

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS



Ciências
ULisboa

**Metodologias inovadoras baseadas em microextração estática
para análise vestigial de contaminantes emergentes em
matrizes reais**

“ Documento Definitivo ”

Doutoramento em Química
Especialidade de Química Analítica

Alessandra Honjo Ide

Tese orientada por:
Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira

Documento especialmente elaborado para a obtenção do grau de doutor

2018

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS



Ciências
ULisboa

**Metodologias inovadoras baseadas em microextração estática
para análise vestigial de contaminantes emergentes em
matrizes reais**

Doutoramento em Química
Especialidade de Química Analítica

Alessandra Honjo Ide

Tese orientada por:
Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira

Júri:

Presidente:

- Doutora Amélia Pilar Grases dos Santos Silva Rauter, Professora Catedrática e Presidente do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Vogais:

- Doutor José António Maia Rodrigues, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto;
- Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva, Professor Auxiliar com Agregação da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa;
- Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro;
- Doutor José Sousa Câmara, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências Exatas e de Engenharia da Universidade da Madeira;
- Doutora Maria do Rosário Beja Gonzaga Bronze, Professora Associada da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa;
- Doutor José Manuel Florêncio Nogueira, Professor Associado com Agregação da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (orientador).

Documento especialmente elaborado para a obtenção do grau de doutor

Aos meus pais

Prefácio

A introdução de substâncias químicas antropogênicas no meio ambiente, ao nível global, tem-se tornado uma questão de extrema importância, uma vez a presença desses compostos, mesmo a nível dos traços, na água, no solo ou no ar, poder resultar em problemas que afetam tanto a saúde humana quanto a ambiental.

Face à necessidade de monitorização vestigial de diversos compostos emergentes em matrizes com elevada complexidade, novas metodologias analíticas requerem técnicas de enriquecimento de amostras apropriadas para serem combinadas com sistemas cromatográficos e hifenados. Neste sentido, as abordagens modernas devem contemplar a simplificação dos protocolos analíticos, incluindo o desenvolvimento de métodos com sensibilidade, seletividade e eficiência satisfatórias e com boa relação custo-benefício, que sejam amigas do usuário e do ambiente e, ainda, dedicadas ao trabalho em rotina.

A presente dissertação, intitulada “Metodologias Inovadoras Baseadas em Microextração Estática para Análise Vestigial de Contaminantes Emergentes em Matrizes Reais”, propõe o desenvolvimento de metodologias analíticas inovadoras e alternativas para a identificação e quantificação vestigial de diversas classes de compostos orgânicos em diferentes matrizes reais em áreas com reconhecida importância na sociedade. Neste sentido, recorreu-se à ‘microextração adsorptiva em barra’ (BA μ E), uma técnica muito versátil no enriquecimento de amostras para monitorização de substâncias ao nível dos traços. Nesta abordagem, utiliza-se um dispositivo analítico que pode ser revestido com a fase sorvente mais adequada para cada análise em particular e que opera sob a tecnologia de amostragem por flutuação. Neste contexto, são propostas novas aplicações utilizando esta técnica, assim como o desenvolvimento de uma nova geração de dispositivos BA μ E, que permitiu a introdução de um ciclo analítico inovador, com a eliminação de diversos passos de manipulação da amostra. Por outro lado, uma nova técnica de preparação de amostras é igualmente proposta, ‘microextração em fibra oca’ (HF μ E), sendo uma abordagem híbrida para a microextração de analitos mais apolares, utilizando quantidades negligenciáveis de solvente orgânico imobilizado numa

membrana porosa. Assim, todas as metodologias desenvolvidas caracterizam-se por serem amigas do usuário e do ambiente, além de apresentarem elevada simplicidade e excelente relação custo-benefício para utilização em rotina.

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foram realizadas diversas publicações em revistas internacionais da especialidade com arbitragem científica, assim como comunicações em painel e orais em encontros científicos nacionais e internacionais, como de seguida se refere:

a) Artigos em revistas internacionais da especialidade com arbitragem científica:

- **A.H. Ide**, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Enhancement for trace analysis of sulfonamide antibiotics in water matrices using bar adsorptive microextraction (BA μ E)*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 129 (2016) 593-599.
- F.N. Andrade, **A.H. Ide**, N.R. Neng, F.M. Lanças, J.M.F. Nogueira, *Determination of trace levels of triazines in corn matrices by bar adsorptive microextraction with a molecularly imprinted polymer*, Journal of Separation Science, 39 (2016) 756-761.
- S.M. Ahmad, **A.H. Ide**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Application of bar adsorptive microextraction to determine trace organic micro-pollutants in environmental water matrices*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 97:5 (2017) 484-498.
- **A.H. Ide**, J.M.F. Nogueira, *New-generation bar adsorptive microextraction (BA μ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach - Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 153 (2018) 126-134.
- **A.H. Ide**, J.M.F. Nogueira, *Hollow fiber microextraction (HF μ E) - A new hybrid microextraction technique for trace analysis*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410 (2018) 2911-2920.
- **A.H. Ide**, J.M.F. Nogueira, *Determination of hydrophilic UV filters in real matrices using new generation bar adsorptive microextraction devices*, submetido.

- **A.H. Ide**, J.M.F. Nogueira, *Dual-Hollow fiber microextraction - Application for trace analysis of organochlorine pesticides in real matrices*, submetido.

b) Comunicações orais em encontros científicos:

- XVI Congresso Latino-Americano de Cromatografia e 9º Encontro Nacional de Cromatografia, 5-9 Janeiro 2016, Lisboa, Portugal:
 - **A.H. Ide**, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction (BA μ E) for the determination of sulfonamides in water matrices*.
- Chem&Biochem Postgraduate Students Meeting, 9 Fevereiro 2017, Lisboa, Portugal:
 - **A.H. Ide**, J.M.F. Nogueira. *Novel bar adsorptive microextraction devices for the analysis of antidepressant agents in water matrices*.
- 10º Encontro Nacional de Cromatografia, 4-6 Dezembro 2017, Bragança, Portugal:
 - **A.H. Ide**, J.M.F. Nogueira. *Hollow fiber microextraction (HF μ E) - A new hybrid microextraction technique for trace analysis*.

c) Comunicações em painel em encontros científicos:

- XVI Congresso Latino-Americano de Cromatografia e 9º Encontro Nacional de Cromatografia (XVI COLACRO & 9ENC), 5-9 Janeiro 2016, Lisboa, Portugal:
 - **A.H. Ide**, A.M. Segurado, A.M. Fernandes, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Novel technologies for sample preparation using the green analytical chemistry principles*.
 - F.N. Andrade, **A.H. Ide**, N.R. Neng, F.M. Lanças, J.M.F. Nogueira, *Determination of triazines in corn matrices by bar adsorptive microextraction with a molecularly imprinted polymer*.

- F.N. Andrade, **A.H. Ide**, N.R. Neng, F.M. Lanças, J.M.F. Nogueira, *Molecularly imprinted polymer sorbent for analysis of sulphonylureas by BA μ E-HPLC-DAD.*
- 40th International Symposium on Capillary Chromatography (40th ISCC), 29 Maio-3 Junho 2016, Riva del Garda, Itália:
 - **A.H. Ide**, J.M.F. Nogueira, *New Generation BA μ E Devices for Microextraction Analysis.*
 - N.R. Neng, A.M. Segurado, A.M. Fernandes, **A.H. Ide**, S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction (BA μ E): an outstanding analytical tool for trace analysis.*
- 8º Encontro da Divisão de Química Analítica (Analítica 2016), 6-7 Junho 2016, Lisboa, Portugal:
 - **A.H. Ide**, A.M. Segurado, A.M. Fernandes, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction (BA μ E) - A simple, robust and effective sample preparation technique.*
- XVI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques (XVI SECyTA), 2-4 Novembro 2016, Sevilha, Espanha:
 - **A.H. Ide**, J.M.F. Nogueira, *Determination of antidepressant compounds in real matrices by new generation BA μ E devices.*
 - N.R. Neng, **A.H. Ide**, J.M.F. Nogueira, *New generation BA μ E devices for the determination of triazinic herbicides and metabolites in environmental water matrices.*
- HPLC 2017, 18-22 Junho 2017, Praga, República Checa:
 - **A.H. Ide**, J.M.F. Nogueira, *New improvements in bar adsorptive microextraction devices for the analysis of emerging compounds in real matrices.*

- 19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (Extech 2017), 27-30 Junho 2017, Santiago de Compostela, Espanha:
 - **A.H. Ide**, J.M.F. Nogueira, *Hollow fiber microextraction (HF μ E) - A new enrichment approach for ultra-trace analysis of priority compounds in real matrices.*

- 9º Encontro da Divisão de Química Analítica (Analítica 2018), 26-27 Março 2018, Porto, Portugal:
 - **A.H. Ide**, J.M.F. Nogueira, *Hollow fiber microextraction (HF μ E) for ultra-trace analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in real matrices (poster pitch).*

Agradecimentos

A todas as pessoas e instituições que contribuíram para a realização desta dissertação, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de doutoramento (BEX 0394-14-9) e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo financiamento e ao Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa pelo acolhimento.

Ao meu orientador, Professor José Manuel Florêncio Nogueira, pela oportunidade de trabalhar e aprender no seu grupo de investigação.

À Professora Maria do Rosário Bronze, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pelo uso do equipamento LC-MS/MS.

Ao Professor Leonel Gordo, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pelas amostras de fígado de peixe.

À Clínica Joaquim Chaves Saúde pelas amostras de plasma e urina e à Estação de Tratamento de Águas Residuais de Alcântara pelas amostras de efluentes.

Aos meus colegas de laboratório Nuno Neng e Samir Ahmad pelo auxílio e amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar.

A minha família e amigos pelo apoio incondicional.

Resumo

A determinação vestigial de compostos orgânicos em matrizes com elevada complexidade requer o uso de métodos analíticos adequados para a preparação da amostra prévia à análise instrumental. Neste sentido, a presente dissertação propõe metodologias inovadoras baseadas em microextração estática para a monitorização vestigial de compostos emergentes em matrizes reais.

A microextração adsortiva em barra (BA μ E), uma técnica estática que opera sob a tecnologia de amostragem por flutuação, foi aplicada para determinação vestigial de antibióticos, antidepressivos e filtros UV, em amostras aquosas ambientais, fluidos biológicos e cremes de proteção solar. Durante a implementação experimental foram introduzidos avanços de modo a simplificar ainda mais esta abordagem do ponto de vista prático. Neste sentido, uma nova geração de dispositivos BA μ E foi desenvolvida, possibilitando a implementação de um ciclo analítico inovador, abrangendo uma etapa de microextração efetiva seguida da etapa de retroextração, realizada num único passo, podendo ser facilmente combinada com os amostradores automáticos convencionais dos sistemas cromatográficos e hifenados.

Uma nova técnica para enriquecimento de amostras foi ainda proposta, a microextração em fibra oca (HF μ E), uma abordagem híbrida baseada em líquidos para a microextração de compostos apolares. A capacidade analítica da HF μ E foi demonstrada com recurso à análise vestigial de 18 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e 17 pesticidas organoclorados em diversos tipos de matrizes quer da área ambiental, quer alimentar.

Os resultados obtidos demonstraram que as metodologias propostas alcançaram excelente desempenho analítico, elevada eficiência, seletividade e sensibilidade ao nível dos traços, tendo revelado serem efetivas para monitorização de compostos emergentes, comparativamente com outras técnicas de microextração estática bem estabelecidas.

Em resumo, o presente trabalho propõe o desenvolvimento e a aplicação em rotina de metodologias analíticas alternativas com elevada simplicidade, custo-benefício, amigas do utilizador e do ambiente, para a análise vestigial de compostos emergentes em matrizes complexas com diversa origem.

Palavras-chave

Técnicas inovadoras de microextração estática

Microextração adsortiva em barra (BA μ E)

Microextração em fibra oca (HF μ E)

Poluentes emergentes

Matrizes reais

Abstract

The trace determination of organic compounds in complex matrices requires the use of appropriate analytical methods for sample preparation prior to instrumental analysis. Therefore, the present thesis proposes innovative methodologies based on static microextraction approaches for trace analysis of emerging compounds in real matrices.

Bar adsorptive microextraction (BA μ E), a static technique that operates under the floating sampling technology, was applied for trace determination of antibiotics, antidepressant compounds and UV filters in environmental aqueous samples, biological fluids and sunscreens. During the experimental implementation, some advances were introduced to make this approach still more user-friendly. Therefore, BA μ E devices of new generation were developed, for the implementation of an innovative analytical cycle, including an effective microextraction stage followed by the back-extraction stage performed in an “only single step”, allowing the combination with the autosamplers of chromatographic and hyphenated systems.

A novel technique for sample enrichment is also proposed, hollow fiber microextraction (HF μ E), a liquid-based hybrid approach for the microextraction of non-polar compounds. The analytical performance of HF μ E was demonstrated through the trace analysis of 18 polycyclic aromatic hydrocarbons and 17 organochlorine pesticides in several real matrices in environmental and food areas.

The results obtained proved that the proposed methodologies reached remarkable analytical performance, good recovery yields, selectivity and sensitivity at the trace levels, being effective for monitoring emerging compounds when compared with other well-established static microextraction techniques.

In short, the present work proposes the development and application in routine of alternative analytical methodologies with high simplicity, cost-effectiveness, user and eco-friendly for trace analysis of emerging compounds in complex matrices from diverse sources.

Keywords

Innovative static microextraction techniques

Bar adsorptive microextraction (BA μ E)

Hollow fiber microextraction (HF μ E)

Emerging pollutants

Real matrices

Abreviaturas, acrónimos e símbolos

AC	Carvão ativado
Ace	Acetona
ACN	Acetonitrilo
AMI	Amitriptilina
BA μ E	Microextração adsortiva em barra
BUP	Bupropiona
BZ4	Ácido 5-benzoil-4-hidroxi-2-metoxi-benzenossulfónico
C18	Octadecil
CE	Eletroforese capilar
CIT	Citalopram
Clor	Clorofórmio
DAD	Detetor por rede de díodos
DCM	Diclorometano
DI	Imersão direta
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
dSPE	Extração em fase sólida dispersiva
EtOAc	Acetato de etilo
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
EI	Ionização eletrónica
GAC	Química analítica verde
GC	Cromatografia em fase gasosa
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa
GLC	Cromatografia gás-líquido
GSC	Cromatografia gás-sólido
HF	Fibra oca
HF-LPME	Microextração em fase líquida suportada com membrana oca
HF μ E	Microextração em fibra oca
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HS	Espaço de cabeça
IEC	Cromatografia de troca iónica
LC	Cromatografia líquida

LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
μ LD	Microdessorção líquida
LD	Dessorção líquida
LLC	Cromatografia líquido-líquido
LLE	Extração líquido-líquido
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LPME	Microextração em fase líquida
LSC	Cromatografia líquido-sólido
LVI	Injeção de grandes volumes
MeOH	Metanol
MNP	Nanopartícula magnética
MRM	Monitorização de reações múltiplas
MS	Espectrometria de massa
MSA μ E	Microextração adsortiva em multi-esferas
MSPE	Extração em fase sólida magnética
MTBE	Tert-butil-metileter
<i>n</i> -C6	<i>n</i> -hexano
<i>n</i> -C7	<i>n</i> -heptano
<i>n</i> -C8	<i>n</i> -octano
<i>n</i> -C9	<i>n</i> -nonano
OCP	Pesticida organoclorado
P	Polímero
PAH	Hidrocarboneto aromático policíclico
PBS	Ácido 2-fenil-5-benzimidazolesulfónico
PC	Cromatografia em papel
PDMS	Polidimetilsiloxano
PP	Polipropileno
PPCPs	Produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal
PS	Poliestireno
PS-DVB	Poliestireno-divinilbenzeno
PTV	Vaporização com temperatura controlada
RSD	Desvio padrão relativo

SAM	Método da adição de padrão
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação
SDM	Sulfadimetoxina
SDME	Microextração em gota única
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
SIM	Monitorização de iões selecionados
SLM	Membrana líquida suportada
SME	Microextração com solvente
SMX	Sulfametoxazole
S/N	Razão sinal/ruído
STZ	Sulfatiazole
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
SX	Strata-x
TD	Dessorção térmica
TLC	Cromatografia em camada fina
TMP	Trimetoprima
Tol	Tolueno
TRA	Trazodona
UV	Ultravioleta
UVA	Raios ultravioleta do tipo A
UVB	Raios ultravioleta do tipo B
UVC	Raios ultravioleta do tipo C
Vis	Visível
α	Seletividade
λ_{\max}	Comprimento de onda de máxima absorção
c	Concentração
c_s	Concentração relativa de um componente na fase estacionária
c_M	Concentração relativa de um componente na fase móvel

CPDMS	Concentração do analito na fase de PDMS
CW	Concentração do analito na fase aquosa
H	Altura do prato teórico
K	Coefficiente de distribuição
K_{fs}	Coefficiente de partição do analito
$K_{O/W}$	Coefficiente de distribuição octanol-água
$K_{PDMS/W}$	Coefficiente de distribuição PDMS-água
k'	Fator de capacidade
m_{PDMS}	Massa do analito na fase de PDMS
m_W	Massa do analito na fase aquosa
N	Número de pratos teóricos
pH	Escala logarítmica decimal da concentração em hidrogeniões
pH_{pzc}	pH do ponto de carga zero
pK_a	Simétrico do logaritmo decimal da constante de acidez
r^2	Coefficiente de determinação
R_s	Resolução
t_M	Tempo morto
t_R	Tempo de retenção
t_R'	Tempo de retenção ajustado
V	Volume
V_{PDMS}	Volume em PDMS
V_W	Volume de amostra aquosa
W	Largura do pico

%	Porcentagem
\approx	Aproximadamente
<	Inferior
°C	Graus Celsius
μA	Microampere
μg	Micrograma
μL	Microlitro

µm	Micrómetro
cm	Centímetro
Da	Dalton
eV	Eletrão-volt
g	Grama
h	Hora
L	Litro
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
M	Molar
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mUA	Miliunidade de absorvância
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
psi	Unidade de pressão
m:v	Massa por volume
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
v:v	Volume por volume

Índice geral

Prefácio	v
Agradecimentos	xi
Resumo	xviii
Palavras-chave	xiv
Abstract.....	xv
Keywords	xvi
Abreviaturas, acrónimos e símbolos	xvii
Índice geral	xxiii
Índice de figuras.....	xxix
Índice de tabelas	xxxv

Capítulo 1. Introdução..... 1

1.1 Considerações gerais.....	3
1.2 O papel da química analítica.....	5
1.3 Técnicas de preparação de amostras	7
1.3.1 Técnicas de microextração baseadas em sólidos.....	8
1.3.1.1 Microextração em fase sólida (SPME)	8
1.3.1.2 Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)	10
1.3.1.3 Microextração adsortiva em barra (BA μ E).....	14
1.3.1.3.1 Considerações gerais	14
1.3.1.3.2 Otimização da técnica BA μ E	17
1.3.1.3.3 Validação e aplicação da BA μ E	18
1.3.1.4 Extração em fase sólida dispersiva (dSPE).....	19
1.3.2 Técnicas de microextração baseadas em líquidos.....	21
1.3.2.1 Extração sortiva em gota única (SDME).....	22
1.3.2.2 Microextração em fase líquida suportada com membrana oca (HF-LPME)	24
1.3.2.3 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	26
1.3.3 Principais vantagens e limitações das técnicas modernas de preparação de amostras	28
1.4 Referências.....	29

Capítulo 2. Objetivos da tese..... 35

Capítulo 3. Parte experimental	39
3.1 Padrões analíticos	41
3.2 Reagentes químicos	41
3.3 Material corrente e equipamento de laboratório.....	42
3.4 Fases sorventes	43
3.5 Fibras ocas.....	44
3.6 Amostras	44
3.7 Procedimento experimental	44
3.7.1 Preparações das soluções de trabalho.....	44
3.7.2 Condições de operação instrumental.....	45
3.7.2.1 HPLC e LC-MS/MS	45
3.7.2.2 GC-MS	46
3.7.3 Preparação dos dispositivos analíticos para microextração	49
3.7.3.1 BA μ E	49
3.7.3.2 HF μ E	49
3.7.4 Procedimento para a etapa de microextração	49
3.7.5 Procedimentos para a etapa de retroextração.....	50
3.7.6 Validação das metodologias analíticas	50
3.7.7 Aplicação a matrizes reais	51
3.8 Referências.....	51

Capítulo 4. Determinação de antibióticos (sulfonamidas e trimetoprim) em matrizes ambientais aquosas por BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD 53

4.1 Considerações gerais	55
4.2 Resultados e discussão	57
4.2.1 Otimização instrumental.....	57
4.2.2 Otimização do método analítico.....	58
4.2.2.1 Seleção da fase sorvente	58
4.2.2.2 Etapa de retroextração	59
4.2.2.3 Etapa de microextração.....	61
4.2.3 Validação do método analítico	65
4.2.4 Comparação com outras técnicas de microextração	66
4.2.5 Aplicação a matrizes reais	67
4.3 Conclusões.....	68
4.4 Referências	69

Capítulo 5. Nova geração de dispositivos BA μ E - Aplicação para análise vestigial de fármacos antidepressivos em fluidos biológicos..... 73

5.1 Considerações gerais	75
5.2 Resultados e discussão	77
5.2.1 Otimização instrumental.....	77
5.2.2 Implementação de um novo ciclo analítico	78
5.2.3 Otimização do método analítico.....	80
5.2.3.1 Seleção da fase sorvente	80
5.2.3.2 Etapa de retroextração	82
5.2.3.3 Etapa de microextração.....	84
5.2.4 Validação do método analítico.....	87
5.2.5 Aplicação a matrizes reais	89
5.3 Conclusões	90
5.4 Referências	91

Capítulo 6. Determinação de filtros UV hidrofílicos em amostras ambientais aquosas e cremes de proteção solar por BA μ E(PS-DVB)/HPLC-DAD 93

6.1 Considerações gerais	95
6.2 Resultados e discussão	97
6.2.1 Otimização instrumental.....	97
6.2.2 Otimização do método analítico.....	98
6.2.2.1 Seleção da fase sorvente	98
6.2.2.2 Etapa de retroextração	99
6.2.2.3 Etapa de microextração.....	100
6.2.3 Validação do método analítico.....	103
6.2.4 Aplicação a matrizes reais	105
6.3 Conclusões	107
6.4 Referências	107

Capítulo 7. Microextração em fibra oca (HF μ E) - Aplicação para análise vestigial de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em matrizes reais 109

7.1 Considerações gerais	111
7.2 Resultados e discussão	114
7.2.1 Otimização instrumental.....	114
7.2.2 Implementação de um novo ciclo analítico	115

7.2.3 Otimização do método analítico	117
7.2.3.1 Seleção do sorvente orgânico	117
7.2.3.2 Etapa de retroextração	118
7.2.3.3 Etapa de microextração	119
7.2.4 Validação do método analítico	124
7.2.5 Comparação com outras técnicas de microextração	126
7.2.6 Aplicação a matrizes reais	128
7.3 Conclusões.....	128
7.4 Referências.....	130

Capítulo 8. Microextração em fibra oca dupla - Aplicação para determinação vestigial de pesticidas organoclorados em matrizes reais **131**

8.1 Considerações gerais	133
8.2 Resultados e discussão	135
8.2.1 Otimização instrumental.....	135
8.2.2 Otimização do método analítico.....	136
8.2.2.1 Seleção do solvente orgânico.....	136
8.2.2.2 Etapa de retroextração	137
8.2.2.3 Etapa de microextração.....	138
8.2.3 Modificações na HF μ E	142
8.2.4 Validação do método analítico	142
8.2.5 Aplicação a matrizes reais	103
8.3 Conclusões.....	147
8.4 Referências.....	148

Capítulo 9. Conclusões finais e perspectivas futuras..... **151**

9.1 Conclusões finais	153
9.2 Perspectivas futuras.....	155

Anexos **157**

Anexo I Técnicas cromatográficas e hifenadas	159
A.1 Breve nota histórica.....	159
A.2 Conceitos teóricos fundamentais	160

A.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	165
A.4 Cromatografia gasosa (GC).....	167
A.5 Espectrometria de massa (MS)	169
A.5.1 Ionização.....	170
A.5.2 Analisador de massa.....	170
A.5.3 Detetor	171
A.6 Espectrometria de massa <i>tandem</i> (MS/MS).....	172
A.7 Referências	172
Anexo II Gráficos suplementares de otimização dos métodos.....	174

Índice de Figuras

1.1	Exemplos de contaminantes emergentes	4
1.2	Principais etapas que compõe o processo analítico	6
1.3	Exemplo das etapas de uma análise efetuada por SPME-GC	9
1.4	Dispositivo analítico usado em SBSE	11
1.5	Comparação da eficiência teórica por SPME e SBSE em função do $\log K_{O/W}$ sob idênticas condições experimentais.....	13
1.6	Representação esquemática do dispositivo analítico utilizado na BA μ E	16
1.7	Representação esquemática e imagem exemplificando a microextração por flutuação usada na técnica BA μ E. 1 - Frasco de amostragem; 2 - Vortex; 3 - Amostra; 4 - Dispositivo BA μ E e 5 - Barra de agitação magnética em Teflon.	17
1.8	Etapas envolvidas no procedimento experimental por MSPE	20
1.9	Modos de operação em SDME	23
1.10	Modos de operação em HF-LPME: sistema com duas fases (a) e três fases (b)	25
1.11	Etapas envolvidas no procedimento experimental por DLLME	27
1.12	Resumo dos principais métodos de preparação de amostras utilizados para análise vestigial.....	28
4.1	Estruturas químicas dos quatro antibióticos estudados.....	56
4.2	Efeito da variação da fase sorvente para a microextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 15 min sob ultrassons	59
4.3	Efeito da variação do solvente orgânico na retroextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 15 min sob ultrassons.	60
4.4	Efeito da variação do tempo de tratamento ultrassônico na retroextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH/ACN (100 μ L, 1:1).....	61
4.5	Efeito da variação do tempo de equilíbrio (a) e da velocidade de agitação para a microextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, pH 5,5; retroextração, ACN/MeOH (100 μ L 1:1), 15 min sob ultrassons	62
4.6	Efeito da variação do pH da matriz na microextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, 16 h (750 rpm); retroextração, ACN/MeOH (100 μ L, 1:1), 15 min sob ultrassons	63
4.7	Efeito da variação da força iônica da matriz para a microextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, 16 h (750 rpm) pH 5,5; retroextração, ACN/MeOH (100 μ L, 1:1), 15 min sob ultrassons.....	64
4.8	Efeito da variação da polaridade da matriz para a microextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, 16 h (750 rpm) pH 5,5; retroextração, ACN/MeOH (100 μ L, 1:1), 15 min sob ultrassons.....	65

