesse. O empacotamento foi realizado utilizando-se uma bomba LC-20AD e como fase móvel água e acetonitrila. Para avaliar o desempenho das colunas de extração empacotadas, injetou-se na coluna 20 μL de soluções individuais dos analitos (triazinas e sulfonamidas) na concentração de 10 mg L^{-1} . Injetou-se acetona como composto não retido para ser utilizado como tempo morto. A Tabela 4.1 apresenta os comprimentos de onda monitorados para os analitos de interesse e as fases móveis utilizadas para cada classe de compostos.

O fluxo de fase que foi percolada pela coluna extratora para avaliar a retenção dos analitos nos materiais foi de 1 mL min^{-1} composta por acetonitrila e água na proporção de 30:70 (para alguns experimentos essa porcentagem variou). Esse experimento foi realizado em triplicata para cada variação da porcentagem de solvente orgânico utilizada. Injetou-se também solução de alguns contaminantes na coluna extratora na concentração de 10 mg L^{-1} , utilizando as mesmas condições de análise dos analitos, porém com comprimentos de onda específicos para os contaminantes para

que também fosse possível avaliar o comportamento deles na fase que apresentou maior seletividade para os analitos de interesse nesse trabalho.

Tabela 4.1: Condições cromatográficas na separação das triazinas e sulfonamidas por HPLC-UV/Vis.

	Triazinas	Sulfonamidas
Temperatura da coluna	45 °C	40 °C
Fase móvel	Água e acetonitrila	Água e acetonitrila (ambas com 0,1% de ácido acético)
Fluxo da fase móvel	0,2 mL min ⁻¹	0,2 mL min ⁻¹
Modo de eluição	Isocrático (40% da fase orgânica por 10 minutos)	8% da fase orgânica por 1 minuto, aumento de 8 a 30% durante 24 minutos, diminuição de 30 a 8% em 2 minutos e por fim mantém 8% durante 5 minutos
Comprimento de onda	220 nm	254 nm
Volume de injeção	5 µL	5 µL

Para avaliar o material foram calculados o fator de retenção (k), o fator de separação (α), o fator de impressão (I_f) e o índice de retenção (RI).^{7,9,10} A interatividade do analito de interesse com o material mais seletivo foi avaliada através do tempo de retenção do mesmo com o tempo de eluição de um composto não retido (acetona) utilizando-se a Equação 4.1 para calcular o fator de retenção. Sendo t_0 o tempo de eluição de um composto não retido.

$$k = (t_R - t_0) / t_0$$

Equação 4.1

Para avaliar a seletividade da separação entre dois analitos com o mesmo material foi calculado o fator de separação utilizando-se a Equação 4.2. Nesse caso a comparação foi feita utilizando os analitos de interesse em comparação com outros compostos diferentes da classe dos analitos estudados (concomitante) para aquele material.

$$\alpha = k_{\text{analito}}/k_{\text{concomitante}}$$

Equação 4.2

Com o fator de impressão (I_f) avaliou a capacidade de retenção do materiais seletivos utilizando um mesmo composto para eluição. Os cálculos foram realizados utilizando a Equação 4.3.

$$I_f = k_{\text{MIP}}/k_{\text{NIP}}$$

Equação 4.3

O último parâmetro calculado através da Equação 4.4 foi o índice de retenção (RI) para avaliar o grau de retenção de um concomitante em relação ao analito de interesse.

$$\text{RI} = I_{\text{fconcomitante}}/I_{\text{fanalito}}$$

Equação 4.4

4.3.8 Caracterização do material mais seletivo

Após a obtenção dos materiais de interesse, o que apresentou maior seletividade pelos analitos foi caracterizado utilizando-se duas técnicas: Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As análises no infravermelho (FTIR) foram realizadas com um equipamento Shimadzu IRAffinity 1 (Kyoto, Japão). Utilizou-se discos de brometo de potássio (KBr) no preparo das amostras e a faixa espectral avaliada variou de 400 a 4000 cm^{-1} .

Para o MEV, um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, Inglaterra) com detector OXFORD (modelo 7060) foi operado com feixe de elétrons de 20 kV. As amostras foram recobertas com uma fina camada (6 nm) de ouro, já que não apresentam condutividade elétrica adequada, e mantidas em um dessecador até o momento da análise.

4.3.9 Instrumentação e condições cromatográficas para avaliação da seletividade e retenção das triazinas e sulfonamidas

As análises de seletividade para ambas as classes de compostos foram realizadas em um sistema HPLC (Série Prominence LC-20A - Shimadzu) com detecção por UV/Vis, conforme as condições da Tabela 4.1. Em todas as análises utilizou-se para separação cromatográfica dos compostos uma coluna analítica Kinetex (Phenomenex) XB-C18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μ m). Posteriormente ao teste de seletividade avaliou-se a retenção dos analitos no mesmo equipamento utilizando-se colunas de extração empacotadas com o material mais seletivo (identificado pelo teste de seletividade).

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Avaliação da seletividade dos materiais sintetizados

As Figuras 4.1 e 4.2 apresentam a porcentagem de cada triazina e sulfonamida, respectivamente, retida em cada um dos materiais desenvolvidos.

Figura 4.1: Teste de seletividade das triazinas com os materiais sintetizados.

Figura 4.2: Teste de seletividade das sulfonamidas com os materiais sintetizados.

A partir dos gráficos foi possível verificar que os polímeros impressos molecularmente (MIP) apresentaram no geral maior retenção para as triazinas e sulfonamidas estudadas. Este fato deve-se, provavelmente, estar relacionado com as cavidades seletivas impressas nesse material e que, consequentemente, levam ao reconhecimento molecular dos analitos. Apesar de ser um material controle, o polímero não-impresso também demonstrou boa retenção dos analitos; por se tratar de um material poroso, para alguns analitos da classe das sulfonamidas apresentou resultados superiores aos do MIP. Considerando a retenção dos outros materiais para a classe das triazinas, os analitos atrazina e ametrina foram retidos significativamente pela fase comercial C18 e a simazina apresentou maior retenção com o grafeno. Para essa classe de compostos os líquidos iônicos não demonstraram elevada seletividade, sendo o analito ametrina o que mostrou maior afinidade pelo material. Para todas as sulfonamidas o líquido iônico apresentou menor capacidade de retenção. O grafeno apresentou melhor retenção com a sulfadiazina e sulfamerazina, já para os analitos sulfaclopiridazina, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina a retenção foi tão boa quanto a dos polímeros. A fase comercial C18 apresentou pouca retenção para essa classe de antibióticos, sendo que a sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina foram as que demonstraram maior capacidade de retenção em C18. No geral, as sulfonamidas foram melhor extraídas com o MIP, porém devido à grande quantidade de sulfas (oito) presentes no polímero para realizar o teste de seletividade

provavelmente ocorreu uma competição dos poros do material sendo que algumas conseguiram ficar mais retidas que outras.

Portanto, foi utilizado como fase extratora tanto para as triazinas quanto para as sulfonamidas os polímeros impressos molecularmente, já que esses conseguiram extrair a maioria dos analitos. Foi possível perceber também que em ambos os polímeros as moléculas *template* (atrazina e sulfadimentoxina) ficaram 100% retidas no material.

4.4.2 Caracterização do material mais seletivo para o sistema *in-tube* SPME (polímeros impressos molecularmente e não-impressos)

4.4.2.1 Espectrometria vibracional no infravermelho (FTIR)

Essa técnica foi utilizada para confirmar a síntese dos polímeros pela presença de grupos funcionais que são característicos de cada um deles, fornecendo assim informações qualitativas. As Figuras 4.3 e 4.4 apresentam os espectros de infravermelho dos polímeros MIP e NIP sintetizados neste trabalho para as triazinas e sulfonamidas, respectivamente.

Figura 4.3: Espectros de absorção vibracional na região do infravermelho dos polímeros MIP e NIP para as triazinas.

Figura 4.4: Espectros de absorção vibracional na região do infravermelho dos polímeros MIP e NIP para as sulfonamidas.

Para ambas as figuras os espectros do material impresso e do não-impresso são similares estruturalmente, já que os polímeros (MIP e NIP) apresentam os mesmos grupos funcionais incorporados na estrutura polimérica por terem sido utilizados os mesmos reagentes em cada síntese acrescentando somente a molécula molde no MIP para as triazinas e sulfonamidas.

As bandas observadas pela técnica de FTIR são características das ligações encontradas no polímero ácido metacrílico. O ácido metacrílico foi utilizado tanto na síntese do MIP para a classe das triazinas quanto para as sulfonamidas. O monômero funcional da síntese tem como função formar a rede polimérica através de diferentes tipos de ligações entre as moléculas em solução. Além disso, devem suportar os grupos funcionais necessários e complementares ao *template*, já que o monômero é misturado com o solvente e com a molécula *template*.^{11,12}

De acordo com os espectros é possível atribuir aos dois polímeros (MIP e NIP) das duas classes de compostos as seguintes bandas de vibração: deformação axial em 3589 cm^{-1} que corresponde a grupos hidroxila (OH) (1). Estiramento de C-H em 3182 cm^{-1} (2); deformação axial de C=O em 1735 cm^{-1} (3). Deformação angular no plano e fora do plano do C-O-H em 1637 cm^{-1} (4) e 979 cm^{-1} (5).

4.4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Essa técnica foi utilizada para avaliar a morfologia das superfícies dos polímeros, ou seja, a disposição, tamanho e forma das partículas associando com as características retentivas de cada polímero. Nas Figuras 4.5 e 4.6 são apresentadas as morfologias do MIP e NIP para os polímeros sintetizados para as triazinas e sulfonamidas, respectivamente.

Figura 4.5: Imagens da microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 10.000 vezes: A) MIP e B) NIP para as triazinas.

Figura 4.6: Imagens da microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 10.000 vezes: A) MIP e B) NIP para as sulfonamidas.

Como pode ser observado nos resultados de MEV obtidos para as triazinas e sulfonamidas, tanto o polímero impresso quanto o não impresso apresentaram partículas irregulares e distribuição dos tamanhos não uniforme. O polímero impresso apresentou partículas em escala nanométrica (microesferas), maior grau de agregação e rugosidade quando comparado ao correspondente polímero não impresso, apresentando assim maior área superficial e, conseqüentemente, um melhor reconhecimento molecular. Percebeu-se que para a mesma ampliação das figuras (MIP e NIP) o polímero não impresso apresentou partículas maiores, com menor grau de agregação e com distribuição mais uniforme. Esta característica sugere que o *template* exerce influência na morfologia do polímero, visto que o polímero impresso apresentou partículas menores e com maior agregação. Além disso, a superfície rugosa indica que a presença das moléculas de *template* durante a síntese é de fundamental importância para a formação das cavidades e poros nos polímeros.

4.4.3 Avaliação do material mais seletivo

De acordo com os testes de seletividade as triazinas e sulfonamidas apresentaram maior afinidade pelos polímeros impressos molecularmente. Diante disso, realizou-se a avaliação dos polímeros com os analitos de interesse. Para avaliar a capacidade de retenção do MIP e NIP sintetizados comparou-se o tempo de retenção das triazinas e sulfonamidas com moléculas interferentes nas colunas empacotadas com os materiais. Os MIPs foram comparados com os NIPs calculando-se o fator de retenção para cada analito (k). A Tabela 4.2 apresenta os valores de k para o MIP e NIP utilizando algumas das condições descritas no item 4.3.7.

De forma geral, os polímeros impressos molecularmente para as triazinas e sulfonamidas apresentaram melhor fator de retenção (valores de k entre 4,8-2,5 e 0,6-0,2, respectivamente) quando comparados com os polímeros não-impressos. Isto sugere que eles possuem sítios de reconhecimento específico para aqueles compostos sendo, assim, mais seletivos utilizando a porcentagem de acetonitrila e água de 30:70. Esse comportamento permaneceu constante até mesmo quando foi variada a porcentagem de acetonitrila e água (20:80 e 15:85) para a molécula *template* de cada grupo. Além disso, os interferentes (caféina, norfloxacino, estrona e progesterona) apresentaram valores de k menores quando comparados com os analitos de interesse, apresentando pouca retenção e afinidade pelos polímeros.

Tabela 4.2: Comparação do fator de retenção do MIP e NIP para as triazinas e sulfonamidas em relação a alguns interferentes variando a porcentagem de fase móvel pela coluna extratora.

Acetonitrila e água (30:70)					
	Triazinas			Sulfonamidas	
	k_{MIP}	k_{NIP}		k_{MIP}	k_{NIP}
Atrazina	4,81	2,69	Sulfadimetoxina	0,45	0,39
Ametrina	8,49	6,25	Sulfamerazina	0,22	0,20
Simazina	2,59	1,59	Sulfatiazol	0,21	0,20
Cafeína	0,39	0,17	Sulfametazina	0,22	0,19
Norfloxacino	0,27	0,12	Sulfadiazina	0,22	0,11
Estrona	0,14	0,14	Sulfaquinoxalina	0,69	0,59
Progesterona	0,16	0,15	Sulfametoxazol	0,46	0,44
			Sulfaclorpiridazina	0,43	0,37
			Cafeína	0,16	0,18
			Norfloxacino	0,08	0,11
			Estrona	0,11	0,14
			Progesterona	0,11	0,15
Acetonitrila e água (20:80)					
	Triazinas			Sulfonamidas	
	k_{MIP}	k_{NIP}		k_{MIP}	k_{NIP}
Atrazina	16,24	8,71	Sulfadimetoxina	2,09	1,77
Acetonitrila e água (15:85)					
	Triazinas			Sulfonamidas	
	k_{MIP}	k_{NIP}		k_{MIP}	k_{NIP}
Atrazina	38,80	18,32	Sulfadimetoxina	7,74	7,45

Pelo fator de separação (α) foi possível avaliar a relação do fator de retenção para o analito utilizado como *template* (atrazina/sulfadimetoxina) em função dos outros analitos da mesma classe e dos interferentes. A Tabela 4.3 apresenta os valores calculados para esse parâmetro.

Tabela 4.3: Fator de separação dos polímeros impressos molecularmente que foram sintetizados para as triazinas e sulfonamidas.

Acetonitrila e água (30:70)			
Triazinas		Sulfonamidas	
	α_{MIP}		α_{MIP}
Atrazina	*	Sulfadimetoxina	*
Ametrina	0,57	Sulfamerazina	2,00
Simazina	1,85	Sulfatiazol	2,13
Cafeína	12,23	Sulfametazina	2,03
Norfloxacino	17,81	Sulfadiazina	0,65
Estrona	33,64	Sulfaquinoxalina	0,65
Progesterona	29,54	Sulfametoxazol	0,98
		Sulfaclopiridazina	1,04
		Cafeína	2,84
		Norfloxacino	5,82
		Estrona	4,00
		Progesterona	4,00

* molécula *template*

Quanto maior for o valor de α maior será a retenção da molécula *template* comparada com o concomitante, ou seja, a molécula *template* e os analitos de interesse da mesma classe devem ficar mais retidos no material do que os contaminantes. Pode-se observar que o polímero reteve os compostos de interesse, apresentando para a classe das triazinas valores de α igual a 0,57 para ametrina e para simazina o α foi de 1,85 apresentando menor seletividade e consequentemente retenção com o polímero quando comparado com a ametrina. Já para as sulfonamidas os valores de α para a sulfadiazina, sulfaquinoxalina, sulfametoxazol e sulfaclopiridazina variaram de 0,65 a 1,04 demonstrando que essas sulfas apresentaram melhor retenção. A sulfamerazina, sulfatiazol e sulfametazina foram as que apresentaram menor retenção quando comparadas a molécula molde sulfadimetoxina. Em relação aos interferentes a atrazina e sulfadimetoxina foram mais retidas. É necessário levar em consideração que o valor de α calculado seguiu a Equação 4.2, a qual não é totalmente análoga ao fator de separação empregado em cromatografia, já que o k das moléculas *templates* para ambas as classes de compostos foi sempre mantido no numerador, independentemente de ser o composto mais ou menos retido.

Outro parâmetro calculado para avaliar os polímeros foi o fator de impressão (I_f), o qual permite analisar o desempenho dos MIPs em relação aos NIPs. A Tabela 4.4 apresenta os valores de I_f .

Tabela 4.4: Fator de impressão dos polímeros sintetizados.

Acetonitrila e água (30:70)			
Triazinas		Sulfonamidas	
	I_f (MIP, NIP)		I_f (MIP, NIP)
Atrazina	1,78	Sulfadimetoxina	1,16
Ametrina	1,36	Sulfamerazina	1,11
Simazina	1,63	Sulfatiazol	1,05
Cafeína	2,26	Sulfametazina	1,14
Norfloxacino	2,26	Sulfadiazina	2,12
Estrona	1,02	Sulfaquinoxalina	1,16
Progesterona	1,06	Sulfametoxazol	1,04
		Sulfaclorpiridazina	1,15
		Cafeína	0,86
		Norfloxacino	0,70
		Estrona	0,79
		Progesterona	0,76

O fator de impressão para a maioria dos analitos de interesse foi maior que 1 mostrando que o reconhecimento molecular foi melhor nos polímeros impressos molecularmente quando comparados com os polímeros não-impressos. Diante disso, os MIPs são mais seletivos para os compostos de interesse já que possuem cavidades seletivas para determinada classe de analitos (triazinas e sulfonamidas). Para o grupo das triazinas, os interferentes cafeína e norfloxacino foram exceções já que apresentaram valores de I_f maior que 1, indicando que esses ficaram bem mais retidos no polímero impresso molecularmente comparado ao não-impresso.

O último parâmetro calculado foi o índice de retenção (RI), o qual permite avaliar o fator de impressão da molécula *template* em relação aos outros analitos da mesma classe e dos interferentes. A Tabela 4.5 apresenta os índices de retenção para os polímeros das triazinas e sulfonamidas sintetizados.

Tabela 4.5: Índice de retenção dos polímeros sintetizados.

Acetonitrila e água (30:70)			
Triazinas		Sulfonamidas	
	RI		RI
Atrazina	1,00	Sulfadimetoxina	1,00
Ametrina	0,76	Sulfamerazina	0,96
Simazina	0,91	Sulfatiazol	0,90
Cafeína	1,26	Sulfametazina	0,98
Norfloxacino	1,27	Sulfadiazina	1,83
Estrona	0,57	Sulfaquinoxalina	1,00
Progesterona	0,59	Sulfametoxazol	0,90
		Sulfaclorpiridazina	1,00
		Cafeína	0,74
		Norfloxacino	0,61
		Estrona	0,69
		Progesterona	0,65

Foi possível perceber com os resultados do RI que a maioria das triazinas apresentou uma interação mais fraca com os polímeros em relação ao *template* (valores <1). Porém, dois interferentes das triazinas (cafeína e norfloxacino) apresentaram valores de RI superiores a 1 indicando uma interação mais forte com o polímero do que a molécula *template*, já para todos os interferentes das sulfonamidas os valores foram inferiores a 1, indicando que o fator de impressão para o *template* foi maior em relação aos interferentes. Os outros analitos da classe das sulfonamidas apresentaram valores de $RI \leq 1$ demonstrando interações mais fracas e iguais quando comparados com o *template*, com exceção da sulfadiazina que apresentou valor igual a 1,83.

4.5 Conclusão

Após a síntese e caracterização dos materiais a serem estudados como sorventes, foi realizada a avaliação dos mesmos como fases extratoras para serem utilizadas em microtécnicas de extração. Dentre os materiais sintetizados (polímeros impressos e não-impressos, líquido iônico e grafeno) foi possível determinar, através de testes de seletividade, que o polímero impresso molecularmente apresentou maior afinidade pelas duas classes de compostos que foram estudadas

nesse trabalho (triazinas e sulfonamidas) quando comparado com os outros materiais: líquido iônico, grafeno e uma fase comercial C18.

Os polímeros impressos molecularmente e não-impressos foram caracterizados por espectrometria vibracional no infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para posteriormente o MIP ser utilizado como fase extratora em sistemas automatizados. Além disso, testes para avaliar a retenção e seletividade dos polímeros impressos e não-impressos com os analitos de interesse foram realizados e demonstraram que o MIP apresentou boa retenção e seletividade quando comparado com o material não impresso e com os interferentes.

Referências bibliográficas

1 DÍAZ-ÁLVAREZ, M.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Hollow fiber membrane-protected molecularly imprinted microspheres for micro solid-phase extraction and clean-up of thiabendazole in citrus samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1531, p. 39-45, 2018.

2 JI, W.; SUN, R.; DUAN, W.; WANG, X.; WANG, T.; MU, Y.; GUO, L. Selective solid phase extraction of chloroacetamide herbicides from environmental water samples by amphiphilic magnetic molecularly imprinted polymers. **Talanta**, v. 170, p. 111-118, 2017.

3 HAN, Q.; LIANG, Q.; ZHANG, X.; YANG, L.; DING, M. Graphene aerogel based monolith for effective solid-phase extraction of trace environmental pollutants from water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1447, p. 39-46, 2016.

4 ZHANG, J.; LIU, D.; MENG, X.; SHI, Y.; WANG, R.; XIAO, D.; HE, H. Solid phase extraction based on porous magnetic graphene oxide/ β -cyclodextrine composite coupled with high performance liquid chromatography for determination of antiepileptic drugs in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1524, p. 49-56, 2017.

5 ANDRADE, F. N.; SANTOS NETO, A. J.; LANÇAS, F. M. Microextraction by packed sorbent liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry of triazines employing a molecularly imprinted polymer. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 3150-3156, 2014.

6 SHI, X.; MENG, Y.; LIU, J.; SUN, A.; LI, D.; YAO, C.; LU, Y.; CHEN, J. Group-selective molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the simultaneous determination of six sulfonamides in aquaculture products. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1071-1076, 2011.