4.9	Cromatogramas obtidos por BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD na análise dos quatro antibióticos em amostras de água potável (a) e superficial (b) fortificadas (8,0 μ g L ⁻¹), sob condições experimentais otimizadas.....	68
5.1	Estruturas químicas dos quatro antidepressivos estudados.....	76
5.2	Novo dispositivo BA μ E.....	79
5.3	Procedimento experimental proposto no novo ciclo BA μ E.....	80
5.4	Efeito da variação da fase sorvente para a microextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm) pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob ultrassons.....	81
5.5	Cromatograma obtido por BA μ E(SX)- μ LD/HPLC-DAD na análise dos quatro antidepressivos numa amostra aquosa fortificada (20 μ g L ⁻¹). Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob ultrassons.....	82
5.6	Efeito da variação do solvente (a) e do tempo de tratamento ultrassónico (b) na retroextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5.....	83
5.7	Efeito da variação do tempo de equilíbrio na microextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob ultrassons.....	84
5.8	Efeito da variação do pH da matriz na microextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (750 rpm); retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob ultrassons.....	85
5.9	Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h (750 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob ultrassons.....	86
5.10	Cromatogramas obtidos por BA μ E(SX)- μ LD/LC-MS/MS no modo MRM para análise dos quatro fármacos antidepressivos numa amostra aquosa fortificada (1,0 μ g L ⁻¹), sob condições experimentais otimizadas.....	88
5.11	Cromatogramas obtidos a partir da análise duma amostra de urina positiva para TRA, sob condições experimentais otimizadas.....	90
6.1	Efeito da variação da fase sorvente na microextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 2,0; retroextração, fase móvel (100 μ L), 30 min sob ultrassons.....	98
6.2	Efeito da variação do pH da matriz na microextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm); retroextração, fase móvel (100 μ L), 10 min sob ultrassons.....	101
6.3	Efeito da variação do tempo de equilíbrio na microextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 2,0; retroextração, fase móvel (100 μ L), 10 min sob ultrassons.....	101

6.4	Efeito da variação da força iónica da matriz na microextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (750 rpm), pH 2,0; retroextração, fase móvel (100 µL), 10 min sob ultrassons	102
6.5	Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (750 rpm), pH 2,0; retroextração, fase móvel (100 µL), 10 min sob ultrassons	103
6.6	Cromatogramas obtidos por BAµE(PS-DVB)-µLD/HPLC na análise dos dois filtros UV nas amostras de água ultrapura (a), água potável (b), água do mar (c), água estuarina (d) e efluente de ETAR (e), bem como em creme de proteção solar (f), sob condições experimentais otimizadas	106
7.1	Estruturas químicas dos 18 PAHs estudados	113
7.2	Dispositivo HFµE	116
7.3	Procedimento experimental proposto no ciclo HFµE	117
7.4	Efeito da variação do solvente orgânico na microextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração, 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons	119
7.5	Efeito da variação do tempo de equilíbrio na microextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons	121
7.6	Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração, 1 h, pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons	122
7.7	Efeito da variação da força iónica da matriz na microextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração, 1 h (700 rpm), pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons	122
7.8	Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração 1 h (700 rpm), pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons	123
7.9	Cromatograma obtido por HFµE(<i>n</i> -C9)-µLD/GC-MS(SIM) na análise dos 18 PAHs numa amostra aquosa fortificada (1,0 µg L ⁻¹) sob condições experimentais otimizadas. 1, naftaleno; 2, 2-metilnaftaleno; 3, 2-metilnaftaleno; 4, acenaftileno; 5, acenafteno; 6, fluoreno; 7, fenantreno; 8, antraceno; 9, fluoranteno; 10, pireno; 11, benzo[a]antraceno; 12, criseno; 13, benzo[a]fluoranteno; 14, benzo[k]fluoranteno; 15, benzo[a]pireno; 16, indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno; 17, dibenzo[a,h]antraceno e 18, benzo[<i>g,h,i</i>]perileno	124
7.10	Cromatogramas obtidos por HFµE(<i>n</i> -C9)/GC-MS(SIM) na análise dos 18 PAHs em amostras de efluente (a), solo (b), chá (c) e fígado de peixe, sob condições experimentais otimizadas. 1, naftaleno; 2, 2-metilnaftaleno; 3, 2-metilnaftaleno; 4, acenaftileno; 5, acenafteno; 6, fluoreno; 7, fenantreno; 8, antraceno; 9, fluoranteno; 10, pireno; 11, benzo[a]antraceno; 12, criseno; 13, benzo[a]fluoranteno; 14, benzo[k]fluoranteno; 15,	

	benzo[a]pireno; 16, indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno; 17, dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno e 18, benzo[<i>g,h,i</i>]perileno	129
8.1	Estruturas químicas dos 17 OPCs estudados	134
8.2	Efeito da variação do solvente orgânico na microextração dos 17 OPCs estudados. Condições experimentais: microextração 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons	137
8.3	Efeito da variação do tempo de tratamento ultrassónico na retroextração dos 17 OPCs estudados. Condições experimentais: microextração 1 h (1000 rpm), pH 5,5	138
8.4	Efeito da variação do tempo de equilíbrio na microextração dos 17 OPCs estudados. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons	139
8.5	Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos 17 OPCs estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h, pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons	140
8.6	Efeito da variação da força iónica da matriz na microextração dos 17 OPCs estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h (1200 rpm), pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons	141
8.7	Efeito do uso de duas HFs (<i>n</i> -C7) no tempo (<i>a</i>) e na eficiência (<i>n</i> -C7+Tol) de microextração dos 17 OPCs estudados. Condições experimentais: microextração, 1200 rpm, pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons	143
8.8	Cromatograma obtido por HF μ E(<i>n</i> -C7+Tol)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM) na análise dos 17 OPCs numa amostra aquosa fortificada (5,0 μ g L ⁻¹), sob condições experimentais otimizadas. 1, α -BHC; 2, γ -BHC; 3, β -BHC; 4, heptacloro; 5, aldrin; 6, heptacloro epóxido; 7, γ -clordano; 8, α -clordano, 9, α -endosulfan; 10, 4,4'-DDE; 11, dieldrin; 12, endrin; 13, β -endosulfan; 14, 4,4'-DDD; 15, endrin aldeído; 16, 4,4'-DDT e 17, metoxicloro	144
8.9	Cromatogramas obtidos por HF μ E(<i>n</i> -C7+Tol)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM) na análise dos 17 OPCs em amostras fortificadas de efluente (<i>a</i>), solo (<i>b</i>), chá (<i>c</i>) e tomate, sob condições experimentais otimizadas. 1, α -BHC; 2, γ -BHC; 3, β -BHC; 4, heptacloro; 5, aldrin; 6, heptacloro epóxido; 7, γ -clordano; 8, α -clordano, 9, α -endosulfan; 10, 4,4'-DDE; 11, dieldrin; 12, endrin; 13, β -endosulfan; 14, 4,4'-DDD; 15, endrin aldeído; 16, 4,4'-DDT e 17, metoxicloro	148
A.I.1	Ilustração do tempo morto (t_M), retenção ajustado (t_R') e do tempo de retenção (t_R) num cromatograma típico	161
A.I.2	Classificação dos principais métodos cromatográficos	164
A.I.3	Esquema simplificado de um sistema de HPLC convencional	165
A.I.4	Esquema simplificado de um sistema de GC convencional	167
A.I.5	Diagrama simplificado com os principais componentes de um espectrómetro de massa	169

A.II.1	Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h, pH 5,5; retroextração, MeOH (100 µL), 30 min sob ultrassons	174
A.II.2	Efeito da variação da força iónica da matriz na microextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h (750 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (100 µL), 30 min sob ultrassons	174
A.II.3	Efeito da variação do tempo de tratamento ultrassónico na retroextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 2,0; retroextração, fase móvel (100 µL)	175
A.II.4	Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h, pH 2,0; retroextração, fase móvel (100 µL), 10 min sob ultrassons	175
A.II.5	Efeito da variação do tempo de tratamento ultrassónico na retroextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração, 1 h (1000 rpm), pH 5,5	176
A.II.6	Efeito da variação pH na microextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração, 1 h (700 rpm); retroextração, 2 min sob ultrassons	176
A.II.7	Efeito da variação pH na microextração dos 17 OCPs estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h (1200 rpm); retroextração, 2 min sob ultrassons...	177
A.II.8	Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos 17 OCPs estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h (1200 rpm), pH 5,5; retroextração, 2 min sob ultrassons	177

Índice de Tabelas

3.1	Condições experimentais utilizadas para análise de cada classe de compostos estudados por HPLC-DAD	45
3.2	Transições selecionadas para análise de cada antidepressivo estudado por LC-MS/MS no modo MRM.	46
3.3	Iões alvo e fragmentos selecionados para análise dos PAHs e OCPs por GC-MS(SIM)	48
4.1	Log K_{OW} , pK_a , tempos de retenção (t_R), LODs, LOQs, gama linear e coeficientes de determinação para os quatro antibióticos obtidos por HPLC-DAD, sob condições instrumentais otimizadas.	57
4.2	Recuperações médias, LODs, LOQs, gama linear e coeficientes de determinação para os quatro antibióticos obtidos por BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD na validação do método analítico, sob condições experimentais otimizadas	66
4.3	Comparação dos LODs e recuperações médias obtidas neste trabalho com outras técnicas de microextração presentes na literatura para a determinação dos quatro antibióticos estudados.	67
5.1	Parâmetros otimizados para quantificação dos quatro antidepressivos por LC-MS/MS no modo MRM	78
5.2	Recuperações médias, LODs, LOQs, gama linear e coeficientes de determinação para os quatro antidepressivos obtidos por BA μ E(SX)- μ LD/LC-MS/MS na validação do método analítico, sob condições experimentais otimizadas	87
5.3	Coefficientes de determinação (r^2) obtidos para os quatro antidepressivos em amostras de plasma e urina, sob condições experimentais otimizadas	89
6.1	Estruturas químicas, log K_{OW} e pK_a dos filtros UV estudados	96
6.2	Recuperações médias, LODs, LOQs, gama linear dinâmica e coeficientes de determinação para os dois filtros UV obtidos por BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD na validação do método analítico, sob condições experimentais otimizadas	104
6.3	Coefficientes de determinação e concentração detetada para os dois filtros UV obtidos por BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD nas matrizes reais analisadas, sob condições experimentais otimizadas	106
7.1	Coefficientes de partição octanol-água (Log K_{OW}), tempos de retenção e iões selecionados para a análise dos 18 PAHs por GC-MS(SIM)	114
7.2	Pontos de ebulição e solubilidade em água dos solventes avaliados como fase extratora para HF μ E	121
7.3	Recuperações médias, LODs, LOQs, gama linear dinâmica e coeficientes de determinação para os 18 PAHs obtidos por HF μ E(<i>n</i> -C9)- μ LD/GC-MS(SIM) na validação do método analítico, sob condições experimentais otimizadas	125
7.4	Comparação entre as técnicas de microextração mais utilizadas para a análise de PAHs	126

8.1	Coeficientes de partição octanol-água ($\text{Log } K_{OW}$), tempos de retenção e iões seleccionados para a análise dos 17 OCPs por GC-MS(SIM).	135
8.2	Recuperações médias, LODs, LOQs, gama linear dinâmica e coeficientes de determinação para os 17 OCPs obtidos por HF μ E(<i>n</i> -C7+Tol)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM) na validação do método analítico, sob condições experimentais otimizadas	145

Capítulo 1

Introdução

1.1 Considerações gerais

Desde o surgimento da espécie humana que agimos de maneira transformadora sobre a natureza. Durante séculos de existência, por irresponsabilidade e desconhecimento das consequências, o Homem explorou os recursos naturais como se fossem inesgotáveis. Atualmente, o nosso planeta encontra-se numa fase de profundas mudanças ambientais ao nível do solo, da água e da atmosfera. Estas alterações ocorrem não só por causas naturais, mas principalmente como resultado da atividade humana, destacando-se o uso continuado dos combustíveis fósseis, assim como a urbanização desregrada, a agricultura intensiva, o elevado consumo de água potável, entre outras, que conseqüentemente causam a destruição da biosfera e geram uma enorme quantidade de resíduos. Desta forma, todos os compostos químicos libertados pelas atividades humanas serão introduzidos e dispersos no meio ambiente, tendo como destino final os ecossistemas aquáticos.

Mais de 700 poluentes emergentes, os respetivos metabolitos e produtos de transformação encontram-se na lista negra de compostos prioritários ou emergentes presentes nos recursos aquáticos europeus [1]. Por definição, os poluentes emergentes são compostos químicos com origem natural ou antropogénica que não são por regra monitorizados, mas que apresentam potencial para entrar no meio ambiente e causar efeitos adversos quer à saúde humana, quer à biota. Apesar de se terem tornado alvo de estudos somente a partir das últimas décadas, a presença destes micropoluentes na natureza não é recente. Porém, a deteção e a quantificação desses compostos em concentrações ao nível dos traços apenas foi possível face aos avanços quer da instrumentação, quer dos métodos analíticos mais modernos [2].

Os poluentes emergentes podem ser divididos em diversas classes, destacando-se os produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PPCPs), os pesticidas, os esteroides, os plastificantes, os subprodutos industriais, os retardantes de chama, os produtos de desinfeção da água, as cianotoxinas, entre outras [3]. Podem ser introduzidos no ambiente através de fontes pontuais, como estações de tratamento de águas residuais (ETARs) urbanas e industriais ou fontes difusas, como deposição atmosférica e lixiviação da agricultura e pecuária. Os poluentes emergentes não se encontram incluídos nos programas

de monitorização internacionais e seu destino no ambiente, bem como comportamento e efeitos toxicológicos ainda não são completamente conhecidos [4]. A figura 1.1 ilustra alguns exemplos de poluentes emergentes com reconhecida preocupação ambiental.

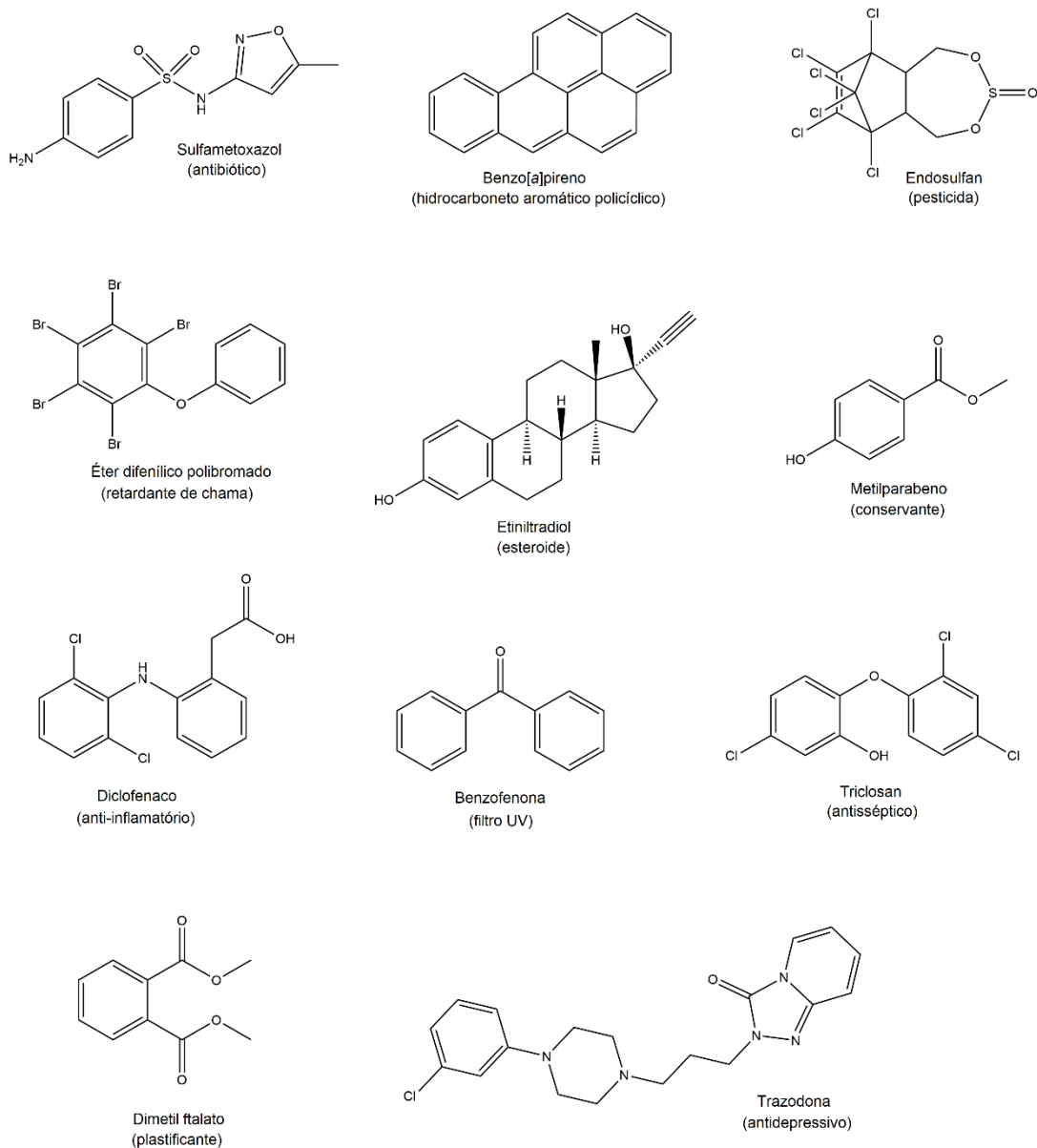


Figura 1.1. Exemplos de poluentes emergentes.

Apesar desses poluentes serem normalmente encontrados no ambiente aquático ao nível vestigial, da ordem de partes por trilhão a partes por bilhão, estudos recentes indicam que a exposição a estes compostos pode ocasionar diversos efeitos biológicos, como disfunção hormonal e desenvolvimento de células carcinogénicas [5]. Neste contexto, o controlo da poluição ambiental representa um dos grandes desafios do século XXI, sendo imprescindível o desenvolvimento de metodologias analíticas inovadoras e alternativas para monitorização de diversos poluentes emergentes. Uma vez as matrizes ambientais apresentarem elevada complexidade e os analitos com interesse ocorrerem ao nível vestigial, métodos eficientes de preparação da amostra são indispensáveis previamente à análise instrumental.

1.2 O papel da química analítica

Genericamente, qualquer processo analítico abrange diversas etapas, conforme ilustrado na figura 1.2, sendo a qualidade da análise química dependente de todos os procedimentos envolvidos até à determinação dos analitos alvo por um sistema instrumental.

A amostragem consiste num passo fundamental, exceto aquando do uso de técnicas de análise direta. O protocolo de amostragem deve incluir um número mínimo de amostras que sejam representativas do universo a ser analisado. Os procedimentos para colheita, armazenamento e transporte das mesmas devem ser realizados com o cuidado de garantir a integridade do material sem que ocorram alterações físicas e/ou químicas desde o local de recolha até a análise laboratorial.

De seguida, a preparação da amostra é um passo essencial prévio à análise por técnicas instrumentais. Esta etapa tem como objetivos, além do incremento da sensibilidade, transformar a amostra numa solução apropriada para a injeção instrumental com o mínimo de interferentes e que seja compatível com a metodologia proposta. Desta forma, o método mais adequado deve ser selecionado levando em consideração o objetivo da análise, o tempo necessário e os recursos disponíveis. A preparação da amostra pode envolver diversas operações, como por exemplo filtração, extração, evaporação, derivatização,

entre outras, sendo em geral o erro analítico proporcional ao número de passos envolvidos.



Figura 1.2. Principais etapas que compõem o processo analítico.

No que diz respeito à análise instrumental, a técnica mais conveniente deve ser definida de acordo com as propriedades físicas e/ou químicas dos analitos envolvidos e da amostra. Além disso, a sensibilidade e a seletividade desejadas devem ser levadas em consideração na escolha do sistema de separação e quantificação mais adequado. Entre os sistemas instrumentais disponíveis, recorre-se frequentemente à cromatografia em fase gasosa (GC - *gas chromatography*), à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *high performance liquid chromatography*) ou ainda a técnicas acopladas à espectrometria de massa (MS), como são os casos do GC-MS e LC-MS. O Anexo I apresenta uma breve descrição dos fundamentos e características mais importantes de algumas destas técnicas de análise instrumental.

1.3 Técnicas de preparação de amostras

A análise direta de contaminantes de matrizes complexas é uma tarefa difícil, uma vez estes compostos se encontrarem presentes em concentrações vestigiais, juntamente com dezenas ou mesmo centenas de interferentes. Desta forma, na maioria dos casos, a preparação da amostra é indispensável para a aplicação posterior de técnicas cromatográficas e hífenadas mais adequadas, podendo esta etapa ser responsável por mais de 80 % do tempo despendido em qualquer processo analítico [6].

De forma geral, a preparação da amostra consiste em transformar a matriz real numa amostra compatível com os sistemas instrumentais, que pode incluir um passo de extração e pré-concentração dos analitos, bem como a minimização ou mesmo a eliminação de possíveis interferentes, tendo como objetivo aumentar a sensibilidade e a seletividade da análise envolvida.

Um dos métodos mais básicos para enriquecimento de analitos em amostras para posterior análise cromatográfica é a extração líquido-líquido (LLE - *liquid-liquid extraction*), na qual ocorre a partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis, geralmente uma aquosa e outra orgânica, baseada na solubilidade dos compostos alvos entre ambas. Do ponto de vista prático, a LLE recorre ao uso de ampolas de decantação e requer volumes consideráveis de amostra (0,1 - 2,0 L) e de solvente orgânico (5 - 100 mL) para obter boa sensibilidade e recuperar eficientemente os analitos em estudo. Apesar de ser ainda hoje muito utilizada em química analítica face à simplicidade e eficácia, atualmente a LLE tem vindo a ser substituída por outras técnicas que procuram a automatização e a redução do volume da amostra e dos solventes orgânicos envolvidos.

Entre outras possibilidades, uma técnica amplamente utilizada para preparação de amostras é a extração em fase sólida (SPE - *solid phase extraction*), introduzida na década de oitenta do século XX. Para operação laboratorial, a amostra é forçada a atravessar uma fase extrativa, na qual os analitos com interesse ficam retidos, sendo posteriormente desorvidos com recurso a solventes orgânicos adequados. A SPE é uma das técnicas de amostragem dinâmica mais utilizadas na atualidade face à rapidez, eficiência, versatilidade e possibilidade de automatização. Contudo, abordagens mais

modernas de enriquecimento de analitos em amostras encontram-se direcionadas para a miniaturização e a redução do número de passos envolvidos no processo analítico.

Neste contexto, as novas tecnologias utilizadas na preparação de amostras atendem à simplificação, fácil manuseio dos dispositivos analíticos, automatização, assim como redução ou ausência do uso de solventes orgânicos tóxicos e diminuição do volume das amostras, satisfazendo aos princípios da química analítica verde (GAC). Dessa forma, nas últimas décadas têm vindo a ser propostas diversas técnicas de microextração que se revelaram alternativas efetivas, muito promissoras e consideradas “amigas do ambiente”.

1.3.1 Técnicas de microextração baseadas em sólidos

As técnicas de preparação de amostras baseadas em mecanismos de sorção podem ser consideradas atualmente como abordagens bem estabelecidas e aceites, com ampla aplicação nos laboratórios analíticos. Entre as técnicas de microextração sortiva mais usadas encontram-se a microextração em fase sólida (SPME - *solid phase microextraction*), a extração sortiva em barra de agitação (SBSE - *stir bar sorptive extraction*), a microextração adsorptiva em barra (BA μ E - *bar adsorptive microextraction*) e a extração em fase sólida dispersiva (dSPE - *dispersive solid phase extraction*).

1.3.1.1 Microextração em fase sólida (SPME)

A SPME foi introduzida em 1990 por Arthur e Pawlisyn [7] como uma técnica inovadora no domínio da preparação de amostras, uma vez ser uma abordagem de microextração estática simples, rápida, com elevada sensibilidade e seletividade e eliminação total do uso de solventes orgânicos.

Na SPME, o sorvente é um fino filme de um polímero ou de um sólido adsorvente (10 a 100 μ m de espessura) sobre uma fibra de sílica fundida inserida no interior de um dispositivo com formato de seringa que possui um êmbolo capaz de expor a fase no momento da microextração. Existem disponíveis

comercialmente fibras com diferentes fases sorventes, para as mais diversas aplicações, nomeadamente o polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato, carboxeno-PDMS, PDMS-divinilbenzeno, entre outras. As fibras são reutilizáveis e o tempo de vida depende principalmente do tipo de matriz envolvida e das condições experimentais utilizadas.

A SPME é realizada em duas etapas, conforme reproduzido na figura 1.3. Na primeira, o enriquecimento da amostra, pode ser efetuado por modo direto, no qual a fibra é imersa na amostra líquida para sorção de analitos semi-voláteis a não-voláteis, ou no modo *headspace* (HS) para microextração de compostos voláteis a semi-voláteis. Na segunda etapa, a fibra é recolhida para o interior da seringa e transferida para o sistema analítico no qual a dessorção, separação e quantificação dos analitos será realizada. O passo de retroextração pode ter lugar no injetor quente de um sistema de GC por dessorção térmica (TD - *thermal desorption*) ou numa interface dum sistema de HPLC por dessorção líquida (LD - *liquid desorption*).

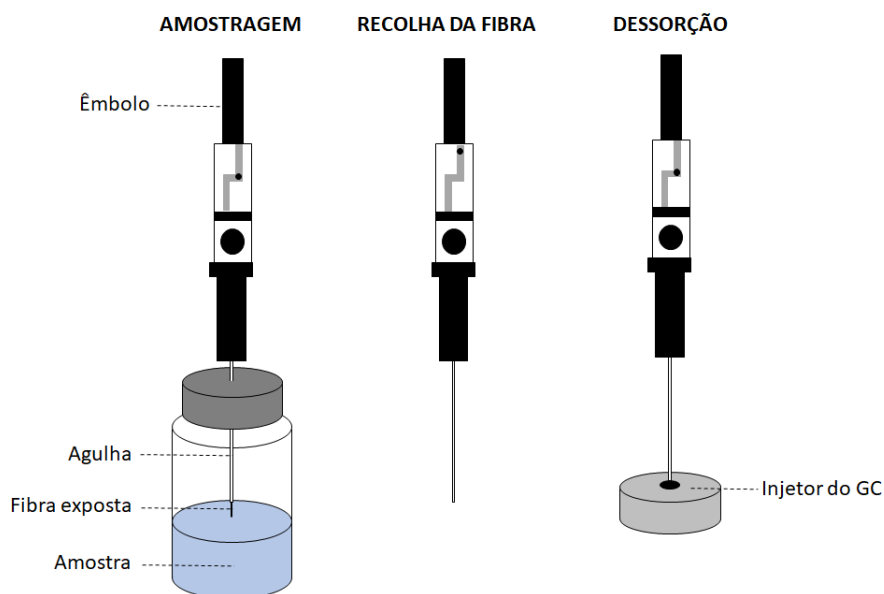


Figura 1.3. Exemplo das etapas de uma análise efetuada por SPME-GC.

Uma vez ser uma técnica que opera no modo estático, a SPME baseia-se no equilíbrio da concentração do analito entre a amostra e a fase extrativa, até que a concentração do analito na fase extrativa permaneça constante no tempo, sendo o tempo de equilíbrio um parâmetro importante a ser otimizado. Após

alcançado o equilíbrio e, quando o volume de amostra é substancialmente superior ao volume do material sorvente, a quantidade de massa dos analitos extraídos pode ser calculada por meio da expressão 1 simplificada:

$$n = K_{fs} \times V_f \times C_0 \quad (1)$$

na qual n é a massa dos analitos extraídos, K_{fs} o coeficiente de partição do analito entre o sorvente da fibra e a amostra, V_f o volume do sorvente e C_0 a concentração inicial do analito na amostra.

Entre as principais vantagens apresentadas pela SPME, esta técnica é *solventless* e integra vários passos analíticos num só, como amostragem, extração, pré-concentração e introdução dos analitos no sistema cromatográfico. Por esta razão, tem sido largamente aplicada nas mais diversas áreas, como a ambiental [8], a alimentar [9] e a bioanalítica [10] ao longo dos seus mais de 25 anos de existência. Por outro lado, as principais desvantagens estão relacionadas com a fragilidade das fibras e com a reduzida quantidade de fase extrativa envolvida. Considerando uma fibra de PDMS de 100 μm , uma das mais utilizadas em SPME, o volume correspondente de sorvente é de apenas aproximadamente 0,5 μL , o que limita a sensibilidade da técnica às partes por bilião. Por esta razão, outras técnicas alternativas foram propostas, com intuito de incrementar a sensibilidade.

1.3.1.2 Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)

A SBSE foi introduzida em 1999 por Sandra e colaboradores [11] como uma nova aplicação para análise vestigial de compostos orgânicos em amostras aquosas. Nesta técnica utiliza-se como dispositivo analítico uma barra de agitação constituída por um ímã envolto num tubo de vidro revestido por um filme de PDMS (0,5 a 1,0 mm de espessura), conforme ilustrado na figura 1.4, comercialmente conhecido como “*Twister*”. Inicialmente foi concebida para análise ambiental, mas ao longo dos anos centenas de aplicações nas mais diversas áreas científicas têm sido desenvolvidas, fazendo da SBSE atualmente uma das técnicas mais utilizadas para a análise vestigial [12].

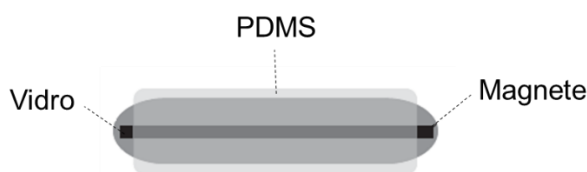


Figura 1.4. Dispositivo analítico usado em SBSE.

O princípio de operação da SBSE envolve sempre duas etapas fundamentais, nomeadamente a microextração dos analitos da amostra para a fase de PDMS seguida da retroextração da fase sorvente para o sistema instrumental. A microextração pode ser realizada no modo de amostragem por imersão ou por HS, sendo esta última indicada para o caso de compostos voláteis a semi-voláteis. A retroextração pode ser efetuada com recurso aos modos TD ou LD. O primeiro é mais direto, *solventless* e *on-line*, sendo no entanto limitado para compostos voláteis e semi-voláteis, requerendo uma unidade de TD dedicada para a operação de aquecimento e apenas compatível com análise por GC. Por outro lado, a abordagem por LD pode ser combinada com qualquer sistema instrumental, seja GC, HPLC ou mesmo eletroforese capilar (CE), permitindo reanálise e consistindo numa operação *off-line* com diversos passos de manipulação, como a evaporação e/ou troca de solvente.

A base teórica da SBSE(PDMS) é muito semelhante à da SPME, uma vez ambas serem técnicas de microextração sortiva estática envolvendo o mesmo polímero. A eficiência de extração de um analito de uma amostra aquosa (W) está relacionada com a partição entre a fase de PDMS da barra e a matriz aquosa ($K_{PDMS/W}$), apresentando um comportamento similar à distribuição descrita pelos coeficientes de partição octanol-água ($K_{O/W}$) no equilíbrio. Assim, o coeficiente de distribuição entre o PDMS e a água ($K_{PDMS/W}$) é definido pela razão entre a concentração do analito na fase de PDMS (C_{PDMS}) e na fase aquosa (C_W), depois de alcançado o equilíbrio da extração, como descrito pela equação (2):

$$K_{O/W} \approx K_{PDMS/W} = \frac{C_{PDMS}}{C_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \times \frac{V_W}{V_{PDMS}} \quad (2)$$

na qual m_{PDMS} é a massa do analito na fase de PDMS, m_W a massa do analito na fase aquosa, V_W o volume de amostra na fase aquosa e V_{PDMS} o volume em PDMS. Tendo em conta a razão de fases $\beta = (V_W / V_{SBSE})$, a equação 2 pode ser reescrita para a expressão 3:

$$\frac{K_{O/W}}{\beta} = \frac{m_{SBSE}}{m_W} = \frac{m_{SBSE}}{m_0 - m_{SBSE}} \quad (3)$$

sendo m_0 a quantidade inicial de analito presente na amostra de água, possibilitando estimar a eficiência de extração de um determinado analito a partir de uma matriz aquosa. Desta forma, a recuperação teórica percentual pode ser calculada pela expressão 4 resultante:

$$Eficiência (\%) = \left(\frac{m_{SBSE}}{m_0} \right) \times 100\% = \left(\frac{\frac{K_{O/W}}{\beta}}{1 + \frac{K_{O/W}}{\beta}} \right) \times 100\% \quad (4)$$

Considerando a equação 4, conclui-se que a recuperação dos analitos depende substancialmente de dois fatores, $K_{O/W}$ e β . Desta forma, ao usar maiores quantidades de PDMS, β diminui, aumentando conseqüentemente a eficiência da microextração. Por este motivo, a SBSE apresenta grande vantagem em relação à capacidade extrativa por SPME, uma vez o volume de PDMS envolvido ser muito superior (24 a 126 μ L contra 0,5 μ L), contribuindo para o aumento da sensibilidade. A figura 1.5 reproduz a diferença entre a eficiência obtida por SBSE e SPME em função do $\log K_{O/W}$, demonstrando que a primeira é bem descrita pelos correspondentes coeficientes, sendo a recuperação quantitativamente superior sob as mesmas condições experimentais.

A grande limitação da SBSE(PDMS) é não apresentar boa resposta analítica para determinação de compostos mais polares ($\log K_{O/W} < 3$), tendo sido propostas novas estratégias analíticas com a finalidade de superar esta dificuldade. Dentre elas, destacam-se os ensaios multi-modo, os processos de derivatização, a introdução de novas fases poliméricas e também o desenvolvimento de novos dispositivos que utilizem fases sorventes com elevada capacidade sortiva para compostos polares. Nos ensaios multi-modo,

indicado para casos nos quais a amostra contém famílias de analitos com propriedades físico-químicas diferentes, são usadas simultaneamente duas ou mais barras de SBSE por amostra ou analisadas diversas amostras contendo apenas uma barra cada, a fim de aumentar a sensibilidade após o passo de retroextração. É também possível adotar o modo sequencial, no qual as condições experimentais da matriz são alteradas durante o mesmo ensaio, utilizando-se uma ou mais barras individuais para tornar possível a recuperação de diferentes classes de compostos. Como alternativa, é ainda possível derivatizar os compostos mais polares por meio de reações de alquilação, acetilação, acilação, sililação, dentre outras. No entanto, este é um procedimento específico para alguns analitos e por isso não muito abrangente, além de contribuir para introdução de interferentes na análise.

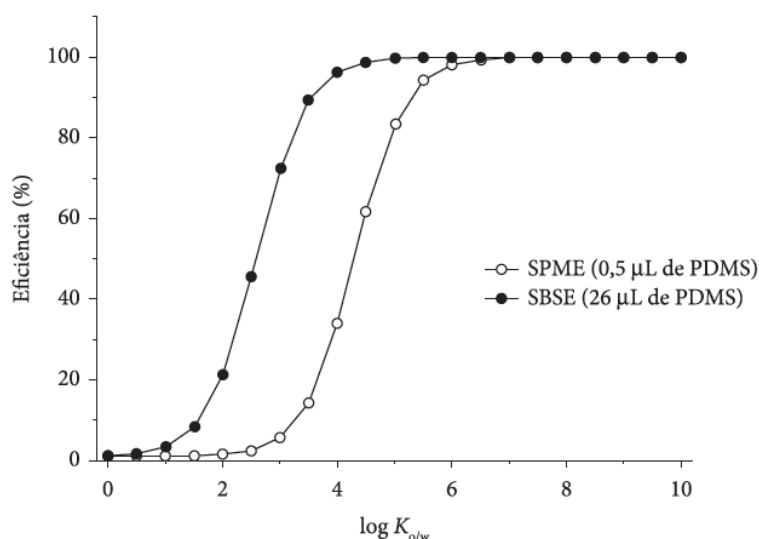


Figura 1.5. Comparação da eficiência teórica por SPME e SBSE em função do $\log K_{ow}$ sob idênticas condições experimentais [13]

A alternativa mais relevante para expandir a aplicabilidade da SBSE a compostos mais polares consiste no desenvolvimento de novas fases sorventes como alternativa ao PDMS. Poliacrilato e etilenoglicol/silicone são exemplos de fases disponíveis comercialmente, embora ainda com poucas aplicações propostas. Entre outras opções reportadas destacam-se a barra-dual ou barra constituída por dois sorventes distintos, revestimentos com materiais monolíticos fixados por via química ou física, impressão molecular de polímeros, tecnologia

de síntese polimérica de precipitação por imersão e tecnologia de síntese sol-gel. Porém, a maioria desses materiais apresentam desvantagens como elevado tempo de execução, preparação muito complexa e baixa estabilidade.

1.3.1.3 Microextração adsortiva em barra (BA μ E)

1.3.1.3.1 Considerações gerais

A BA μ E, proposta por J.M.F. Nogueira e colaboradores em 2010 [14], foi desenvolvida principalmente com a finalidade de superar as limitações impostas pela técnica de SBSE(PDMS) na análise de compostos com características mais polares. Esta abordagem tem demonstrado ser muito efetiva e abrangente na monitorização vestigial de diversas classes de compostos orgânicos, com características desde polares a apolares, nos mais variados tipos de matrizes [15].

Nesta técnica são utilizados dispositivos analíticos nos quais são fixados materiais sorventes finamente divididos com elevada capacidade sortiva. Por serem menos densos que a água, os dispositivos flutuam na amostra durante a microextração, com recurso a uma barra de agitação magnética convencional. O enriquecimento é então promovido pela força centrípeta, que faz com que os analitos migrem por difusão do seio da amostra até à fase sorvente. Esta abordagem inovadora, designada por ‘tecnologia de amostragem por flutuação’, é vantajosa uma vez evitar choques mecânicos resultantes da agitação magnética que poderiam causar a desagregação do material sorvente.

Inicialmente foram desenvolvidas duas configurações de dispositivos analíticos que diferiam na geometria e modo de preparação, porém ambos operando no modo de flutuação. Na BA μ E, o dispositivo consiste num tubo de polipropileno (PP) ou polietileno (PE) com formato cilíndrico ao qual são fixados sorventes com recurso a um adesivo apropriado. Na microextração adsortiva em multiesferas (MSA μ E - *Multi-spheres Adsorptive Microextraction*), o dispositivo apresenta geometria com base em pequenas esferas, sendo constituído por um suporte em poliestireno expandido com formato esférico, ao qual são fixados sorventes apropriados por tratamento térmico. Embora as duas configurações

apresentem ótimo desempenho analítico [14], a BA μ E acabou por ser uma abordagem mais prática do ponto de vista de preparação dos dispositivos e manipulação experimental. Numa primeira fase, os dispositivos BA μ E possuíam dimensões de 15 mm em comprimento e 3 mm em diâmetro e revestimentos contendo 1 a 5 mg de fase sorvente.

A principal vantagem da BA μ E consiste na possibilidade de escolher a fase sorvente mais seletiva de acordo com as características dos compostos a serem analisados, tentando obter a máxima eficiência no processo de enriquecimento da amostra. Neste contexto, são utilizados materiais sólidos com estrutura porosa bem desenvolvida e centros ativos adequados, aos quais os compostos polares são facilmente adsorvidos por fenômenos eletrostáticos e/ou dispersivos (propriedades de adsorção/dessorção). Quando finamente divididos, estes materiais caracterizam-se por possuir áreas superficiais elevadas com grande capacidade adsortiva, dependendo apenas da química superficial e da textura envolvida. São, portanto, considerados materiais excelentes para microextração de compostos orgânicos, uma vez encontrarem-se abaixo dos correspondentes patamares isotérmicos, não sendo por esse motivo aplicáveis as considerações teóricas de Langmuir e Freundlich [14,15]. A figura 1.6 ilustra um esquema com os principais materiais constituintes do dispositivo analítico utilizado por BA μ E.

Entre os materiais que podem ser utilizados para revestimento dos dispositivos encontram-se os carvões ativados (ACs), sólidos caracterizados por apresentarem partículas nanoestruturadas e porosas compostas por poros com dimensões diferenciadas, como os macroporos (> 50 nm), os mesoporos (2-50 nm) e os microporos (< 2 nm). De maneira geral, os ACs possuem elevadas áreas superficiais que podem chegar a 1200 m² g⁻¹ e grande capacidade para retenção (\approx 100-500 μ g mg⁻¹), dependendo do pH_{pzc} (pH do ponto de carga zero) e de textura. O pH_{pzc} dos ACs é determinado de acordo com a composição química superficial, que além de carbono pode apresentar grupos químicos e heteroátomos (oxigênio e azoto), sendo muito importantes para gerar mecanismos efetivos de interação com os analitos ao conferir-lhes características ácidas e/ou básicas.

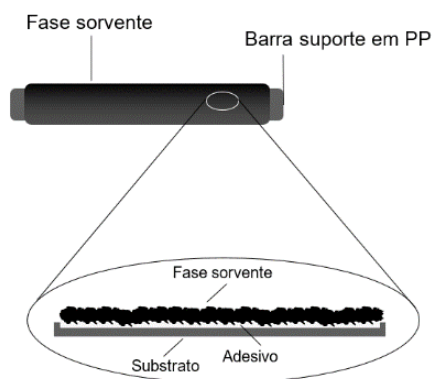


Figura 1.6. Representação esquemática do dispositivo analítico utilizado na BAμE

Outros tipos de materiais alternativos aos ACs que podem ser utilizados são os sorventes poliméricos finamente divididos, de acordo com as vantagens analíticas que possam oferecer para cada aplicação em particular. Os polímeros (Ps) são macromoléculas formadas a partir de ligações covalentes fortes com repetidas unidades básicas designadas por monómeros. Duma forma geral, os Ps apresentam mecanismos múltiplos de interação, retendo os analitos por meio de interações π - π , dipolo-dipolo, ligações de hidrogénio e troca iónica. As características texturais desses materiais, como tamanho de partícula, área superficial, microporosidade e pH também constituem importantes fatores nas interações físicas e químicas entre sorventes e analitos.

Neste contexto, a limitação do PDMS para análise de compostos mais polares foi, desta forma, ultrapassada com a viabilidade da BAμE poder operar com vários tipos de materiais sorventes, permitindo a determinação de analitos com ampla gama de polaridades. Diversas classes de compostos já foram testados com enorme sucesso, como produtos farmacêuticos [16–19] e de higiene pessoal [20,21], pesticidas [22–25] e esteroides [26,27] em diversos tipos de matrizes, nomeadamente, ambientais, alimentares e biológicas.

Do ponto de vista prático, o ciclo analítico da BAμE envolve igualmente duas etapas, a microextração dos analitos da amostra e a retroextração dos mesmos da fase sorvente num solvente adequado para posterior análise no sistema instrumental (figura 1.7). Neste sentido, na primeira etapa o dispositivo analítico é colocado em contato com a amostra e o enriquecimento ocorre no modo de flutuação por intermédio de agitação magnética. O primeiro ensaio a

ser realizado é normalmente com a finalidade de escolher a fase sorvente capaz de alcançar a melhor seletividade. Para este fim, são realizados ensaios sob condições experimentais padrão em água ultra-pura fortificada com os compostos com interesse.

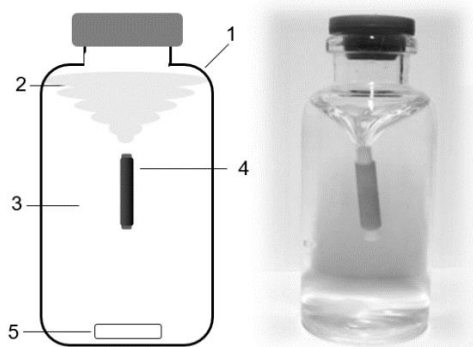


Figura 1.7. Representação esquemática e imagem exemplificando a microextração por flutuação usada na técnica BAμE. 1 - Frasco de amostragem; 2 - Vortex; 3 - Amostra; 4 - Dispositivo BAμE e 5 - Barra de agitação magnética em Teflon.

1.3.1.3.2 Otimização da técnica BAμE

Após ter sido selecionada a fase sorvente mais adequada, as condições experimentais devem ser otimizadas a fim de se obter máxima eficiência na análise, conforme acontece nas técnicas de SPME e SBSE. Os principais parâmetros que influenciam a cinética da microextração são o tempo de extração e a velocidade de agitação, uma vez determinarem a distribuição dos analitos entre o seio da matriz e o sorvente. A agitação da amostra é muito importante no processo de amostragem por flutuação no sentido da difusão dos analitos, porém velocidades elevadas devem ser evitadas uma vez podem desestabilizar o dispositivo analítico, provocando choques contra as paredes do frascos e consequente desagregação do material sorvente. Da mesma forma, parâmetros termodinâmicos como o pH, a polaridade da matriz e a força iônica devem ser igualmente otimizados. O controle do pH é muito importante sobretudo quando se trabalha com analitos ionizáveis, uma vez a forma química na qual se encontram poder influenciar diretamente as interações que ocorrem com a fase extrativa. A polaridade e a força iônica são igualmente parâmetros essenciais

que devem ser otimizados, usando-se geralmente álcoois (ex. metanol) e eletrólitos fortes (ex. cloreto de sódio) para controlar os fenômenos de *wall-effect* e *salting-out*, respectivamente.

Depois de otimizadas as condições experimentais relativas à microextração, os parâmetros que influenciam a retroextração são igualmente avaliados. Esta segunda etapa é realizada por meio da LD, na qual o dispositivo analítico é imerso num solvente compatível com a técnica BA μ E e submetido a tratamento ultrassônico. Neste sentido, diversos solventes e misturas, assim como o tempo de tratamento ultrassônico são parâmetros que devem ser otimizados para garantir a completa dessorção dos analitos da fase sorvente. Por último, o extrato resultante pode ainda ser evaporado, ocorrer troca de solvente e analisado instrumentalmente por HPLC, GC, CE ou técnicas hífenadas, dependendo de cada aplicação em particular.

1.3.1.3.3 Validação e aplicação da BA μ E

Com todas as condições experimentais otimizadas, o passo seguinte é a validação da metodologia, no qual são avaliados os limites de detecção (LODs) e quantificação (LOQs), linearidade e precisão. São ainda realizados ensaios em matrizes reais com interesse em cada aplicação específica para demonstrar a aplicabilidade e desempenho analítico da metodologia. Por forma a contornar os possíveis efeitos de matriz recorre-se normalmente ao método de adição de padrão (SAM - *standard addition method*), uma vez as amostras poderem ser muito complexas e apresentarem potenciais interferentes.

Embora a BA μ E tenha demonstrado excelente resposta na análise vestigial de diversas classes de compostos prioritários em diferentes tipos de matrizes, foram recentemente introduzidas modificações no dispositivo analítico por forma a melhorar ainda mais o seu desempenho [28,29]. Neste contexto, propôs-se um novo dispositivo com a metade do comprimento original (7,5 mm em comprimento e 3 mm em diâmetro), sem que houvesse perda de eficiência na etapa de microextração. Com esta melhoria, a etapa de retroextração, que antes era realizada em 1,5 mL de solvente orgânico, passou a ser efetuada em

200 μL e, posteriormente, em apenas 100 μL [30], tornando a abordagem ainda mais prática e ambientalmente favorável.

1.3.1.4 Extração em fase sólida dispersiva (dSPE)

Embora a SPE seja até os dias de hoje uma das técnicas sortivas mais utilizadas nos laboratórios de química analítica, algumas de suas limitações impulsionaram o desenvolvimento da dSPE, uma variante da SPE que proporciona como principal vantagem a redução do tempo de preparação da amostra. Ao contrário da SPE, na qual a fase extrativa se encontra no interior de um cartucho, na dSPE o sorvente é adicionado diretamente à matriz para extração/*clean-up* dos analitos alvo, conforme proposto nos QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe*). Neste sentido, o fluxo da amostra que atravessa o cartucho, um parâmetro crítico em SPE e que deve ser cuidadosamente controlado, deixa de ser uma limitação por dSPE, uma vez o contato entre as fases ser imediato e proporcionar uma cinética mais rápida e efetiva, devido ao aumento da área superficial. Outra vantagem da dSPE é a possibilidade de analisar amostras contendo micropartículas ou microorganismos, muito comuns no domínio da análise ambiental, que poderiam bloquear os cartuchos na SPE convencional, comprometendo a etapa de extração [31].

Após alcançado o tempo de equilíbrio durante a extração, a separação do sorvente e da matriz na dSPE pode ser realizada por centrifugação, filtração ou separação magnética. O uso de um campo magnético externo para auxiliar nos processos de extração/retroextração constitui uma estratégia que ultimamente tem vindo a ser proposta, tendo esta abordagem sido designada, em 1999, por extração em fase sólida magnética (MSPE - *magnetic solid phase extraction*) [32].

Nesta abordagem, os sorventes utilizados são nanopartículas magnéticas (MNPs - *magnetic nanoparticles*), materiais compostos por um núcleo rígido com propriedade magnética revestido com uma camada de sorvente com seletividade adequada para a extração dos analitos alvos.

Do ponto de vista prático, o manuseio em MSPE é muito simples, conforme mostrado na figura 1.8. Inicialmente, o sorvente é disperso na amostra por meio de agitação mecânica, vortex ou ultrassons. De seguida, utiliza-se um magnete (íman) para separar a matriz da fase sorvente, sendo posteriormente os analitos eluídos num solvente adequado e o extrato resultante conduzido para análise instrumental.

As MNPs mais utilizadas são à base de óxido de ferro (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, entre outros), sintetizadas por métodos de coprecipitação, síntese hidrotérmica e solvotérmica, sol-gel, decomposição térmica, microemulsão e síntese sonoquímica [33]. Com relação ao revestimento das MNPs, pode ser efetuado com materiais inorgânicos, orgânicos ou híbridos por meio de ligações químicas ou interações físicas, sendo que a escolha do material deve ser feita de acordo com a natureza das interações sorvente-analito. A sílica é o material mais utilizado como revestimento, possibilitando a funcionalização com diversos grupos químicos a fim de aumentar a seletividade da fase. Outros exemplos de revestimentos apresentados na literatura são polímeros molecularmente impressos [34], líquidos iônicos [35], nanotubos de carbono [36], estruturas metal-orgânicas [37], entre outros.

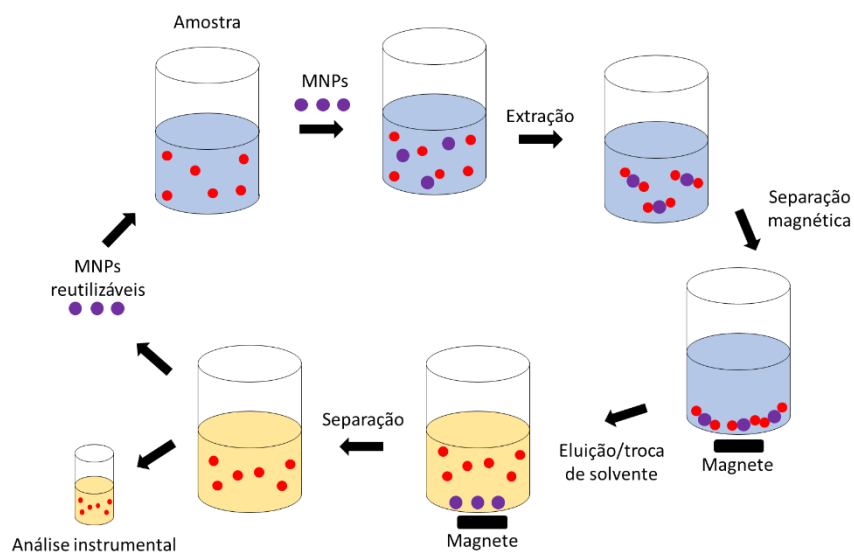


Figura 1.8. Etapas envolvidas no procedimento experimental por MSPE.

No desenvolvimento de um método baseado em MSPE, os principais parâmetros a serem otimizados são a quantidade de sorvente, o tempo de equilíbrio, a velocidade de agitação, o pH da solução, o efeito *salting-out*, o volume da amostra, assim como o tipo e a quantidade de solvente para retroextração. A capacidade analítica da MSPE foi demonstrada em diversas aplicações, principalmente nas áreas ambiental [38,39], biológica [40,41] e alimentar [42,43].

Apesar de a MSPE apresentar fácil manuseio e tempo de extração reduzido face à rápida cinética envolvida, o principal inconveniente desta técnica reside na síntese dos MNPs, uma vez envolver reações químicas complexas realizadas sob condições muito controladas. Outra questão importante é, até o momento, haver pouca informação disponível sobre a toxicidade das MNPs. Assim, como a MSPE não oferece um procedimento prático de forma efetiva, esta técnica não tem vindo a substituir outras metodologias de microextração bem estabelecidas.

1.3.2 Técnicas de microextração baseadas em líquidos

A introdução da técnica de SPME impulsionou o desenvolvimento de técnicas miniaturizadas em química analítica. Neste contexto, a partir de 1995, foram publicados os primeiros trabalhos [44] relacionados com o desenvolvimento de técnicas de microextração com solventes (SME - *solvent microextraction*) ou microextração em fase líquida (LPME - *liquid phase microextraction*). Estas abordagens consistem essencialmente em versões miniaturizadas da tradicional LLE, com a finalidade de ultrapassar as principais limitações, nomeadamente o longo tempo associado à preparação da amostra, o elevado consumo de solventes orgânicos tóxicos, bem como a exigência de grandes quantidades de amostras.