7 QIAO, L.; DOU, A.; SHI, X.; LI, H.; SHAN, Y.; LU, X.; XU, G. Development and evaluation of new imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 19, p. 137-145, 2013.

8 HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, p. 1339-1339, 1958.

9 TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L.T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, p. 1076-1086, 2005.

10 SPIVAK, D. A. Optimization, evaluation and characterization of molecularly imprinted polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1779-1794, 2005.

11 STUART, B. H. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. New York: Wiley, 2004. 224 p.

12 SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

CAPÍTULO 5

Desenvolvimento do sistema on-line automatizado in-tube SPME

5.1 Introdução

A microextração em fase sólida no tubo, conhecida como *in-tube* SPME é considerada uma eficiente técnica de preparo de amostra que emprega um tubo capilar de sílica fundida, aço inoxidável e outros materiais para extração. No seu formato original, o tubo é revestido internamente com uma fase estacionária mais apropriada para extrair os analitos de interesse. A *in-tube* SPME tem como objetivo simplificar as análises já que reuni em uma única etapa injeção, extração, pré-concentração, separação e detecção dos compostos de interesse no mesmo equipamento. Essa técnica foi desenvolvida com o intuito de superar as desvantagens da SPME convencional, como baixa capacidade de sorção e elevada fragilidade, apresentando como vantagem a extração direta dos analitos de interesse da matriz aquosa e a concentração deles na fase estacionária que recobre internamente o capilar.¹⁻⁴

Esses tipos de sistemas de preparo de amostras vêm sendo facilmente automatizados, ou seja, pode ser acoplado em linha com o sistema de HPLC permitindo, assim, total automatização do processo de extração. Esses acoplamentos apresentam várias vantagens como aumentar exponencialmente a eficiência das análises com tecnologias eficientes e metodologias de baixo custo, melhorar a sensibilidade analítica, diminuição dos impactos ambientais, minimização de solventes tóxicos, redução de perdas no processo analítico.⁵⁻⁷

Os modos de operação desse sistema baseado no acoplamento *on-line* por dispositivo de comutação de coluna já foram descritos no Capítulo 2 dessa tese. Nesse tipo de acoplamento utiliza-se o cromatógrafo em um arranjo bidimensional (conhecido também como *column switching*), onde a coluna de extração está interligada com a coluna analítica por meio de uma válvula de comutação que pode ser interna ou externa ao equipamento. Posteriormente a montagem de todo o sistema, a amostra é então injetada pelo injetor automático do LC, passando pela coluna de extração onde os analitos ficarão retidos e os interferentes da amostra são direcionados para o descarte. A válvula de comutação é então girada para a outra posição e os analitos são eluídos da coluna de extração e direcionados para a coluna analítica, onde serão separados e posteriormente detectados.^{2,8-11}

Esse tipo de montagem do sistema apresenta algumas vantagens como, por ser um método totalmente automatizado, evita perdas da amostra no processo de extração, os resultados apresentam maior reprodutibilidade, a mesma coluna de extração por ser utilizada várias vezes,

suportando assim muitas injeções e o risco de contaminação das amostras é reduzido, já que há pouca manipulação. O acoplamento do *in-tube* SPME com técnicas cromatográficas miniaturizadas foi explorado somente em algumas aplicações, apresentando ainda amplo campo para evolução de pesquisas nessa área. A total miniaturização desses sistemas que abrangem em uma única etapa diversas funções ainda é um grande desafio, uma vez que poucas experiências são descritas na literatura; porém, já se observa exemplos bem sucedidos de sua aplicação.^{2,8-11}

5.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo foi montar um sistema de extração *in-tube* SPME acoplado *on-line* a um equipamento LC-MS/MS para analisar triazinas e sulfonamidas em matrizes alimentícias e ambientais.

5.3 Parte experimental

5.3.1 Montagem do sistema *in-tube* SPME

O sistema *in-tube* SPME acoplado com UPLC-MS/MS foi montado no modo de configuração de extração única (*flow through extraction*), sendo que a amostra passa somente uma vez pela coluna extratora com o fluxo somente em uma direção. A eluição dos analitos foi realizada na direção contrária do fluxo de carregamento da amostra, conhecido como *back-flush*.

A configuração do sistema possui uma válvula de comutação externa com seis pórticos (Supelpro - Supelco, Bellefont, USA) mantida em temperatura ambiente para mudança das posições carregar e eluir. Durante a extração a válvula é colocada na posição carregar e 50 µL da amostra são injetados na coluna extratora utilizando uma bomba externa com a fase de carregamento mais adequada para cada aplicação (Shimadzu LC-10Ai, Japão) e esta foi conectada ao injetor automático do cromatógrafo líquido para carregamento da amostra. Posteriormente ao carregamento da amostra, a válvula externa é colocada na posição eluir para que ocorra a eluição dos analitos de interesse. Os analitos são eluídos com a fase móvel apropriada para cada analito de estudo. A fase móvel é percolada pela coluna extratora utilizando as bombas do cromatógrafo

líquido. Após a eluição dos analitos da coluna extratora eles são direcionados para a coluna analítica onde são separados e, em seguida, quantificados no sistema MS/MS. A operação do sistema é apresentada na Figura 5.1.

Figura 5.1: Configuração do sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS.

Fonte: Autoria própria.

A coluna de extração utilizada nesse sistema foi produzida empacotando-se tubos de aço inoxidável e de sílica fundida com o material mais seletivo para cada classe de analito a ser estudado nessa tese. No decorrer das aplicações estudadas, dois tubos de aço inoxidável foram utilizados, sendo um com comprimento de 40 mm e diâmetro interno de 2 mm e o outro de 50 mm de comprimento e diâmetro interno de 500 μ m. Adicionalmente, um tubo de sílica fundida com 50 mm de comprimento e diâmetro interno de 500 μ m foi também avaliado.

Nas terminações de todas as colunas foram colocados anilhas e uniões de volume morto zero (*zero dead volume* ou ZDV) com *frits* de 2 μ m de porosidade para evitar perda do material e garantir o fechamento apropriado da coluna. O empacotamento das colunas foi feito pelo método

slurry packing, similar ao empacotamento de colunas de cromatografia líquida, o qual consiste na pressurização do material de empacotamento para o interior da coluna. Para tal utilizou-se uma bomba de alta pressão (Shimadzu Prominence LC-20A) que impulsiona, juntamente com o sorvente um solvente adequado. Foi utilizado como solvente para o empacotamento água deionizada e acetonitrila, e o fluxo variou de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ até que todo o material fosse depositado no interior da coluna. No final foi percolado pela coluna novamente água deionizada para retirar o solvente orgânico.

Depois de pronta, a coluna de extração foi conectada a válvula externa do equipamento utilizando-se tubos de PEEK (1/16 in. de diâmetro externo e 0,005 de diâmetro interno). Todos os consumíveis utilizados para produzir a coluna capilar foram adquiridos da Valco.¹⁵

Para cada aplicação realizada no sistema *in-tube* SPME quatro etapas foram necessárias para reproduzir a metodologia desenvolvida, as quais foram: extração, eluição, limpeza e condicionamento. As condições de cada etapa são mostradas nos capítulos de cada aplicação, já que dependendo dos analitos e da matriz de análise ocorreram mudanças no tempo do giro da válvula, na posição da válvula de comutação (carregar/eluir), composição do solvente na coluna extratora e na coluna analítica. Além disso, foram otimizadas algumas variáveis do sistema para cada aplicação realizada.

A Figura 5.2 mostra um esquema da coluna empacotada utilizada para a extração onde foram colocadas uniões no início e no fim da coluna juntamente com os *frits* que tem como função segurar as partículas no interior do tubo. O tubo foi completamente preenchido com o material de extração e em suas extremidades foram colocadas anilhas para garantir fixação e vedação. A Figura 5.3 mostra a coluna já inserida na válvula de comutação externa.

Figura 5.2: Esquema de montagem da coluna utilizada para extração dos analitos.

Figura 5.3: Coluna extratora inserida na válvula de comutação do sistema *in-tube* SPME.

Fonte: Autoria própria.

5.4 Resultados e discussão

O sistema utilizado apresentou resultados satisfatórios, elevada repetibilidade e seletividade nas análises em que foi utilizado nessa tese. Nos capítulos 6; 7 e 8 são apresentados os resultados obtidos em diferentes aplicações em que se utilizou o sistema *in-tube* SPME.

5.5 Conclusão

Neste capítulo descreveu-se a montagem e avaliação de um sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS, o qual foi posteriormente aplicado com êxito para análise de herbicidas da classe das triazinas em amostras de uvas e sucos de uva integral e amostras de água, e para análise de antibióticos da classe das sulfonamidas em amostras de leite apresentando baixos limites de detecção, elevada sensibilidade e seletividade. Os resultados são apresentados nos capítulos seguintes, de acordo com cada aplicação específica.

Referências bibliográficas

- 1 KATAOKA, H.; ISHIZAKI, A.; NONAKA, Y.; SAITO, K. Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 655, p. 8-29, 2009.

- 2 HAKOBYAN, L.; TOLOS, J. P.; MOLINER-MARTINEZ, Y.; MOLINS-LEGUA, C.; RAMOS, J. R.; GORDON, M.; RAMIREZ-GALLEYMORE, P.; CAMPINS-FALCO, P. Determination of meropenem in endotracheal tubes by in-tube solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 151, p. 170-177, 2018.

- 3 AHMADI, S. H.; MANBOHI, A.; HEYDAR, K. T. Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p. 335-341, 2015.

- 4 SUN, M.; FENG, J.; BU, Y.; LUO, C. Ionic liquid coated copper wires and tubes for fiber-in-tube solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1458, p. 1-8, 2016.

- 5 VITTA, Y.; MOLINER-MARTINEZ, Y.; CAMPINS-FALCO, P.; CUERVO, A. F. An in-tube SPME device for the selective determination of chlorophyll *a* in aquatic systems. **Talanta**, v. 82, p. 952-956, 2010.

- 6 MEI, M.; HUANG, X. Online analysis of five organic ultraviolet filters in environmental water samples using magnetism-enhanced monolith-based in-tube solid phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1525, p. 1-9, 2017.

- 7 FENG, J.; SU, M.; BU, Y.; LUO, C. Development of a cheap and accessible carbon fibers-in-poly(etherether ketone) tube with high stability for online in-tube solid-phase Microextraction. **Talanta**, v. 148, p. 313-320, 2016.

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

- 9 SERRA-MORA, P.; JORNET-MARTINEZ, N.; MOLINER-MARTINEZ, Y.; CAMPINS-FALCO, P. In tube-solid phase microextraction-nano liquid chromatography: Application to the determination of intact and degraded polar triazines in waters and recovered struvite. **Journal of Chromatography A**, v. 1513, p. 51-58, 2017.
- 10 YANG X.; HU Y.; LI G.; ZHANG Z. Acrylamide-functionalized graphene micro-solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for the online analysis of trace monoamine acidic metabolites in biological samples. **Journal of Separation Science**, v. 38, p. 1380-1387, 2015.
- 11 QUEIROZ, M. E. C. Microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME) para automação das análises de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 1-9, 2009.
- 12 VALCO INSTRUMENTS CO. INC. (VICI). **Tubos e conexões**. 2016. Disponível em: <<http://www.vici.com>> Acesso em: 13 set. 2016.

CAPÍTULO 6

*Aplicação do sistema in-
tube SPME na
determinação de triazinas
em amostra
alimentícia empregando
como sorvente polímero
impresso molecularmente*

6.1 Introdução

Este capítulo descreve aplicações do sistema *in-tube* SPME desenvolvido nesta tese na determinação de uma classe de herbicidas (triazinas) em amostras de alimentos. Como sorvente empregou-se um polímero impresso molecularmente, também desenvolvido neste trabalho.

6.1.1 Agrotóxicos

O contínuo aumento da utilização de agrotóxicos vem se tornando necessário na agricultura para assegurar a quantidade e qualidade dos alimentos já que, de um modo geral, a sua aplicação promove um aumento da produtividade nas colheitas e também a melhoria das características qualitativas dos alimentos.¹

Como consequência, problemas com o meio ambiente e com a saúde humana vêm crescendo constantemente, tornando-se umas das principais preocupações mundiais do momento devido à elevada mobilidade e persistência desses compostos, os quais são capazes de bioacumular-se em diferentes organismos, contaminar os alimentos, água, solo e sedimento.¹

Recentemente o Brasil se tornou líder mundial no consumo de agrotóxicos. Devido às condições de clima e solo favoráveis, o país é um dos maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos, exportando para mais de 180 países. Diante do aumento da produção de alimentos e, conseqüentemente, do consumo de agrotóxicos, intensificou-se a fiscalização desses resíduos pelos órgãos nacionais e internacionais.²

A fiscalização dos agrotóxicos no Brasil é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Um intenso monitoramento dos agrotóxicos se faz necessário em diversas áreas, destacando-se a alimentícia, já que a saúde da população pode ser colocada em risco através do consumo de alimentos que apresentam concentrações acima do limite máximo de resíduo (LMR) permitido pelos órgãos reguladores.³

Desta maneira, grandes avanços estão sendo obtidos visando a determinação confiável desses resíduos com a substituição de técnicas tradicionais que empregam diversas etapas, grandes

volumes de solvente e custo elevado por técnicas de microextração. Essas últimas apresentam baixo custo, rapidez na execução das análises, mínimo volume de solvente e de amostra, aumento da seletividade, automatização, boa recuperação, elevada precisão e robustez.

6.1.2 Triazinas

Há anos que os herbicidas triazinas têm sido amplamente utilizados na pré e pós-emergência do controle de plantas daninhas em diferentes culturas agrícolas, como milho, sorgo, cana-de-açúcar, abacaxi, uva e eucalipto.^{4,5}

As triazinas foram descobertas no início da década de 1950 e desde então a atrazina (AT), simazina (SIM) e ametrina (AM) vêm sendo largamente empregadas no Brasil. As principais triazinas são derivadas da *s*-triazina a qual possui um anel heterocíclico de seis membros onde os átomos de carbono e nitrogênio estão simetricamente localizados e os substituintes das posições 2, 4 e 6 constituem-se no diferencial entre as diversas formulações disponíveis no mercado.^{6,7}

São consideradas tóxicas, altamente persistentes e podem permanecer por alguns meses ou até muitos anos no ambiente, animais e plantas. Os resíduos das triazinas e de seus metabólitos podem causar sérios riscos à saúde humana, apresentando problemas cardiovasculares, no sistema endócrino e reprodutivo, ação carcinogênica, defeitos de nascença, entre outros.⁷

Diante disso, o monitoramento e controle desses herbicidas nos alimentos são essenciais para garantir a segurança alimentar e a exportação. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) determina que os limites máximos de resíduos de triazinas nos produtos agrícolas são de 0,25 mg kg⁻¹.⁸ A ANVISA estabelece para a cultura de uva um limite máximo permitido para a simazina e ametrina de 0,02 mg kg⁻¹ e o MAPA com o Plano Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes (PNCRC) monitora também os mesmos herbicidas em uvas com um limite máximo permitido de 0,02 mg kg⁻¹ da mesma maneira que a ANVISA. A Figura 6.1 apresenta as triazinas estudadas.

Figura 6.1: Fórmula estrutural das triazinas estudadas.

Fonte: Autoria própria.

6.1.3 Uva e suco de uva integral

Em decorrência das mudanças no setor alimentício os produtos industrializados ocupam progressivamente uma maior parcela do mercado de alimentos. Isso ocorre pelo fato de serem práticos, apresentarem maiores prazos de validade e fácil armazenamento. Porém, para se conseguir essas características é necessária a utilização de grandes quantidades de aditivos químicos. Diante do exposto, a procura por alimentos naturais está aumentando gradualmente.

Um dos setores de maior destaque do agronegócio brasileiro é a fruticultura, a qual vem gerando expressivos resultados com uma grande diversidade de culturas produzidas em todas as regiões do país. Com tantas características propícias o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo, atrás apenas da China e Índia, destacando-se nas culturas de banana, manga, uva, mamão, laranja e maçã.⁹⁻¹¹

A uva é considerada uma das principais frutas produzidas no Brasil. Apresenta grande importância econômica e advém de lavouras permanentes, ou seja, produzida durante todo o ano para exportação e consumo nacional.⁹⁻¹¹

A viticultura brasileira apresenta grande diversidade e atualmente ocupa uma área de aproximadamente 80 mil hectares sendo que os estados com maior produção nos últimos três anos foram Rio Grande do Sul, Pernambuco e São Paulo. Com relação à safra de 2014, entre as principais frutas produzidas, a uva obteve o melhor aproveitamento da área plantada (98,2%). Em 2015 a produção de uvas foi da ordem de aproximadamente 1,5 milhões de toneladas por ano, o

que significa um aumento de 4,4% em relação ao ano de 2014. Em 2015, 52,1% da produção de uvas foi destinada ao processamento para elaboração de derivados da uva e 47,8% comercializado como uvas de mesa.¹²

A uva pode ser aproveitada de diversas maneiras (geleias, doces, vinhos) sendo umas das alternativas a produção dos sucos de uva integral que vêm crescendo anualmente.¹⁰ O suco de uva integral é uma bebida não fermentada, obtida do mosto simples, apresentado na sua concentração e composição natural, límpido ou turvo e sem adição de outro tipo de açúcar e água.¹³ Em relação ao aspecto nutricional é comparado a própria uva por apresentar praticamente a mesma composição: açúcares, minerais, ácidos, vitaminas e compostos fenólicos que são responsáveis pela cor e estrutura.

Estudos revelam que os sucos de uva integral são os responsáveis pelos efeitos benéficos na saúde por conter grandes quantidades de antioxidantes, destacando-se os compostos fenólicos como os flavonoides, catequinas, antocianinas, taninos, ácidos fenólicos, entre outros. Esses compostos, geralmente presentes tanto no suco de uva como no vinho, são capazes de evitar a oxidação do colesterol ruim ou das lipoproteínas que levam a formação de placas nas paredes das artérias, combatem o envelhecimento do organismo, diminuem o risco de doenças como o câncer, mal de Parkinson, catarata e vários outros benefícios. Além disso, os sucos apresentam atividade anti-inflamatória, propriedades cardioprotetoras, estimulam as funções hepáticas e do sistema digestivo e ajudam no restabelecimento do equilíbrio ácido-alcalino do organismo quando consumidos regularmente.^{10,14,15}

A preservação do sabor natural da uva após o processamento é uma característica primordial para a elaboração dos sucos. Geralmente os sucos produzidos em muitos países são elaborados com uvas *Vitis vinífera* tanto de cultivares tintos como brancas; no Brasil o suco de uva é produzido com uvas do tipo *Vitis labrusca* e híbridas tintas. Entre os cultivares de videiras no país para elaboração do suco destacam-se a Bordô, Isabel e Concord, todas da espécie *Vitis labrusca*. Diante dessas variedades, os constituintes químicos presentes nos sucos e os teores são influenciados e dependentes de diversos fatores, como tipo de cultivo, manejo, método empregado na extração do suco, tratamento e condições de estocagem.^{16,17}

A produção de sucos de uva integral apresentou crescimento nos últimos anos. Em 2013 foram produzidos aproximadamente 34,0 milhões de litros e em 2015 houve um aumento para 53,0

milhões de litros. A comercialização do suco de uva integral também apresentou aumento em 2015 de 31,1% atendendo a crescente demanda dos últimos anos, já o suco de uva concentrado apresentou redução de 5,5%.¹²

Contudo, a produção dos sucos ainda necessita de parâmetros de qualidade e segurança para se estabelecer no mercado externo já que há intensa utilização de agrotóxicos nas uvas e, tanto as uvas quanto os sucos, devem obedecer as normas de segurança alimentar que definem a quantidade máxima permitida de resíduos de agrotóxicos nas culturas ou produtos.

6.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo foi utilizar o material mais seletivo dentre os sintetizados, qual seja o polímero impresso molecularmente, para extrair triazinas utilizando a microtécnica de extração *in-tube* SPME. Além disso, desenvolver, otimizar e validar o método analítico para extrair triazinas em amostras de uvas e sucos de uva integral, empregando LC-MS/MS.

6.3 Parte experimental

6.3.1 Padrões analíticos e reagentes

Os padrões analíticos simazina (99%), atrazina (98,8%) e ametrina (98,5%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os solventes utilizados foram acetonitrila, tolueno, acetato de etila e metanol grau HPLC da Tedia (Fairfield, EUA), acetona grau HPLC da Panreac Applichem (Darmstadt, Alemanha) e água deionizada preparada em sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, EUA).

6.3.2 Preparo das soluções contendo os padrões analíticos

Soluções estoques individuais das triazinas foram preparadas na concentração de 100 mg L⁻¹ em acetonitrila e armazenadas a aproximadamente -30 °C. Padrões mistos de triazinas foram preparados em diferentes concentrações no decorrer do estudo, conforme necessidade.

6.3.3 Instrumentação e condições cromatográficas para separação das triazinas no sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS

Para otimização dos parâmetros do sistema *in-tube* SPME (Capítulo 5) e validação do método utilizou-se um sistema UPLC-MS/MS (Acquity Ultra Performance LC – Waters e Xevo TQ MS Detector – Waters com ionização a pressão atmosférica por *electrospray* (ESI)) e para aquisição dos dados o software MassLynx V. 4.1. As condições utilizadas no cromatógrafo líquido acoplado ao detector de massas foram as mesmas descritas na Tabela 4.1, com exceção do volume de injeção onde foi utilizado 50 μL para o sistema *on-line* e do comprimento de onda, já que se empregou como detector um espectrômetro de massas sequencial ou em *tandem* (MS/MS). Para separação cromatográfica dos compostos utilizou-se uma coluna analítica Kinetex (Phenomenex) XB-C18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm).