De forma geral, as técnicas de SME baseiam-se no princípio de partição dos analitos da amostra aquosa para um solvente orgânico imiscível com a água e apresentam como principais vantagens um elevado fator de enriquecimento e tempo de equilíbrio reduzido. Atualmente existem na literatura diversos métodos por SME, classificados de acordo com a forma com a qual a fase extrativa é

usada [45]. Entre as diversas técnicas propostas, as mais referenciadas são a microextração em gota única (SDME - *single drop microextraction*), a microextração com fibra oca (HF-LPME - *hollow fiber liquid phase microextraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME - *dispersive liquid-liquid microextraction*), podendo cada uma delas apresentar modificações e serem tratadas como técnicas diferenciadas na literatura.

1.3.2.1 Microextração em gota única (SDME)

A SDME [46] baseia-se na microextração dos compostos com interesse de uma matriz aquosa para uma pequena gota de solvente orgânico. Na primeira descrição da técnica, Jeannot *et al.* usou uma gota de octano suspensa no final de um tubo de Teflon imersa na amostra. Desta maneira, os analitos foram extraídos da amostra aquosa pela gota em suspensão, baseada na difusão passiva, sendo a recuperação da extração essencialmente determinada pelo coeficiente de partição entre o solvente orgânico e a água. Depois de determinado tempo de contato entre as fases, uma alíquota da gota de solvente foi retirada de dentro do tubo com uma microseringa e injetada no sistema cromatográfico. He e Lee propuseram, em 1997 [47], uma simplificação da técnica substituindo o tubo de Teflon por uma microseringa. Neste sentido, antes da microextração, a seringa foi imersa no solvente orgânico para aspiração de alguns microlitros da fase extrativa. De seguida, a agulha foi inserida no frasco de amostragem com ligeira pressão do êmbolo para a formação da gota. Após a microextração, o solvente foi retraído para dentro da microseringa e injetado diretamente no sistema de GC.

Desde então a SDME tem sido utilizada devido à grande simplicidade, não requerendo equipamentos específicos para sua aplicação. O enriquecimento da amostra pode ser realizado em diferentes modos de operação, destacando-se os modos de imersão direta (DI-SDME) e HS (HS-SDME), como ilustrado na figura 1.9. Inicialmente esta técnica foi desenvolvida para aplicação em GC, podendo ser também combinada com diversas outras técnicas instrumentais, nomeadamente HPLC e CE.

Entre os principais parâmetros que podem afetar a eficiência de extração na SDME, destacam-se a escolha do solvente extrator, o volume da gota, o tempo de extração, a velocidade de agitação e a força iônica da matriz. O solvente extrator deve ser pouco solúvel em água, ao mesmo tempo que os analitos devem ser bastante solúveis no solvente orgânico em relação à matriz aquosa e apresentar ponto de ebulição elevado o suficiente para não evaporar durante a amostragem. Os volumes de gota mais utilizados variam entre 1 e 3 μL , embora volumes maiores possam ser obtidos com recurso a adaptadores acoplados ao final da microseringa. Contudo, o aumento do volume da gota implica maior área superficial, proporcionando instabilidade da mesma e afetando diretamente o tempo de extração e a velocidade de agitação, respetivamente. O aumento da velocidade de agitação reduz substancialmente o tempo de extração, podendo entretanto ocasionar o desprendimento da gota [48].

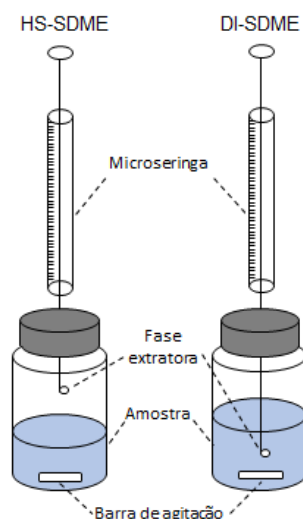


Figura 1.9. Modos de operação em SDME.

Quando comparada à LLE, a SDME apresenta grande simplificação e enorme redução do volume de solvente orgânico utilizado, tendo sido proposta para extração de diversas classes de analitos combinada com diferentes sistemas instrumentais [49–51]. No entanto, a sua principal limitação é a estabilidade da gota, que pode ser facilmente perdida na amostra durante a microextração. No sentido de contornar esta desvantagem, Pedersen-Bjegaard e Rasmussen, em 1999 [52], introduziram a HF-LPME [53].

1.3.2.2 Microextração em fase líquida suportada com membrana oca (HF-LPME)

Na HF-LPME, o solvente orgânico é imobilizado nos poros de uma membrana oca (HF - *hollow fiber*), cujo tamanho varia, geralmente, entre 1,5 e 10 cm, formando uma membrana líquida suportada (SLM - *supported liquid membrane*). Para isso, a membrana é simplesmente submersa durante alguns segundos no solvente orgânico, que migra por capilaridade pelas paredes da fibra oca. A elevada porosidade do material permite que um volume considerável de solvente fique imobilizado. Em seguida, o interior da fibra é preenchido com uma solução recetora e o conjunto é inserido na amostra. Durante a microextração, os analitos migram da matriz através da SLM e ficam retidos na solução recetora dentro da fibra oca. Após a extração, a solução recetora é retirada com ajuda de uma microseringa e injetada no sistema instrumental [53].

Com relação às configurações disponíveis para HF-LPME, esta abordagem apresenta duas formas: o uso de duas ou três fases durante o enriquecimento da amostra. No sistema com duas fases (figura 1.10a), um solvente orgânico é imobilizado nos poros da membrana e usado para preencher o interior da mesma como fase recetora, sendo a fase orgânica compatível com GC ou HPLC. Assim, os analitos são extraídos por difusão passiva da amostra aquosa para o solvente orgânico, dependendo o processo do coeficiente de partição entre ambas as fases. No sistema trifásico (figura 1.10b), por outro lado, a solução recetora consiste numa solução aquosa, funcionando o solvente orgânico neste caso como barreira entre a solução recetora e a solução doadora (amostra), não permitindo a mistura das fases aquosas. Sendo a solução recetora aquosa, este sistema é compatível com técnicas instrumentais como HPLC ou CE [54].

Na otimização de um método analítico baseado em HF-LPME, os principais parâmetros a serem considerados são a escolha do tipo de membrana e do solvente orgânico a serem usados, os volumes de solução doadora e recetora, o tempo de extração, assim como o ajuste do pH e da força iônica da matriz. As membranas devem ser hidrofóbicas com elevada porosidade, a fim de serem compatíveis com o solvente orgânico e capazes de imobilizá-lo nas paredes, sendo que geralmente as mais utilizadas são em PP e possuem

porosidade de aproximadamente 70 %, tamanho de poros de 0,2 μm , espessura de parede de 200 μm e diâmetro interno de 600 μm . O solvente, assim como nas demais técnicas de microextração em fase líquida, deve ser imiscível em água. O pH, por sua vez, desempenha um papel importante na HF-LPME no modo trifásico. Idealmente, o pH da amostra deve ser ajustado para que os analitos se encontrem na sua forma não ionizada, enquanto o pH da fase recetora deve ser ajustado a um valor em que os analitos permaneçam na forma ionizada, permitindo assim a difusão dos compostos com interesse [55].

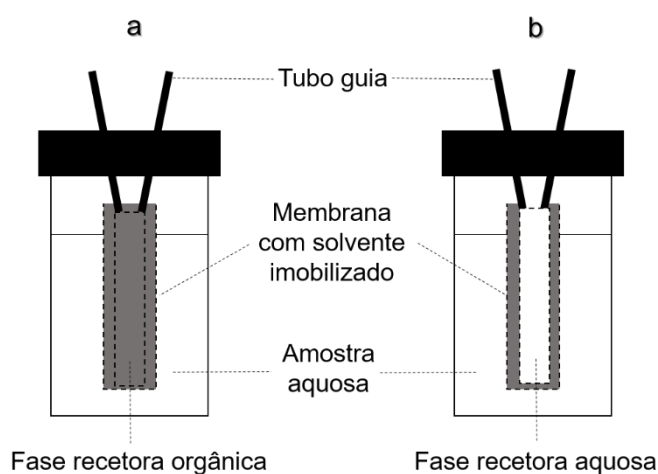


Figura 1.10. Modos de operação em HF-LPME: sistema com duas (a) e três fases (b).

Uma grande vantagem apresentada pela HF-LPME é o elevado fator de enriquecimento que pode ser alcançado com a redução da razão entre as fases recetoras e doadoras, com o uso de apenas poucos μL de fase recetora, aumentando conseqüentemente muito a sensibilidade do método [56]. No entanto, a principal desvantagem da HF-LPME é a dificuldade de manuseio, uma vez o volume de fase recetora a ser retirado do interior da fibra oca com uma microseringa para análise instrumental ser muito pequeno. Outra limitação é a dificuldade de automatização do sistema, sendo limitada para análise de rotina.

Outras configurações envolvendo HFs são referenciadas na literatura, como a adaptação da membrana em formato de U, na qual se utilizam duas seringas para injeção e remoção da solução recetora do interior da membrana. Outra possibilidade reside no uso da HF em forma de haste, com uma das pontas selada, sendo também necessário o uso de uma microseringa para adição e

remoção do solvente [57]. Uma outra variante é a *solvent bar microextraction* (SBME) proposta por Lee e colaboradores [58], na qual um solvente orgânico é imobilizado no poros de uma HF de 2 cm de comprimento com ambas as pontas seladas, e o conjunto utilizado como dispositivo analítico a flutuar na amostra sob agitação. No final do processo de microextração, uma das pontas da HF é cortada e uma alíquota de 1 µL do solvente orgânico é retirado com ajuda de uma microseringa e injetado no sistema de GC. Apesar de esta ser uma abordagem mais simplificada do que a ideia original por HF-LPME, a manipulação de todo o aparato envolvido continua a ser algo laborioso, sendo indispensável o uso de microseringas.

1.3.2.3 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Uma outra importante técnica baseada em líquidos é a DLLME, introduzida em 2006 por Razzae e colaboradores [59]. Nesta técnica, os analitos são extraídos da amostra aquosa para um solvente extrator, imiscível com a matriz, com a ajuda de um solvente dispersor, miscível em ambas as fases. A microextração é realizada num tubo de fundo cônico contendo a amostra e ocorre normalmente em duas etapas, como representada na figura 1.11. Na primeira delas injeta-se rapidamente na amostra uma mistura adequada de solventes extrator e dispersor. O solvente extrator é disperso então na matriz, facilitado pelo solvente dispersor, na forma de microgotas, provocando a partição dos analitos para a fase orgânica. Uma vez a área superficial entre a amostra aquosa e o solvente extrator ser muito grande, atinge-se o equilíbrio com enorme rapidez e a microextração é independente do tempo, sendo a principal vantagem desta abordagem. A segunda etapa consiste na centrifugação da solução resultante com transferência da fase sedimentada para um vial, seguida de análise instrumental.

Do ponto de vista teórico, a DLLME baseia-se na partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis, a amostra aquosa e o solvente orgânico. Os fatores que mais afetam a eficiência do processo são o tipo e o volume dos solventes extrator e dispersor envolvidos. O solvente extrator deve possuir densidade maior que a da água a fim de permitir a formação da fase

sedimentada. O volume utilizado determina o fator de concentração da técnica, devendo-se otimizar o volume para que se obtenha um elevado fator de concentração com a formação de uma quantidade suficiente de fase sedimentada, permitindo a realização das análises subsequentes. Por outro lado, a quantidade de solvente dispersor a ser utilizada para garantir boa formação das microgotas depende do volume da fase aquosa e também do volume de solvente extrator [60].

A DLLME tem sido aplicada na análise de diversas classes de compostos no domínio das áreas ambiental, alimentar e biológica, uma vez ser um método simples, eficiente e ainda apresentar tempo de equilíbrio bastante rápido [61,62]. A principal desvantagem reside na necessidade da etapa de separação de fases ser geralmente realizada por centrifugação, o que dificulta a automatização com os sistemas de análise instrumental. Além disso, os solventes orgânicos utilizados como fase extrativa são geralmente clorados, em dissonância com os princípios da GAC.

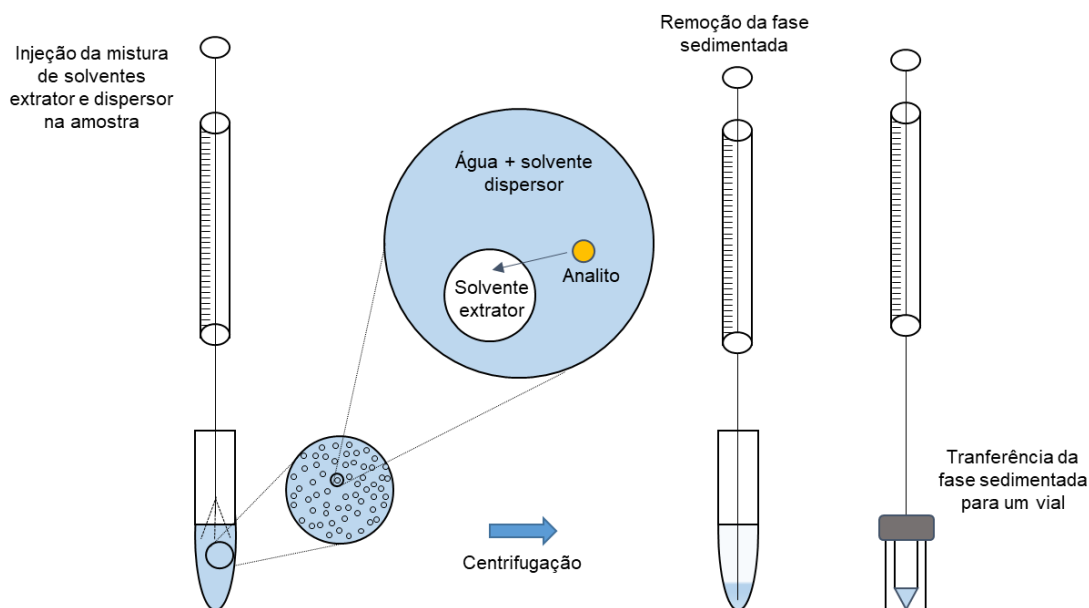


Figura 1.11. Etapas envolvidas no procedimento experimental da DLLME.

1.3.3 Principais vantagens e limitações das técnicas modernas de preparação de amostras

Sendo a preparação de amostras a etapa mais importante e limitativa em qualquer processo analítico, uma vez ser a principal responsável por eventuais erros associados e tempo despendido, é justificável o enorme desenvolvimento nesta área que vem ocorrendo nas últimas décadas. Embora existam na literatura diferentes técnicas para enriquecimento de amostras, é praticamente impossível eleger apenas uma como abordagem universal, sendo portanto necessário levar em consideração as características do analito, bem como o tipo da amostra a ser estudada. Contudo, entre as técnicas de microextração anteriormente descritas e resumidas na figura 1.12, é difícil selecionar uma que apresente simultaneamente simplicidade, baixo custo, facilidade de manipulação, seja completamente ecológica e com possibilidade de automatização para análise de rotina, apresentando todas elas vantagens e limitações.

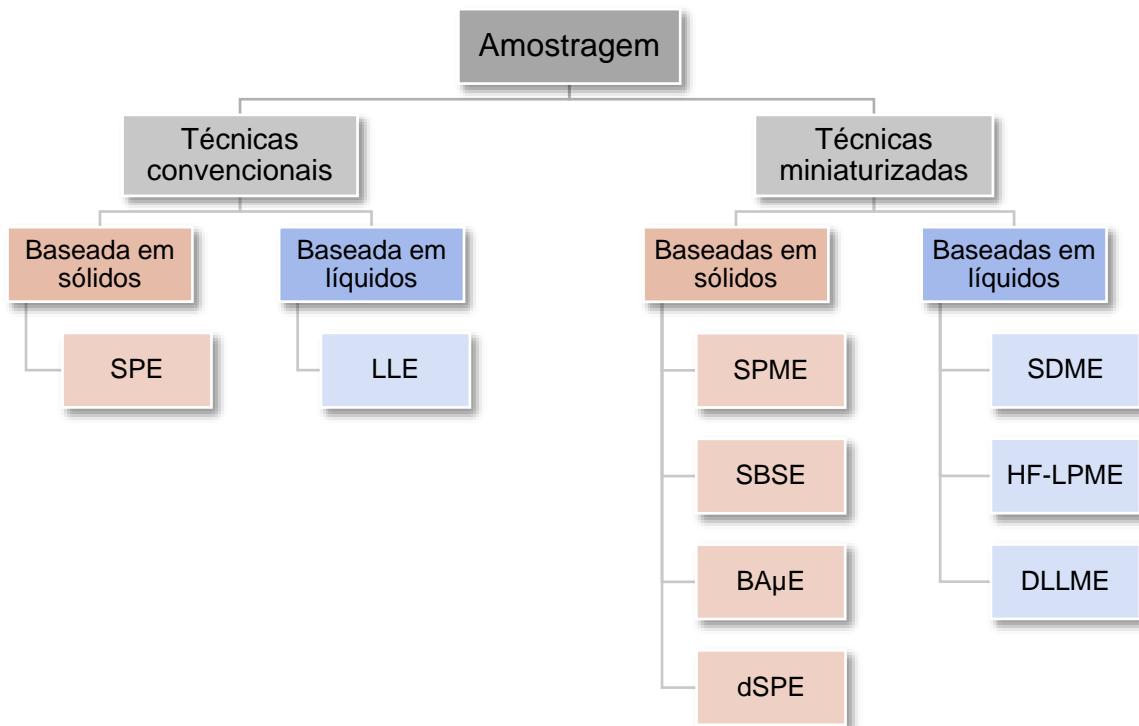


Figura 1.12. Resumo dos principais métodos de preparação de amostras atualmente mais utilizados para análise vestigial.

As técnicas de microextração baseadas em sólidos como SPME, SBSE, BA μ E e dSPE, além de serem de fácil aplicação, são consideradas mais amigas do ambiente, podendo as duas primeiras serem automatizadas para uso em rotina. Porém, estas técnicas necessitam sempre uma etapa de retroextração, realizada por LD ou TD, dependendo das propriedades dos analitos e das matrizes envolvidas. A TD consiste na opção ecologicamente mais favorável, uma vez ser uma abordagem *solventless*. Porém, é apenas compatível com sistemas de GC e dedicada para compostos desde voláteis a semi-voláteis. Em contrapartida, apesar de a LD ser mais versátil, menos onerosa e permitir reanálises, a limitação encontra-se no maior tempo despendido devido à exigência de múltiplos passos de manipulação, dificultando o seu uso para análise de rotina.

Por outro lado, as técnicas de microextração baseadas em líquidos, como a SDME, a HF-LPME e a DLLME, apresentam cinética rápida e possibilitam elevado fator de concentração. Contudo, apesar de utilizarem materiais simples e baratos para aplicação, do ponto de vista prático exigem diversos passos de manipulação da amostra e são de difícil automatização.

Neste contexto, face às diversas desvantagens apontadas pelas técnicas mencionadas, é imperativa a concepção de novas ideias para o desenvolvimento de abordagens dedicadas à análise de rotina, com elevado custo-benefício e compatíveis com sistemas cromatográficos convencionais disponíveis em qualquer laboratório de química analítica. Outro desafio consiste em alcançar o compromisso entre a qualidade dos resultados obtidos em química analítica utilizando processos mais simples e com o mínimo de impacto ambiental.

1.4 Referências

- [1] V. Geissen, H. Mol, E. Klumpp, G. Umlauf, M. Nadal, M. van der Ploeg, S.E.A.T.M. van de Zee, C.J. Ritsema, Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management, *Int. Soil Water Conserv. Res.* 3 (2015) 57–65.
- [2] K. Kümmerer, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use—present knowledge and future challenges, *J. Environ. Manage.* 90 (2009) 2354–66.

- [3] S.D. Richardson, S.Y. Kimura, *Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues*, *Anal. Chem.* 88 (2016) 546–582.
- [4] M. Gavrilescu, K. Demnerová, J. Aamand, S. Agathos, F. Fava, *Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation*, *N. Biotechnol.* 32 (2015) 147–156.
- [5] M. Lei, L. Zhang, J. Lei, L. Zong, J. Li, Z. Wu, Z. Wang, *Overview of emerging contaminants and associated human health effects*, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015) 1–12.
- [6] Y. Chen, Z. Guo, X. Wang, C. Qiu, *Sample preparation*, *J. Chromatogr. A.* 1184 (2008) 191–219.
- [7] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [8] É.A. Souza-Silva, R. Jiang, A. Rodríguez-Lafuente, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, *A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis*, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 224–235.
- [9] É.A. Souza-Silva, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, *A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis*, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 236–248.
- [10] É.A. Souza-Silva, N. Reyes-Garcés, G.A. Gómez-Ríos, E. Boyaci, B. Bojko, J. Pawliszyn, *A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications*, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 249–264.
- [11] E. Baltussen, P. Sandra, *Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles*, *J. Microcolumn* 11 (1999) 737–747.
- [12] J.M.F. Nogueira, *Stir-bar sorptive extraction : 15 years making sample preparation*, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 214–223.
- [13] J.M.F. Nogueira, *Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE): uma metodologia inovadora para microextração estática*, *Sci. Chromatogr.* 4 (2012) 259–269.
- [14] N.R. Neng, A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, *Adsorptive micro-extraction techniques-Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media*, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7303–7310.
- [15] J.M.F. Nogueira, *Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques*, *Anal. Chim. Acta.* 757 (2012) 1–10.
- [16] N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, *Cork-based activated carbons as supported adsorbent materials for trace level analysis of ibuprofen and clofibrac acid in environmental and biological matrices*, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 6263–6270.
- [17] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction (BA μ E) coated with mixed sorbent phases-Enhanced selectivity for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in real matrices in combination with capillary electrophoresis*, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1008 (2016) 115–124.
- [18] A.H. Ide, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Enhancement for trace analysis of sulfonamide antibiotics in water matrices using bar adsorptive microextraction (BA μ E)*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 593–599.

- [19] S.M. Ahmad, A.H. Ide, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Application of bar adsorptive microextraction to determine trace organic micro-pollutants in environmental water matrices, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* (2017) 1–15.
- [20] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Development of a bar adsorptive micro-extraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1355–1364.
- [21] C. Almeida, A. Stępkowska, A. Alegre, J.M.F. Nogueira, Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases, *J. Chromatogr. A.* 1311 (2013) 1–10.
- [22] N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices, *Talanta.* 83 (2011) 1643–1649.
- [23] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction-Application to trace level analysis of fungicides in real matrices, *J. Chromatogr. A.* 1265 (2012) 7–16.
- [24] N.R. Neng, R.P. Santalla, J.M.F. Nogueira, Determination of tributyltin in environmental water matrices using stir bar sorptive extraction with in-situ derivatisation and large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta.* 126 (2014) 8–11.
- [25] F.N. Andrade, A.H. Ide, N.R. Neng, F.M. Lanças, J.M.F. Nogueira, Determination of trace levels of triazines in corn matrices by bar adsorptive microextraction with a molecularly imprinted polymer, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 756–761.
- [26] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Application of bar adsorptive microextraction (BA μ E) for anti-doping control screening of anabolic steroids in urine matrices, *J. Chromatogr. B.* 969 (2014) 35–41.
- [27] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *Talanta* Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA μ E), 136 (2015) 145–154.
- [28] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique-Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices, *Talanta.* 120 (2014) 126–134.
- [29] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases, *J. Chromatogr. A.* 1348 (2014) 17–26.
- [30] C. Almeida, S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, Bar adsorptive microextraction technique - application for the determination of pharmaceuticals in real matrices, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 2093–2106.
- [31] B. Socas-Rodríguez, A. V. Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, Dispersive Solid-Phase Extraction, *Anal. Sep. Sci.* 1 (2015) 1525–1570.
- [32] M. Safarikova, I. Safarik, Magnetic solid-phase extraction, *J. Magn. Magn. Mater.* 194 (1999) 108–112.
- [33] A. Kaiser, E.S. Neto, L.H. Viana, F.M. Lanças, C.E.D. Nazario, Extração em Fase Sólida Magnética (MSPE): Fundamentos e Aplicações, *Sci. Chromatogr.* 8 (2016) 239–256.

- [34] H.B. Zheng, J.Z. Mo, Y. Zhang, Q. Gao, J. Ding, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, Facile synthesis of magnetic molecularly imprinted polymers and its application in magnetic solid phase extraction for fluoroquinolones in milk samples, *J. Chromatogr. A.* 1329 (2014) 17–23.
- [35] J. Chen, X. Zhu, Magnetic solid phase extraction using ionic liquid-coated core-shell magnetic nanoparticles followed by high-performance liquid chromatography for determination of Rhodamine B in food samples, *Food Chem.* 200 (2016) 10–15.
- [36] C. Herrero-Latorre, J. Barciela-García, S. García-Martín, R.M. Peña-Crecente, J. Otárola-Jiménez, Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: A review, *Anal. Chim. Acta.* 892 (2015) 10–26.
- [37] F. Maya, C. Palomino Cabello, R.M. Frizzarin, J.M. Estela, G. Turnes Palomino, V. Cerdà, Magnetic solid-phase extraction using metal-organic frameworks (MOFs) and their derived carbons, *Trends Anal. Chem.* 90 (2017) 142–152.
- [38] E. Esmaeili-Shahri, Z. Es'haghi, Superparamagnetic Fe₃O₄@SiO₂ core-shell composite nanoparticles for the mixed hemimicelle solid-phase extraction of benzodiazepines from hair and wastewater samples before high-performance liquid chromatography analysis, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 4095–4104.
- [39] S. Zhang, W. Yao, J. Ying, H. Zhao, Polydopamine-reinforced magnetization of zeolitic imidazolate framework ZIF-7 for magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from the air-water environment, *J. Chromatogr. A.* 1452 (2016) 18–26.
- [40] H. Yan, M. Gao, C. Yang, M. Qiu, Ionic liquid-modified magnetic polymeric microspheres as dispersive solid phase extraction adsorbent: A separation strategy applied to the screening of sulfamonomethoxine and sulfachloropyrazine from urine, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2669–2677.
- [41] G. Sheykhaghaei, M.H. Sadr, S. Khanahmadzadeh, Synthesis and characterization of core-shell magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective extraction of tizanidine in human plasma, *Bull. Mater. Sci.* 39 (2016) 647–653.
- [42] C.S. Binellas, C.D. Stalikas, Magnetic octadecyl-based matrix solid-phase dispersion coupled with gas chromatography with mass spectrometry in a proof-of-concept determination of multi-class pesticide residues in carrots, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 3575–3581.
- [43] X. Yu, H. Yang, Pyrethroid residue determination in organic and conventional vegetables using liquid-solid extraction coupled with magnetic solid phase extraction based on polystyrene-coated magnetic nanoparticles, *Food Chem.* 217 (2017) 303–310.
- [44] H. Liu, P.K. Dasgupta, A Renewable Liquid Droplet as a Sampler and a Windowless Optical Cell. Automated Sensor for Gaseous Chlorine, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4221–4228.
- [45] J.M. Kokosa, Advances in solvent- microextraction techniques, *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 2–13.
- [46] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236–2240.
- [47] Y. He, H.K. Lee, Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4634–4640.
- [48] I.P. de Pinto, M.P. Pedroso, Microextração em gota única (SDME): fundamentos e aplicações, *Sci. Chromatogr.* 7 (2015) 183–198.

- [49] L. Xu, C. Basheer, H.K. Lee, Developments in single-drop microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1152 (2007) 184–192.
- [50] A. Jain, K.K. Verma, Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review, *Anal. Chim. Acta.* 706 (2011) 37–65.
- [51] M.A. Jeannot, A. Przyjazny, J.M. Kokosa, Single drop microextraction-Development, applications and future trends, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2326–2336.
- [52] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid - Liquid - Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650–2656.
- [53] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction, *J. Chromatogr. A.* 1184 (2008) 132–142.
- [54] M. Ghambarian, Y. Yamini, A. Esrafil, Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: Principles and applications, *Microchim. Acta.* 177 (2012) 271–294.
- [55] J. Merib, E. Carasek, Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes, *Sci. Chromatogr.* 5 (2013) 249–262.
- [56] E. Psillakis, N. Kalogerakis, Developments in liquid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 565–574.
- [57] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 1–10.
- [58] X. Jiang, H.K. Lee, Solvent bar microextraction, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5591–5596.
- [59] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1116 (2006) 1–9.
- [60] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2342–2357.
- [61] H.Y. Yan, H. Wang, Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1295 (2013) 1–15.
- [62] M. Saraji, M.K. Boroujeni, Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction *Microextraction Techniques*, 406 (2014) 2027-2066.

Capítulo 2

Objetivos da tese

Apesar de todas as vantagens apresentadas pelas técnicas de microextração descritas, diversas limitações motivam a melhoria das técnicas existentes ou o desenvolvimento de novas abordagens de preparação de amostras, no sentido da maior simplicidade, custo-benefício, eficiência e aplicação em rotina, em sintonia com os princípios da GAC. Neste sentido, a presente dissertação tem como foco o aperfeiçoamento e a introdução de técnicas de microextração estática inovadoras como metodologias para análise vestigial de compostos emergentes em matrizes complexas, tendo como principais objetivos:

- A aplicação da técnica BA μ E na monitorização vestigial de antibióticos (sulfatiazol, sulfametoxazol, sulfadimetoxina e trimetoprim) em amostras aquosas ambientais como alternativa analítica bem estabelecida a outras metodologias;

- O desenvolvimento de uma nova geração de dispositivos BA μ E, permitindo a introdução de um ciclo analítico inovador, com menor manipulação prática e vantagens ao nível do trabalho de rotina para a análise vestigial de compostos polares;

- A aplicação da nova geração de dispositivos BA μ E na determinação de antidepressivos (bupropiona, trazodona, citalopram e amitriptilina) em fluidos biológicos, e de filtros UV (ácido 5-benzoil-4-hidroxi-2-metoxi-benzenosulfónico e ácido 2-fenil-5-benzimidazol sulfónico) em amostras aquosas ambientais e cremes de proteção solar;

- A introdução de uma nova técnica híbrida, microextração em fibra oca (HF μ E - *hollow fiber microextraction*), que utiliza membranas embebidas em solventes orgânicos operando sob a tecnologia de amostragem por flutuação, dedicada à análise vestigial de compostos apolares;

- A aplicação da HF μ E na determinação de traços de 18 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e de 17 pesticidas organoclorados em matrizes ambientais e alimentares.

Capítulo 3

Parte experimental

3.1 Padrões analíticos

Entre os antibióticos estudados, o trimetoprim (TMP, 98%), o sulfametoxazol (SMX) e o sulfatiazol (STZ, 98%) foram adquiridos à Sigma Aldrich (Alemanha) e a sulfadimetoxina (SDM) foi obtida pela Fluka (Suíça). Para o estudo dos agentes antidepressivos, o cloridrato de bupropiona (BUP, > 98,0 %) e o bromidrato de citalopram (CIT, > 98,0 %) foram adquiridos à TCI Chemicals (Bélgica). O cloridrato de amitriptilina (AMI, > 98,0 %) e o cloridrato de trazodona (TRA, > 99,0 %) foram obtidos pela Sigma Aldrich. Os filtros UV estudados, nomeadamente o ácido 2-fenil-5-benzemidazolesulfônico (PBS, 96 %) e o ácido 5-benzoil-4-hidroxi-2-metoxi-benzenossulfônico (BZ4, $\geq 97,0$ %) foram adquiridos à Sigma Aldrich. As misturas de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs, 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em benzeno:diclorometano (50:50) e de pesticidas organoclorados (OCPs, 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em tolueno:hexano (50:50) foram adquiridas da Supelco (Estados Unidos).

3.2 Reagentes químicos

O metanol (MeOH, 99,9 %), acetonitrilo (ACN, 99,9 %), diclorometano (DCM, 99,9 %), acetato de etilo (EtOAc, 99,9 %), *n*-hexano (*n*-C6, 96 %), *n*-heptano (*n*-C7, 99,2 %) e etanol (EtOH, 99,9 %), de qualidade para HPLC, e os ácidos clorídrico (HCl, 37 %) e acético (99,8 %) foram fornecidos pela Carlo Erba (Itália). O *n*-octano (*n*-C8, 99 %) e o *n*-nonano (*n*-C9, 99 %) foram obtidos pela Fluka (Suíça), o tert-butil-metileter (MTBE, 98 %) pela Sigma Aldrich (Alemanha), a acetona (Ace, 99,5 %) pela Lab-Scan (Polônia), o tolueno (Tol, 99 %) e o clorofórmio (Clor, 99 %) pela Koch Light (Reino Unido). O cloreto de sódio (NaCl, 99,5 %) e o hidróxido de sódio (NaOH, 98,9 %) foram fornecidos pela BDH Chemicals (Reino Unido). A água ultrapura utilizada foi obtida através de um sistema de purificação de água Mili-Q (Milipore, Estados Unidos).

3.3 Material corrente e equipamento de laboratório

Para o desenvolvimento do presente trabalho, além de materiais de vidro corrente de laboratório, foram igualmente usadas microseringas analíticas com êmbolo flexível de 10, 50, 100 e 500 μL (Hamilton, Estados Unidos), frascos de vidro para amostragem de 25 mL (VWR Internacional, Portugal) com tampas de borracha (20 mm) e barras de agitação magnética (15 \times 4,5 mm; VWR Internacional, Portugal). Foram usados *vials* transparentes de 1,5 mL (VWR Internacional, Portugal), tampas (diâmetro = 11 mm), *inserts* (200 μL , 31 \times 6 mm; VWR Internacional, Portugal) e um encapsulador manual (Agilent Technologies, Estados Unidos).

Todos os ensaios de microextração foram efetuados em placas de agitação magnética com quinze posições (Variomag, Alemanha). As pesagens foram efetuadas numa balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça), e as medições de pH num medidor de pH modelo 744 pH Meter, equipado com um elétrodo de vidro combinado (Metrohm, Suíça). Foi igualmente usado um vortex (Velp, Itália), um banho de ultrassons equipado com termóstato modelo 3510 E-DTH (Branson, Estados Unidos) e uma estufa modelo ED 115/E2 (Binder, Alemanha).

O presente trabalho foi desenvolvido com recurso aos seguintes sistemas analíticos, um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrómetro de massa (GC-MS), um cromatógrafo líquido de alta eficiência com deteção por rede de díodos (HPLC-DAD) ambos da Agilent Technologies (Alemanha) e um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrómetro de massa (LC-MS/MS) da Waters (Estados Unidos). O sistema GC-MS era constituído por um GC (Agilent 6890 Series) equipado com amostrador automático (Agilent 7683) e injetor de vaporização com temperatura programada (PTV), acoplado ao detetor seletivo de massa (Agilent 5973N). O registo de dados e o controlo instrumental foram efetuados a partir do *software* MS ChemStation (G1701; versão E.02.02.1431; Agilent Technologies). A coluna capilar utilizada foi a TRB-5MS (30 m de comprimento \times 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 μm de espessura de fase estacionária; 95 % dimetil, 5 % difenil polisiloxano) da Teknokroma (Espanha). O sistema de HPLC-DAD era constituído por diversos módulos, nomeadamente desgaseificador (G1322A), bomba quaternária (G1311A), amostrador automático (G1313A), compartimento da coluna

termostatizado (G1316A) e DAD (G1315B). O registo de dados e controlo instrumental foram efetuados a partir do *software* LC3D ChemStation (versão Rev.A.10.02.1757; Agilent Technologies). As análises foram efetuadas numa coluna Kinetex C18 (150 × 4,6 mm, 2,6 µm; Phenomenex, Estados Unidos). O sistema LC-MS/MS era equipado com fonte de ionização por *eletrospray* (Micromass Quattro Micro API, Waters, Estados Unidos), tendo sido os analitos separados numa coluna Sunfire C18 (150 × 3,0 mm, 5,0 µm, Waters). O registo de dados e o controlo instrumental foi realizado usando o *software* Waters MassLynx v4.1.

3.4 Fases sorventes

Os ACs usados tinham as seguintes características: CA1 (área superficial 1400 m² g⁻¹; pHPZC: 2,2) e CN1 (área superficial 1400 m² g⁻¹; pHPZC: 6,4) fornecidos pela Salmon & Cia (Portugal) e R (área superficial 937 m² g⁻¹; pHPZC: 6,5) obtido pela Riedel-de-Haen (Alemanha).

Foram utilizadas as seguintes fases poliméricas: *N*-vinilpirrolidona-divinilbenzeno (HLB, tamanho de partícula 30 µm, área superficial 810 m² g⁻¹ e estabilidade de pH: 1-14), troca catiónica fraca (WCX, tamanho de partícula 30-60 µm, área superficial 830 m² g⁻¹ e estabilidade de pH: 0-14) e troca catiónica forte (MCX, tamanho de partícula 30-60 µm, área superficial 830 m² g⁻¹ e estabilidade de pH: 0-14) obtidas pela Waters; poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB, tamanho de partícula 40-120 µm, área superficial 1200 m² g⁻¹ e estabilidade de pH: 1-13) fornecido pela Merck e *N*-vinilpirrolidona (SX, tamanho de partícula 33 µm, área superficial 800 m² g⁻¹ e estabilidade de pH: 1-14) fornecido pela Phenomenex.

3.5 Fibras ocas

Foram utilizadas fibras ocas (membranas) de PP (Accurel Q3/2, diâmetro interno 600 µm, espessura da parede 200 µm e 0,2 µm tamanho de poro) obtidas pela 3M (Alemanha).

3.6 Amostras

Todas as amostras utilizadas no presente trabalho foram obtidas em Portugal. As amostras de água (potável, superficial, estuarina e marítima) e de solo foram recolhidas na região metropolitana de Lisboa. As amostras de efluentes foram obtidas nas Estações de Tratamento de Águas Residuárias de Beirolas e Alcântara (Lisboa). Os fluidos biológicos (plasma e urina) foram gentilmente cedidos pela Clínica Joaquim Chaves Saúde (Lisboa). As amostras de fígado de peixe eram provenientes do mercado do peixe de Peniche. O chá e o tomate foram adquiridos em supermercados locais.

3.7 Procedimento experimental

3.7.1 Preparação das soluções de trabalho

As soluções estoque de antibióticos, antidepressivos e filtros UV foram preparadas a partir da pesagem rigorosa de 5,0 mg de cada padrão analítico dissolvidos em MeOH em balões volumétricos de 5,0 mL, tendo concentração final de 1000 mg L⁻¹. A solução estoque de PAHs foi preparada também em MeOH (100 mg L⁻¹) e a de OCPs em etanol (100 mg L⁻¹), a partir da diluição dos conteúdos das ampolas. As soluções mistura foram preparadas semanalmente a partir da diluição das soluções estoque. As soluções de trabalho e de calibração instrumental, por sua vez, foram preparadas diariamente por meio da diluição adequada das soluções mistura. Todas as soluções foram armazenadas e conservadas à temperatura de -20 °C.

3.7.2 Condições de operação instrumental

3.7.2.1 HPLC e LC-MS/MS

Para alcançar as melhores condições instrumentais por HPLC-DAD, os compostos alvo foram analisados individualmente com a finalidade de obter os respectivos tempos de retenção e espectros de UV-Vis. As condições de análise selecionadas para cada classe de analitos estudados, nomeadamente o volume de injeção, o fluxo e a composição da fase móvel e o comprimento de onda estão descritas na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Condições experimentais utilizadas para análise de cada classe de compostos estudados por HPLC-DAD.

Compostos	Volume de injeção (μL)	Fluxo (ml min⁻¹)	Composição da fase móvel	Comprimento de onda (λ_{max}, nm)
Antibióticos	15	0,5	Eluente A: H ₂ O com 2,5 % de CH ₃ COOH Eluente B: MeOH 0-5 min: 20 % B 5-15 min: 20-30 % B 15-25 min: 30-95 % B 25-35 min: 95-20 % B 35-38 min: 20 % B	260
Antidepressivos	20	0,5	Eluente A: H ₂ O com 2,5 % de CH ₃ COOH Eluente B: ACN 0-5 min: 20 % B 5-8 min: 20-30 % B 8-15 min: 30-60 % B 15-25 min: 60-20 % B 25-28 min: 20 % B	254
Filtros UV	20	0,5	Eluente A: Tampão acetato 20 mM pH 4,75 Eluente B: MeOH Isocrático com 30 % B	300

Nos ensaios de validação do método para análise dos compostos antidepressivos realizados por LC-MS/MS, a fase móvel consistiu numa mistura de água com 0,1 % de CH₃COOH (A) e ACN (B) de acordo com o seguinte gradiente: 0 min, isocrático com 1 % B, 0-8 min 1-100 % B, 8-15 min 100-1 % B. O fluxo utilizado foi de 0,3 mL min⁻¹ e o volume de injeção de 20 µL. A fonte ESI operou com voltagem capilar de 3 kV, temperatura de 120 °C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, fluxo de gás de cone de 50 L h⁻¹ e fluxo de gás de dessolvatação de 750 L h⁻¹. Foi utilizado o modo de monitorização de reações múltiplas (MRM) por forma a alcançar melhor seletividade e sensibilidade. Neste sentido, soluções estoque individuais de cada analito foram injetadas diretamente no sistema LC-MS/MS no modo varrimento contínuo, permitindo a monitorização dos iões precursores numa gama de *m/z* compreendida entre 50 e 400 Da. Os espectros de massa foram obtidos no modo de ionização positiva, tendo sido selecionadas duas transições (quantificação e confirmação) para cada composto, conforme apresentadas na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Transições selecionadas para análise de cada antidepressivo estudado por LC-MS/MS no modo MRM.

Composto	Íon precursor	Precursor → Produto (<i>m/z</i>) ^a	Precursor → Produto (<i>m/z</i>) ^b
CIT	[M+H] ⁺	325,0 > 108,8	325,0 > 262,0
AMI	[M+H] ⁺	278,1 > 90,8	278,1 > 233,0
BUP	[M+H] ⁺	240,0 > 184,0	240,0 > 166,0
TRA	[M+H] ⁺	372,0 > 176,1	372,0 > 147,9

^a: quantificação

^b: confirmação

3.7.2.2 GC-MS

Para alcançar as melhores condições instrumentais, recorreu-se a injeção de uma solução mistura dos analitos no GC-MS operando no modo varrimento contínuo (*full-scan*). A partir dos dados obtidos, os compostos alvo foram analisados individualmente para obter os parâmetros de retenção e espectros de massa correspondentes. De seguida foram selecionados o ião alvo (pico base)

e os principais fragmentos, divididos em diversos grupos, com a finalidade de alcançar o compromisso entre a seletividade e a sensibilidade para posterior operação no modo SIM, conforme apresentados na tabela 3.3.

O gradiente de temperatura do forno para o estudo dos PAHs por GC-MS foi: 60 °C (durante 1 min) incremento até os 300 °C a 15 °C min⁻¹ e mantido isotérmico durante 10 min, com tempo total de análise de 27,00 min. O volume de injeção foi de 1 µL no modo *splitless* com temperatura isotérmica (280 °C) no injetor.

Para o estudo dos OCPs, recorreu-se a injeção PTV usando um *liner* preenchido com lã de vidro e arrefecido com ar comprimido, operando no modo *solvent vent*. As condições de operação foram as seguintes: tempo de *vent*: 0,40 min, fluxo: 50 mL min⁻¹ e pressão: 0 psi, fluxo de purga: 60 mL min⁻¹, tempo: 2 min. A temperatura do injetor foi programada desde os 55 °C (0,40 min) até aos 300 °C a 600 °C min⁻¹ (isotérmica até final da análise). A programação da temperatura do forno teve início aos 60 °C (durante 1 min), incremento até os 130 °C a 50 °C min⁻¹ (durante 1 min), incremento até os 180 °C a 12 °C min⁻¹, seguido de incremento até os 240 °C a 7 °C min⁻¹ e, finalmente, até os 315 °C a 12 °C min⁻¹ e mantida isotérmica durante 2 min, com tempo total de análise de 24,39 min.

A fase móvel usada foi hélio com elevada pureza (99,999 %, GASIN, Espanha) mantida no modo de pressão constante (pressão média: 9,80 psi). As temperaturas da linha de transferência, fonte de ionização e quadrupolo foram mantidas a 280, 230 e 150 °C, respetivamente, tendo sido selecionado um *solvent delay* de 5,5 min.

Utilizou-se ionização eletrónica (70 eV), operando na gama de massas compreendida entre 35 e 550 Da no modo de varrimento contínuo, com uma corrente de ionização de 34,6 µA e um potencial multiplicador de 1200 V. Para operar no modo de monitorização de iões selecionados (SIM), diversos fragmentos característicos de cada analito foram monitorizados em janelas de tempo definidas de acordo com o correspondente tempo de retenção e correspondente espectro de massa, usando um *dwell time* de 100 ms.

Tabela 3.3. Iões alvo e fragmentos selecionados para análise dos PAHs e OCPs por GC-MS(SIM).

PAHs	Grupo	Ião (m/z) ^a	OCPs	Grupo	Ião (m/z) ^a
Naftaleno	1	127, <u>128</u> , 129	α-BHC	1	111, <u>181</u> , 219
1-Metilnaftaleno	2	115, 141, <u>142</u>	γ-BHC		109, <u>183</u> , 219
2-Metilnaftaleno		115, 141, <u>142</u>	β-BHC		111, <u>181</u> , 219
Acenaftileno	3	151, <u>152</u> , 153	Heptacoloro	2	100, <u>272</u> , 274
Acenafteno		152, <u>153</u> , 154	Aldrina		66, <u>263</u> , 265
Fluoreno	4	165, <u>166</u> , 167	Heptacoloro epóxido		81, 263, <u>353</u>
Fenantreno	5	176, <u>178</u> , 179	γ-Clordano	3	237, 272 <u>373</u>
Antraceno		89, <u>178</u> , 179	α-Clordano		237, 272, <u>373</u>
Fluoranteno	6	201, <u>202</u> , 203	α-Endosulfão		195, <u>241</u> , 265
Pireno		201, <u>202</u> , 203	4,4'-DDE	176, <u>246</u> , 318	
Benzo[a]antraceno	7	114, <u>228</u> , 229	Dieldrina	4	<u>79</u> , 263, 277
Criseno		114, <u>228</u> , 229	Endrina		243, <u>263</u> , 281
Benzo[a]fluoranteno	8	126, <u>252</u> , 253	β-Endosulfão		159, <u>195</u> , 237
Benzo[k]fluoranteno		125, <u>252</u> , 253	4,4'-DDD	165, <u>235</u> , 237	
Benzo[a]pireno		126, <u>252</u> , 253	Endrina aldeído	67, 250, <u>345</u>	
Indeno[1,2,3-cd]pireno	9	138, <u>276</u> , 227	4,4'-DDT	5	165, <u>235</u> , 237
Dibenzo[a,h]antraceno		139, <u>278</u> , 279	Metoxicloro		152, <u>227</u> , 212
Benzo[g,h,i]perileno		138, <u>276</u> , 277			

^a Iões de quantificação (sublinhados) e iões qualificadores (fragmentos).

3.7.3 Preparação dos dispositivos analíticos para microextração

3.7.3.1 BA μ E

A preparação de todos os dispositivos analíticos utilizados neste trabalho foi efetuada *home-made* [1,2]. Os dispositivos BA μ E convencionais utilizados no estudo dos antibióticos [3] possuíam comprimento de 7,5 mm e diâmetro de 3 mm, sendo constituídos por um suporte cilíndrico em PP revestido com o material sorvente finamente dividido que foi fixado com adesivo adequado. A nova geração de dispositivos BA μ E utilizada nos estudos dos antidepressivos e dos filtros UV [4] foi preparada da mesma forma, embora o suporte fosse em *nylon* flexível com dimensões de 7,5 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro. Os dispositivos foram sempre lavados com água ultrapura para remoção de possíveis impurezas antes de serem utilizados.

3.7.3.2 HF μ E

As HFs usadas nos estudos dos PAHs e OCPs [5] foram preparadas a partir do corte manual das membranas comerciais para obter dispositivos analíticos com 10 mm de comprimento. As HFs foram lavadas com acetona e água ultrapura para remoção de impurezas. Para o preparo da microextração, as HFs foram imersas no solvente orgânico apropriado, sendo que cerca de 20 a 25 μ L de solvente extrator ficava adsorvido nas paredes porosas das membranas e então as fibras foram imediatamente inseridas nos *vials* de amostragem.

3.7.4 Procedimento para a etapa de microextração

Os ensaios de microextração realizados durante as etapas de otimização e validação do método foram efetuados adicionando-se 25 mL de água ultrapura em frascos de vidro de amostragem e uma barra de agitação magnética convencional. De seguida, o dispositivo analítico foi colocado na solução, sendo

então a água fortificada com determinado volume da solução padrão com uma concentração adequada para a obtenção de uma concentração final desejada. O frasco foi rapidamente selado e a microextração promovida por meio da agitação da barra magnética durante um determinado período de tempo, a uma dada velocidade, sob temperatura ambiente. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado. Foram igualmente realizados ensaios em branco, que correspondem a todo o processo experimental descrito, mas usando água ultrapura sem qualquer fortificação.

3.7.5 Procedimentos para a etapa de retroextração

Na etapa de retroextração, o dispositivo analítico foi removido do frasco de amostragem e introduzido num *vial* contendo um *insert* e solvente orgânico apropriado. De seguida, efetuaram-se dois tipos de procedimentos diferentes para LD:

- Ensaios com antibióticos: a amostra foi submetida ao tratamento ultrassónico por determinado tempo, de seguida o dispositivo analítico foi removido do *vial*, que foi posteriormente selado e submetido a análise instrumental [3].

- Ensaios com antidepressivos, filtros UV, PAHs e OCPs: o *vial* foi imediatamente selado, submetido a tratamento ultrassônico e levado para a análise instrumental [4,5].

3.7.6 Validação das metodologias analíticas

O processo de validação das metodologias propostas foi realizado de forma semelhante à descrita na seção anterior. No entanto, durante a validação foram efetuados ensaios com diferentes níveis de concentração sob condições experimentais otimizadas para determinação da sensibilidade, linearidade, gama de trabalho e precisão. Foram ainda realizados ensaios em branco usando água ultrapura sem qualquer fortificação. Todos os ensaios relativos à validação foram efetuados em triplicado.

3.7.7 Aplicação a matrizes reais

Os ensaios em matrizes reais foram realizados sob condições experimentais otimizadas e em triplicado. O método da adição de padrão foi sempre adotado para quantificar os analitos em estudo no sentido de suprimir eventuais efeitos de matriz nas amostras reais.

Os ensaios envolvendo amostras de água potável, água superficial, água estuarina, água do mar e efluentes foram realizados conforme o procedimento experimental descrito nas seções anteriores, utilizando um volume de 25 mL sem diluição. Para as amostras de fluidos biológicos, utilizou-se 0,5 mL de plasma e 1,0 mL de urina, sendo o restante volume preenchido com água ultrapura. As amostras sólidas, nomeadamente solo (1,0 g), chá (1,0 g), tomate (0,1 g) e fígado de peixe (0,3 g), passaram por uma etapa prévia de extração com 4 mL de MeOH sob tratamento ultrassônico durante 30 min. De seguida, o sobrenadante foi filtrado e uma alíquota de 1,0 mL foi utilizada no procedimento de microextração sendo o restante volume preenchido com água ultrapura.

3.8 Referências

- [1] N.R. Neng, A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, Adsorptive micro-extraction techniques—Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7303–7310.
- [2] J.M.F. Nogueira, Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques, *Anal. Chim. Acta.* 757 (2012) 1–10.
- [3] A.H. Ide, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Enhancement for trace analysis of sulfonamide antibiotics in water matrices using bar adsorptive microextraction (BA μ E), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 593–599.
- [4] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, New-generation bar adsorptive microextraction (BA μ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach—Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 153 (2018) 126–134.
- [5] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, Hollow fiber microextraction: a new hybrid microextraction technique for trace analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 2911–2920.

Capítulo 4

Determinação de antibióticos (sulfonamidas e trimetoprim) em matrizes ambientais aquosas por BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD

A.H. Ide, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Enhancement for trace analysis of sulfonamide antibiotics in water matrices using bar adsorptive microextraction (BA μ E), J. Pharm. Biomed. Anal. 129 (2016) 593–599 [1].

4.1 Considerações gerais

A presença de PPCPs no meio ambiente é uma questão emergente devido ao uso intensivo e generalizado destes produtos por toda a população [2]. As principais fontes de contaminações com PPCPs são as águas residuais domésticas, que podem conter metabolitos ou compostos parentes excretados na urina e nas fezes. Diversos estudos já demonstraram que muitos desses compostos não são totalmente removidos após o tratamento convencional nas estações de tratamento de águas residuais e os efluentes acabam por contaminar as águas superficiais e subterrâneas [3].

O grande avanço das técnicas analíticas observado nos últimos anos possibilitou a detecção e a quantificação dos PPCPs com concentrações ao nível dos traços, gerando preocupações devido às consequências para a saúde humana e da biota, causadas pela presença dessas substâncias no meio ambiente.