As condições de detecção por espectrometria de massas sequencial (MS/MS) foram otimizadas fazendo-se infusão direta dos analitos pelo sistema em uma concentração de 1,0 mg L⁻¹ preparados na fase móvel. O modo de ionização dos analitos foi positivo (ESI+) e utilizou-se as seguintes condições: voltagem no capilar de 3,0 kV, temperatura da fonte de 150 °C, temperatura do gás de solvatação de 400 °C, fluxo do gás de solvatação de 800 L h⁻¹ (N₂) e fluxo do gás de colisão (Ar) de 0,15 mL min⁻¹. As análises foram realizadas no modo monitoramento de reações selecionadas (SRM) e otimizadas para todos os analitos. A Tabela 6.1 lista os íons precursores, íons fragmentos e suas respectivas energias de colisão, voltagens do cone e o tempo de aquisição de dados (*dwell-time*) utilizados.

O sistema *in-tube* SPME acoplado com UPLC-MS/MS foi montado de acordo com a configuração já descrita no Capítulo 5.

Para essa aplicação utilizou-se uma coluna de extração empacotando-se um tubo de aço inoxidável com comprimento de 50 mm e diâmetro interno de 500 μm com o polímero impresso molecularmente para extrair as triazinas. Duas colunas iguais foram empacotadas e testadas para avaliar a reprodutibilidade e não houve nenhuma diferença nas análises.

Para análise das triazinas no sistema *in-tube* SPME quatro etapas foram necessárias, sendo elas: extração, eluição, limpeza e condicionamento da coluna extratora. As condições de cada etapa são mostradas na Tabela 6.2 onde está detalhado as etapas do sistema, eventos, tempo, fluxo,

posição da válvula de comutação e composição do solvente na coluna extratora e na coluna analítica.

Tabela 6.1: Parâmetros otimizados no MS/MS para análise das triazinas.

Analitos	Precursor (m/z) [M+H] ⁺	SRM transições	Cone (V)	Energia de colisão (V)	Dwell-time (s)
Simazina	202	123	28	18	0,3
		131	28	18	0,3
Atrazina	216	95	34	24	0,3
		103	34	28	0,3
Ametrina	228	90	34	26	0,3
		95	34	26	0,3

Tabela 6.2: Etapas de extração, eluição, limpeza e condicionamento do sistema *in-tube* SPME.

Etapas	Eventos	Tempo (minutos)	Fluxo (mL min ⁻¹)	Composição do solvente na coluna extratora	Composição do solvente na coluna analítica	Posição da válvula
1	Extração dos analitos	0:00 – 1:00	0,2	Água (100%)	Acetonitrila/Água (40:60 v/v)	Carregamento
2	Eluição dos analitos	1:01 – 8:00	0,2	Acetonitrila/Água (40:60 v/v)	Acetonitrila/Água (40:60 v/v)	Eluição
3	Limpeza das colunas	8:01 – 13:00	0,2	Acetonitrila (100%)	Acetonitrila (100%)	Eluição
4	Condicionamento das colunas	13:01 – 16:00	0,2	Água (100%)	Acetonitrila/Água (40:60 v/v)	Carregamento

6.3.4 Otimização do sistema *in-tube* SPME

Para otimizar a extração das triazinas pelo sistema *in-tube* SPME os parâmetros: volume de injeção, tempo, fluxo e porcentagem de solvente orgânico da amostra foram avaliados para que fosse possível otimizar as melhores condições no sistema e obter maior eficiência na extração. Toda a otimização e posterior validação foram realizadas utilizando uma matriz de suco de uva tinto integral isenta dos analitos de interesse.

6.3.5 Validação do método no sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS

Para a validação do método foi utilizado o guia Q2(R1) da *International Conference on Harmonization* (ICH)¹⁸ sendo as seguintes figuras de mérito avaliadas: seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão e recuperação.

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas obtidos na análise do suco de uva tinto integral sem analito com o mesmo suco fortificado na concentração de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Com a amostra de suco isenta dos analitos de interesse foi possível avaliar a existência ou não de possíveis interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

Para determinar os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) concentrações conhecidas dos analitos foram adicionadas na amostra de suco de uva tinto integral para que fosse determinada a menor concentração que cada analito seria detectado e quantificado baseado no critério de três e dez vezes o sinal/ruído, respectivamente.

Para determinar a linearidade do método a curva analítica foi construída com seis níveis de concentrações diferentes (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$) das triazinas no suco de uva tinto integral. Cada nível foi injetado em triplicata e, posteriormente, construiu-se as curvas analíticas para cada composto e avaliou-se a linearidade do método para cada analito a partir da equação da reta utilizando os coeficientes angular e linear.

O parâmetro precisão foi avaliado em termos de repetibilidade e precisão intermediária, em três níveis de concentração e em triplicata. Na repetibilidade o suco de uva foi fortificado em três níveis, baixo ($0,2 \mu\text{g L}^{-1}$), médio ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e alto ($4,0 \mu\text{g L}^{-1}$), resultando em um total de 9 padrões injetados. Para avaliar a precisão intermediária foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima,

porém em dias diferentes. Ambos os resultados foram expressos em função do desvio padrão relativo das injeções (RSD (%)).

A exatidão foi determinada analisando o suco de uva em três níveis de fortificação, baixo ($0,2 \mu\text{g L}^{-1}$), médio ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e alto ($4,0 \mu\text{g L}^{-1}$), para todos os analitos e em triplicata.

Para avaliar a recuperação dos analitos foram feitas injeções *on-line* (passando pela coluna de extração) e injeções direta (não passando pela coluna de extração, direto para a coluna analítica). Em ambas utilizou-se um volume de injeção da amostra de $5 \mu\text{L}$, mesmo padrão analítico e em triplicata para três concentrações ($0,2$; $1,0$ e $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Calculou-se então a concentração porcentagem de recuperação do método de preparo da amostra.

Foi avaliado o fator de concentração também conhecido como fator de enriquecimento do sistema de extração e pré-concentração *in-tube* SPME LC-MS/MS nesse capítulo. Os fatores de enriquecimento para todos os analitos foram calculados comparando as áreas dos picos obtidas das amostras que foram injetadas diretamente no sistema com as áreas obtidas nas injeções *on-line*, ou seja, quando a amostra passa pela coluna de extração. Tanto para as injeções direta quanto para *on-line* injetou-se $5 \mu\text{L}$ de amostra em três concentrações diferentes ($0,2$; $1,0$ e $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e em triplicata para cada concentração.

6.3.6 Amostras

Neste capítulo estudou-se os analitos da classe das triazinas em amostras de uvas e sucos de uva integral adquiridas no comércio da cidade de São Carlos. Nessas amostras a técnica *in-tube* SPME com o material mais seletivo dentre os sintetizados, o polímero impresso molecularmente, foi empregada na análise de resíduos dos herbicidas simazina, ametrina e atrazina.

O preparo das amostras de sucos de uva integral (tinto e branco) consistiu inicialmente no seu congelamento para precipitação dos particulados insolúveis em baixas temperaturas. As amostras foram congeladas por 24 horas a aproximadamente -34°C . Posteriormente, foram descongeladas em temperatura ambiente e centrifugadas diversas vezes a $10,000 \text{ rpm}$ por 10 minutos até que todo precipitado fosse removido. Antes da injeção foram filtradas em filtros de celulose regenerada com diâmetro interno de 13 mm e porosidade de $0,22 \mu\text{m}$.

Para as amostras de uva o preparo iniciou-se com a pesagem, onde tentou-se pesar sempre a mesma quantidade de cada qualidade de uva. Essa massa pesada foi macerada, utilizando-se um pistilo, até obter-se uma amostra homogênea, a qual foi centrifugada para separação das cascas e sementes do sobrenadante. Foram centrifugadas várias vezes para completa remoção do particulado. O sobrenadante foi filtrado em filtro de celulose regenerada com diâmetro interno de 13 mm e porosidade de 0,22 μm para injeção no sistema *on-line*.

6.4 Resultados e discussão

6.4.1 Sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS

A Figura 6.2 apresenta o cromatograma do íon total (TIC) do suco de uva tinto integral fortificado com as três triazinas na concentração de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo possível perceber que o sistema *in-tube* SPME conseguiu extrair significativamente os analitos de interesse, apresentando picos com boa intensidade e separação. Além disso, os resultados obtidos na validação do método (apresentados abaixo) demonstraram repetibilidade e seletividade nas análises utilizando o sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS.

A Figura 6.3 apresenta os cromatogramas de massas individuais dos analitos estudados no modo SRM e a transição que foi monitorada para cada um. Como as áreas das duas transições monitoradas para cada analito ficaram muito próximas optou-se por utilizar a transição que apresentou melhor resolução dos picos. Portanto, as transições utilizadas para quantificação dos analitos foram as seguintes: para simazina m/z 202 $\rightarrow$ m/z 123; atrazina m/z 216 $\rightarrow$ m/z 103 e para ametrina m/z 228 $\rightarrow$ m/z 95.

Figura 6.2: Cromatograma do íon total do suco de uva tinto integral fortificado com todos os analitos na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 6.3: Monitoramento de transições selecionadas (SRM) para cada analito estudado.

6.4.2 Otimização do sistema *in-tube* SPME

A otimização das variáveis mais importantes do método resulta em maiores taxas de extração, aumento da sensibilidade analítica e diminuição do tempo de análise. Desta maneira os parâmetros volume de injeção, tempo, fluxo e porcentagem de solvente orgânico da amostra foram otimizados para esse sistema com injeções em triplicata.

A Figura 6.4 apresenta a otimização do volume de injeção da amostra no sistema. Foram avaliados três volumes (10, 30 e 50 μL), onde foi possível perceber que para os três analitos estudados o volume de 50 μL apresentou a maior área. Portanto, utilizou-se este volume para o restante das análises. O aumento do volume da amostra influenciou diretamente em uma maior retenção dos analitos na fase. Não foi possível testar volumes maiores já que esse é o volume máximo do *loop* de amostragem do equipamento.

Figura 6.4: Influência do volume de injeção na área dos analitos estudados empregando-se o sistema *in-tube* SPME.

A otimização do tempo de carregamento da amostra é extremamente importante para garantir a extração de todos analitos e diminuir as possíveis perdas do sistema, já que a completa retenção dos analitos na fase extratora é dependente do tempo de contato deles com a fase. Para esse parâmetro, como mostra a Figura 6.5, foi possível perceber que no tempo de extração de 1 minuto a fase extratora conseguiu extrair uma maior quantidade dos três analitos, enquanto que quando avaliado os tempos de 2 e 3 minutos, para os analitos simazina e atrazina um pequeno decréscimo na área foi observado.

Diante disso, foi utilizado para todas as análises o tempo de 1 minuto, já que além de apresentar melhor resposta analítica conseguiu, em um menor tempo, eliminar os interferentes da amostra retendo somente os analitos de interesse na coluna extratora. Vale ressaltar que a utilização de fases mais seletivas, como é o caso do MIP, diminui a retenção dos possíveis interferentes presentes na amostra.

Figura 6.5: Influência do tempo de carregamento da amostra na área dos analitos estudados empregando-se o sistema *in-tube* SPME.

Para o parâmetro fluxo de carregamento foram avaliados três fluxos (0,1; 0,2 e 0,3 mL min⁻¹), onde foi possível perceber, pela Figura 6.6, que o fluxo de 0,2 mL min⁻¹ apresentou maiores valores de área para as três triazinas. Para os valores de fluxo superior e inferior, as extrações apresentaram menor eficácia diminuindo a retenção e consequentemente a concentração do analito na coluna de extração. Utilizou-se para o restante das análises um fluxo de carregamento de 0,2 mL min⁻¹.

Por último, foi otimizada a porcentagem do solvente orgânico (acetonitrila) a ser utilizada no carregamento da amostra. A Figura 6.7 apresenta os resultados dos experimentos realizados com 0, 10 e 20% de acetonitrila na fase de carregamento. Observa-se que para os analitos simazina e ametrina 0% de solvente orgânico (utilizando somente água deionizada) aumenta a retenção desses analitos na fase, sendo que um aumento do solvente orgânico no carregamento implicará em uma diminuição da retenção.

Já para a atrazina 10% de solvente orgânico apresentou uma maior área, porém não significativa, quando comparada com as outras porcentagens obtidas. Desta maneira foi utilizado como fase de carregamento a água deionizada, já que dois analitos apresentaram melhor comportamento e a diferença para o terceiro (atrazina) foi insignificante.

Figura 6.6: Influência da variação do fluxo de carregamento da amostra na área dos analitos estudados empregando-se o sistema *in-tube* SPME.

Figura 6.7: Influência da porcentagem do solvente orgânico acetonitrila no carregamento da amostra na área dos analitos estudados empregando-se o sistema *in-tube* SPME.

6.4.3 Validação do método *in-tube* SPME LC-MS/MS

A validação da metodologia foi realizada após as condições de análise do sistema *in-tube* SPME terem sido desenvolvidas e otimizadas.

O método mostrou-se seletivo para os analitos do estudo, sendo assim possível determinar qualitativamente e quantitativamente cada composto. A Figura 6.8 apresenta os cromatogramas sobrepostos da amostra de suco de uva tinto integral sem contaminação e a mesma fortificada na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Como observado nesta figura, mesmo a amostra de suco de uva tinto integral apresentando outros compostos interferentes e/ou componentes da matriz não apresentou picos eluídos no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse. Desta maneira, o método mostrou-se seletivo para a identificação e quantificação das triazinas já que não apresentou interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

Figura 6.8: Comparação entre os cromatogramas do suco de uva tinto integral isento do analito e o mesmo fortificado com as triazinas na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na Tabela 6.3 são apresentados os limites de detecção e quantificação obtidos para as triazinas, os quais variaram de 2,8 a 7,5 e 9,4 a $25,1 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 6.3: Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método para as triazinas.

Analitos	LOD (ng L^{-1})	LOQ (ng L^{-1})
Simazina	2,8	9,4
Atrazina	6,5	21,7
Ametrina	7,5	25,1

As Figuras 6.9, 6.10 e 6.11 apresentam as curvas analíticas com a equação da reta (coeficientes linear (b), angular (a)) e de correlação (r) para os analitos simazina, atrazina e ametrina, respectivamente.

Figura 6.9: Curva analítica da simazina em suco de uva tinto integral.

Figura 6.10: Curva analítica da atrazina em suco de uva tinto integral.

Figura 6.11: Curva analítica da ametrina em suco de uva tinto integral.

As curvas analíticas foram construídas a partir da matriz de suco de uva tinto integral e apresentaram para todas as triazinas coeficientes de correlação linear satisfatórios. Com os valores obtidos pode-se concluir que o modelo de regressão linear mostrou-se adequado e que os coeficientes de correlação foram maiores que 0,99 para os três analitos estudados nas condições analíticas desenvolvidas, mostrando que há uma relação diretamente proporcional entre a concentração do analito na amostra e a intensidade do sinal diante do intervalo da concentração especificada. Quanto maior a resposta gerada pelo detector em função da concentração dos analitos maior é a sensibilidade do método desenvolvido e consequentemente uma menor concentração da faixa linear é possível.

O parâmetro precisão, tanto para a repetitividade quanto para a precisão intermediária (Tabela 6.4) e o parâmetro exatidão (Tabela 6.5) foram avaliados em três níveis de fortificação (0,2; 1,0 e 4,0 µg L⁻¹) e em triplicata. Conforme mostra a Tabela 6.4 os resultados apresentaram desvios baixos e inferiores a 10%, comprovando assim que o método é preciso não só quando os ensaios são realizados no mesmo dia mas também em dias diferentes. Os resultados obtidos para a exatidão mostram que todos os analitos nas três concentrações diferentes ficaram dentro da faixa aceitável.

Tabela 6.4: Resultados obtidos na validação para os parâmetros repetitividade e precisão intermediária.

	Repetitividade (% RSD)			Precisão intermediária (% RSD)		
	0,2 µg L ⁻¹	1,0 µg L ⁻¹	4,0 µg L ⁻¹	0,2 µg L ⁻¹	1,0 µg L ⁻¹	4,0 µg L ⁻¹
Simazina	5,7	5,1	3,8	2,6	9,3	3,8
Atrazina	1,6	3,1	0,4	3,9	5,5	3,2
Ametrina	2,8	5,3	1,7	6,4	2,9	0,7

Tabela 6.5: Resultados obtidos na validação para o parâmetro exatidão.

	Exatidão (%)		
	0,2 µg L ⁻¹	1,0 µg L ⁻¹	4,0 µg L ⁻¹
Simazina	94,4	100,8	102,3
Atrazina	107,2	113,4	105,5
Ametrina	82,5	103,5	101,2

De acordo com o guia do ICH não há um nível de aceitação para esses parâmetros, porém conforme os critérios de aceitação da ANVISA¹⁹ a precisão deve apresentar valores menores que 5% e de acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA)²⁰ o $RSD \leq 20\%$. Para o parâmetro exatidão, a ANVISA, da mesma maneira que o ICH não dispõe de critérios de aceitação. Dessa forma, esse parâmetro foi analisado segundo o MAPA que aceita valores de 70 a 120% em média para todos os analitos.

O parâmetro recuperação é abordado em diversos guias de validação para avaliar a recuperação das técnicas *off-line*, porém nas técnicas *on-line* não há ainda nenhum procedimento descrito para avaliar a recuperação nesses sistemas. Diante disso, aplicou-se um procedimento que pudesse avaliar, da melhor maneira, todo o sistema *on-line* utilizado nesse trabalho.

A Tabela 6.6 mostra os valores obtidos na recuperação dos analitos em três níveis de concentração. Tanto o guia do ICH quanto o guia de validação para métodos analíticos da ANVISA não abordam o parâmetro recuperação. Já o MAPA considera que a recuperação e a exatidão são

iguais. Os valores obtidos estão próximo do esperado para os métodos *off-line* segundo o MAPA, os quais geralmente variam de 70 a 120%. Assim, comparando-se o método *on-line* com os critérios aceitáveis para os métodos *off-line*, conclui-se que os resultados obtidos são satisfatórios para a maioria das concentrações estudadas.

A Tabela 6.7 apresenta os valores do fator de concentração do sistema em três níveis para as triazinas. Para a maioria dos analitos os valores do fator de concentração foram maiores que 1 demonstrando assim que a extração *on-line* concentrou os analitos quando comparados com a injeção direta. Dentre os três herbicidas, utilizando como fase extratora o polímero impresso molecularmente, a ametrina apresentou os menores fatores de enriquecimento para as três concentrações estudadas, ficando até com valores abaixo de 1, o que demonstrou que o sistema *on-line* não foi tão eficiente para extraí-la da amostra de suco.

Tabela 6.6: Resultados obtidos na validação para o parâmetro recuperação.

	Recuperação (%)		
	0,2 µg L ⁻¹	1,0 µg L ⁻¹	4,0 µg L ⁻¹
Simazina	110,5	88,5	97,4
Atrazina	133,1	99,8	100,1
Ametrina	100,0	86,8	99,7

Tabela 6.7: Fator de concentração para os analitos simazina, atrazina e ametrina utilizando o sistema *in-tube* SPME.

	Fator de concentração		
	0,2 µg L ⁻¹	1,0 µg L ⁻¹	4,0 µg L ⁻¹
Simazina	1,3	1,3	1,3
Atrazina	1,7	1,3	1,4
Ametrina	0,9	0,9	1,0

6.4.4 Análise das amostras de suco de uva integral e uva

Após a validação, o método foi aplicado na análise das triazinas estudadas em 8 amostras de suco de uva integral (7 tintos e 1 branco) e em 3 qualidades diferentes de uvas (Rubi, Itália e Benitaka). Os analitos estudados não foram encontrados até o limite de detecção do método.

A Figura 6.12 apresenta os cromatogramas sobrepostos obtidos na análise de uma amostra de suco de uva tinto integral e a mesma fortificada nas concentrações de 0,2 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, onde é possível observar que os analitos não foram detectados na amostra de suco de uva tinto integral, já que não há picos cromatográficos nas amostras, porém são observados nas amostras fortificadas. A Figura 6.13 apresenta os cromatogramas sobrepostos comparando uma amostra de uva analisada e a mesma fortificada com os analitos nas concentrações de 0,2 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em todas as amostras de uvas e sucos de uva integral fortificações foram feitas nas duas concentrações para confirmar a ausência dos analitos de interesse.

Figura 6.12: Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de suco de uva tinto integral sem contaminação e a mesma fortificada em duas concentrações diferentes.

Figura 6.13: Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de uva sem contaminação e a mesma fortificada em duas concentrações diferentes.

Até o limite de detecção do método não foi possível visualizar picos cromatográficos na região dos analitos de interesse. Entretanto, as amostras fortificadas mostram que se os compostos estudados estivessem presentes, os mesmos seriam detectados mesmo em concentrações muito baixas como $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$.

6.5 Conclusão

A microtécnica de extração *in-tube* SPME utilizando o polímero impresso molecularmente, o qual apresentou maior seletividade para a extração das triazinas dentre os sorventes estudados, foi desenvolvida e acoplada com sucesso à cromatografia líquida e espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Nesse sistema os principais parâmetros do método foram otimizados e após a otimização o método foi validado e os parâmetros avaliados apresentaram resultados adequados e satisfatórios.