Entre os PPCPs, os antibióticos constituem uma importante classe e, face ao consumo excessivo principalmente nas últimas décadas, bem como a eliminação de drogas não utilizadas, estes compostos podem ser detetados em diversas matrizes, como águas superficiais [4], potável [5] e residuais [6]. O principal problema relacionado com os antibióticos é o surgimento de bactérias resistentes que podem interromper a eficácia dos tratamentos antimicrobianos, causando sérios problemas de saúde pública [7].

As sulfonamidas apresentam um elevado potencial de resistência à degradação quando presentes no meio ambiente e são hidrofílicas o suficiente para ocorrerem predominantemente no meio aquático [8]. Historicamente, já foram muito utilizadas na medicina humana para tratamento de infeções, embora atualmente têm vindo a ser substituídas por outros antibióticos, sendo mais usadas em medicina veterinária. As sulfonamidas são normalmente administradas juntamente com o trimetoprim para potencializar o seu efeito.

Devido aos baixos níveis em que são encontrados no meio ambiente, cujas concentrações variam de ng L⁻¹ a μ g L⁻¹, e ao elevado grau de complexidade das matrizes ambientais, a monitorização destes antibióticos requer o uso de metodologias analíticas adequadas, envolvendo um processo

de enriquecimento da amostra prévio à análise instrumental, normalmente realizada por HPLC ou técnicas hífenadas (LC-MS ou LC-MS/MS).

Atualmente, as técnicas sortivas são as mais usadas, tendo sido aplicadas com sucesso na monitorização vestigial de antibióticos em diversos tipos de matrizes. Apesar de a SPE requerer grandes quantidades de amostra e volume considerável de solventes orgânicos, continua a ser usada com frequência [9–12]. Por outro lado, a SPME [13] e a SBSE [14] também são exemplos de métodos alternativos que podem ser utilizados e apresentam como vantagens o fato de serem técnicas *solventless* e, como tal, ambientalmente mais favoráveis. No entanto, no caso particular da SBSE, quando estão em estudo analitos mais polares ($\log K_{OW} < 3,0$), como é o caso das sulfonamidas, a SBSE(PDMS) apresenta limitações no enriquecimento eficiente dos analitos.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo demonstrar a abrangência da aplicação da técnica BA μ E como alternativa a outras técnicas de enriquecimento de amostras para a análise de quatro antibióticos (sulfatiazol, STZ; sulfametoxazol, SMX; sulfadimetoxina, SDM e trimetoprim, TMP) em matrizes reais, cujas estruturas químicas se encontram representadas na figura 4.1. Para o efeito, foram efetuados ensaios de otimização que consistiram na comparação de diversas fases sorventes, assim como a avaliação dos principais parâmetros que afetam os processos de microextração e retroextração, validação e aplicação a matrizes ambientais.

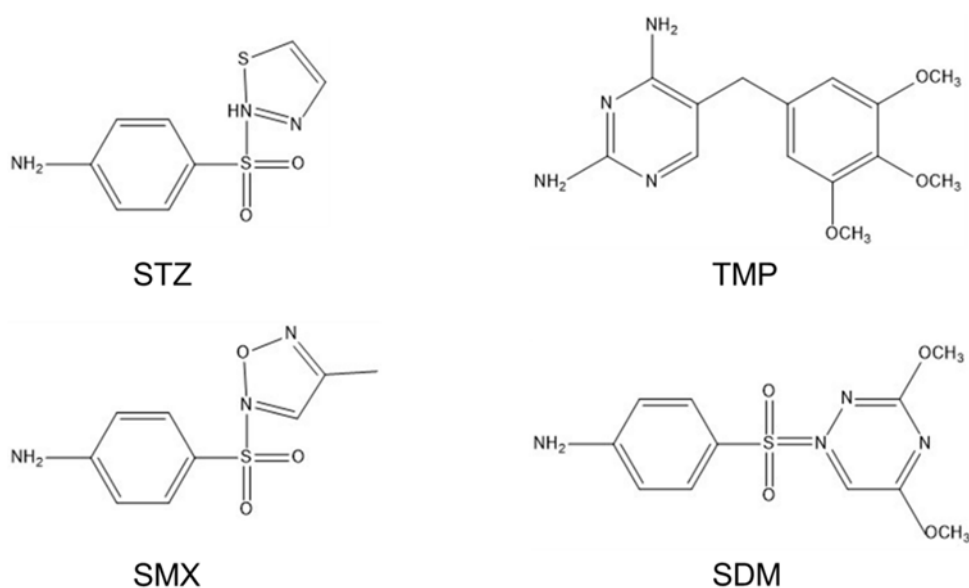


Figura 4.1.Estruturas químicas dos quatro antibióticos estudados.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Otimização instrumental

No presente estudo, quatro antibióticos (STZ, TMP, SMX e SDM; figura 4.1) foram selecionados como compostos modelo. Para se obter as melhores condições de operação instrumental no sistema HPLC-DAD para os analitos, o primeiro passo consistiu na injeção de padrões individuais e misturas a fim de determinar os tempos de retenção, resolução e espectros de absorção UV/vis. De acordo com os resultados obtidos, o comprimento de onda selecionado foi de 260 nm, uma vez que corresponde ao máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) dos compostos alvo. Utilizando uma fase móvel constituída por MeOH e H₂O com 2,5 % de CH₃COOH e uma coluna convencional de fase reversa (25 °C), foi possível obter boa resposta para os quatro antibióticos em estudo num tempo de corrida de 38 min.

A tabela 4.1 resume todos os dados obtidos na calibração instrumental do método.

Tabela 4.1. Log $K_{O/W}$, pK_a , tempos de retenção (t_R), LODs, LOQs, gama linear e coeficientes de determinação para os quatro antibióticos obtidos por HPLC-DAD, sob condições instrumentais otimizadas.

Antibiótico	log $k_{O/W}$	pK_a	t_R (min)	LODs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Gama linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2
STZ	0,05	2,04; 6,93	6,1	2,5	8,3	10,0 - 1000,0	0,9981
TMP	0,91	7,16	9,4	5,0	16,5	10,0 - 1000,0	0,9984
SMX	0,89	1,97; 6,16	15,6	2,5	8,3	10,0 - 1000,0	0,9928
SDM	1,63	1,95; 6,91	23,2	2,5	8,3	10,0 - 1000,0	0,9978

A sensibilidade instrumental foi determinada por intermédio dos LODs e LOQs a partir da injeção sucessiva de padrões de calibração diluídos e calculados com recurso à razão S/N 3 e 10, respetivamente. Desta forma, foram obtidos LODs de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, bem como LOQs de 8,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 16,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as sulfonamidas e TMP, respetivamente. A calibração instrumental foi efetuada com recurso à injeção de padrões de calibração contendo os quatro antibióticos com concentrações compreendidas entre 10,0 e 1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, em

onze níveis. Nesta gama, foi obtida boa linearidade para todos os compostos, com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,9928 (SMX). A injeção somente de solvente evidenciou a ausência de efeitos de memória.

4.2.2 Otimização do método analítico

Durante a implementação de qualquer metodologia analítica, é necessária a otimização de diversos parâmetros que podem afetar a eficiência de recuperação dos analitos em estudo, a fim de se alcançar o máximo desempenho possível. Desta forma, foram realizados ensaios sistemáticos em água ultrapura fortificada ($0,8 \mu\text{g L}^{-1}$) contendo os quatro antibióticos, com o objetivo de otimizar os parâmetros experimentais que poderiam influenciar de modo decisivo a eficiência da BA μ E, nomeadamente a seleção do material sorvente, tempo de extração e velocidade de agitação, pH, força iônica e polaridade da matriz, assim como o tipo e solvente e tempo de LD, de acordo com trabalhos anteriores [15–17].

4.2.2.1 Seleção da fase sorvente

Foram testados diferentes materiais sorventes para revestimento dos dispositivos BA μ E a fim de se obter máxima eficiência na microextração dos quatro antibióticos em estudo. Assim, foram realizados ensaios preliminares com três ACs (R, CN1 e CA1) e dois Ps (SX e PS-DVB) sob condições experimentais padrão; microextração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração: MeOH (100 μL), 15 min sob tratamento ultrassônico.

A figura 4.2 mostra as recuperações médias obtidas para os materiais testados, na qual o PS-DVB apresentou melhor seletividade para todos os analitos, sobretudo em relação aos ACs. Entre as fases estudadas, os ACs são materiais porosos que retêm os solutos por meio de interações eletrostáticas e/ou dispersivas, bem como por propriedades estruturais como área superficial e dimensão dos poros.

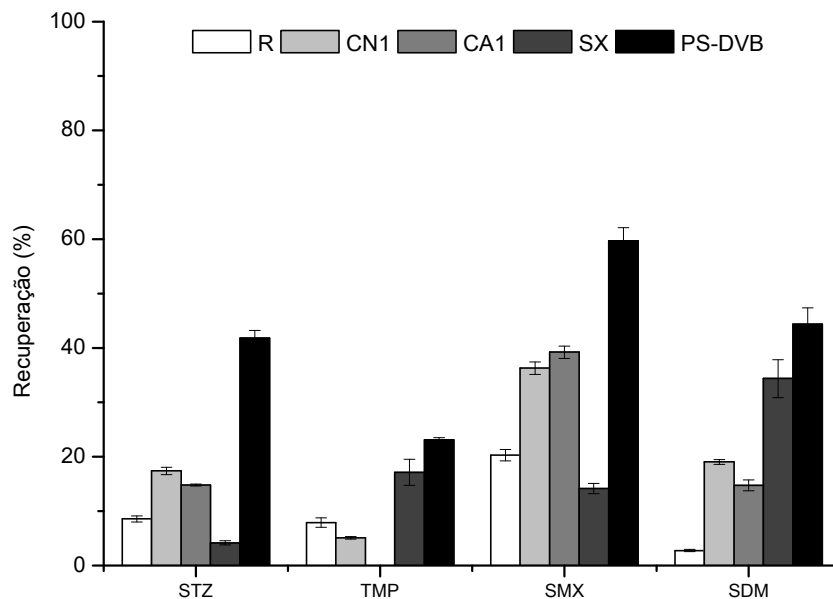


Figura 4.2. Efeito da variação da fase sorvente para a microextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 15 min sob ultrassons.

Além disso, as interações químicas entre os analitos e os ACs são fortemente influenciadas pelo pH do meio. Quando o pH da matriz é igual ao pH_{pzc} , a superfície do AC terá carga neutra devido à ocorrência do mesmo número de cargas positivas e negativas. Se o pH for inferior ao pH_{pzc} , ocorrerá formação de cargas positivas e, se o valor for maior, cargas negativas serão geradas. Deste modo, a pH 5,5 os antibióticos estão maioritariamente na forma neutra, enquanto os ACs (R e CN1) estão carregados positivamente e o CA1, negativamente. Neste sentido, não ocorrem fenômenos de atração nem de repulsão, não sendo favorecida a microextração. Apesar disso, a figura 4.2 mostra que mesmo assim ainda ocorreram processos de adsorção entre os antibióticos e os ACs, que podem ser atribuídos à elevada área superficial dos materiais envolvidos ($> 930 \text{ g m}^{-2}$). Por outro lado, os Ps são do tipo fase reversa, retendo os analitos principalmente de acordo com o tamanho de partícula, área superficial e mecanismos envolvidos. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que os Ps são mais seletivos que os ACs principalmente devido à presença de anéis aromáticos tanto na estrutura polimérica quanto nas moléculas dos antibióticos envolvidos, favorecendo as interações π - π e/ou dipolo-dipolo. O PS-DVB apresentou os melhores resultados provavelmente devido à sua maior área superficial (1200 g m^{-2}) e ausência de cargas na estrutura, quando comparado

ao SX. Neste sentido, o PS-DVB foi a fase sorvente selecionada e usada para os ensaios seguintes de desenvolvimento, otimização, validação e aplicação do método a matrizes reais.

4.2.2.2 Etapa de retroextração

Após a escolha da fase sorvente mais adequada, prosseguiu-se com a otimização dos parâmetros que podem afetar a eficiência do processo de retroextração. Esta é uma etapa decisiva, uma vez o solvente selecionado necessitar ter força suficiente para dessorver completamente os analitos retidos na fase sorvente sob determinado tempo de tratamento ultrassónico. Neste sentido, avaliou-se a eficiência dos solventes MeOH, ACN e mistura de MeOH/ACN (1:1, v:v). A figura 4.3 mostra as recuperações médias obtidas para cada solvente testado, na qual se observa que a mistura apresentou os melhores resultados, sendo portanto escolhida para estudos posteriores.

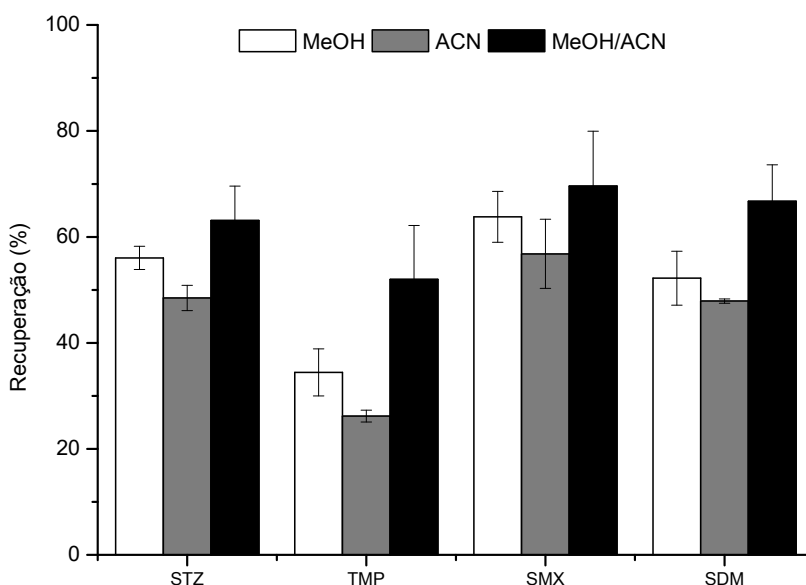


Figura 4.3. Efeito da variação do solvente orgânico na retroextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 15 min sob ultrassons.

O tempo de retroextração foi igualmente estudado, tendo-se variado o tempo de tratamento ultrassónico (15, 30, 60 e 90 min) e concluído que 15 min

eram suficientes para a dessorção dos analitos do PS-DVB, conforme é apresentado na figura 4.4.

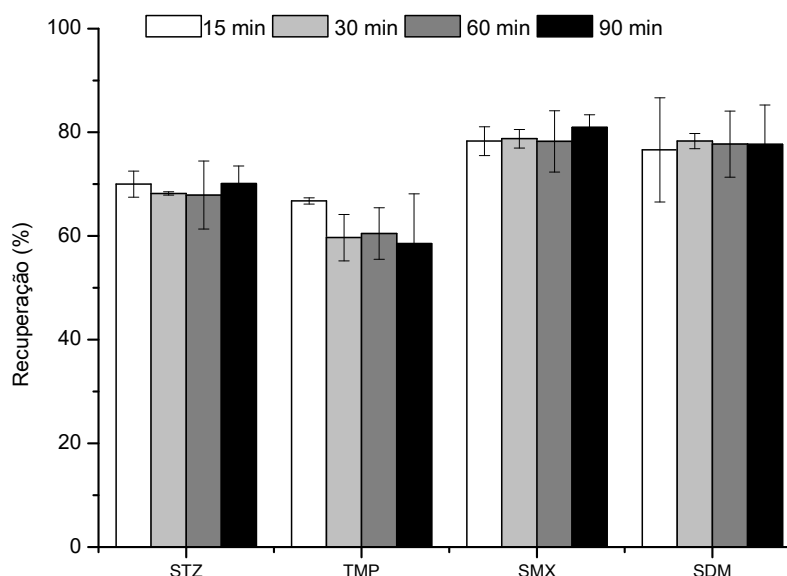


Figura 4.4. Efeito da variação do tempo de tratamento ultrassônico na retroextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH/ACN (100 μ L, 1:1).

4.2.2.3 Etapa de microextração

O processo de microextração é baseado no equilíbrio dos analitos entre a amostra aquosa e a fase sorvente e, de acordo com estudos anteriores [15,18], o tempo de extração e a velocidade de agitação são parâmetros determinantes na eficiência do processo. O tempo de extração apresenta grande efeito na cinética, uma vez que limita a distribuição dos compostos com interesse entre as fases, enquanto a velocidade de agitação influencia na transferência de massa ou difusão dos analitos até a fase sorvente. Desta forma, tempos de equilíbrio entre 1 e 16 h foram avaliados para os quatro antibióticos e, de acordo com os resultados obtidos (figura 4.5a), as melhores recuperações ocorreram para 16 h de microextração. Apesar da cinética ser lenta, esta técnica pode operar durante a noite sem a necessidade de manipulação extra ou a presença do analista.

De seguida, a velocidade de agitação foi estudada entre 750 e 1250 rpm, tendo-se observado que sob rotações mais baixas (750 rpm), melhores

recuperações foram obtidas, uma vez o dispositivo analítico apresentar maior estabilidade, conforme apresentado na figura 4.5b.

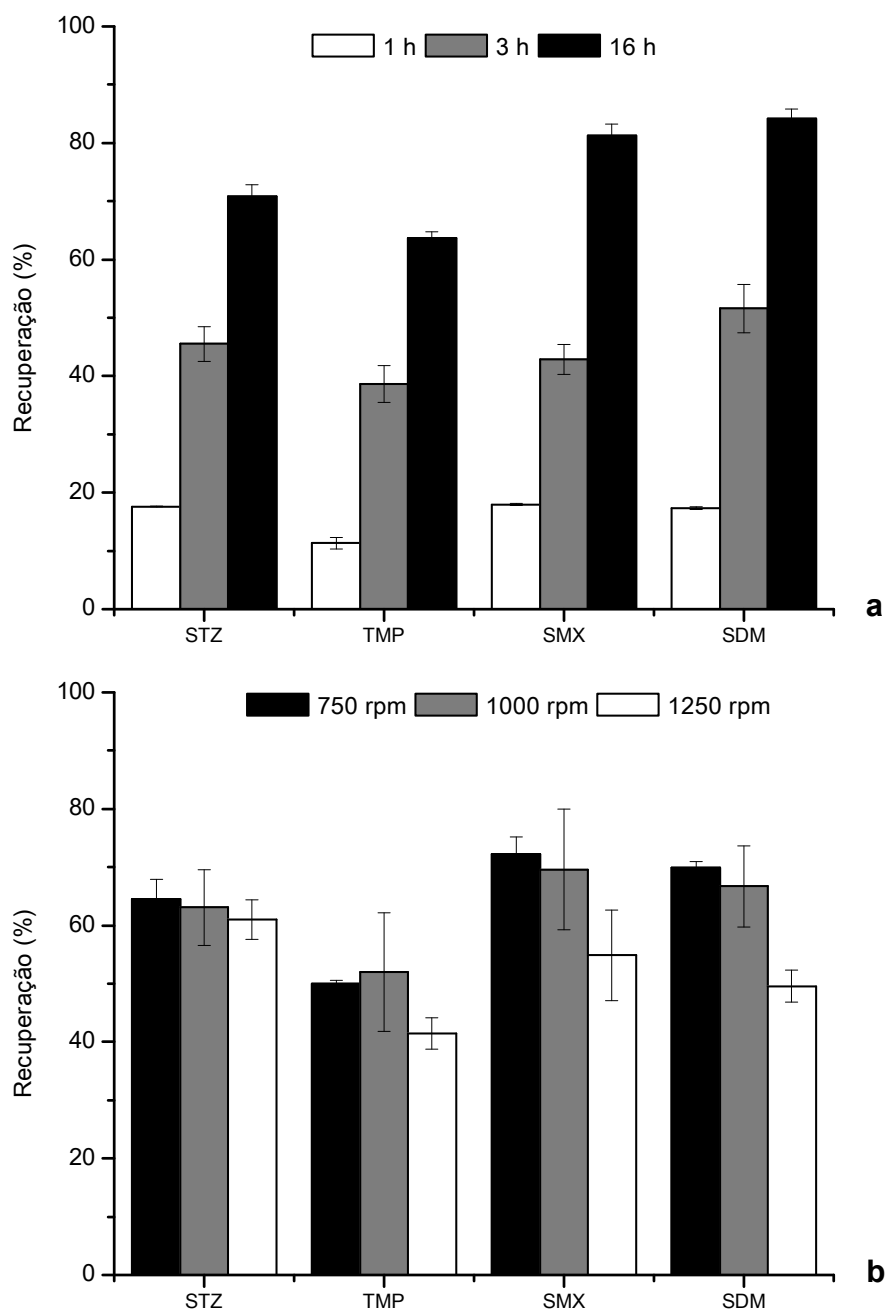


Figura 4.5. Efeito da variação do tempo de equilíbrio (a) e da velocidade de agitação para a microextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, pH 5,5; retroextração, ACN/MeOH (100 μ L1:1), 15 min sob ultrassons.

As características da matriz apresentam enorme influência na termodinâmica do processo de microextração e parâmetros como o pH, a polaridade e a força iônica foram cuidadosamente estudados [19–23]. O pH da

matriz exerce grande influência na microextração, uma vez determinar o estado de dissociação dos analitos, assim como a afinidade dos mesmos para os materiais sorventes. Desta forma, diversos valores de pH (2,0, 4,0, 5,5, 8,0 e 10,0) foram avaliados, tendo as recuperações mais elevadas sido observadas para pH 5,5, conforme é observado no gráfico da figura 4.6. Este resultado era esperado, uma vez os antibióticos em estudo adquirem carga positiva em condições ácidas devido à protonação do azoto. Por outro lado, sob condições básicas, ocorre a respetiva desprotonação, de acordo com os valores de pK_a e a geometria das moléculas (figura 4.1). Assim sendo, valores de pH ácidos ou básicos ocasionam a formação de espécies ionizadas, mais solúveis em água, comprometendo o processo de microextração, que é geralmente favorecido quando as moléculas se encontram na sua forma neutra.

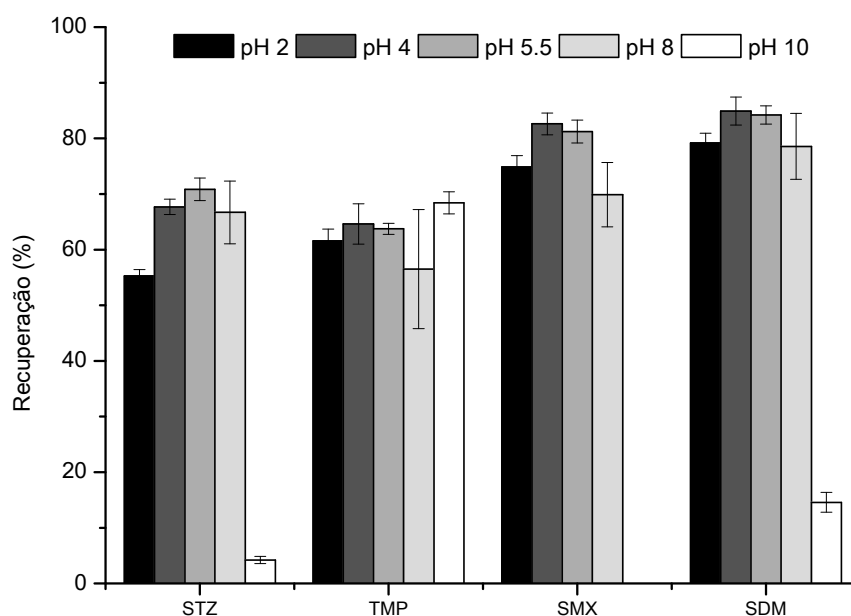


Figura 4.6. Efeito da variação do pH da matriz na microextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, 16 h (750 rpm); retroextração, ACN/MeOH (100 μ L, 1:1), 15 min sob ultrassons.

A força iónica da matriz foi igualmente estudada, por intermédio da adição de um eletrólito (*i.e.* NaCl), o qual normalmente reduz a solubilidade dos compostos orgânicos no meio, em particular para o caso dos analitos mais polares a semi-polares, forçando-os a migrar para a fase sorvente (*salting-out*

effect). No entanto, os ensaios realizados com adição de 5, 10 e 15 % (m:v) de NaCl não demonstraram vantagens para a eficiência do processo de microextração das sulfonamidas, como observado na figura 4.7. Para o TMP, o aumento do conteúdo de sal até 15% resultou num pequeno incremento (\approx 5%) na recuperação, mas que neste contexto pode ser considerado negligenciável.

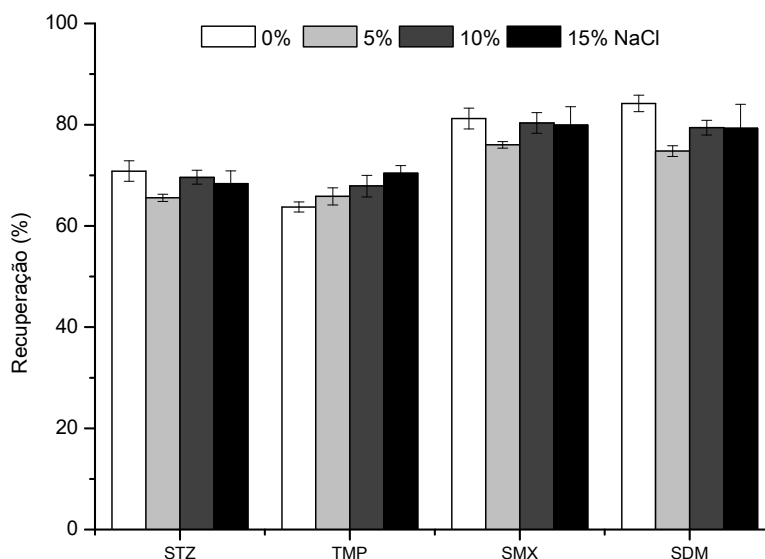


Figura 4.7. Efeito da variação da força iônica da matriz para a microextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, 16 h (750 rpm) pH 5,5; retroextração, ACN/MeOH (100 μ L, 1:1), 15 min sob ultrassons.

O último parâmetro analisado foi o efeito da polaridade da matriz. A adição de um modificador orgânico à amostra aquosa tende a tornar os compostos orgânicos mais solúveis no meio, podendo facilitar o processo de microextração pela redução do *wall-effect*. Este fenómeno baseia-se na adsorção dos compostos com características mais hidrofóbicas nas paredes de vidro dos frascos de amostragem, o que pode reduzir a eficiência do processo de microextração neste sentido, foram testadas concentrações de MeOH de 5, 10 e 15 % (v:v). De acordo com os resultados obtidos e apresentados na figura 4.8, com a adição de MeOH houve redução da eficiência de extração do método, sendo então descartado o uso deste modificador nos ensaios subsequentes.

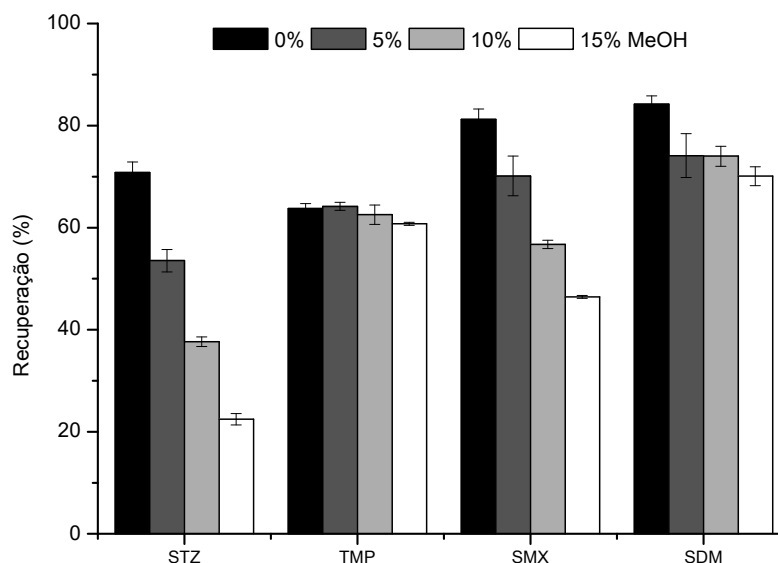


Figura 4.8. Efeito da variação da polaridade da matriz para a microextração dos quatro antibióticos estudados. Condições: microextração, 16 h (750 rpm) pH 5,5; retroextração, ACN/MeOH (100 μ L, 1:1), 15 min sob ultrassons.

4.2.3 Validação do método analítico

Após o estudo dos principais parâmetros que podem influenciar os processos de microextração e retroextração dos antibióticos em estudo por BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD, seguiu-se com a validação da metodologia proposta, usando as seguintes condições experimentais otimizadas, microextração: PS-DVB, 16 h (750 rpm), pH 5,5; retroextração: mix MeOH/ACN (100 μ L), 15 min sob tratamento ultrasónico. A partir dos ensaios realizados em 25 mL de água ultrapura fortificada (8,0 μ g L⁻¹) nas condições experimentais otimizadas, obtiveram-se recuperações médias compreendidas entre 63,8 \pm 1,5% (TMP) e 84,2 \pm 1,9% (SDM). A sensibilidade do método foi avaliada pela determinação dos LODs e LOQs, que variaram entre 0,08 μ g L⁻¹ e 0,26 μ g L⁻¹ para as sulfonamidas, e 0,16 μ g L⁻¹ e 0,53 μ g L⁻¹ para o TMP. Na calibração do método, excelentes linearidades foram alcançadas, com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,9958 (SMX). A tabela 4.2 resume todos os dados obtidos da validação do método, relativamente à calibração, sensibilidade e eficiência, sob condições experimentais otimizadas.

Tabela 4.2. Recuperações médias, LODs, LOQs, gama linear e coeficientes de determinação para os quatro antibióticos obtidos por BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD na validação do método analítico, sob condições experimentais otimizadas.

Antibióticos	Recuperação (% \pm RSD)	LODs (μ g L ⁻¹)	LOQs (μ g L ⁻¹)	Gama linear (μ g L ⁻¹)	r ²
STZ	70,8 \pm 2,9	0,08	0,26	0,26 - 8,0	0,9966
TMP	63,8 \pm 1,5	0,16	0,53	0,53 - 8,0	0,9965
SMX	81,2 \pm 2,5	0,08	0,26	0,26 - 8,0	0,9958
SDM	84,2 \pm 1,9	0,08	0,26	0,26 - 8,0	0,9977

A metodologia proposta foi igualmente avaliada em relação à repetibilidade, por meio de ensaios no mesmo dia (cinco replicados) e em dias diferentes (três replicados em três dias consecutivos), tendo sido obtidos desvios padrão relativos inferiores a 15 %.

4.2.4 Comparação com outras técnicas de microextração

O desempenho analítico da metodologia proposta foi comparada com outras técnicas de microextração bem estabelecidas, nomeadamente SPME, dSPE e SBSE. A tabela 4.3 apresenta os valores de LODs e recuperações médias obtidos por BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD e demais abordagens presentes na literatura para análise dos quatro antibióticos em estudo.

A presente metodologia demonstrou melhor sensibilidade e eficiência de extração que as outras abordagens indicadas, mesmo quando comparada a SPME combinada com um sistema instrumental hifenado (LC-MS/MS) [13]. Desta forma, o notável desempenho analítico somado às vantagens apresentadas pela BA μ E, nomeadamente fácil preparação dos dispositivos analíticos, simplicidade de operação, baixo custo, uso de volumes negligenciáveis de solvente orgânico e robustez do método fazem desta técnica uma excelente alternativa para a análise vestigial de sulfonamidas e TMP em matrizes aquosas.

Tabela 4.3. Comparação dos LODs e recuperações médias obtidas neste trabalho com outras técnicas de microextração presentes na literatura para a determinação dos quatro antibióticos estudados.

Antibiótico	Técnica de microextração	Sistema instrumental	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
SMX	SPME	LC-MS/MS	14,0	59,2 \pm 15,8	[13]
	dSPE	UHPLC-DAD	23,0	59-86	[24]
	SBSE	HPLC-DAD	0,66	72,7-86,7	[14]
	BA μ E	HPLC-DAD	0,26	81,2 \pm 2,5	Este trabalho
STZ	SPME	LC-MS/MS	26,3	29,0 \pm 18,1	[13]
	dSPE	UHPLC-DAD	14,9	46-83	[24]
	SBSE	HPLC-DAD	0,57	60,3-69,9	[14]
	BA μ E	HPLC-DAD	0,26	70,8 \pm 2,9	Este trabalho
SDM	SPME	LC-MS/MS	12,4	74,2 \pm 17,6	[13]
	dSPE	UHPLC-DAD	18,6	28-100	[24]
	BA μ E	HPLC-DAD	0,26	84,2 \pm 1,9	Este trabalho
TPM	SBSE	HPLC-DAD	1,6	49,7-53,9	[25]
	BA μ E	HPLC-DAD	0,53	63,8 \pm 1,5	Este trabalho

4.2.5 Aplicação a matrizes reais

A aplicação da metodologia proposta a matrizes reais é um passo decisivo para demonstrar a sua capacidade analítica, uma vez as amostras reais geralmente apresentam elevada complexidade. Neste contexto, aplicou-se a BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD para monitorizar os quatro antibióticos em estudo em amostras de água potável, estuarina e residual. Para fins de quantificação e minimização do efeito matriz utilizou-se o SAM, por meio da fortificação das amostras reais com soluções padrão dos analitos para obter concentrações finais compreendidas entre 0,8 e 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram ainda realizados ensaios em branco sem a adição dos padrões. De modo geral, foi alcançada boa linearidade nas amostras, com coeficientes de determinação superiores a 0,9869. Não foi detetado ($<$ LOD) nenhum dos antibióticos nas amostras estudadas, como era esperado, em particular para a água potável. A figura 4.9 exemplifica cromatogramas obtidos de ensaios realizados com amostras de água potável (a) e estuarina (b), sob condições experimentais otimizadas, nos quais boa seletividade e sensibilidade são observadas.

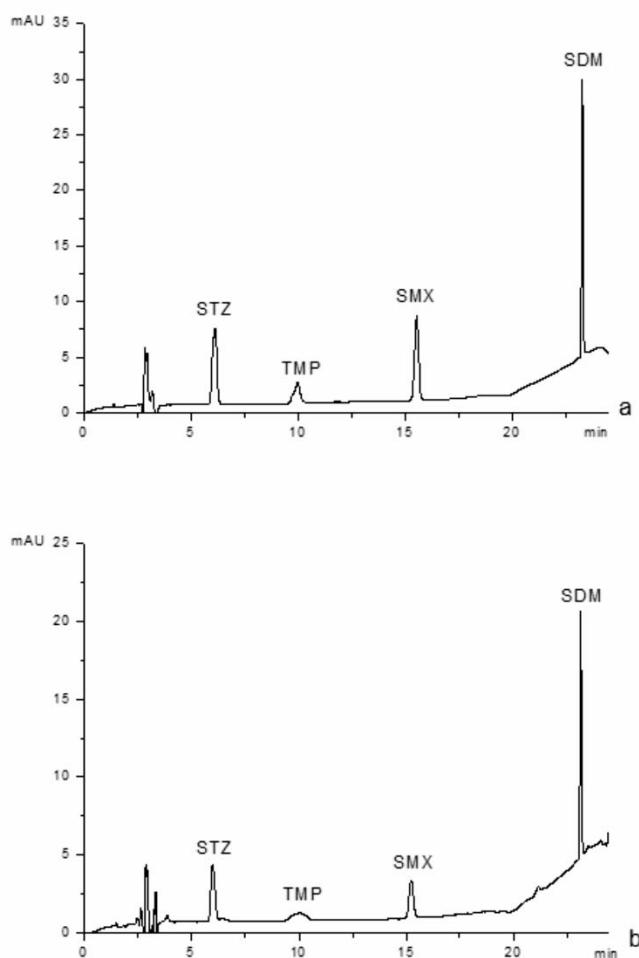


Figura 4.9. Cromatogramas obtidos por BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD na análise dos quatro antibióticos em amostras de água potável (a) e superficial (b) fortificadas ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$), sob condições experimentais otimizadas.

4.3 Conclusões

A metodologia proposta, BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD foi otimizada e validada para a monitorização de quatro antibióticos em matrizes aquosas reais. Sob condições experimentais otimizadas, o presente método apresentou excelente desempenho analítico, com boa eficiência na extração dos compostos alvo, precisão adequada, limites de detecção ao nível dos traços e uma boa gama linear dinâmica. A aplicação do método a matrizes reais, nomeadamente água potável, estuarina e residual, demonstrou comportamento analítico satisfatório

com boa resposta em todas as amostras estudadas. Além disso, a fácil preparação dos dispositivos BAμE com a possibilidade de escolher a fase sorvente mais adequada consoante aos analitos em estudo, a simplicidade de operação, o baixo custo da análise e o uso de volumes negligenciáveis de solventes orgânicos fazem desta técnica uma abordagem promissora para a análise vestigial de compostos prioritários em matrizes reais.

4.4 Referências

- [1] A.H. Ide, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Enhancement for trace analysis of sulfonamide antibiotics in water matrices using bar adsorptive microextraction (BAμE), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 593–599.
- [2] K. Kümmerer, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use—present knowledge and future challenges., *J. Environ. Manage.* 90 (2009) 2354–66.
- [3] J. Wilkinson, P.S. Hooda, J. Barker, S. Barton, J. Swinden, Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field, *Environ. Pollut.* 231 (2017) 954–970.
- [4] M. Petrović, B. Škrbić, J. Živančev, L. Ferrando-Climent, D. Barcelo, Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap in different types of water in Serbia, *Sci. Total Environ.* 468–469 (2014) 415–428.
- [5] Y. Valcárcel, S. González Alonso, J.L. Rodríguez-Gil, a. Gil, M. Catalá, Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk, *Chemosphere* 84 (2011) 1336–1348.
- [6] J. Xu, Y. Xu, H. Wang, C. Guo, H. Qiu, Y. Zang, X. Li, W. Meng, Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river, *Chemosphere* 119 (2015) 1379–1385.
- [7] A. Kumar, D. Pal, Antibiotic resistance and wastewater: Correlation, impact and critical human health challenges, *J. Environ. Chem. Eng.* 6 (2018) 52–58.
- [8] M.Y. Haller, S.R. Müller, C.S. McArdeall, A.C. Alder, M.J.F. Suter, Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 952 (2002) 111–120.
- [9] J. Nurmi, J. Pellinen, Multiresidue method for the analysis of emerging contaminants in wastewater by ultra performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 6712–6719.
- [10] R. López-Serna, M. Petrović, D. Barceló, Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain), *Sci. Total Environ.* 440 (2012) 280–289.

- [11] M.R. Boleda, M.T. Galceran, F. Ventura, Validation and uncertainty estimation of a multiresidue method for pharmaceuticals in surface and treated waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1286 (2013) 146–158.
- [12] M. Gbylik-Sikorska, A. Posyniak, T. Sniegocki, J. Zmudzki, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for the determination of antibiotics residues in water samples from water supply systems in food-producing animal farms, *Chemosphere.* 119 (2015) 8–15.
- [13] V.K. Balakrishnan, K.A. Terry, J. Toito, Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods, *J. Chromatogr. A.* 1131 (2006) 1–10.
- [14] Z. Xu, C. Song, Y. Hu, G. Li, Molecularly imprinted stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography for trace analysis of sulfa drugs in complex samples, *Talanta.* 85 (2011) 97–103.
- [15] N.R. Neng, A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, Adsorptive micro-extraction techniques-Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7303–7310.
- [16] J.M.F. Nogueira, Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques, *Anal. Chim. Acta.* 757 (2012) 1–10.
- [17] J.M.F. Nogueira, Microextração adsorptiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática, *Sci. Chromatogr.* 5 (2014) 275–283.
- [18] J.M.F. Nogueira, Stir-bar sorptive extraction : 15 years making sample preparation, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 214–223.
- [19] N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices, *Talanta* 83 (2011) 1643–9.
- [20] N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, Cork-based activated carbons as supported adsorbent materials for trace level analysis of ibuprofen and clofibric acid in environmental and biological matrices, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 6263–6270.
- [21] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Development of a bar adsorptive micro-extraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1355–1364.
- [22] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique-Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices, *Talanta* 120 (2014) 126–134.
- [23] C. Almeida, S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, Bar adsorptive microextraction technique - application for the determination of pharmaceuticals in real matrices, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 2093–2106.
- [24] A.V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.Á. Rodríguez-Delgado, Dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 75 (2013) 130–137.

- [25] Z.G. Xu, Z. Du, Y.L. Hu, Y.F. Hu, Y.P. Pan, G.K. Li, Preparation of trimethoprim molecularly imprinted stir bar sorptive extraction and its application for trace analysis of trimethoprim and sulfonamides in complex samples, Chinese J. Anal. Chem. 40 (2012) 1002–1010.

Capítulo 5

Nova geração de dispositivos BAμE - Aplicação para análise vestigial de fármacos antidepressivos em fluidos biológicos

A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, New-generation bar adsorptive microextraction (BAμE) devices for a better eco-user-friendly analytical approach - Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids, J. Pharm. Biomed. Anal. 153 (2018) 126–134 [1].

5.1 Considerações gerais

As técnicas de microextração baseadas em sorção têm evidenciado, nas últimas três décadas, notável desenvolvimento tendo provado serem uma abordagem muito efetiva para a análise de traços em diversos tipos de matrizes como etapa de enriquecimento prévio para aplicação de técnicas cromatográficas e hífenadas [2]. Neste contexto, a BA μ E enquadra-se como alternativa promissora, fundamentalmente para a determinação de compostos com características mais polares, tendo demonstrado excelente desempenho analítico em diversos tipos de aplicações [3–6]

Apesar de todas as vantagens apresentadas pela BA μ E, nomeadamente boa relação custo-benefício, fácil aplicação, possibilidade de selecionar a fase sorvente mais adequada para cada aplicação particular e robustez [7], existem ainda diversas limitações que devem ser aperfeiçoadas. Recentemente, alguns avanços foram introduzidos, incluindo a miniaturização do dispositivo, o qual foi reduzido para a metade do seu tamanho original, eliminando o passo de evaporação e troca de solventes e diminuindo o volume de solvente orgânico necessário para a etapa de retroextração (de 1,5 mL para apenas 100 μ L) [8,9].

No ciclo analítico da BA μ E, após a etapa de microextração, o dispositivo é removido do *vial* de amostragem, transferido para um *vial* contendo um *insert* com o solvente orgânico adequado e, de seguida o conjunto é levado ao banho ultrassónico por determinado tempo. Posteriormente, retira-se o dispositivo do solvente, sela-se o *vial* e finalmente o extrato pode ser submetido a análise instrumental. Desta forma, a etapa de dessorção dos analitos continua a ser limitativa do ponto de vista prático, uma vez requerer diversos passos de manipulação da amostra, sendo difícil a interface com os sistemas instrumentais.

Neste sentido, no presente trabalho é introduzido um ciclo analítico inovador para a análise por BA μ E, com menor manipulação da amostra e vantagens efetivas. Para isso, um novo dispositivo analítico foi desenvolvido, menor e mais flexível, que permite a realização da etapa de retroextração num único passo. Com esta abordagem mais simplificada, a nova geração de dispositivos BA μ E pode ser facilmente combinada com o uso de amostradores automáticos de sistemas instrumentais convencionais, favorecendo a respetiva aplicação em análise de rotina.

Para demonstrar o desempenho analítico dos avanços propostos, quatro fármacos antidepressivos (bupropiona, BUP; trazodona, TRA; citalopram, CIT e amitriptilina, AMI) foram selecionados como compostos modelo, cujas estruturas químicas estão representadas na figura 5.1. Os antidepressivos constituem um importante grupo de medicamentos utilizados no tratamento de pacientes psiquiátricos que sofrem de depressão clínica. Em Portugal, o nível de consumo desses fármacos é considerado muito elevado, sendo o segundo país que mais utiliza compostos antidepressivos na Europa [10]. A monitorização desses agentes em fluidos biológicos é fundamental para garantir a qualidade em preparados farmacêuticos a fim de se obter concentrações ótimas para doses terapêuticas, minimizando o risco de superdosagem e efeitos adversos [11].

Durante o desenvolvimento da metodologia proposta, diversos ensaios de otimização foram efetuados e avaliados, incluindo a comparação entre diferentes fases sorventes, assim como a influência de parâmetros experimentais nas etapas de microextração e retroextração. A validação e a aplicação da metodologia proposta para a determinação vestigial de antidepressivos em fluidos biológicos é igualmente discutida e, finalmente, são apresentadas comparações com outros métodos disponíveis na literatura.

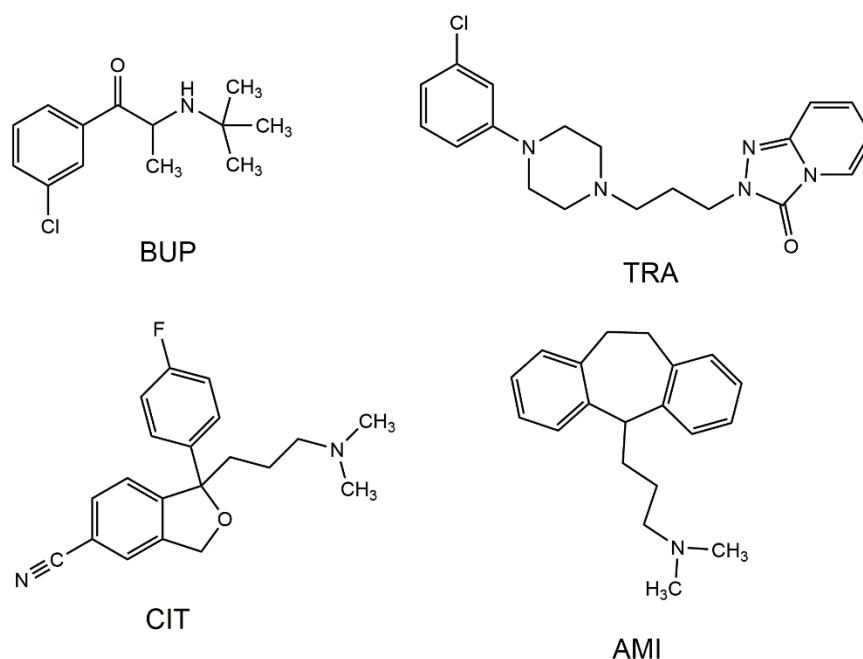


Figura 5.1. Estruturas químicas dos quatro antidepressivos estudados.

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Otimização instrumental

No presente estudo, quatro fármacos antidepressivos foram selecionados como compostos alvo. Com a finalidade de se obter as melhores condições instrumentais no sistema HPLC-DAD, começou por se injetar padrões individuais no sentido de determinar os tempos de retenção e os espectros de absorção UV/vis, tendo-se posteriormente injetado misturas de padrões dos antidepressivos em estudo para verificação da resolução cromatográfica. De acordo com os resultados obtidos, selecionou-se o comprimento de onda de 254 nm, uma vez corresponder ao máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) para os quatro fármacos. A fase móvel constituída por ACN e H₂O com 2,5 % de CH₃COOH, para separação cromatográfica com recurso a gradiente, numa coluna convencional de fase reversa (25 °C), permitiu a obtenção de resposta instrumental adequada com boa resolução para os antidepressivos em estudo, num tempo de 28 min.

A sensibilidade instrumental foi avaliada em termos dos LODs e LOQs pela injeção sucessiva de padrões de calibração diluídos, atendendo à razão S/N 3 e 10, respetivamente. Neste sentido, foram obtidos valores compreendidos 15 a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 50 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os LODs e LOQs dos quatro analitos em estudo, respetivamente. De seguida, a calibração instrumental foi efetuada com recurso à injeção de soluções padrão contendo a mistura composta pelos quatro antidepressivos, abrangendo concentrações desde 100 a 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$, num total de dez níveis. Na gama estudada, foram obtidas boas linearidades, com coeficientes de determinação superiores a 0,9969 (CIT).

Embora a HPLC-DAD seja uma técnica adequada para a análise proposta, recorreu-se igualmente a um sistema LC-MS/MS, operando no modo MRM, por forma a alcançar melhor seletividade e sensibilidade. Neste sentido, soluções estoque individuais de cada analito foram injetadas diretamente no sistema LC-MS/MS no modo varrimento contínuo, permitindo a monitorização dos iões precursores numa gama de m/z compreendida entre 50 e 400 Da. Os espectros de massa foram obtidos no modo de ionização positiva, uma vez os compostos de interesse possuem átomos de azoto na estrutura química

suscetíveis de sofrer protonação. Foram selecionadas duas transições (quantificação e confirmação) para cada composto com base em dados presentes na literatura. A tabela 5.1 resume os parâmetros instrumentais otimizados para a quantificação dos quatro fármacos antidepressivos por LC-MS/MS. A calibração instrumental foi efetuada com recurso a injeção de soluções padrão contendo a mistura dos quatro analitos numa gama de concentrações compreendidas entre 10 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando sete níveis. Foram obtidos bons resultados, com coeficientes de determinação superiores a 0,9962 (BUP), LODs de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LOQs de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 5.1. Parâmetros otimizados para quantificação dos quatro antidepressivos por LC-MS/MS no modo MRM.

Composto	t_R	Íon precursor	Precursor → Produto (m/z) ^a	Precursor → Produto (m/z) ^b	Voltagem de cone (V)	Energia de colisão (eV)
CIT	5,93	[M+H] ⁺	325,0 > 108,8	325,0 > 262,0	25	20
AMI	6,21	[M+H] ⁺	278,1 > 90,8	278,1 > 233,0	35	20
BUP	5,32	[M+H] ⁺	240,0 > 184,0	240,0 > 166,0	25	15
TRA	5,70	[M+H] ⁺	372,0 > 176,1	372,0 > 147,9	30	25

^a: quantificação

^b: confirmação

5.2.2 Implementação de um novo ciclo analítico

A execução de uma análise por BAμE envolve sempre duas etapas principais, a microextração seguida da retroextração, sendo que a segunda é a etapa mais limitativa, uma vez requerer diversos passos de manipulação até a análise instrumental. Neste contexto, no presente estudo realizou-se a simplificação do procedimento experimental da BAμE por intermédio da introdução de um ciclo analítico inovador composto por uma etapa de microextração efetiva seguida da retroextração realizada num único passo. Para isso, os novos dispositivos BAμE, apresentados na figura 5.2, foram preparados tendo como suporte um material de *nylon* com menor diâmetro e mais flexível que os tubos de PP utilizados nos dispositivos originais. A fixação das fases sorventes foi, no entanto, realizada da mesma forma. Os novos dispositivos

foram concebidos com a finalidade de aumentar a razão entre a fase sorvente e o solvente orgânico na retroextração sem comprometer a eficiência na etapa de microextração. Além disso, devido ao uso de materiais simples e de baixo custo para a preparação, os dispositivos são descartáveis, sendo utilizados apenas uma vez por análise.

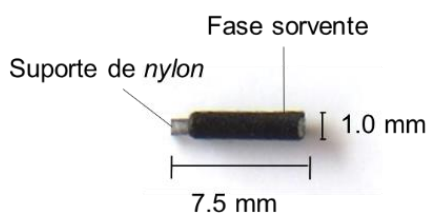


Figura 5.2. Novo dispositivo BA μ E.

Desta forma, no novo ciclo analítico proposto, após a microextração, o dispositivo analítico é removido do *vial* de amostragem, transferido para um *vial* contendo um *insert* e 100 μ L do solvente orgânico adequado, sendo depois selado. Após o tratamento ultrassônico, o *vial* contendo o extrato e o dispositivo BA μ E pode ser imediatamente submetido a análise instrumental. Devido às pequenas dimensões e flexibilidade dos novos dispositivos, a etapa da retroextração pode ser efetuada num único passo, sem a necessidade de remoção do dispositivo, havendo espaço suficiente para a operação de injeção instrumental. Neste sentido, a BA μ E pode ser combinada com amostradores automáticos de sistemas cromatográficos convencionais presentes normalmente em laboratórios de química analítica, podendo ser facilmente utilizada em rotina.

A figura 5.3 mostra o esquema resumido do procedimento experimental proposto para o novo ciclo analítico por BA μ E, no qual se observa uma abordagem simples e vantajosa do ponto de vista de manipulação.



Figura 5.3. Procedimento experimental proposto no novo ciclo BA μ E.

5.2.3 Otimização do método analítico

5.2.3.1 Seleção da fase sorvente

Foram realizados ensaios com os novos dispositivos BA μ E revestidos com diferentes fases sorventes a fim de se obter máxima seletividade no processo de microextração dos quatro antidepressivos em estudo. Deste modo, foram testados cinco Ps (MCX, WCX, PS-DVB, HLB e SX) sob condições experimentais padrão; microextração: 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração: MeOH (100 μ L), 30 min sob tratamento ultrassónico.

A figura 5.4 mostra os resultados obtidos, na qual as melhores recuperações foram alcançadas com a fase SX. Este sorvente é um P à base de *N*-vinilpirrolidona e retém os analitos de acordo com o tamanho de partícula, área superficial e principalmente mecanismos envolvidos, como interações π - π , dipolo-dipolo e/ou ligações hidrogénio. Neste sentido, a presença de anéis

aromáticos na rede polimérica, assim como na estrutura química dos analitos, sugere ser responsável pela forte interação observada.