O método desenvolvido apresentou elevada capacidade sortiva para os analitos de interesse, rapidez, simplicidade e quantidades reduzidas de amostras e solventes quando comparado com técnicas *off-line*. Além disso, a coluna de extração foi reutilizada em aproximadamente 300

injeções sem que houvesse *carry over* entre as injeções, ou depois de uma sequência. Também não houve perda de retenção dos analitos pela coluna extratora após muitas injeções. É possível afirmar que método apresentou custo reduzido quando comparado com técnicas que utilizam materiais comerciais e que são descartados após único uso.

O método desenvolvido apresentou resultados confiáveis e rapidez já que em menos de 8 minutos todos os analitos já haviam sido extraídos, pré-concentrados, separados e identificados. Além disso, foi utilizado baixo volume de injeção (5 µL) e de solventes orgânicos.

O sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS foi aplicado com êxito para concentração e separação de três herbicidas da classe das triazinas em amostras de uvas e sucos de uva integral, apresentando limites de detecção que variaram de 1,14 – 2,91 ng L⁻¹, elevada sensibilidade e seletividade e valores adequados nos testes de recuperação. Além disso, o método desenvolvido apresentou como vantagens menor quantidade de amostras, solvente orgânico, tempo de extração e reutilização da fase extratora. Embora os analitos em estudo não tenham sido detectados nas amostras analisadas, o método foi aplicado com sucesso na análise das mesmas amostras fortificadas com concentrações conhecidas dos analitos investigados.

Referências bibliográficas

1 DONG, X.; LIANG, S.; SHI, Z.; SUN, H. Development of multi-residue analysis of herbicides in cereal grain by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 192, p. 432-440, 2016.

2 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Alimentos**. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/exportacao/alimentos>> Acesso em: 20 set. 2016.

3 STACHNIUK, A.; FORNAL, E. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 1654-1665, 2016.

4 FANG, R.; CHEN, G. H.; YI, L. X.; SHAO, Y. X.; ZHANG, L.; CAI, Q. H.; XIAO, J. Determination of eight triazine herbicide residues in cereal and vegetable by micellar electrokinetic capillary chromatography with on-line sweeping. **Food Chemistry**, v. 145, p. 41-48, 2014.

5 MORALES-PÉREZ, A. A.; ARIAS, C.; RAMÍREZ-ZAMORA, R. M. Removal of atrazine from water using an iron photo catalyst supported on activated carbon. **Adsorption**, v. 22, p. 49-58, 2016.

6 LIU, T.; CAO, P.; GENG, J.; LI, J.; WANG, M.; WANG, M.; LI, X.; YIN, D. Determination of triazine herbicides in milk by cloud point extraction and high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 142, p. 358-364, 2014.

7 ELBASHIR, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Separation and analysis of triazines herbicide residues by capillary electrophoresis. **Biomedical Chromatography**, v. 29, p. 835-842, 2015.

8 ZHANG, L.; YU, R.; WANG, Z.; LI, N.; ZHANG, H.; YU, A. Determination of triazine herbicides in vegetables by ionic liquid foam floatation solid phase extraction high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 953-954, p. 132-137, 2014.

9 BERES, C.; SIMAS-TOSIN, F. F.; CABEZUDO, I.; FREITAS, S. P.; IACOMINI, M.; MELLINGER-SILVA, C.; CABRAL, L. M. C. Antioxidant dietary fibre recovery from Brazilian *Pinot noir* grape pomace. **Food Chemistry**, v. 201, p. 145-152, 2016.

10 GRANATO, D.; CARRAPEIRO, M. M.; FOGLIANO, V.; RUTH, S. M. V. Effects of geographical origin, varietal and farming system on the chemical composition and functional properties of purple grape juices: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 31-48, 2016.

11 SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Agronegócio fruticultura**: Mercado de fruticultura. Panorama do setor no Brasil. 2015.

Disponível em: <

[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/\\$File/5791.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/64ab878c176e5103877bfd3f92a2a68f/$File/5791.pdf)> Acesso em: 20 set. 2016.

12 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015**. 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>> Acesso em: 20 set. 2016.

13 SPINELLI, F. R.; DUTRA, S. V.; CARNIELI, G.; LEONARDELLI, S.; DREHMER, A. P.; VANDERLINDE, R. Detection of addition of apple juice in purple grape juice. **Food Control**, v. 69, p. 1-4, 2016.

14 MARGRAF, T.; SANTOS, E. N. T.; ANDRADE, E. F.; RUTH, S. M. V.; GRANATO, D. Effects of geographical origin, variety and farming system on the chemical markers and *in vitro* antioxidant capacity of Brazilian purple grape juices. **Food Research International**, v. 82, p. 145-155, 2016.

15 MAGRO, L. D.; DALAGNOL, L. M. G.; MANFROI, V.; HERTZ, P. F.; KLEIN, M. P.; RODRIGUEZ, R. C. Synergistic effects of Pectinex Ultra Clear and Lallzyme Beta on yield and bioactive compounds extraction of Concord grape juice. **Food Science and Technology**, v. 72, p. 157-165, 2016.

16 ALVES, A. A. R.; RODRIGUEZ, A. S.; BARROS, E. B. P.; UEKANE, T. M.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. Determination of pesticides residues in Brazilian grape juices using GC-MS-SIM. **Food and Analytical Methods**, v. 7, p. 1834-1839, 2014.

17 MORENO-MONTORO, M.; OLALLA-HERRERA, M.; GIMENEZ-MARTINWZ, R.; NAVARRO-ALARCON, M.; RUFIÁN-HENARES, J. A. Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 38, p. 19-26, 2015.

18 INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical procedures**: text and methodology – Q2(R1). 2005. 17 p. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf> Acesso em: 15 set. 2016.

19 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 166 de 24 de julho 2017. **Diário oficial da União**, Brasília, 2017.

20 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Secretaria de defesa agropecuária. **Diário oficial da União**, Brasília, 2011.

CAPÍTULO 7

*Aplicação do sistema in-
tube SPME na
determinação de triazinas
em amostra ambiental
empregando como sorvente
óxido de grafeno ancorado
em sílica (Si-GO)*

7.1 Introdução

O crescente uso de herbicidas vêm causando vários acidentes no meio ambiente. Esses compostos são amplamente utilizados em todo o mundo para maximizar os rendimentos das culturas durante a fase de crescimento, bem como para proteger os produtos agrícolas. Os herbicidas triazinas são amplamente utilizados devido à sua alta eficiência para eliminar e controlar ervas daninhas, tanto anuais quanto perenes, em diferentes culturas agrícolas tais como plantações de milho, cana, sorgo e eucalipto.^{1,2} As triazinas, derivadas da s-triazina são caracterizadas por terem um heterociclo de seis membros com átomos localizados simetricamente, substituídos nas posições 2, 4 e 6. O impacto ambiental causado pelos herbicidas é, frequentemente, avaliado pela sua meia-vida, a qual pode variar desde semanas até vários meses.^{1,3,4} As triazinas são muito tóxicas e altamente persistentes, permanecendo muitos anos no ambiente (solo e água), animais e plantas.⁵ São perigosas para a saúde humana causando defeitos congênitos, cânceres, problemas nos sistemas cardiovascular e reprodutivo, bem como na interrupção da função hormonal.^{6,7} Portanto, análises e controle rigoroso desses herbicidas são muito importantes, especialmente em fontes de água potável.^{1,5,8} A atrazina (ATR) e simazina (SIM) são as triazinas mais comuns analisadas em amostras de água e foram incluídas no grupo de desreguladores endócrinos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA).^{1,9,10} A EPA estabeleceu os limites máximos de resíduos (LMR) de herbicidas triazínicos na água potável na faixa de partes por bilhão ($\mu\text{g L}^{-1}$), enquanto que os compostos atrazina e simazina têm níveis máximos de contaminantes permitidos de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.^{11,12} A União Européia (UE) estabelece os limites máximos permitidos de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para uma triazina e de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para o total de triazinas na água potável.^{3,11,13}

A resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente no Brasil (CONAMA 357/2005) determinou os níveis máximos de concentração permitidos nas água potável como $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para os analitos atrazina e simazina.¹⁴ Portanto, é necessário o desenvolvimento contínuo de métodos analíticos sensíveis, seletivos e eficientes para extração, separação e quantificação de baixas concentrações de triazinas em diferentes águas.

Para isolar e concentrar os analitos de interesse antes da análise cromatográfica técnicas de preparo de amostras vêm sendo desenvolvidas para extrair esses compostos em baixas

concentrações de matrizes com elevada complexidade. Dentre essas técnicas temos a microextração em fase sólida no tubo (*in-tube* SPME) a qual vêm sendo empregada em combinação com HPLC ou GC para realizar análises *on-line* combinando tratamento de amostras e determinação dos analitos em uma única etapa.¹⁵ Esta técnica é muito atraente pois permite a automatização, redução do tempo de análise e de consumo de solventes orgânicos e amostras podendo, assim, proporcionar uma melhor exatidão, precisão e sensibilidade em comparação com as técnicas *off-line*.^{16,17}

Vários métodos foram desenvolvidos usando *in-tube* SPME para a determinação simultânea (ou não) de diferentes analitos em amostras complexas como, por exemplo, ambientais (água, solo, sedimentos), clínicas, alimentares e industriais.^{18,19} Diferentes fases extratoras vêm sendo utilizadas nessa técnica e vários estudos são desenvolvidos sobre novos materiais para utilização como fase de extração para *in-tube* SPME, incluindo monolitos,^{20,21} polímeros impressos molecularmente,^{22,23} materiais de acesso restrito,^{24,25} grafeno óxido (GO)/grafeno (G),^{26,27} líquidos iônicos^{28,29} e nanotubos de carbono.^{30,31} Estes materiais visam melhorar a eficiência de extração, seletividade e sensibilidade dos métodos analíticos.

Entre os materiais mais citados tem-se o grafeno e seus derivados, os quais receberam atenção especial nos últimos anos. Devido às suas propriedades físico-químicas, como elevada área superficial, sistema de elétrons π - π deslocalizados, boas propriedades térmicas e mecânicas, o grafeno pode ser facilmente modificado para óxido de grafeno (GO).³² O sistema de elétrons π - π no grafeno e seus derivados proporcionam boa afinidade para compostos com anéis aromáticos, caso de muitos contaminantes que podem ser encontrados em amostras alimentares, biológicas e ambientais.

No entanto, alguns problemas podem surgir durante o uso deste material como sorvente em técnicas de extração que utilizam colunas extratoras empacotadas, como no caso do sistema *in-tube* SPME, pois pode ocorrer um aumento na pressão da coluna de extração devido à elevada área superficial das folhas de G ou GO. Para resolver esses problemas no presente trabalho, acoramos covalentemente GO em aminopropil-sílica (simbolizado por Si) usando a abordagem inicialmente proposta por Liu et al.³³ Este material proposto já foi empregado com sucesso em várias aplicações de SPE,^{34,35} o que é um indicativo de que o uso de Si-GO como fase extratora no sistema *in-tube* SPME também pode fornecer resultados interessantes.

7.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo foi avaliar o uso de óxido de grafeno ligado covalentemente à aminopropil-sílica para extrair triazinas utilizando a microtécnica de extração *in-tube* SPME. Além disso, desenvolver, otimizar e validar as condições de análise do sistema *in-tube* SPME para extrair as triazinas em amostras de água, empregando LC-MS/MS.

7.3 Parte experimental

7.3.1 Padrões analíticos e reagentes

As três triazinas selecionadas, os solventes e reagentes utilizados foram os mesmos descritos no Capítulo 6, com exceção para a síntese do óxido de grafeno (GO) ancorado a sílica. Para a síntese do óxido de grafeno suportado a Si utilizou-se permanganato de potássio (KMnO_4), nitrato de sódio (NaNO_3), diciclohexilcarbodiimida (DCC) e dimetilformamida (DMF) adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), ácido sulfúrico (H_2SO_4) da Tedia (Fairfield, OH, EUA), ácido clorídrico (HCl) da Qhemis (Jundiaí, Brasil) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) da Synth (Diadema, Brasil). A aminopropil-sílica (Si) usada para suportar o GO foi adquirida de Varian (Lake Forest, CA, EUA).

7.3.2 Preparo das soluções contendo os padrões analíticos

Os padrões analíticos foram os mesmos utilizados no Capítulo 6, seguindo assim o mesmo procedimento de preparo.

7.3.3 Síntese do óxido de grafeno ancorado a aminopropil sílica (Si-GO)

As etapas utilizadas na síntese do Si-GO são praticamente as mesmas etapas utilizadas na síntese do grafeno (descritas no Capítulo 4 dessa tese, porém sem o ancoramento da sílica).

O procedimento de síntese do GO seguiu basicamente o método relatado por Hummers³⁶ para obtenção óxido de grafite. Após secagem durante 72 horas a 40 °C e redispersão em água a uma concentração de 1 mg mL⁻¹, esta solução foi sonicada durante 1 hora e liofilizada resultando em GO.

Para ancorar GO na superfície da Si, utilizou-se o procedimento descrito no método relatado por Liu et al.³³ Nesse método, 40 mg do GO sintetizado foram dispersos em 100 mL de DMF e sonicado durante 1 hora; depois foram adicionados 1 g de Si e 40 mg de DCC. A mistura foi agitada a 50 °C durante 30 horas. O produto obtido (Si-GO) foi lavado com metanol para remover o GO que não foi ancorado a sílica antes da liofilização do material.

7.3.4 Instrumentação e condições cromatográficas para separação das triazinas no sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS

A instrumentação e condições cromatográficas utilizadas nesse trabalho foram similares as utilizadas no item 6.3.3 do Capítulo 6, com exceção para as condições de extração, eluição, limpeza e condicionamento. As condições otimizadas apresentaram resultados diferentes para alguns parâmetros o que pode estar relacionado com o tipo de material extrator, o qual é diferente do descrito no Capítulo 6.

Nesse capítulo a coluna de extração utilizada no sistema foi produzida empacotando-se um tubo de aço inoxidável com comprimento de 40 mm e diâmetro interno de 2 mm com o sorvente óxido de grafeno ancorado em sílica. Duas colunas iguais foram empacotadas e testadas para avaliar a reprodutibilidade, não havendo nenhuma diferença nas análises.

Para análise das triazinas no sistema *in-tube* SPME quatro etapas foram necessárias, sendo elas: extração, eluição, limpeza e condicionamento da coluna extratora. As condições de cada etapa são mostradas na Tabela 7.1 onde está detalhado as etapas do sistema, eventos, tempo, fluxo, posição da válvula de comutação e composição do solvente na coluna extratora e na coluna analítica.

Tabela 7.1: Etapas de extração, eluição, limpeza e condicionamento do sistema *in-tube* SPME.

Etapas	Eventos	Tempo (minutos)	Fluxo (mL min ⁻¹)	Composição do solvente na coluna extratora	Composição do solvente na coluna analítica	Posição da válvula
1	Extração dos analitos	0:00 – 2:00	0,2	Água (100%)	Acetonitrila/Água (40:60 v/v)	Carregamento
2	Eluição dos analitos	2:00 – 10:00	0,2	Acetonitrila/Água (40:60 v/v)	Acetonitrila/Água (40:60 v/v)	Eluição
3	Limpeza das colunas	10:01 – 15:00	0,2	Acetonitrila (100%)	Acetonitrila (100%)	Eluição
4	Condicionamento das colunas	15:01 – 18:00	0,2	Água (100%)	Acetonitrila/Água (40:60 v/v)	Carregamento

7.3.5 Otimização do sistema *in-tube* SPME

Para otimizar a extração das triazinas utilizando como fase extratora o óxido de grafeno ancorado em sílica no sistema *in-tube* SPME dois parâmetros foram avaliados (volume de injeção e tempo de carregamento da amostra) para que fosse possível otimizar as melhores condições no sistema e obter maior eficiência na extração. Os parâmetros fluxo e porcentagem de solvente orgânico no carregamento da amostra não requereram otimização. Uma avaliação para confirmar se o fluxo seria o mesmo do sistema já otimizado no Capítulo 6 mostrou resultados satisfatórios. Para o carregamento da amostra o fluxo de 0,2 mL min⁻¹ apresentou a maior área da mesma maneira que o capítulo anterior. No parâmetro porcentagem de solvente orgânico no carregamento da amostra utilizou-se 0%, da mesma maneira que no Capítulo 6, já que são os mesmos analitos. Quando adicionou-se solvente orgânico os analitos de interesse apresentaram maior interação com o solvente orgânico, ficando menos retido na coluna extratora. Toda a otimização e posterior validação foram realizadas utilizando uma amostra de água isenta dos analitos de interesse.

7.3.6 Validação do método no sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS

Para a validação do método foi utilizado o guia Q2(R1) da *International Conference on Harmonization* (ICH)³⁷ e as seguintes figuras de mérito foram avaliadas: seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão e recuperação.

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas obtidos na análise da amostra de água sem analito com a mesma fortificada na concentração de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Com a amostra de água isenta dos analitos de interesse foi possível avaliar a existência ou não de possíveis interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

Para determinar os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) concentrações conhecidas dos analitos foram adicionadas na amostra de água para que fosse determinada a menor concentração que cada analito seria detectado e quantificado baseado no critério de três e dez vezes o sinal/ruído, respectivamente.

Para determinar a linearidade do método a curva analítica foi construída com cinco níveis de concentrações diferentes (0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$) das triazinas na amostra de água. Cada nível foi injetado em triplicata e, posteriormente, construiu-se as curvas analíticas para cada composto e avaliou-se a linearidade do método para cada analito a partir da equação da reta utilizando os coeficientes angular e linear.

O parâmetro precisão foi avaliado em termos de repetibilidade e precisão intermediária, em três níveis de concentração e em triplicata. Na repetibilidade a amostra foi fortificada em três níveis, baixo ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$), médio ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e alto ($4,0 \mu\text{g L}^{-1}$), resultando em um total de 9 padrões injetados. Para avaliar a precisão intermediária foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima, porém em dias diferentes. Ambos os resultados foram expressos em função do desvio padrão relativo das injeções (RSD (%)).

A exatidão foi determinada analisando a amostra de água em três níveis de fortificação, baixo ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$), médio ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e alto ($4,0 \mu\text{g L}^{-1}$), para todos os analitos e em triplicata.

Para avaliar a recuperação dos analitos foram feitas injeções *on-line* (passando pela coluna de extração) e injeções direta (não passando pela coluna de extração, direto para a coluna analítica), em ambas utilizou-se um volume de injeção da amostra de $5 \mu\text{L}$, mesmo padrão analítico e em

triplicata para três concentrações (0,5; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Calculou-se então a porcentagem de recuperação do método de preparo da amostra.

Foi avaliado o fator de concentração também conhecido como fator de enriquecimento do sistema de extração e pré-concentração *in-tube* SPME LC-MS/MS. Os fatores de enriquecimento para todos os analitos foram calculados comparando as áreas dos picos obtidas das amostras que foram injetadas diretamente no sistema com as áreas obtidas nas injeções *on-line*, ou seja, quando a amostra passa pela coluna de extração. Tanto para as injeções direta quanto para *on-line* injetou-se 5 μL de amostra em três concentrações diferentes (0,5; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e em triplicata para cada concentração.

7.3.7 Amostras

Amostras de água, incluindo águas superficiais, subterrâneas e mineral, foram analisadas quanto à presença das triazinas após a validação do método. As águas subterrâneas foram coletadas na cidade de São Carlos, SP em dois locais de águas residuárias domésticas, em uma fonte de águas subterrâneas e dois lagos. Foram também compradas três garrafas de água mineral em mercados da cidade. As amostras foram coletadas em garrafas de vidro e armazenadas a $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise. O preparo das amostras consistiu em centrifugá-las para remover partículas finas a 10,000 rpm até que todo precipitado fosse removido. Antes da injeção todas as amostras foram filtradas em filtros de celulose regenerada com diâmetro interno de 13 mm e porosidade de 0,22 μm .

7.4 Resultados e discussão

7.4.1 Caracterização do óxido de grafeno ancorado a aminopropil-sílica

Como a síntese desse material foi realizada em colaboração por outro aluno do grupo a caracterização desse material não está descrita nessa tese. A referência 38 descreve o procedimento e os resultados da caracterização desse material de extração.

7.4.2 Sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS

O sistema utilizado apresentou resultados satisfatórios, já que conseguiu extrair significativamente as triazinas nas amostras fortificadas e apresentou picos com boa resolução e intensidade. A Figura 7.1 apresenta o cromatograma do íon total (TIC) da amostra de água fortificada com as três triazinas na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

Como as áreas das duas transições monitoradas para cada analito ficaram muito próximas optou-se por utilizar a transição que apresentou melhor resolução dos picos. Portanto, utilizou-se as mesmas transições, para quantificação dos analitos, do Capítulo 6. Para simazina m/z 202 $\rightarrow$ m/z 123; atrazina m/z 216 $\rightarrow$ m/z 103 e para ametrina m/z 228 $\rightarrow$ m/z 95.

Figura 7.1: Cromatograma do íon total da amostra de água fortificada com os analitos na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

7.4.3 Otimização do sistema *in-tube* SPME

Foram otimizados algumas das variáveis mais importantes do método para que fosse possível aumentar a taxa de extração, sensibilidade analítica e diminuição do tempo de análise. Assim, os parâmetros volume de injeção e tempo de carregamento da amostra foram otimizados para esse sistema com injeções em triplicata. Já os parâmetros fluxo e porcentagem de solvente orgânico no carregamento da amostra foram mantidos iguais ao sistema já otimizado para as triazinas na análise de amostras de uva e suco de uva integral (Capítulo 6).

Esses dois parâmetros (fluxo e porcentagem de solvente orgânico) estão mais relacionados com o tipo de analito a ser estudado. Como demonstrado no capítulo anterior o fluxo de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ apresentou melhor resposta para as triazinas, porém como se utilizou outra fase de extração (óxido de grafeno ancorado em sílica) realizou somente uma injeção para cada fluxo ($0,1$; $0,2$ e $0,3 \text{ mL min}^{-1}$) somente para confirmar que o fluxo de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ apresentaria maior área extraída conforme era o esperado. Para a porcentagem de solvente na fase de carregamento utilizou-se 0% pois os analitos apresentaram maior afinidade pelo solvente orgânico quando esse era adicionado na fase de carregamento da amostra como foi demonstrado no Capítulo 6 dessa tese.

Geralmente, grandes volumes de injeção são favoráveis ao aumento da concentração dos analitos na fase de extração, porém nem sempre isso pode ocorrer de forma diretamente proporcional pois depende de como o analito irá interagir com a fase extratora. O volume de injeção foi investigado variando o volume da amostra (30 , 37 e $50 \text{ }\mu\text{L}$). Conforme mostra a Figura 7.2, para todos os analitos, a área do pico aumentou discretamente com o aumento da injeção do volume até $50 \text{ }\mu\text{L}$. Portanto, foi utilizado a quantidade de $50 \text{ }\mu\text{L}$ como volume de injeção da amostra, já que essa apresentou melhor resposta. Além disso, não foram testados volumes maiores pois essa é a quantidade máxima de injeção desse *loop*.

Figura 7.2: Influência do volume de injeção na área dos analitos estudados empregando-se o sistema *in-tube* SPME.

O tempo de carregamento da amostra é muito importante para garantir a extração completa dos analitos, uma vez que a total sorção depende do tempo em que os analitos estarão em contato com a fase de extração. Neste caso, como mostra a Figura 7.3, para todos os analitos, diferentes tempos de carregamento (2, 3 e 4 minutos) mostraram resultados semelhantes, com a área do pico mostrando um aumento muito discreto conforme o aumento do tempo de carregamento da amostra no sistema *in-tube* SPME. Isso pode ser atribuído à elevada afinidade apresentada pela fase de extração com todos os analitos investigados. Os resultados indicam que uma melhor resposta foi obtida com o tempo de quatro minutos para os analitos simazina e atrazina e para a ametrina o tempo dois minutos apresentou melhor resultado. Como o tempo de carregamento de 3 e 4 minutos aumentava muito a pressão na coluna de extração, já que ficava mais tempo percolando a fase de carregamento pela coluna, além do fato desse material apresentar pouca afinidade com água, optou-se então por utilizar o tempo de dois minutos de carregamento das amostras.

Figura 7.3: Influência da variação do tempo de carregamento da amostra na área dos analitos estudados empregando-se o sistema *in-tube* SPME.

7.4.4 Validação do método *in-tube* SPME LC-MS/MS

A validação do método analítico foi realizada após as condições de análise do sistema *in-tube* SPME terem sido desenvolvidas e otimizadas.

O método mostrou-se seletivo para os analitos do estudo, sendo assim possível determinar qualitativamente e quantitativamente cada composto. A Figura 7.4 apresenta os cromatogramas sobrepostos da amostra de água sem contaminação e a mesma fortificada na concentração de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Como observado nesta figura, não há picos eluídos no mesmo tempo de retenção dos analitos. Desta maneira, o método mostrou-se seletivo para a identificação e quantificação das triazinas já que não apresentou interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

Figura 7.4: Comparação entre os cromatogramas da amostra de água isenta do analito e a mesma fortificada com as triazinas na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na Tabela 7.2 são apresentados os limites de detecção e quantificação obtidos para as triazinas, os quais variaram de 1,1 a 2,9 e 3,8 a 9,7 ng L^{-1} , respectivamente. Observa-se que os valores obtidos para o LOD e LOQ são muito inferiores (melhores) do que os limites preconizados pelo EPA,^{11,12} União Européia,^{3,11,13} e CONAMA.¹⁴

Tabela 7.2: Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método para as triazinas.

Analitos	LOD (ng L^{-1})	LOQ (ng L^{-1})
Simazina	2,9	9,7
Atrazina	1,7	5,7
Ametrina	1,1	3,8

As curvas analíticas foram construídas a partir da amostra de água isenta dos analitos e apresentaram para todas as triazinas coeficientes de correlação linear satisfatórios. Com os valores obtidos pode-se concluir que o modelo de regressão linear mostrou-se adequado e que os coeficientes de correlação foram maiores que 0,99 para dois analitos estudados e para a simazina foi de 0,98 diante das condições analíticas desenvolvidas, mostrando que há uma relação diretamente proporcional entre a concentração do analito na amostra e a intensidade do sinal diante do intervalo da concentração especificada. Quanto maior a resposta gerada pelo detector em função da concentração dos analitos maior é a sensibilidade da metodologia desenvolvida e, consequentemente, uma menor concentração da faixa linear é possível.

As Figuras 7.5, 7.6 e 7.7 apresentam as curvas analíticas com a equação da reta (coeficientes linear (b), angular (a)) e de correlação (r) para os analitos simazina, atrazina e ametrina, respectivamente.

Figura 7.5: Curva analítica da simazina em amostra de água.

Figura 7.6: Curva analítica da atrazina em amostra de água.

Figura 7.7: Curva analítica da ametrina em amostra de água.

O parâmetro precisão, tanto para a repetitividade quanto para a precisão intermediária (Tabela 7.3) e o parâmetro exatidão (Tabela 7.4) foram avaliados em três níveis de fortificação (0,5; 1,0 e 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e em triplicata. Conforme mostra a Tabela 7.3 os resultados apresentaram desvios baixos e inferiores a 15%, com exceção para um nível de concentração da precisão intermediária comprovando, assim, que o método é preciso não só quando os ensaios são realizados no mesmo dia mas também em dias diferentes. Os resultados obtidos para a exatidão mostram que todos os analitos nas três concentrações diferentes ficaram dentro da faixa aceitável.

De acordo com o guia do ICH não há um limite para aceitação desses parâmetros, porém conforme os critérios de aceitação da ANVISA³⁹ a precisão deve apresentar valores menores que 5% e de acordo com o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA)⁴⁰ o $\text{RSD} \leq 20\%$. Para o parâmetro exatidão, a ANVISA, da mesma maneira que o ICH não dispõe de critérios de aceitação. Dessa forma, esse parâmetro foi analisado segundo o MAPA que aceita valores de 70 a 120% em média para todos os analitos.

Tabela 7.3: Resultados obtidos na validação para repetitividade e precisão intermediária.

	Repetitividade (% RSD)			Precisão intermediária (% RSD)		
	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$
Simazina	11,8	9,5	6,8	11,5	16,9	3,3
Atrazina	3,7	3,3	0,5	6,0	9,4	6,9
Ametrina	2,3	2,7	2,0	8,1	2,1	3,2

Tabela 7.4: Resultados obtidos na validação para exatidão.

	Exatidão (%)		
	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$
Simazina	97,4	111,0	90,8
Atrazina	96,1	106,8	94,2
Ametrina	99,2	104,3	93,8

O parâmetro recuperação é abordado em diversos guias de validação para avaliar a recuperação das técnicas *off-line*, porém nas técnicas *on-line* não há ainda nenhum procedimento descrito para avaliar a recuperação nesses sistemas. Diante disso, aplicou-se um procedimento que pudesse avaliar, da melhor maneira, o sistema *on-line* utilizado nesse trabalho como um todo.

A Tabela 7.5 apresenta os valores obtidos na recuperação dos analitos em três níveis de concentração. Tanto o guia do ICH quanto o guia de validação para métodos analíticos da ANVISA não abordam o parâmetro recuperação. Já o MAPA considera que a recuperação e a exatidão são iguais. Os valores obtidos estão próximo do esperado para os métodos *off-line* segundo o MAPA, os quais geralmente variam de 70 a 120%, com exceção para os analitos simazina e ametrina para a concentração do nível médio ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) onde a recuperação foi de 140%. Assim, comparando-se o método *on-line* com os critérios aceitáveis para os métodos *off-line* obteve-se resultados satisfatórios para a maioria das concentrações estudadas.

A Tabela 7.6 apresenta os valores do fator de concentração do sistema em três níveis para as triazinas. Foi possível perceber que para todos os analitos os valores foram maiores que 1 demonstrando, assim, que a extração *on-line* concentrou os analitos quando comparados com a injeção direta. Dentre as três triazinas, utilizando como fase extratora o óxido de grafeno ancorado em sílica, a ametrina apresentou menor fator de enriquecimento para as três concentrações estudadas.

Tabela 7.5: Resultados obtidos na validação para recuperação.

	Recuperação (%)		
	$0,5 \mu\text{g L}^{-1}$	$1,0 \mu\text{g L}^{-1}$	$2,0 \mu\text{g L}^{-1}$
Simazina	76,4	140,2	95,2
Atrazina	66,0	140,9	94,8
Ametrina	97,2	102,3	99,6

Tabela 7.6: Fator de concentração para os analitos simazina, atrazina e ametrina utilizando o sistema *in-tube* SPME.

	Fator de concentração		
	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$
Simazina	2,0	3,5	2,4
Atrazina	2,9	4,9	3,0
Ametrina	1,2	1,3	1,2

7.4.5 Amostras

Após a validação, o método foi aplicado na análise das triazinas estudadas em 9 amostras de água. O sistema *in-tube* SPME utilizando uma coluna empacotada com Si-GO acoplado com LC-MS/MS, foi aplicado com sucesso nas análises das amostras de água, incluindo água subterrânea, superficial e mineral de diferentes locais. As três triazinas investigadas não estavam presentes nessas amostras até o LOD do método, mas todos os resultados com as mesmas amostras fortificadas mostraram que o sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS proposto com o material Si-GO é capaz de extrair os herbicidas estudados em amostras reais.

A Figura 7.8 e 7.9 apresentam os cromatogramas sobrepostos obtidos na análise de uma amostra de água sem contaminação e a mesma fortificada na concentração de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 4 $\mu\text{g L}^{-1}$, onde foi possível observar que os analitos não foram detectados, já que não há picos cromatográficos nas amostras, porém foram observados nas amostras fortificadas.

Figura 7.8: Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de água e a mesma fortificada com $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 7.9: Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de água sem contaminação e a mesma fortificada com $4 \mu\text{g L}^{-1}$.

7.5 Conclusão

Foi desenvolvido, otimizado e validado um método *on-line in-tube* SPME LC-MS/MS utilizando uma coluna de extração empacotada com Si-GO para análise de triazinas em amostras de água. O material de extração Si-GO demonstrou boa extração dos analitos, já que apresenta elétrons π deslocalizados favorecendo assim a extração de moléculas com anéis aromáticos em sua estrutura, como é o caso das triazinas estudadas. O método apresentou limites de detecção que variaram de 1,1 a 2,9 ng L⁻¹ (superior ao requerido pelas legislações existentes), apresentando alta sensibilidade e seletividade.

A coluna de extração foi reutilizada mais de 300 vezes sem apresentar carryover, baixo volume de amostra (50 μ L) e rapidez analítica pois o método desenvolvido apresentou tempo total de 10 minutos para separar três analitos, sendo possível analisar 5 amostras por hora. Embora os analitos de interesse não estejam presentes nas amostras reais analisadas até LOD do método, o método proposto foi aplicado com sucesso na análise de triazinas em amostras de superficial, subterrânea e mineral.

Referências bibliográficas

- 1 ZHOU, Q.; ZHI, F. Use of TiO₂ nanotube arrays as the adsorbents for preconcentration of triazine herbicides in environmental water samples prior to determination by high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 7 p. 3277-3282, 2015.
- 2 MORALES-PEREZ, A. A.; ARIAS, C.; RAMÍREZ-ZAMORA, R. M. Removal of atrazine from water using an iron photo catalyst supported on activated carbon. **Adsorption**, v. 22 p. 49-58, 2016.
- 3 ANDRADE, F. N.; NAZÁRIO, C. E. D; NETO, A. J. S.; LANÇAS, F. M. Development of an on-line molecularly imprinted solid phase extraction by liquid chromatography-mass spectrometry for triazine analysis in corn samples. **Analytical Methods**, v. 8 p. 1181-1186, 2016.

4 NOUSIAINEN, A. O.; BJÖRKLÖF, K.; SAGARKAR, S.; NIELSEN, J. L.; KAPLEY, A.; JØRGENSEN, K. S. Bioremediation strategies for removal of residual atrazine in the boreal groundwater zone. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99 p. 10249-10259, 2015.

5 LIYUAN, Z.; YU, R.; WANG, Z.; LI, N.; ZHANG, H.; YU, A. Determination of triazine herbicides in vegetables by ionic liquid foam floatation solid phase extraction high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 953-954, p. 132-137, 2014.

6 AHMADI-JOUBARI, T.; PASDAR, Y.; PIRSAHEB, M.; FATTAHI, N. Continuous sample drop flow-microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of triazine herbicides from fruit juices. **Analytical Methods**, v. 9, p. 980-985, 2017.

7 ZHOU, T.; DING, J.; NI, L.; YU, J.; LI, H.; DING, H.; CHEN, Y.; DING, L. Preparation of magnetic superhydrophilic molecularly imprinted resins for detection of triazines in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1497, p. 38-46, 2017.

8 YANG, H.; WEI, H.; HU, L.; LIU, H.; YANG, L.; AU, C.; YI, B. Mechanism for the photocatalytic transformation of s-triazine herbicides by OH radicals over TiO₂. **Chemical Engineering Journal**, v. 300, p. 209-216, 2016.

9 U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Federal Register**, 2009. Disponível em: <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2009-04-15/pdf/E9-8709.pdf>. Acesso em: 15 de Jun. 2017.

10 LIU, X.; SHEN, Z.; WANG, P.; LIU, C.; ZHOU, Z.; LIU, D. Effervescence assisted on-site liquid phase microextraction for the determination of five triazines herbicides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1371, p. 58-64, 2014.

11 NAGARAJU, D.; HUANG, S. D. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry **Journal of Chromatography A**, v. 1161, p. 89-97, 2007.

12 U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **List of contaminants and their MCLs**. 2015. Disponível em: <https://safewater.zendesk.com/hc/en-us/articles/211401248-4-What-are-EPA-s-drinking-water-regulations-for-simazine-> and

<https://safewater.zendesk.com/hc/en-us/articles/212077787-4-What-are-EPA-s-drinking-water-regulations-for-atrazine-/>>. Acesso em: 15 de Jun. 2017.

13 BECEIRO-GONZÁLEZ, E.; GONZÁLEZ-CASTRO, M. J.; POUSO-BLANCO, R.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. A simple method for simultaneous determination of nine triazines in drinking water. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 7, p. 271-277, 2014.

14 BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº. 357 de 17 de março 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de março de 2005.

15 FERNANDEZ-AMADO, M.; PRIETO-BLANCO, M. C.; LOPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review. **Analytical Chimica Acta**, v. 906, p. 41-57, 2016.

16 KATAOKA, H.; MIZUNO, K.; ODA, E.; SAITO, A. Determination of the oxidative stress biomarker urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1019, p. 140-146, 2016.

17 BU, Y.; FENG, J.; SUN, M.; ZHOU, C.; LUO, C. Facile and efficient poly(ethylene terephthalate) fibers-in-tube for online solid-phase microextraction towards polycyclic aromatic hydrocarbons. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 4871-4882, 2016.

18 ISHIZAKI, A.; UEMURA, A.; KATAOKA, H. A sensitive method to determine melatonin in saliva by automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with stable isotopedilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 9, p. 3134-3140, 2017.

19 LIMA, M. M.; VIEIRA, A. C.; MARTINS, I.; BORALLI, V. B.; BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C. On-line restricted access molecularly imprinted solid phase extraction of ivermectin in meat samples followed by HPLC-UV analysis. **Food Chemistry**, v. 197, p. 7-13, 2016.

20 LIU, W. L.; LIRIO, S.; YANG, Y.; WU, L. T.; HSIAO, S. Y.; HUANG, H. Y. A poly(alkyl methacrylate-divinylbenzene-vinylbenzyltrimethylammonium chloride) monolithic column for solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography B**, v. 1395, p. 32-40, 2015.

21 CURRIVAN, S.; MACAK, J. M.; JANDERA, P. Polymethacrylate monolithic columns for hydrophilic interaction liquid chromatography prepared using a secondary surface polymerization. **Journal of Chromatography A**, v. 1402, p. 82-93, 2015.

22 TANG, Y.; LAN, J.; GAO, X.; LIU, X.; ZHANG, D.; WEI, L.; GAO, Z.; LI, J. Determination of clenbuterol in pork and potable water samples by molecularly imprinted polymer through the use of covalent imprinting method. **Food Chemistry**, v. 190, p. 952-959, 2016.

23 BOMPART, M.; GOTO, A.; WATTRAINT, O.; SARAZIN, C.; GONZATO, Y. T. C.; HAUPT, K. Molecularly imprinted polymers by reversible chain transfer catalyzed polymerization. **Polymer**, v. 78, p. 31-36, 2015.

24 WANG, F.; GUAN, Y.; ZHANG, S.; XIA, Y. Hydrophilic modification of silica–titania mesoporous materials as restricted-access matrix adsorbents for enrichment of phosphopeptides. **Journal of Chromatography A**, v. 1246, p. 76-83, 2012.

25 SOUZA, I. D.; MELO, L. P.; JARDIM, I. C. S. F.; MONTEIRO, J. C. S.; NAKANO, A. M. S.; QUEIROZ, M. E. C. Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples. **Analytical Chimica Acta**, v. 932, p. 49-59, 2016.

26 ASIABI, H.; YAMINI, Y.; SEIDI, S.; SHAMSAYEI, M.; SAFARI, M.; REZAEI, F. On-line electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction of inorganic selenium followed by hydride generation atomic absorption spectrometry. **Analytical Chimica Acta**, v. 922, p. 37-47, 2016.

27 AHMADI, S. H.; MANBOHI, A.; HEYDAR, K. T. Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction. **Analytical Chimica Acta**, v. 853, p. 335-341, 2015.

28 WANG, T. T.; CHEN, Y. H.; MA, J. F.; HU, M. J.; LI, Y.; FANG, J. H.; GAO, H. Q. A novel ionic liquid-modified organic-polymer monolith as the sorbent for in-tube solid-phase microextraction of acidic food additives. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 4955-4963, 2014.

- 29 SHEARROW, A. M. HARRIS, G. A.; FANG, L.; SEKHAR, P. K.; NGUYEN, L. T.; TURNER, E. B.; BHANSALI, S.; MALIK, A. Ionic liquid-mediated sol–gel coatings for capillary microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5449-5458, 2009.
- 30 GONZÁLEZ-FUENZALIDA, R. A.; LÓPEZ-GARCÍA, E.; MOLINER-MARTÍNEZ, Y.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. Adsorbent phases with nanomaterials for in-tube solid-phase microextraction coupled on-line to liquid nanochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1432, p. 17-25, 2016.
- 31 JORNET-MARTÍNEZ, N.; SERRA-MORA, P.; MOLINER-MARTÍNEZ, Y.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. Evaluation of carbon nanotubes functionalized polydimethylsiloxane based coatings for in-tube solid Phase Microextraction coupled to capillary liquid chromatography. **Chromatography**, v. 2, p. 515-528, 2015.
- 32 FUMES, B. H.; SILVA, M. R.; ANDRADE, F. N.; NAZÁRIO, C. R. D.; LANÇAS, F. M. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **Trends Analytical Chemistry**, v. 71, p. 9-25, 2015.
- 33 LIU, Q.; SHI, J.; SUN, J.; WANG, T.; ZENG, L.; JIANG, G. Graphene and graphene oxide sheets supported on silica as versatile and high-performance adsorbents for solid-phase extraction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 5913-5917, 2011.
- 34 SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; CONSOLI, L.; ZEFFIRO, A.; PROFUMO, A. Graphene-derivatized silica as an efficient solid-phase extraction sorbent for pre-concentration of fluoroquinolones from water followed by liquid-chromatography fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1379, p. 9-15, 2015.
- 35 SHI, R.; YAN, L.; XU, T.; LIU, D.; ZHU, Y.; ZHOU, J. Graphene oxide bound silica for solid-phase extraction of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke. **Journal of Chromatography A**, v. 1375, p. 1-7, 2015.
- 36 HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, p. 1339-1339, 1958.
- 37 INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical procedures**: text and methodology – Q2(R1). 2005. 17 p. Disponível em:

<http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf> Acesso em: 15 set. 2016.

38 FUMMES, B. H.; LANÇAS, F. M. Use of graphene supported on aminopropyl silica for microextraction of parabens from water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1487, p. 64-71, 2017.

39 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 166 de 24 de julho 2017. **Diário oficial da União**, Brasília, 2017.

40 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Secretaria de defesa agropecuária. **Diário oficial da União**, Brasília, 2011.

CAPÍTULO 8

*Aplicação do sistema in-
tube SPME na
determinação de
sulfonamidas em amostra
alimentícia empregando
como sorvente polímero
impresso molecularmente*

8.1 Introdução

O presente capítulo descreve aplicações do sistema *in-tube* SPME desenvolvido nesta tese na determinação de uma classe de antibióticos (sulfonamidas) em amostras de alimentos. Como sorvente empregou-se um polímero impresso molecularmente, também desenvolvido neste trabalho.

8.1.1 Antibióticos

O uso dos antibióticos vêm crescendo cada dia mais já que podem ser utilizados tanto para o tratamento ou prevenção de doenças quanto como um aditivo alimentar para aumentar o peso dos animais. São compostos que são classificados como naturais, semi-sintéticos ou sintéticos pois podem ser originados a partir da síntese química ou através de culturas de microrganismos que podem ser posteriormente modificados ou não. Os antibióticos são extensivamente utilizados em diversos animais que posteriormente irão ser abatidos para gerar alimentos à população.¹⁻⁴

A incorreta utilização pode deixar resíduos desses contaminantes nos animais e, conseqüentemente, em seus tecidos ocasionando, assim, diversos problemas de saúde pública e afetando a qualidade e segurança dos alimentos. Além disso, antibióticos presentes no meio ambiente, ainda que em baixas concentrações, podem ocasionar o desenvolvimento de microrganismos mais resistentes e conseqüentemente afetar os organismos presentes no solo e na água.^{5,6}

Diante disso, o monitoramento e controle dos resíduos gerados pelo emprego de antibióticos em alimentos é uma área de grande preocupação e que requer atenção especial. Devido ao seu potencial impacto na saúde humana, torna-se necessário evitar a exposição da população a esses compostos, requerendo direcionar as ações de controle visando à proteção do consumidor.^{7,8}

8.1.2 Sulfonamidas

As sulfonamidas (SAs) ou sulfas foram os primeiros agentes químicos antimicrobianos sintetizados em laboratório. São compostos sintéticos derivados da p-aminobenzenosulfonamida que apresentam em sua estrutura um anel benzênico, um grupo amino e um grupo sulfonamida na posição *para* do anel.^{9,10} Existem diferentes sulfonamidas e derivados sintetizados, onde suas estruturas variam de acordo com a substituição de hidrogênios do grupo sulfonamida ou do grupo amino no anel aromático. Para avaliar as características das sulfonamidas deve-se levar em consideração qual dos hidrogênios foi substituído. Os derivados mais ativos das sulfonamidas contem radicais heterocíclicos; porém, se um hidrogênio do grupo amino for substituído, esta pode perder a atividade. Estima-se que mais de 40 sulfonamidas e derivados são utilizadas em práticas medicinais e veterinárias. São amplamente utilizadas para prevenir e curar diversas doenças infecciosas do sistema biológico já que apresentam atividades farmacológicas como antibacteriano, antifúngico, antiviral, anti-inflamatório e inibidoras da enzima anidrase carbônica.¹¹ As sulfonamidas são destaque na medicina veterinária não apenas para fins terapêuticos e profiláticos mas também são utilizadas para o crescimento do gado leiteiro, frangos e suínos com o objetivo de aumentar o peso do animal.¹¹⁻¹³

Essas substâncias são introduzidas no organismo animal e agem de maneira seletiva sobre o causador do processo infeccioso, não causando grandes efeitos adversos ao hospedeiro. As sulfas são antimicrobianos que apresentam estrutura similar a do ácido p-amino-benzóico (PABA) e, por serem antagonistas competitivas, disputam com o PABA na síntese enzimática do ácido fólico afetando, assim, os organismos que precisam sintetizar o seu próprio ácido fólico. Essa característica das sulfonamidas conferem a elas elevada sensibilidade aos microrganismos que sintetizam o seu próprio ácido.^{12,13}

Esses compostos quando utilizados de forma incorreta e em concentrações acima do limite máximo permitido podem causar graves danos ao ser humano e ao meio ambiente. As sulfonamidas são monitoradas em diversos tipos de alimentos já que podem ser encontradas em produtos de origem animal como, por exemplo carne, derivados do leite, ovos e mel. Os resíduos desses antibióticos são de grande preocupação, já que apresentam potencial toxicidade, podendo causar diferentes efeitos adversos como reações alérgicas em pessoas sensíveis, distúrbios em diversos

sistemas do organismo, efeitos carcinogênicos, hemotoxicidade, supressão da atividade enzimática, entre outros.^{10,14,15}

Na Figura 8.1 são apresentadas as estruturas químicas das sulfonamidas estudadas nesse trabalho.

Figura 8.1: Estruturas das sulfonamidas estudadas.

Sulfadimetoxina (SDM)

Sulfametoxazol (SMX)

Sulfadiazina (SDZ)

Sulfamerazina (SMR)

Sulfatiazol (STZ)

Sulfametazina (SMZ)

Sulfaclopiridazina (SCP)

Sulfaquinoxalina (SQX)

8.1.3 Leite

O leite e seus derivados estão entre os alimentos mais consumidos no mundo por milhões de pessoas todos os dias, principalmente por crianças, já que o leite contém diversos macro e micro

nutrientes necessários para o ser humano. O leite é um fluido natural complexo, composto principalmente por água, lipídeos, proteínas, gorduras e carboidratos. Além disso, é uma valiosa fonte de cálcio, vitaminas e antioxidantes. Pode ser utilizado na sua forma *in-natura* ou como matéria prima para produção de outros alimentos como queijos, iogurtes, manteigas entre outros.^{16,17}

Em 2016 a produção total de leite no mundo foi de 816 milhões de toneladas sendo que o Brasil está entre os dez países que mais produzem leite e é o terceiro maior produtor de laticínios do mundo.^{18,19} Nesse mesmo ano o país produziu aproximadamente 35 milhões de toneladas de leite, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor de leite do país. O setor leiteiro vem crescendo ano a ano e demonstra importante papel na ordem econômica e social do agronegócio brasileiro. De acordo com a FAO a produção mundial de leite em 2023 será de 46,7 bilhões de litros.^{19,20}

O leite é produzido pela glândula mamária das vacas leiteiras a partir de elementos que passam da corrente sanguínea para as células desta glândula. Juntamente com esses elementos pode-se ter os contaminantes veterinários como, por exemplo, os antibióticos que foram administrados ao animal e também chegaram até a glândula e, conseqüentemente, ao leite.^{21,22}

A mastite é uma infecção bastante comum que ocorre nessas glândulas e o tratamento é feito através da utilização de antibióticos. Como resultado, vem crescendo a ocorrência de resíduos desses compostos no leite e se tornado um grande problema de saúde pública, já que uma vez contaminado com essas substâncias o leite é considerado adulterado e impróprio para o consumo, devendo ser descartado. Se ingerido, o leite pode causar vários danos à saúde como graves reações alérgicas, aumento da resistência de agentes patogênicos a antibióticos, intoxicações, entre outras.^{22,23}

As sulfonamidas são uma classe de antibióticos amplamente empregadas para prevenir e tratar diversas infecções microbianas como a mastite. Diante disso, para garantir a segurança alimentar dos consumidores e as exigências dos mercados compradores, programas e normas cada vez mais exigentes vêm sendo criados para monitorar a quantidade desses resíduos presentes no leite. A União Européia, Canadá e os Estados Unidos determinaram o valor de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada composto e para a soma de resíduos de todas as sulfonamidas no leite. No Brasil, o limite máximo de resíduo (LMR) de sulfonamidas no leite é também de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.^{13,15,24-27}

8.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo foi utilizar o material mais seletivo sintetizado, o qual foi o polímero impresso molecularmente, para extrair sulfonamidas utilizando a microtécnica de extração *in-tube* SPME. Além disso, desenvolver, otimizar e validar as condições de análise do sistema *in-tube* SPME para analisar sulfonamidas em amostras de leite, empregando *in-tube* SPME LC-MS/MS.

8.3 Parte experimental

8.3.1 Padrões analíticos e reagentes

Os padrões analíticos sulfadiazina (SDZ - 99%), sulfametoxazol (SMX - 99%), sulfatiazol (STZ - 99%), sulfamerazina (SMR - 99%), sulfametazina (SMZ - 99%), sulfaclopiridazina (SCP - 99%), sulfaquinoxalina (SQX - 95%) e sulfadimetoxina (SDM - 99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Espanha, Itália e Alemanha). Os solventes utilizados foram acetonitrila, tolueno e metanol grau HPLC da Tedia (Fairfield, EUA), acetona grau HPLC da Panreac Applichem (Darmstadt, Alemanha), ácido fórmico P.A. da Synth (Diadema, Brasil), ácido trifluoroacético da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e água deionizada Milli-Q da Millipore (Billerica, EUA).

8.3.2 Preparo das soluções contendo os padrões analíticos

Soluções estoques individuais das sulfonamidas foram preparadas na concentração de 100 mg L⁻¹ em acetonitrila e armazenadas a -30 °C. Padrões mistos de sulfonamidas foram preparados em diferentes concentrações no decorrer do estudo, conforme necessidade.

8.3.3 Instrumentação e condições cromatográficas para separação das triazinas no sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS

Para otimização dos parâmetros do sistema *in-tube* SPME (Capítulo 5) e validação do método utilizou-se um sistema UPLC-MS/MS (Acquity Ultra Performance LC – Waters; Xevo TQ MS Detector – Waters com ionização a pressão atmosférica por *electrospray* (ESI)) e para aquisição dos dados o software MassLynx. As condições do cromatógrafo líquido acoplado ao detector de massas foram as mesmas descritas na Tabela 4.1, com exceção do volume de injeção onde foi utilizado 50 µL para o sistema *on-line* e do comprimento de onda, já que se empregou como detector um espectrômetro de massas. Para separação cromatográfica dos compostos utilizou-se uma coluna analítica Kinetex (Phenomenex) XB-C18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 µm).

As condições de detecção por espectrometria de massas sequencial (MS/MS) foram otimizadas fazendo-se infusão direta dos analitos pelo sistema em uma concentração de 1,0 mg L⁻¹ preparados na fase móvel. O modo de ionização dos analitos foi positivo (ESI+) e utilizou-se as seguintes condições: voltagem no capilar de 3,0 kV, temperatura da fonte de 150 °C, temperatura do gás de solvatação de 400 °C, fluxo do gás de solvatação de 800 L h⁻¹ (N₂) e fluxo do gás de colisão (Ar) de 0,15 mL min⁻¹. As análises foram realizadas no modo Monitoramento de Reações Seleccionadas (SRM) e otimizadas para todos os analitos. A Tabela 8.1 lista os íons precursores, íons fragmentos e suas respectivas energias de colisão, voltagens do cone e o tempo de aquisição de dados (*dwell-time*) utilizados.

O sistema *in-tube* SPME acoplado com UPLC-MS/MS foi montado de acordo com a configuração já descrita no Capítulo 5.

Nesse capítulo duas colunas de extração de mesmo comprimento e diâmetro interno foram avaliadas, porém com tubos feitos de materiais diferentes, sendo uma de aço inoxidável e a outra de sílica fundida. As dimensões de ambas colunas utilizadas no sistema foi de 50 mm de comprimento e diâmetro interno de 500 µm, as quais foram empacotadas com o polímero impresso molecularmente para extrair as sulfonamidas. Avaliou-se as duas colunas, não havendo diferenças notáveis entre elas nas análises. Para o desenvolvimento do método, otimização e validação optou-se por utilizar o tubo de sílica fundida.

Tabela 8.1: Parâmetros otimizados no MS/MS para análise das sulfonamidas.

Analitos	Precursor (m/z) [M+H] ⁺	SRM transições	Cone (V)	Energia de colisão (V)	Dwell-time (s)
Sulfadiazina	251	92	22	28	0,3
		156	22	18	0,3
Sulfametoxazol	254	92	20	26	0,3
		156	20	16	0,3
Sulfatiazol	255	92	24	28	0,3
		156	24	16	0,3
Sulfamerazina	265	92	26	28	0,3
		156	26	18	0,3
Sulfametazina	279	92	30	26	0,3
		186	30	18	0,3
Sulfaclorpiridazina	285	92	20	32	0,3
		156	20	16	0,3
Sulfaquinoxalina	301	92	28	34	0,3
		156	28	16	0,3
Sulfadimetoxina	311	92	30	34	0,3
		156	30	20	0,3

Para a análise das sulfonamidas no sistema *in-tube* SPME quatro etapas foram necessárias, sendo elas: extração, eluição, limpeza e condicionamento da coluna extratora. As condições de cada etapa são mostradas na Tabela 8.2 onde está detalhado as etapas do sistema, eventos, tempo, fluxo, posição da válvula de comutação e composição do solvente na coluna extratora e na coluna analítica.

Tabela 8.2: Etapas de extração, eluição, limpeza e condicionamento do sistema *in-tube* SPME.

Etapas	Eventos	Tempo (minutos)	Fluxo (mL min ⁻¹)	Composição do solvente na coluna extratora	Composição do solvente na coluna analítica	Posição da válvula
1	Extração dos analitos	0:00 – 2:00	0,2	Água (100%)	Acetonitrila/ Água (12%:88%)	Carregamento
2	Eluição dos analitos	2:00 – 18:00	0,2	Acetonitrila/ Água (12%:88% até 30%:70%)	Acetonitrila/ Água (12%:88% até 30%:70%)	Eluição
3	Limpeza das colunas	18:01– 19:00	0,2	Acetonitrila (100%)	Acetonitrila (100%)	Eluição
4	Condicionamento das colunas	19:01 – 20:00	0,2	Água (100%)	Acetonitrila/ Água (12%:88%)	Carregamento

8.3.4 Otimização do sistema *in-tube* SPME

Para otimizar a extração das sulfonamidas pelo sistema *in-tube* SPME os parâmetros: volume de injeção, tempo, fluxo e porcentagem de solvente orgânico da amostra foram avaliados para que fosse possível otimizar as melhores condições no sistema e obter maior eficiência na extração. Toda a otimização, e posterior validação, foram realizadas utilizando uma matriz de leite isenta dos analitos de interesse.

8.3.5 Validação do método no sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS

Para a validação do método foi utilizado o guia Q2(R1) da *International Conference on Harmonization* (ICH)²⁸ e as seguintes figuras de mérito foram avaliados: seletividade, limite de detecção, linearidade, precisão, exatidão e recuperação.

O parâmetro seletividade foi avaliado comparando-se os cromatogramas obtidos na análise de leite sem analito com o mesmo leite fortificado na concentração de 10 µg L⁻¹. Com a amostra de leite isenta dos analitos de interesse foi possível avaliar a existência ou não de possíveis interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

Para determinar os limites de detecção (LOD) concentrações conhecidas dos analitos foram adicionadas na amostra de leite isenta de analitos para que fosse determinada a menor concentração que cada analito seria detectado baseado no critério de três vezes o sinal/ruído.

Para determinação da linearidade do método a curva analítica foi construída com seis níveis de concentrações diferentes (5; 10; 20; 40; 80 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) das sulfonamidas na amostra e leite. Cada nível foi injetado em triplicata e, posteriormente, construiu-se as curvas analíticas para cada composto e avaliou-se a linearidade do método para cada analito a partir da equação da reta utilizando os coeficientes angular e linear.

O parâmetro precisão foi avaliado em termos de repetibilidade e precisão intermediária, em três níveis de concentração e em triplicata. Na repetibilidade a amostra de leite foi fortificada em três níveis - baixo (10 $\mu\text{g L}^{-1}$), médio (40 $\mu\text{g L}^{-1}$) e alto (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) - resultando em um total de 9 padrões injetados. Para avaliar a precisão intermediária foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima, porém em dias diferentes. Ambos os resultados foram expressos em função do desvio padrão relativo das injeções (RSD (%)).

Da mesma maneira, foi determinada a exatidão analisando a amostra de leite em três níveis de fortificação, baixo (10 $\mu\text{g L}^{-1}$), médio (40 $\mu\text{g L}^{-1}$) e alto (100 $\mu\text{g L}^{-1}$), para todos os analitos e em triplicata.

Para avaliar a recuperação dos analitos foram feitas injeções *on-line* (passando pela coluna de extração) e injeções direta (não passando pela coluna de extração, direto para a coluna analítica). Nessa validação optou-se por injetar na injeção direta 50 μL , ou seja o volume utilizado durante o método, o qual é o máximo do *loop* do injetor; para a injeção *on-line* utilizou-se o mínimo de volume que poderia ser injetado na coluna analítica para ter todos os picos com uma altura significativa. Utilizou-se o mesmo padrão analítico e as injeções foram feitas em triplicata para as três concentrações (10; 40 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$). Calculou-se então a porcentagem de recuperação do método de preparo da amostra.

Para as sulfonamidas também foi avaliado o fator de pré-concentração do sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS. Os fatores foram calculados comparando as áreas dos picos obtidas das amostras que foram injetadas diretamente no sistema com as áreas obtidas nas injeções *on-line*, ou seja, quando a amostra passa pela coluna de extração. Para as injeções direta injetou-se o volume

de 1 μL e para as injeções *on-line* injetou-se 50 μL de amostra em três concentrações diferentes (10; 40 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$), em triplicata para cada concentração.

8.3.6 Amostras

Algumas amostras de leite foram adquiridas no comércio da cidade de São Carlos e outras foram recebidas como doação para análise.

Para precipitação das proteínas nas amostras de leite adicionou-se 500 μL de ácido trifluoroacético (20%) em 1000 μL de leite. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex (Labnet International, Edison, USA) por aproximadamente 1 minuto e centrifugadas a 10,000 rpm por 20 minutos em uma centrífuga (Hettich Zentrifugen MIKRO 120, Germany) até que toda proteína fosse precipitada e removida. Antes da injeção foram filtradas em filtros de celulose regenerada (Millipore, Billerica, EUA) com diâmetro interno de 13 mm e porosidade de 0,22 μm para remoção do particulado fino.

8.4 Resultados e discussão

8.4.1 Sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS

O sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS conseguiu extrair todas as sulfonamidas estudadas e apresentou boa intensidade dos picos em diferentes concentrações (Figura 8.2). Devido à grande quantidade de analitos e por ser um sistema com preparo de amostras automatizado alguns fatores influenciaram na separação cromatográfica, não sendo possível separar todos os compostos na coluna analítica. Porém, pela m/z de cada analito foi possível obter os picos individuais (separados), sem a presença de possíveis contaminantes da matriz (Figura 8.3). Em todos os cromatogramas os picos das sulfonamidas apresentaram alargamento o que pode estar relacionado com a elevada interação das sulfas com a fase de extração seletiva e como consequência uma maior demora na eluição dessas analitos da coluna de extração; outro aspecto que deve ser considerado é o volume morto presente nas conexões entre os módulos do equipamento, e, que se agrava nesse caso por se tratar de uma microtécnica de extração acoplada *on-line* com UPLC-MS/MS.

A Figura 8.2 apresenta o cromatograma do íon total (TIC) da amostra de leite fortificada com as sulfonamidas em duas concentrações: 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os números no cromatograma representam a ordem de eluição dos analitos: 1 - sulfadiazina; 2 - sulfatiazol; 3 - sulfamerazina; 4 - sulfametazina; 5 - sulfaclopiridazina, 6 - sulfametoxazol, 7 - sulfadimetoxina e 8 - sulfaquinoxalina.

A Figura 8.3 apresenta os cromatogramas individuais dos analitos estudados no modo SRM. Utilizou-se nesse método a maior área para quantificação e a menor área para confirmação dos analitos. Portanto, as transições utilizadas para quantificação dos analitos foram as seguintes: para sulfadiazina m/z 251 $\rightarrow$ m/z 156; sulfametoxazol m/z 254 $\rightarrow$ m/z 156; sulfatiazol m/z 255 $\rightarrow$ m/z 156; sulfamerazina m/z 265 $\rightarrow$ m/z 92; sulfametazina m/z 279 $\rightarrow$ m/z 186; sulfaclopiridazina m/z 285 $\rightarrow$ m/z 156; sulfaquinoxalina m/z 301 $\rightarrow$ m/z 156 e sulfadimetoxina m/z 311 $\rightarrow$ m/z 156.

Figura 8.2: Cromatogramas do íon total da amostra de leite fortificada com os analitos nas concentrações de (A) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e (B) 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sendo, 1 - SDZ; 2 - STZ; 3 - SMR; 4 - SMZ; 5 - SCP; 6 - SMX; 7 - SDM e 8 - SQX.

Figura 8.3: Cromatogramas individuais do monitoramento das transições selecionadas (SRM) para cada analito estudado na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

8.4.2 Otimização do sistema *in-tube* SPME

A otimização das variáveis mais importantes do método é de extrema importância já que resulta em maiores taxas de extração, aumento da sensibilidade analítica e diminuição do tempo de análise. Desta maneira os parâmetros volume de injeção, tempo, fluxo e porcentagem de solvente orgânico da amostra foram otimizados para esse sistema com injeções em triplicata.

A Figura 8.4 apresenta a otimização do volume de injeção da amostra no sistema. Foram avaliados três volumes (10, 30 e 50 μL), onde foi possível perceber que para todos os analitos estudados o volume de 50 μL apresentou a maior área. Portanto, utilizou-se este volume para o restante das análises. O aumento do volume da amostra influenciou diretamente na quantidade de analitos e, conseqüentemente, na maior retenção desses na fase. Não foi possível testar volumes maiores já que esse é o volume máximo do *loop* de amostragem do equipamento.

Figura 8.4: Influência do volume de injeção na concentração dos analitos estudados empregando-se o sistema *in-tube* SPME.

A otimização do tempo de carregamento da amostra é extremamente importante para garantir a extração de todos analitos e diminuir as possíveis perdas do sistema, já que a completa retenção dos analitos na fase extratora é dependente do tempo de contato deles com a fase.

Para esse parâmetro, como mostra a Figura 8.5, foi possível observar que no tempo de carregamento de 1 minuto somente para dois analitos (SCP e SQM) a fase extratora conseguiu extrair uma maior quantidade, porém sem grande significância se comparado com os outros tempos. Quando testado o tempo de 2 minutos percebeu-se que três analitos (SDZ, SMR e SMZ) apresentaram maior área e no tempo de 4 minutos somente dois analitos (SMX e SDM) apresentaram melhor resposta. Os analitos STZ e SQM ficaram com áreas muito próximas para os tempos de carregamento de 2 e 4 minutos. Diante desses resultados foi utilizado para todas as análises o tempo de carregamento de 2 minutos, pois apresentou melhor resposta para mais analitos quando comparado com os outros tempos. Além disso, conseguiu-se em um menor tempo, eliminar-se os interferentes da amostra restando-se somente os analitos de interesse na coluna extratora. Vale ressaltar que a utilização de fases mais seletivas, como é o caso do MIP, diminui a retenção dos possíveis interferentes presentes na amostra

Figura 8.5: Influência do tempo de carregamento da amostra na concentração dos analitos estudados empregando-se o sistema *in-tube* SPME.

Para o parâmetro fluxo de carregamento foram testados três fluxos: 0,1; 0,2 e 0,3 mL min⁻¹, é possível perceber pela Figura 8.6 que o fluxo de 0,1 mL min⁻¹ apresentou para metade dos analitos maiores valores de área e para os outros analitos o fluxo de 0,2 mL min⁻¹ apresentou melhor resposta, porém não muito significativa quando comparado com os outros fluxos avaliados. Portanto, como o fluxo de 0,1 mL min⁻¹ apresentou diferenças significativas quando comparado com os outros fluxos utilizou-se, para o restante das análises, o fluxo de carregamento de 0,1 mL min⁻¹.

Por último, foi otimizada a porcentagem do solvente orgânico acetonitrila a ser utilizada no carregamento da amostra. A Figura 8.7 apresenta os resultados dos experimentos realizados com 0, 10 e 20% de acetonitrila na fase de carregamento onde, para todos os analitos, 0% de solvente orgânico (utilizando somente água deionizada) aumentou a retenção desses na fase extratora. Foi possível perceber que um aumento na quantidade de solvente orgânico no carregamento implicou em uma diminuição da retenção dos analitos. Desta maneira, foi utilizado para todos os analitos como fase de carregamento somente água deionizada, já que todos os analitos apresentaram melhor resposta nessa condição.

Figura 8.6: Influência da variação do fluxo de carregamento da amostra na concentração dos analitos estudados empregando-se o sistema *in-tube* SPME.

Figura 8.7: Influência da porcentagem do solvente orgânico acetonitrila no carregamento da amostra na concentração dos analitos estudados empregando-se o sistema *in-tube* SPME.

8.4.3 Validação do método *in-tube* SPME LC-MS/MS

A validação da metodologia foi realizada após as condições de análise do sistema *in-tube* SPME terem sido desenvolvidas e otimizadas.

O método mostrou-se seletivo para os analitos do estudo sendo, assim, possível determinar qualitativamente e quantitativamente cada composto. A Figura 8.8 apresenta os cromatogramas sobrepostos da amostra de leite sem contaminação e a mesma fortificada na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Como observado nesta figura, a amostra de leite não apresentou picos eluídos no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse. Desta maneira, o método mostrou-se seletivo para a identificação e quantificação das sulfonamidas já que não apresentou interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

Figura 8.8: Comparação entre os cromatogramas de leite integral isento do analito e o mesmo fortificado com as sulfonamidas na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sendo, 1 - SDZ; 2 - STZ; 3 - SMR; 4 - SMZ; 5 - SCP; 6 - SMX; 7 - SDM e 8 - SQX.

Na Tabela 8.3 são apresentados os limites de detecção obtidos para as sulfonamidas, os quais variaram de 0,01 a 1,6 ng L^{-1} .

Tabela 8.3: Limites de detecção (LOD) do método para as sulfonamidas.

Analitos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Sulfadiazina	1,6
Sulfatiazol	1,6
Sulfamerazina	0,6
Sulfametazina	0,5
Sulfaclopiridazina	0,08
Sulfametoxazol	0,08
Sulfadimetoxina	0,01
Sulfaquinoxalina	0,01

As curvas analíticas foram construídas a partir da matriz de leite integral e apresentaram para todas as sulfonamidas coeficientes de correlação linear satisfatórios. Com os valores obtidos pode-se concluir que o modelo de regressão linear mostrou-se adequado nas condições analíticas desenvolvidas e que os coeficientes de correlação foram maiores que 0,99 para sete analitos estudados sendo que somente a sulfadiazina apresentou o valor de 0,98 mostrando, mesmo assim, que há uma relação diretamente proporcional entre a concentração do analito na amostra e a intensidade do sinal diante do intervalo de concentração especificado. Quanto maior a resposta gerada pelo detector em função da concentração dos analitos maior é a sensibilidade da metodologia desenvolvida e consequentemente uma menor concentração da faixa linear é possível.

As Figuras 8.9 até a 8.16 apresentam as curvas analíticas com a equação da reta (coeficientes linear (b), angular (a)) e de correlação (r) para os analitos sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfaclopiridazina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina, respectivamente.

Figura 8.9: Curva analítica da sulfadiazina em leite integral.

Figura 8.10: Curva analítica da sulfatiazol em leite integral.

Figura 8.11: Curva analítica da sulfamerazina em leite integral.

Figura 8.12: Curva analítica da sulfametazina em leite integral.

Figura 8.13: Curva analítica da sulfaclopiridazina em leite integral.

Figura 8.14: Curva analítica da sulfametoxazol em leite integral.

Figura 8.15: Curva analítica da sulfadimetoxina em leite integral.

Figura 8.16: Curva analítica da sulfaquinoxalina em leite integral.

O parâmetro precisão, tanto para a repetitividade quanto para a precisão intermediária (Tabela 8.4) e o parâmetro exatidão (Tabela 8.5) foram avaliados em três níveis de fortificação (10; 40 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) e em triplicata. Conforme mostra a Tabela 8.4 os resultados apresentaram desvios baixos e inferiores a 15% para a maioria dos analitos nas três concentrações, com exceção da sulfadiazina, sulfamerazina e sulfametazina que apresentaram valores maiores que 15% para a menor concentração analisada (10 $\mu\text{g L}^{-1}$) comprovando, assim, que o método é preciso não só quando os ensaios são realizados no mesmo dia mas também em dias diferentes.

Os resultados obtidos para a exatidão mostraram que as oito sulfonamidas estudadas ficaram dentro da faixa aceitável nas três concentrações diferentes de acordo com os critérios do o Manual de Garantia Qualidade Analítica (MAPA).²⁹

De acordo com o guia do ICH não há um nível de aceitação para esses parâmetros porém, conforme os critérios de aceitação da ANVISA,³⁰ a precisão deve apresentar valores menores que 5% e, de acordo com o Manual de Garantia Qualidade Analítica (MAPA) o RSD deve ser $\leq 20\%$. Para o parâmetro exatidão, a ANVISA, da mesma maneira que o ICH não dispõe de critérios de aceitação. Dessa forma, esse parâmetro foi analisado segundo o MAPA que aceita valores de 70 a 120% em média para todos os analitos.

Tabela 8.4: Resultados obtidos na validação para repetitividade e precisão intermediária.

	Repetitividade (% RSD)			Precisão intermediária (% RSD)		
	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	40 $\mu\text{g L}^{-1}$	100 $\mu\text{g L}^{-1}$	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	40 $\mu\text{g L}^{-1}$	100 $\mu\text{g L}^{-1}$
Sulfadiazina	23,0	4,6	2,2	7,9	4,1	1,9
Sulfatiazol	13,3	2,1	2,7	11,9	12,0	2,0
Sulfamerazina	8,4	4,2	5,2	15,6	2,3	6,5
Sulfametazina	16,7	3,4	4,1	10,8	13,4	1,6
Sulfaclorpiridazina	8,2	1,8	5,8	0,9	2,9	2,5
Sulfametoxazol	11,4	3,6	0,7	1,3	2,2	2,5
Sulfadimetoxina	8,0	4,1	3,7	2,8	3,8	3,8
Sulfaquinoxalina	6,7	3,0	3,9	3,2	0,5	2,6

Tabela 8.5: Resultados obtidos na validação para exatidão.

	Exatidão (%)		
	10 µg L ⁻¹	40 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹
Sulfadiazina	99,1	102,8	93,7
Sulfatiazol	108,4	93,7	87,3
Sulfamerazina	109,7	109,2	101,1
Sulfametazina	108,4	101,2	77,5
Sulfaclorpiridazina	116,8	106,7	93,5
Sulfametoxazol	112,5	95,0	82,7
Sulfadimetoxina	107,9	107,9	94,8
Sulfaquinoxalina	113,2	99,8	85,6

O parâmetro recuperação é abordado em diversos guias de validação para avaliar a recuperação das técnicas *off-line*, porém nas técnicas *on-line* não há ainda nenhum procedimento descrito para avaliar a recuperação nesses sistemas. Diante disso, aplicou-se um procedimento que pudesse avaliar, da melhor maneira, o sistema *on-line* utilizado nesse trabalho como um todo.

A Tabela 8.6 mostra os valores obtidos na recuperação dos analitos em três níveis de concentração. Tanto o guia do ICH quanto o guia de validação para métodos analíticos da ANVISA não abordam o parâmetro recuperação. Já o MAPA considera que a recuperação e a exatidão são parâmetros iguais. Os valores obtidos nesse trabalho estão, em sua maioria, próximos do valores esperados para os métodos *off-line* segundo o MAPA, os quais geralmente variam de 70 a 120%. Somente o analito sulfatiazol para a menor concentração avaliada (10 µg L⁻¹) apresentou uma porcentagem de recuperação inferior a 70%; para os analitos sulfametazina e sulfametoxazol, também na concentração do nível baixo, não foi possível calcular o valor da recuperação já que o valor da área recuperado ficou abaixo do primeiro ponto da curva de recuperação para a injeção direta na coluna analítica, não sendo possível calcular o valor da concentração que foi recuperado.

Assim, comparando-se o método *on-line* com os critérios aceitáveis para os métodos *off-line* obteve-se resultados satisfatórios para a maioria das concentrações estudadas.

Tabela 8.6: Resultados obtidos na validação para recuperação.

	Recuperação (%)		
	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	40 $\mu\text{g L}^{-1}$	100 $\mu\text{g L}^{-1}$
Sulfadiazina	102,7	99,1	100,1
Sulfatiazol	66,8	116,7	98,0
Sulfamerazina	101,0	99,6	100,0
Sulfametazina	-	80,8	103,4
Sulfaclopiridazina	118,3	91,7	81,4
Sulfametoxazol	-	77,9	82,7
Sulfadimetoxina	101,4	99,5	100,1
Sulfaquinoxalina	94,8	101,7	99,8

A Tabela 8.7 apresenta os valores do fator de concentração do sistema em três níveis de concentração para as sulfonamidas. Foi possível perceber que para todos os analitos os valores foram maiores que 1 demonstrando, assim, que a extração *on-line* concentrou os analitos quando comparados com a injeção direta.

Dentre as oito sulfonamidas, utilizando como fase extratora o polímero impresso molecularmente, a sulfaclopiridazina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina e sulfaquinoxalina apresentaram maiores fatores para as três concentrações estudadas quando comparadas com as outras quatro sulfonamidas. Nesse caso, o polímero impresso molecularmente apresentou boa seletividade para os analitos de interesse, possibilitando assim uma maior extração dos mesmo e consequentemente maior sensibilidade analítica.

Tabela 8.7: Fator de concentração para as oito sulfonamidas analisadas utilizando o sistema *in-tube* SPME.

	Fator de concentração		
	10 µg L ⁻¹	40 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹
Sulfadiazina	1,6	1,7	1,8
Sulfatiazol	4,9	9,0	8,0
Sulfamerazina	2,4	2,8	3,0
Sulfametazina	4,6	3,8	5,2
Sulfaclorpiridazina	14,4	12,4	11,3
Sulfametoxazol	21,0	13,0	13,7
Sulfadimetoxina	19,1	14,9	14,3
Sulfaquinoxalina	27,2	20,7	19,0

8.4.4 Amostras

Após a validação, o método foi aplicado na análise dos antibióticos sulfonamidas em 12 amostras de leites. Os analitos estudados não foram encontrados até o limite de detecção do método.

A Figura 8.17 apresenta um cromatograma sobreposto que foi obtido na análise de uma amostra de leite integral, fortificada na concentração de 10 µg L⁻¹. Foi possível observar na figura que os analitos não foram detectados na amostra de leite integral, já que não há picos cromatográficos na amostra, os quais foram observados nas amostras fortificadas. Em todas as amostras de leites fortificações foram feitas para confirmar a ausência dos analitos de interesse.

Figura 8.17: Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de leite integral sem contaminação e a mesma fortificada na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

8.5 Conclusão

Como o polímero impresso molecularmente apresentou maior seletividade para a extração das sulfonamidas, foi utilizado como fase extratora no sistema *in-tube* SPME acoplado com sucesso a cromatografia líquida e espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Nesse sistema os principais parâmetros do método foram otimizados e, após a otimização, o método foi validado e os parâmetros avaliados apresentaram resultados adequados e satisfatórios.

O sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS foi aplicado com êxito para concentração e separação de oito antibióticos da classe das sulfonamidas em amostras de leites, apresentando baixos limites de detecção, elevada sensibilidade e valores adequados nos testes de recuperação. A coluna de extração foi reutilizada mais de 300 vezes e o método em menos de 18 minutos extraiu, pré-concentrou, separou e identificou os analitos de interesse. Além disso, o método desenvolvido apresentou como vantagens o uso de menor quantidade de amostras e solventes orgânicos e tempo de extração reduzido. Embora os analitos em estudo não tenham sido detectados nas amostras

analisadas, o método foi aplicado com sucesso na análise das mesmas amostras fortificadas com concentrações conhecidas dos analitos investigados.

Referências bibliográficas

- 1 ZHANG, J.; ZHANG, L.; LOH, K. C.; DAI, Y.; TONG, Y. W. Enhanced anaerobic digestion of food waste by adding activated carbon: Fate of bacterial pathogens and antibiotic resistance genes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 128, p. 19-25, 2017.
- 2 GRENNI, P.; ANCONA, V.; CARACCILOLO, A. B. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, v. 136 p. 25-39, 2018.
- 3 CHIESA, L. M.; NOBILE, M.; PANSERI, S.; ARIOLI, F. Antibiotic use in heavy pigs: Comparison between urine and muscle samples from food chain animals analysed by HPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 235 p. 111-118, 2017.
- 4 TIAN, H.; WANG, J.; ZHANG, Y.; LI, S.; JIANG, J.; TAO, D.; ZHENG, N. Quantitative multiresidue analysis of antibiotics in milk and milk powder by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1033-1034 p. 172-179, 2016.
- 5 VILA-COSTA, M.; GIOIA, R.; ACENA, J.; PEREZ, S.; CASAMAYOR, E. O.; DACHS, J. Degradation of sulfonamides as a microbial resistance mechanism. **Water Research**, v. 115 p. 309-317, 2017.
- 6 PARK, J. Y.; HUWE, B. Effect of pH and soil structure on transport of sulfonamide antibiotics in agricultural soils. **Environmental Pollution**, v. 213 p. 561-570, 2016.
- 7 LI, N.; HO, K. W. K.; YING, G. G.; DENG, W. J. Veterinary antibiotics in food, drinking water, and the urine of preschool children in Hong Kong. **Environment International**, v. 108 p. 246-252, 2017.
- 8 CHEN, T.; CHENG, G.; AHMED, S.; WANG, Y.; WANG, X.; HAO, H.; YUAN, Z. New methodologies in screening of antibiotic residues in animal-derived foods: Biosensors. **Talanta**, v. 175 p. 435-442, 2017.

9 YU, C.; HU, B. C18-coated stir bar sorptive extraction combined with high performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for the analysis of sulfonamides in milk and milk powder. **Talanta**, v. 90 p. 77-84, 2012.

10 DMITRIENKO, S. G.; KOCHUK, E. V.; APYARI, V. V.; TOLMACHEVA, V. V.; ZOLOTOV, Y. A. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection – A review, **Analytica Chimica Acta**, v. 850 p. 6-25, 2014.

11 ZHANG, F.; LIU, E.; ZHENG, X.; YU, L.; YAN, Y. A flexible imprinted photonic resin film templated by nanocrystalline cellulose for naked-eye recognition of sulfonamides. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 58 p. 172-178, 2018.

12 KIM, H. J.; JEONG, M. H.; PARK, H. J.; KIM, W. C.; KIM, J. E. Development of an immunoaffinity chromatography and HPLC-UV method for determination of 16 sulfonamides in feed. **Food Chemistry**, v. 196 p. 1144-1149, 2016.

13 XU, W.; SU, S.; JIANG, P.; WANG, H.; DONG, X.; ZHANG, M. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. **Journal of Chromatography A**, v. 1217 p. 7198-7207, 2010.

14 SHI, X.; MENG, Y.; LIU, J.; SUN, A.; LI, D.; YAO, C.; LU, Y.; CHEN, J. Group-selective molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the simultaneous determination of six sulfonamides in aquaculture products. **Journal of Chromatography B**, v. 879 p. 1071-1076, 2011.

15 ARROYO-MANZANARES, N.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 879 p. 1071-1076, 2011.

16 MAZUREK, S.; SZOSTAK, R.; CZAJA, T.; ZACHWIEJA, A. Analysis of milk by FT-Raman spectroscopy. **Talanta**, v. 138 p. 285-289, 2015.

- 17 JAISWAL, P.; JHA, S. N.; KAUR, J.; BORAH, A.; RAMYA, H. G. Detection of aflatoxin M1 in milk using spectroscopy and multivariate analyses. **Food Chemistry**, v. 238 p. 209-214, 2018.
- 18 AGUIAR, R. S.; ESMERINO, E. A.; ROCHA, R. S.; PIMENTEL, T. C.; ALVARENGA, V. O.; FREITAS, M. Q.; SILVA, M. C.; SANT'ANA, A. S.; SILVA, A. C. O.; CRUZ, A. G. Physical hazards in dairy products: Incidence in a consumer complaint website in Brazil. **Food Control**, v. 86 p. 66-70, 2018.
- 19 YILDIRIM, N.; GENC, S. Energy and exergy analysis of a milk powder production system. **Energy Conversion and Management**, v. 149 p. 698-705, 2017.
- 20 MONCAYO, S.; MANZOOR, S.; ROSALES, J. D.; ANZANO, J.; CACERES, J. O. Qualitative and quantitative analysis of milk for the detection of adulteration by Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). **Food Chemistry**, v. 232 p. 322-328, 2017.
- 21 MAO, J.; ZHENG, N.; WEN, F.; GUO, L.; FU, C.; OUYANG, H.; ZHONG, L.; WANG, J.; LEI, S. Multi-mycotoxins analysis in raw milk by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. **Food Control**, v. 84 p. 305-311, 2018.
- 22 NYMAN, A. K.; WALLER, K. P.; EMANUELSON, U.; FRÖSSLING, J. Sensitivity and specificity of PCR analysis and bacteriological culture of milk samples for identification of intramammary infections in dairy cows using latent class analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 135 p. 123-131, 2016.
- 23 HAUBERT, L.; KRONING, I. S.; IGLESIAS, M. A.; SILVA, W. P. First report of the *Staphylococcus aureus* isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene *dfrG* and transposon family Tn916-1545. **Microbial Pathogenesis**, v. 113 p. 242-247, 2017.
- 24 ZHANG, Y. D.; ZHENG, N.; HAN, R. W.; ZHENG, B. Q.; YU, Z. N.; LI, S. L.; ZHENG, S. S.; WANG, J. Q. Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, sulfamethazine and quinolones in pasteurized milk and UHT milk in China's Market. **Food Control**, v. 36 p. 238-242, 2014.
- 25 CHATZIMITAKOS, T.; SAMANIDOU, V.; STALIKAS, C. D. Graphene-functionalized melamine sponges for microextraction of sulfonamides from food and environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1522 p. 1-8, 2017.

26 ARIAS, J. L. O.; SCHNEIDER, A.; ANDRADE, J. A. B.; VIEIRA, A. A.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk. **Food Chemistry**, v. 240 p. 1243-1253, 2018.

27 TOALDO, I. M.; GAMBA, G. Z.; PICININ, L. A.; HOFF, G. R. R.; LUIZ, M. B. Multiclass analysis of antibacterial residues in milk using RP-liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection and tandem mass spectrometer confirmation. **Talanta**, v. 99 p. 616-624, 2012.

28 INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical procedures: text and methodology – Q2(R1)**. 2005. 17 p. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf> Acesso em: 15 set. 2016.

29 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Secretaria de defesa agropecuária. **Diário oficial da União**, Brasília, 2011.

30 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 166 de 24 de julho 2017. **Diário oficial da União**, Brasília, 2017.

CAPÍTULO 9

Desenvolvimento de colunas tubulares abertas do tipo PLOT

9.1 Introdução

A miniaturização de colunas cromatográficas iniciou com Golay¹ através das colunas capilares para cromatografia gasosa. Já em cromatografia líquida o avanço para essas colunas demorou um período maior. Inicialmente houve uma redução do diâmetro interno até chegar nas dimensões das colunas capilares atuais (nano e micro colunas), as quais apresentam diversas vantagens em comparação com as colunas convencionais de LC tais como maior eficiência, menor consumo de fases móveis, menor consumo de amostra e acoplamento mais fácil com a espectrometria de massas.²

As colunas empregadas na cromatografia líquida miniaturizada são classificadas conforme ilustra a Figura 9.1. São dois grupos a serem destacados: (1) colunas onde o tubo é totalmente preenchido com a fase estacionária/extratora conhecidas como colunas empacotadas ou recheadas e as monolíticas; (2) colunas onde a fase estacionária/extratora reveste somente a parede interna do tubo conhecidas como colunas tubulares abertas (*open tubular*), as quais podem ser do tipo WCOT (*wall-coated open tubular*) ou PLOT (*porous-layer open tubular*).²

As colunas tubulares abertas do tipo WCOT, possuem um filme revestindo a parede interna do capilar, enquanto as colunas PLOT são constituídas por uma camada porosa aderida na parede interna do capilar. As colunas do tipo WCOT, por serem constituídas de materiais não porosos, possuem menor capacidade de transporte de massas se comparadas às colunas PLOT e, atualmente, ainda são pouco empregadas em LC capilar (cLC). Ao contrário das colunas WCOT, as colunas PLOT apresentam uma fase estacionária/extratora com maior área superficial para interação com a fase móvel, e, assim, as moléculas do soluto que se encontram dissolvidas na fase móvel podem migrar (por meio dos processos de partição ou adsorção) de forma mais efetiva para a fase estacionária/extratora, resultando em eficientes retenções.² Neste capítulo são apresentados alguns resultados iniciais sobre o desenvolvimento de colunas tubulares abertas do tipo PLOT.

Figura 9.1: Ilustração de um corte frontal dos tipos de colunas miniaturizadas.

Fonte: Adaptado da referência 2.

9.1.1 Colunas tubulares abertas

As colunas do tipo WCOT e PLOT ainda são pouco relatadas na literatura para cromatografia líquida, visto que foram usadas inicialmente somente para a cromatografia gasosa. Porém, com os avanços tecnológicos na miniaturização da cromatografia líquida juntamente com a instrumentação adequada vem sendo possível avaliar com maior precisão essas colunas.

Estudos recentes demonstram a sua aplicabilidade em análises proteômica e metabolômica.^{3,4} Yue e colaboradores³ introduziram colunas do tipo PLOT em LC produzidas em capilares de sílica fundida, demonstrando o preparo dessas colunas com PS-DVB (estireno-divinilbenzeno), o qual está ligado covalentemente as paredes do capilar. Outros grupos de pesquisas já demonstraram a utilização dessas colunas (PLOT PS-DVD) em sistemas *on-line* e a aplicação de colunas monolíticas como pré-colunas.^{5,6}

A maioria dos trabalhos mostram o desenvolvimento de colunas PLOT com fases a base de PS-DVB. Este fato estimula o desenvolvimento de estudos com outras fases e a ampliação do potencial de utilização das mesmas na separação de compostos de menor massa molar e maior polaridade. Como resultado poderão apresentar características distintas das moléculas já estudadas em proteômica empregando PS-DVB.^{3,5,7}

A utilização de colunas WCOT está consolidada em cromatografia gasosa de alta resolução. No entanto, em cromatografia líquida Ishii e colaboradores⁸ foram os primeiros a testar colunas

WCOT com obtenção de resultados satisfatórios. Desde então, pouco tem sido explorado a respeito dessas colunas em LC.

Essas colunas apresentam uma fina película, a qual reveste internamente a parede do capilar. Diante disso, a área superficial de contato onde ocorrem as interações analito/fase estacionária é muito pequena, conferindo à coluna baixa capacidade de amostra. Este é um dos principais motivos das colunas WCOT terem sido pouco utilizadas até o momento em LC. Por outro lado, essa característica é ideal quando se dispõe de pequenas quantidades de amostras. É o caso de algumas áreas como a proteômica, genômica, análise forense, biomédica, entre outras. Como forma de aumentar a capacidade de carga de massa da coluna, quando necessário, pode-se empregar fases mais espessas.⁹ Outra alternativa pouco explorada é inchar o filme da coluna com um solvente apropriado, o que então mudaria suas características.

Dentre as colunas tubulares abertas, conforme descrito acima, estão as do tipo PLOT, as quais serão avaliadas nesse trabalho. A fase estacionária dessas colunas que podem ser utilizadas como extratoras ou analíticas apresentam uma maior área superficial para interação com as moléculas do soluto, resultando assim em uma maior capacidade de transporte de massa. As colunas PLOT quando comparadas com a WCOT apresentam como principal vantagem uma maior capacidade em reter o analito de interesse já que a área superficial da fase é ampliada por essa apresentar maior porosidade. Além disso, essas colunas são promissoras para uso em cromatografia líquida, já que apresentam baixo consumo de solvente e consequentemente maior facilidade para se utilizar um espectrômetro de massas com ionização por electrospray.¹⁰⁻¹⁴

9.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo foi preparar colunas tubulares abertas do tipo PLOT para serem utilizados como colunas extratoras em sistemas automatizados de análise.

9.3 Parte experimental

9.3.1 Padrões analíticos e reagentes

Para o preparo das colunas os solventes utilizados foram acetonitrila e metanol grau HPLC da Tedia (Fairfield, EUA), tetrahidrofurano e ácido acético P.A. da J.T. Baker (EUA), hidróxido de sódio da Mallinckrodt (Xalostoc, México) e água deionizada Milli-Q da Millipore (Billerica, EUA). Polietilenoglicol (PEG) da Alfa Aesar (Heysham, Lancaster), tetrametil ortosilicato (TMOS) e clorodimetiloctadecylsilano (Alemanha), solução de 2,2' azobis(2-metil-propionitrila) (EUA), divinilbenzeno (DVB) e 3-(trimetoxisilil)propilmetacrilato (EUA), estireno (Países Baixos), xileno (Alemanha) todos da Sigma-Aldrich.

9.3.2 Tratamento do tubo de sílica

Inicialmente foi feito um pré-tratamento no tubo de sílica para ativar e melhor fixar a fase nas paredes do tubo realizando algumas modificações nos procedimentos propostos por Coufal et al.¹⁵ e Rogeberg et al.⁴ Os tubos de sílica com o diâmetro interno de 100 e 250 μm foram preenchidos com uma solução de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} . As extremidades do tubo foram então fechadas utilizando septos de borracha e colocados em um forno a 60 °C por 6 horas. Posteriormente, lavou-se o tubo com água deionizada e acetonitrila, por 30 minutos com cada um, a 0,1 mL min^{-1} . Para finalizar o preparo, o tubo foi seco com nitrogênio por 30 minutos para garantir que não houvesse resíduos de água e acetonitrila, já que a presença de água evita a reação do reagente de silanização 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato (γ -MAPS) com os grupos silanóis presentes na superfície da sílica.

Após o pré-tratamento do tubo de sílica iniciou o processo de silanização. Para a silanização preparou-se uma solução composta por 40 μL de γ -MAPS em 10 mL de ácido acético 6 mol L^{-1} , a qual foi sonicada por 5 minutos. O tubo de sílica foi então fechado com septos de borracha e colocados em um forno a 60 °C por 20 horas. Após esse período o tubo de sílica foi lavado com água deionizada e acetonitrila por 30 minutos cada um a 0,1 mL min^{-1} e posteriormente seco com nitrogênio por uma hora. Assim, a parede interna do tubo está pronta para aderir a fase de interesse.

9.3.3 Preparação das colunas

9.3.3.1 Preparação das colunas PS-DVB-OT

Capilares de sílica fundida com diâmetro interno de 100 e 250 μm e comprimento de 40 cm, previamente tratados, foram utilizados seguindo a metodologia descrita por Yue et al.³ com algumas modificações para preparar colunas de poliestireno divinilbenzeno. Uma solução de polimerização foi preparada colocando 5 mg de AIBN, 200 μL de estireno, 200 μL de divinilbenzeno e 600 μL de etanol. Após misturar todos os reagentes a solução foi levada para o ultrassom por 5 min e então os capilares foram totalmente preenchidos com essa solução verificando que não houve formação de bolhas no interior dos capilares. As extremidade dos capilares foram fechadas com septo e em seguida as colunas foram levadas para um banho de água a 65 °C, variando-se o tempo de polimerização. Posteriormente a coluna foi lavada com acetonitrila por 30 minutos e seca com nitrogênio por 1 hora.

9.3.3.2 Preparação das colunas ODS-OT

Capilares de sílica fundida com diâmetro interno de 100 e 250 μm e comprimento de 40 cm foram também utilizados para preparar colunas com a fase octadecilsilano seguindo a metodologia descrita por Vehus et al.¹³ PEG foi dissolvido em 0,01M de ácido acético em uma concentração final de $9 \pm 1\%$ (*m/m*) com agitação constante em uma temperatura de 4 °C por pelo menos 30 minutos. Posteriormente, a solução foi então filtrada em membrana de 0.45 μm . Adicionou-se a essa solução o TMOS com concentração final de $17 \pm 1\%$ (*m/m*). A mistura foi sonicada e misturada em vortex antes de preencher os tubos. Posteriormente, percolou-se pelo capilar de sílica fundida a solução, fechando as extremidades com septos. Os capilares foram então aquecidos em forno por 48 horas a 40 °C. Após as 48 horas a temperatura foi aumentada para 200 °C por 24 horas. Após esfriar a temperatura ambiente o capilar foi lavado com etanol por 2 horas e seco com nitrogênio por uma hora.

A funcionalização dos capilares foi feita passando a solução clorodimetiloctadecilsilano/p-xileno 50/50 (*m/m*) pelo capilar durante 1 hora. Posteriormente, as extremidades foram fechadas

com septo e o capilar foi aquecido *overnight* a 110 °C. Após esfriar em temperatura ambiente os capilares foram lavados com THF, MeOH, MeOH/água 50/50 (v/v) e MeOH em sequência (cada etapa foi mantida por 15 minutos). Finalmente, a coluna foi seca com nitrogênio por uma hora.

9.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

Após o preparo das colunas realizou-se a caracterização delas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Utilizou-se um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, Inglaterra) com detector OXFORD (modelo 7060), operado com feixe de elétrons de 20 kV. As amostras foram recobertas com uma fina camada (6 nm) de ouro já que não apresentam condutividade elétrica e mantidas em um dessecador até o momento da análise.

9.4 Resultados e discussão

9.4.1 Morfologia e avaliação das colunas PS-DVB-OT

As colunas PS-DVB foram avaliadas de acordo com o procedimento descrito acima. Manteve-se o comprimento das colunas e variou-se o diâmetro interno delas e o tempo de polimerização no banho. Os tempos avaliados foram 0,5; 1 e 2 horas. A Figura 9.2 apresenta somente o tubo de sílica pré-tratado e sem fase enquanto que as Figuras 9.3 e 9.4 apresentam as imagens obtidas pelo MEV de colunas de 250 µm e 100 µm, respectivamente, onde variou-se os tempos de polimerização (0,5; 1 e 2 horas).

Foi possível perceber para os tubos de 250 µm que, comparando-se a imagem do tubo sem fase com os tubos com fase, houve formação de uma espessa camada de fase aderida a superfície interna do capilar de sílica. A Figura 9.3 mostra que os tempos de polimerização avaliados em banho de água apresentaram diferenças significativas na formação da camada porosa para as colunas preparadas. Para todos os tempos de polimerização houve formação de fase na parede do tubo, porém para duas horas de polimerização (C) a parede ficou mais espessa quando comparada com os outros tempos.

Figura 9.2: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do capilar de sílica fundida de 250 μm pré-tratado, sem estar revestido internamente com o sorvente de interesse.

Figura 9.3: Capilares de sílica fundida de 250 μm pré-tratados e com fase polimerizada em diferentes tempos: (A) 0,5; (B) 1,0 e (C) 2,0 horas de polimerização em banho de água.

A Figura 9.4 mostra que para os tubos de 100 μm , devido ao diâmetro interno ser menor, foi mais difícil visualizar a formação de fase. Porém, foi observado o mesmo comportamento nos tubos de 250 μm : o tempo de duas horas apresentou uma fase mais espessa e porosa que os outros tubos. É possível ver com nitidez, na ampliação da imagem (C1) do tubo polymerizado por duas horas, as partículas do polímero formado, o que não foi possível visualizar para os outros tempos testados (A1 e B1).

Tanto as colunas de 100 μm quanto as de 250 μm apresentaram melhores resultados para o tempo de polymerização no banho de duas horas. Tempos maiores foram testados, porém não apresentaram resultados satisfatórios, já que houve formação de muita fase no interior do capilar deixando o tubo praticamente todo preenchido, similar as colunas monolíticas. Outro fator avaliado para as colunas PS-DVB foi realizar os mesmos testes de tempo, porém deixando elas polymerizarem em forno ao invés de em banho de água. Os resultados mostraram que com a polymerização em forno a maioria das colunas ficaram totalmente preenchidas.

Figura 9.4: Capilares de sílica fundida de 100 μm pré-tratados e com fase polymerizada em diferentes tempos: (A) 0,5; (B) 1,0 e (C) 2,0 horas de polymerização em banho de água. As imagens A1, B1 e C1 são as ampliações para cada tubo.

9.4.2 Morfologia e avaliação das colunas ODS-OT

As colunas ODS foram avaliadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Para essas colunas, a polimerização foi realizada utilizando fornos já que a maioria dos trabalhos descritos na literatura utilizam esse procedimento. Foi mantido o comprimento das colunas variando-se somente o diâmetro interno. As Figuras 9.5 e 9.6 apresentam as imagens obtidas pelo MEV de colunas de 250 μm e 100 μm , respectivamente, utilizando como fase ODS e mostrando as diferentes morfologias das colunas preparadas.

Para a coluna ODS-OT de 250 μm foi possível perceber que essa metodologia utilizada não foi satisfatória, já que não conseguiu fixar a fase de interesse na parede do capilar de sílica fundida. Já para a coluna de 100 μm a mesma fase apresentou melhores resultados ficando praticamente totalmente fixada no interior do capilar. A Figura 9.6 apresenta uma ampliação da fase ODS no interior da coluna onde foi possível perceber que a fase está fixada no interior do capilar e apresenta algumas ondulações em sua superfície.

Todas as colunas preparadas nesse capítulo foram lavadas conforme os procedimentos anteriormente descritos, apresentando baixas pressões. Ainda não foi realizada uma avaliação dessas colunas tubulares abertas no preparo de amostras, esse capítulo consistiu somente em verificar a formação da fase extratora nas paredes do tubo do capilar de sílica.

Figura 9.5: Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da coluna ODS-OT utilizando capilar de sílica fundida de 250 μm pré-tratado.

Figura 9.6: Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das colunas ODS-OT utilizando capilar de sílica fundida de 100 μm pré-tratado sem (A) e com (B) ampliação da fase.

9.5 Conclusão

As colunas tubulares abertas desenvolvidas nesse trabalho apresentaram, no geral, melhores resultados empregando-se a fase PS-DVB para ambos diâmetros internos avaliados: 250 μm e 100 μm . Ajustes ainda deverão ser feitos para melhor fixar a fase ODS nas paredes das colunas de 250 μm .

Essas colunas ainda irão ser avaliadas como colunas extratoras para o preparo de amostras visando a pré-concentração *on-line* de moléculas pequenas, como parte de um sistema analítico totalmente automatizado. Serão desenvolvidas também outros tipos de fases extratoras para aumentar a eficiência e seletividade de extração para moléculas pequenas. Com um melhor desenvolvimento e conhecimento desta tecnologia, pretende-se posteriormente utilizar as colunas PLOT preparadas como colunas analíticas em sistemas de cromatografia líquida miniaturizados (capilar e nano-LC).

Referências bibliográficas

- 1 GOLAY, M. J. E. Vapor phase chromatography and telegrapher's equation. **Analytical Chemistry**, v. 29, p. 928-932, 1957.
- 2 LEAL, V. L.; SILVA, M. R.; LANÇAS, F. M. Avanços recentes na miniaturização de colunas para cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 9, p. 117-133, 2017.
- 3 YUE, G.; LUO, Q.; ZHANG, J.; WU, S.L.; KARGER, B. L. Ultratrace LC/MS proteomic analysis using 10- μ m-i.d. porous layer open tubular poly(styrene-divinylbenzene) capillary columns. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 938-946, 2007.
- 4 ROGEBERG, M.; VEHUS, T.; GRUTLE, L.; GREIBROKK, T.; WILSON, S. R.; LUNDANES, E. Separation optimization of long porous-layer open-tubular columns for nano-LC-MS of limited proteomic samples. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 2838-2847, 2013.
- 5 LUO, Q.; GU, Y.; WU, S. L.; REJTAR, T.; KARGER, B. L. Two dimensional SCX/PLOT/MS for ultratrace proteomic analysis using a 10 μ m i.d. poly(styrene-divinylbenzene) porous layer open tubular column with an on-line triphasic trapping column. **Electrophoresis**, v. 29, p. 1604-1611, 2008.
- 6 KAZARIAN, A. A.; RODRIGUEZ, E. S.; DEVERELL, J. A.; MCCORD, J.; MUDDIMAN, D. C.; PAULL, B. Wall modified photonic crystal fibre capillaries as porous layer open tubular columns for in-capillary micro-extraction and capillary chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 905, p. 1-7, 2016.
- 7 ROGEBERG, M.; WILSON, S. R.; GREIBROKK, T.; LUNDANES, E. Separation of intact proteins on porous layer open tubular (PLOT) columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2782-2786, 2010.
- 8 ISHII, D.; TSUDA, T.; TAKEUCHI, T. Studies of open-tubular micro-capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 185, p. 73-78, 1979.

9 COLLINS, D. A.; NESTERENKO, E. P.; PAULL, B. Porous layer open tubular columns in capillary liquid chromatography. **Analyst**, v. 139, p. 1292-1302, 2014.

10 WILSON, S. R.; VEHUS, T.; BERG, H. S.; LUNDANES, E. Nano-LC in proteomics: recent advances and approaches. **Bioanalysis**, v. 7, p. 1799-1815, 2015.

11 ROGEBERG, M.; MALEROD, H.; ROBERG-LARSEN, H.; AASS, C.; WILSON, S. R. On-line solid phase extraction–liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 120-129, 2015.

12 HUSTOFT, H. K.; VEHUS, T.; BRANDTZAEG, O. K.; KRAUSS, S.; GREIBROKK, T.; WILSON, S. R. Open tubular lab-on-column/mass spectrometry for targeted proteomics of nanogram sample amounts. **PLoS One**, v. 9, p. 1-10, 2014.

13 VEHUS, T.; ROBERG-LARSEN, H.; WAALER, J.; ASLAKSEN, S.; KRAUSS, S.; WILSON, S. R. Versatile, sensitive liquid chromatography mass spectrometry – Implementation of 10 μm OT columns suitable for small molecules, peptides and proteins. **Nature**, v. 6, p. 1-10, 2016.

14 LUO, Q.; YUE, G.; VALASKOVIC, G. A.; GU, Y.; WU, S.; KARGER, B. L. On-line 1D and 2D porous layer open tubular/LC-ESI-MS using 10 μm i.d. poly(styrene-divinylbenzene) columns for ultrasensitive proteomic analysis. **Analytical Chimica Acta**, v. 79, p. 6174-6181, 2007.

15 COUFAL, P.; CIHAK, M.; SUCHANKOVA, J.; TESAROVA, E.; BOSAKOVA, Z.; STULIK, K. Methacrylate monolithic columns of 320 mm I.D. for capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 946, p. 99-106, 2002

CAPÍTULO 10

Conclusão geral e perspectivas futuras

10.1 Conclusão geral

O desenvolvimento de novos materiais sorventes proporcionou maior eficiência para extrair os analitos de interesse com resultados adequados quando aplicados para extração no sistema *in-tube* SPME. Os polímeros impressos molecularmente foram os materiais que se mostraram mais seletivos para extração dos analitos estudados nesta tese. Para as triazinas, o material óxido de grafeno apresentou também resultados satisfatórios, permitindo a obtenção de figuras de mérito apropriadas.

A utilização da microtécnica de extração *in-tube* SPME como preparo de amostra automatizado acoplada *on-line* com UPLC-MS/MS apresentou resultados satisfatórios para extração de todos os analitos de interesse em diferentes matrizes complexas. Além disso, a mesma apresentou várias vantagens sobre métodos *off-lines* e métodos mais clássicos (LLE e SPE) como simplicidade, baixo custo, rapidez nas análises com métodos confiáveis, quantidades de amostra e solvente reduzidas, reutilização de aproximadamente 300 vezes da coluna de extração, entre outras.

Os métodos otimizados e validados com o sistema *in-tube* SPME LC-MS/MS apresentaram diversas vantagens como: baixo volume da amostra (50 µL), tempos de corridas extremamente reduzido incluindo ainda o preparo da amostra *on-line* e um dos métodos foi possível analisar 6 amostras por hora, quantidade de análise extremamente significativa

Os resultados preliminares referentes ao desenvolvimento de colunas tubulares abertas do tipo PLOT demonstraram um grande potencial para os dois tipos de fase que foram preparadas e avaliadas. Essas colunas apresentaram uma espessura considerável do material poroso, o qual provavelmente irá permitir uma maior interação do analito de interesse com a fase e, conseqüentemente, maior capacidade de extração e sensibilidade analítica quando forem testadas como colunas extratoras.

10.2 Perspectivas futuras

A microtécnica de extração *in-tube* SPME acoplada *on-line* com UPLC-MS/MS para extração e pré-concentração dos analitos de interesse em amostras complexas apresentou resultados promissores e poderá ser testada com outros tipos de materiais (isolados e combinados) para

diferentes analitos. Este avanço possibilitará o desenvolvimento de novas metodologias com elevada sensibilidade e seletividade para microtécnicas de extração acopladas com sistemas automatizados.

As colunas tubulares abertas desenvolvidas neste trabalho ainda deverão ser avaliadas para extração de diferentes classes de compostos em sistemas com preparo de amostras automatizados, tanto na escala convencional quanto na miniaturizada. Outros tipos de fases extratoras serão preparadas ainda no interior dos tubos de sílica fundida utilizando diferentes reagentes e materiais, a fim de aumentar a seletividade do método.