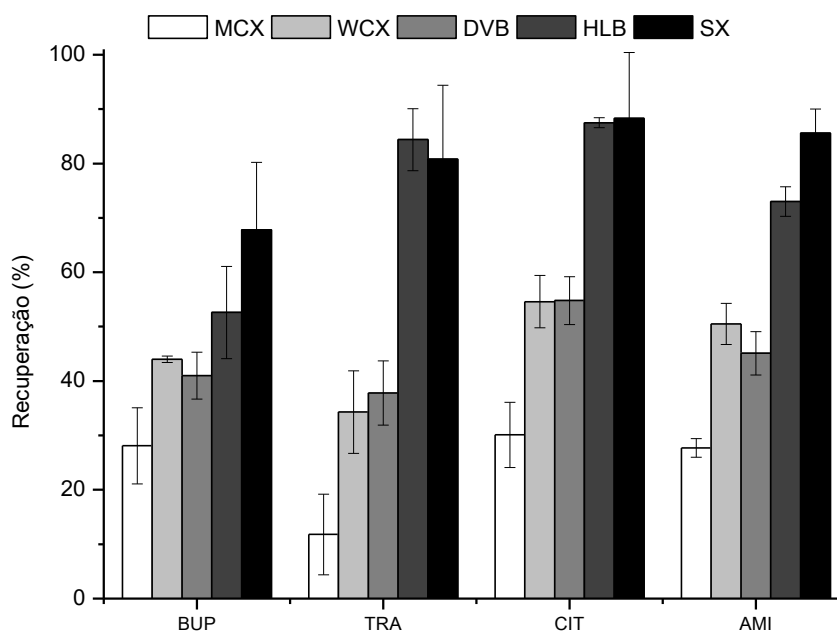


Figura 5.4. Efeito da variação da fase sorvente para a microextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm) pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob ultrassons.

Estes mecanismos podem justificar as elevadas eficiências de extração alcançadas para todos os antidepressivos, à exceção do BUP que apresentou menor recuperação média ($\approx 60\%$), uma vez esta molécula possui apenas um anel aromático, resultando eventualmente em interações π - π mais fracas. A utilização de uma menor quantidade de sorvente ($\approx 0,5$ mg) relativamente aos dispositivos BA μ E originais (≈ 5 mg) parece não afetar a eficiência do processo de microextração, uma vez estes materiais possuem elevada capacidade sortiva (≈ 100 - 500 μ g mg^{-1}). Neste sentido, a fase extratora disponível é suficiente para extração dos analitos presentes nas amostras ao nível dos traços.

Deste modo, entre todas as sorventes, a fase SX foi selecionada para ser usada como revestimento da BA μ E nos estudos posteriores. A figura 5.5 exemplifica um cromatograma obtido de um ensaio realizado por BA μ E(SX)- μ LD/HPLC-DAD numa amostra aquosa fortificada (20 μ g L^{-1}), na qual se observa excelente desempenho analítico, com boa seletividade e sensibilidade.

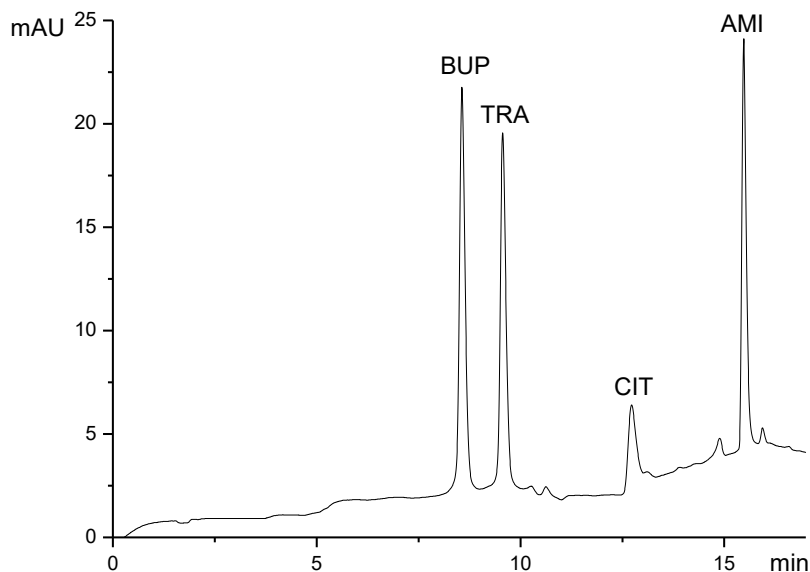


Figura 5.5. Cromatograma obtido por BA μ E(SX)- μ LD/HPLC-DAD na análise dos quatro antidepressivos numa amostra aquosa fortificada ($20 \mu\text{g L}^{-1}$). Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μL), 30 min sob ultrassons.

5.2.3.2 Etapa de retroextração

Na etapa de retroextração do novo ciclo analítico proposto, após a microextração, o dispositivo BA μ E é removido do vial de amostragem e transferido para um *vial* contendo um *insert* e 100 μL do solvente orgânico adequado. O conjunto é selado, submetido a tratamento ultrassónico por determinado tempo, ficando o extrato disponível para análise instrumental. Desta forma, para que o melhor desempenho fosse alcançado nesta etapa, alguns parâmetros foram otimizados, nomeadamente o solvente orgânico capaz de dessorver na totalidade os analitos da fase sorvente, assim como o tempo de ultrassons. Os solventes ACN, MeOH e uma mistura de ambos (Mix, 1:1, v:v) foram avaliados e, uma vez que não foram observadas diferenças expressivas entre eles (figura 5.6a), foi selecionado MeOH para os ensaios seguintes. De seguida, o tempo de ultrassons foi avaliado entre 15 e 60 min e, de acordo com os resultados obtidos (figura 5.6b), 30 min foram suficientes para a dessorção dos quatro agentes antidepressivos da fase SX.

A retroextração realizada num único passo na LD demonstrou ser uma abordagem muito simples e amigável do usuário do ponto de vista prático. Devido ao reduzido tamanho e flexibilidade do novo dispositivo analítico, a operação de injeção decorreu sem riscos de dano na agulha do amostrador automático ou qualquer outro tipo de problema técnico, sendo portanto totalmente compatível com sistemas convencionais de LC.

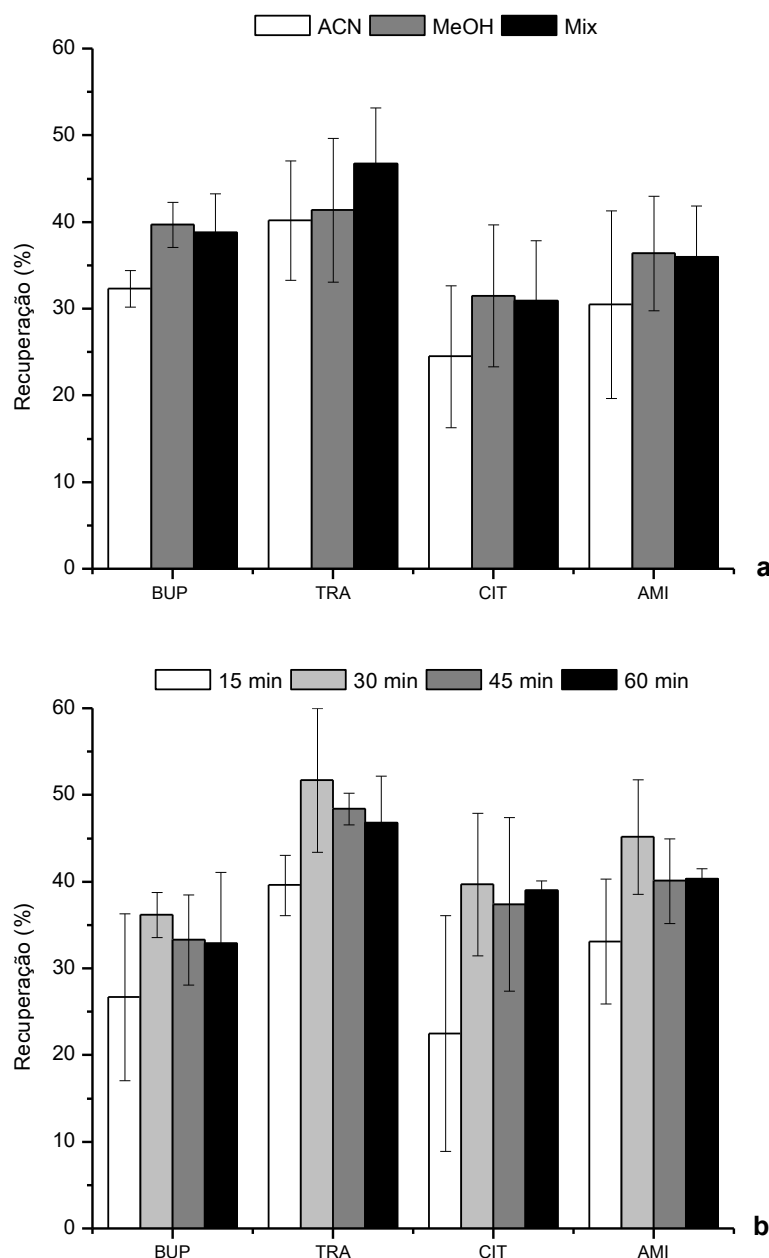


Figura 5.6. Efeito da variação do solvente (a) e do tempo de tratamento ultrassônico (b) na retroextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5.

5.2.3.3 Etapa de microextração

Os novos dispositivos BAμE, a exemplo dos originais, operam sob a inovadora tecnologia de amostragem por flutuação. Neste sentido, diversos parâmetros que podem influenciar a cinética do processo, nomeadamente o tempo de extração e a velocidade de agitação, devem ser avaliados, uma vez afetarem a distribuição dos analitos entre a matriz e a fase sorvente. Neste contexto, tempos de equilíbrio variando entre 1 e 16 h foram estudados para a microextração dos quatro fármacos antidepressivos. De acordo com os resultados apresentados na figura 5.7, observa-se uma cinética de equilíbrio lenta que requer um período de 16 h para alcançar uma maior eficiência de extração. Assim, o tempo de 16 h foi selecionado para estudos posteriores, não sendo um fator limitativo uma vez esta técnica poder operar durante a noite sem necessidades adicionais.

O efeito da velocidade de agitação foi avaliado por intermédio de ensaios efetuados a 750, 1000 e 1250 rpm e, de acordo com os dados obtidos (A.II.1), o dispositivo analítico operou com maior estabilidade sob rotações mais baixas, refletindo em maiores valores de recuperação. Deste modo optou-se por continuar os estudos de otimização do método com ensaios a 750 rpm.

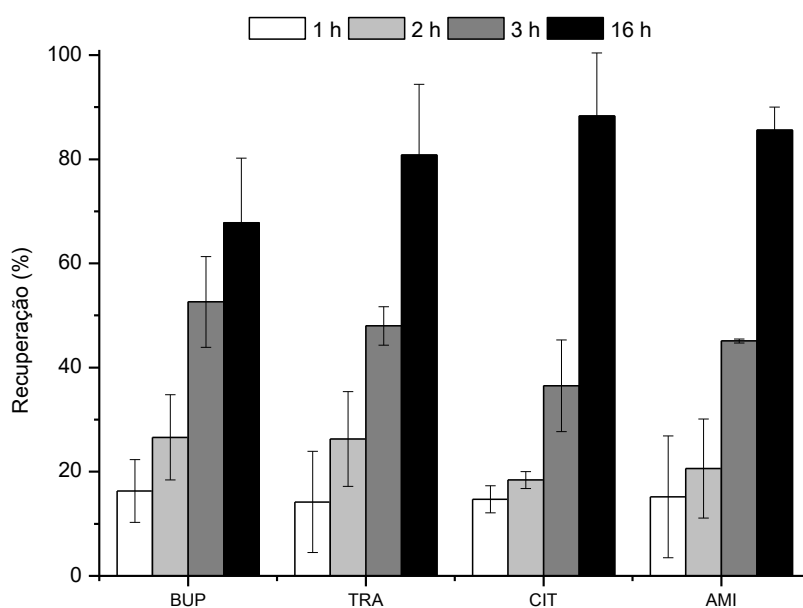


Figura 5.7. Efeito da variação do tempo de equilíbrio na microextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μL), 30 min sob ultrassons.

O passo seguinte foi investigar a influência das características da matriz, nomeadamente pH, força iónica e polaridade, uma vez serem parâmetros termodinâmicos importantes que podem afetar a afinidade dos analitos com a fase sorvente, refletindo a eficiência da etapa de microextração. Desta forma, foram testados diversos valores de pH (3,0; 5,5; 7,5 e 10,0) e, de acordo com os resultados apresentados na figura 5.8, foram observadas melhores eficiências de extração a pH 5,5 para os quatro antidepressivos em estudo. Apesar de as recuperações médias apresentarem alguma variação com a mudança de pH, as interações π - π pareceram ser o mecanismo predominante responsável pela retenção dos analitos na fase sorvente SX. A valores de pH mais ácidos, os compostos antidepressivos em estudo, que apresentam $pK_a > 7$, encontram-se carregados positivamente devido à protonação do azoto presente na molécula, embora esta situação não pareça influenciar a eficiência de extração, dominada pelas interações π - π entre os anéis aromáticos. Contudo, para o caso particular do BUP, a pH 3,0 houve uma queda acentuada na recuperação média obtida ($9,4 \pm 3,6$ %). Esta situação pode ser justificada pela mudança da carga global do anel aromático da molécula sob condições ácidas face a presença do grupo carbonilo na estrutura química do composto, enfraquecendo, deste modo, as interações π - π .

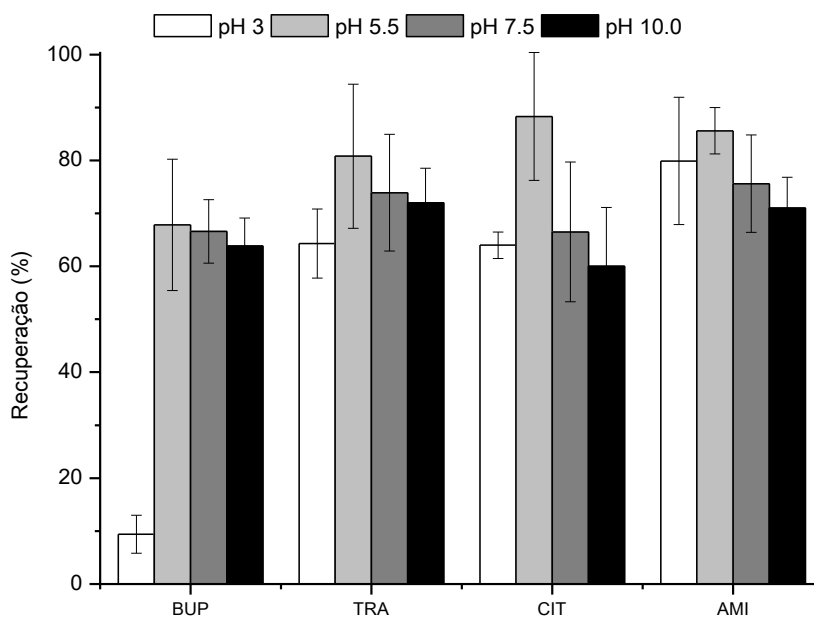


Figura 5.8. Efeito da variação do pH da matriz na microextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (750 rpm); retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob ultrassons.

De seguida, avaliou-se o efeito da força iónica da matriz por meio de ensaios contendo percentagens de NaCl de 0, 5, 10 e 15% (m:v) em água. A incorporação de um eletrólito na matriz pode favorecer a migração dos compostos orgânicos em direção à fase sorvente devido ao efeito conhecido por *salting-out*, uma vez este fenómeno contribuir para o aumento da solubilidade dos analitos no meio aquoso. Contudo, com o aumento da força iónica, observou-se a perda de recuperação dos analitos (A.II.2), sendo o uso de sal descartado na presente metodologia.

Por fim, a polaridade da matriz foi igualmente estudada com a adição de MeOH ao meio aquoso com a finalidade de anular ou diminuir o efeito designado por *wall-effect*. O uso de um modificador orgânico pode, em algumas situações, aumentar a eficiência do processo de microextração por reduzir a adsorção dos compostos orgânicos às paredes dos frascos de amostragem. Porém, no caso dos analitos em estudo, a adição de MeOH não trouxe benefícios à metodologia, conforme é apresentado na figura 5.9, tendo sido rejeitado para os ensaios subsequentes.

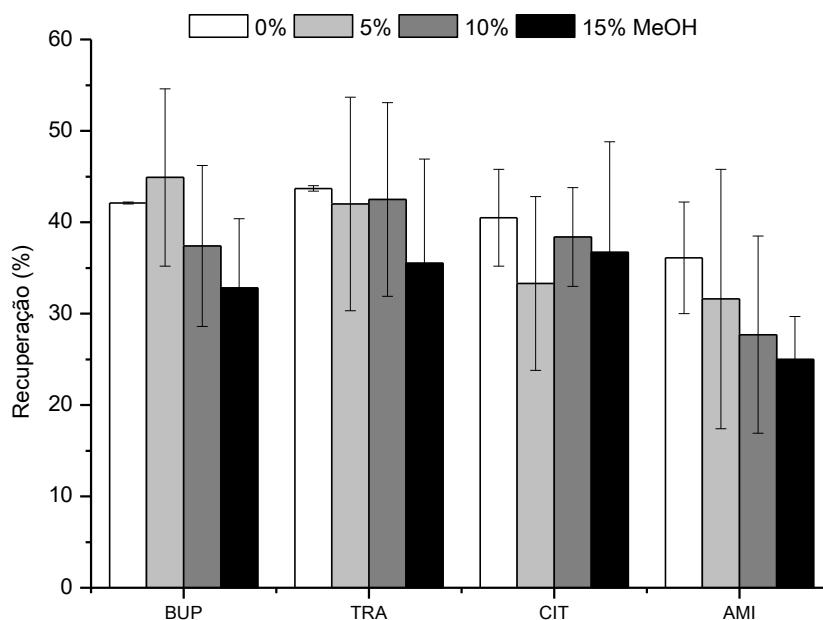


Figura 5.9. Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h (750 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob ultrassons.

5.2.4 Validação do método analítico

Após otimizados os parâmetros capazes de afetar o desempenho analítico da metodologia proposta, estabeleceram-se as condições experimentais ótimas para prosseguir para a validação do método; microextração: SX, 16 h (750 rpm), pH 5,5; retroextração: MeOH (100 μL), 30 min sob tratamento ultrassónico.

A fim de aumentar a sensibilidade do método, a validação analítica foi realizada com recurso a um sistema LC-MS/MS. A partir de ensaios realizados em 25 mL de água ultrapura fortificada numa gama de concentrações compreendidas entre 160 e 2000 ng L⁻¹ nas condições experimentais otimizadas, obtiveram-se recuperações médias entre 67,8 ± 12,4% (BUP) e 88,3 ± 12,1% (CIT) e coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,9820. A sensibilidade do método foi avaliada, tendo sido alcançados LODs e LOQs de 50 e 160 ng L⁻¹, calculados com recurso à razão S/N 3 e 10, respetivamente.

A tabela 5.2 resume todos os dados obtidos da validação do método, relativamente à calibração, sensibilidade e eficiência, sob condições experimentais otimizadas.

Tabela 5.2. Recuperações médias, LODs, LOQs, gama linear e coeficientes de determinação para os quatro antidepressivos obtidos por BAμE(SX)-μLD/LC-MS/MS na validação do método analítico, sob condições experimentais otimizadas.

Antidepressivos	Recuperação (% ± RSD)	LODs (ng L ⁻¹)	LOQs (ng L ⁻¹)	Gama linear (ng L ⁻¹)	r^2
BUP	67,8 ± 12,4	50	160	160-2000	0,9982
TRA	80,8 ± 13,6				0,9960
CIT	88,3 ± 12,1				0,9980
AMI	85,6 ± 14,4				0,9820

A figura 5.10 exemplifica um cromatograma obtido por BAμE(SX)-μLD/LC-MS/MS no modo MRM para a análise dos quatro fármacos antidepressivos numa amostra aquosa fortificada (1,0 μg L⁻¹), sob condições experimentais otimizadas. De forma geral, a metodologia proposta demonstrou excelente desempenho analítico na etapa de validação, com boa eficiência de extração para os quatro compostos antidepressivos em estudo numa ampla

gama linear, baixos LODs e LOQs, assim como linearidade apropriada. Além do mais, os novos dispositivos BA μ E foram combinados com um segundo sistema instrumental, provando que a retroextração num só passo é uma abordagem compatível com amostradores automáticos convencionais de diferentes modelos de instrumentação.

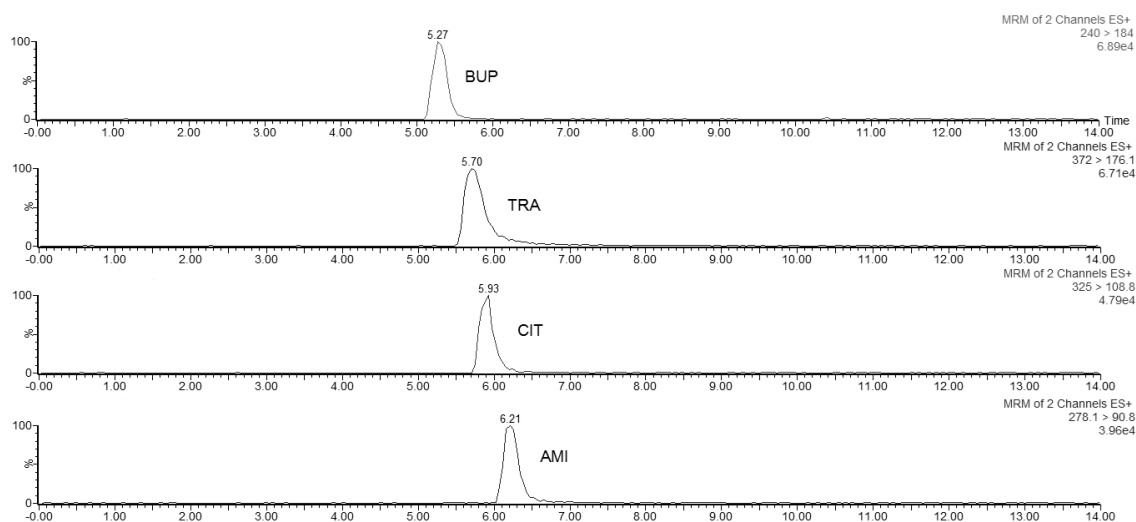


Figura 5.10. Cromatogramas obtidos por BA μ E(SX)- μ LD/LC-MS/MS no modo MRM para análise dos quatro fármacos antidepressivos numa amostra aquosa fortificada ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$), sob condições experimentais otimizadas.

De acordo com a literatura, já foram propostas outras metodologias para a análise de agentes antidepressivos, embora a maioria seja por SPE [12–14], uma técnica que requer maiores volumes de amostra e de solventes orgânicos, bem como de maior manipulação analítica quando comparada com a BA μ E. Relativamente a outras abordagens de microextração, a SPME [15] e a SBSE [16] apresentaram LODs (3 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente) superiores que a metodologia proposta neste trabalho. Neste sentido, para além dos resultados muito satisfatórios demonstrados pelas figuras de mérito do presente estudo, o uso dos novos dispositivos BA μ E permitiu a introdução de um ciclo analítico simplificado, conseguindo-se reduzir drasticamente a manipulação da amostra e facilitando a combinação com os sistemas cromatográficos convencionais para uso em rotina.

5.2.5 Aplicação a matrizes reais

Para demonstrar a capacidade analítica da metodologia desenvolvida, foram realizados ensaios em fluidos biológicos com recurso ao SAM para minimizar possíveis efeitos de matriz. Amostras de plasma e urina foram fortificadas para obter concentrações dos quatro antidepressivos entre 200 e 2000 ng mL⁻¹ e 100 e 1000 ng mL⁻¹, em quatro níveis, respetivamente. Foram realizados ensaios em branco sem a adição de padrão para maior controlo do processo.

A tabela 5.3 mostra os coeficientes de determinação (r^2) obtidos nos ensaios efetuados nos fluidos biológicos, na qual pode ser observada boa linearidade. À exceção do composto AMI, houve ligeira perda de sensibilidade do método para aplicação em matrizes reais, que pode ser atribuída à presença de diversos interferentes nas amostras estudadas, como o teor de sal, alterando a força iónica da matriz, como discutido anteriormente.

Tabela 5.3. Coeficientes de determinação (r^2) obtidos para os quatro antidepressivos em amostras de plasma e urina, sob condições experimentais otimizadas.

r^2	BUP	TRA	CIT	AMI
Plasma	0,9928	0,9939	0,9997	0,9929
Urina	0,9844	0,9867	0,9891	0,9973

A metodologia proposta foi ainda aplicada na análise duma amostra de urina obtida de uma paciente sob tratamento com o medicamento contendo o antidepressivo TRA, tendo o composto sido positivamente detetado com uma concentração de 1028 ± 92 ng mL⁻¹.

A figura 5.11 mostra os perfis cromatográficos obtidos a partir da análise da amostra de urina antes e depois da fortificação, sob condições experimentais otimizadas, confirmando a presença do antidepressivo TRA. O resultado encontra-se de acordo com os dados presentes na literatura, nos quais TRA é vulgarmente quantificado com esta ordem de magnitude em amostras de urina [17].

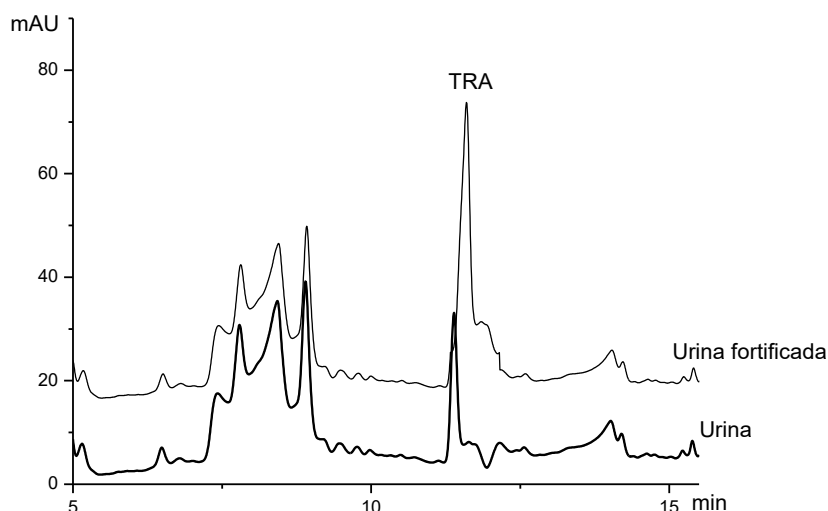


Figura 5.11. Cromatogramas obtidos a partir da análise de uma amostra de urina positiva para TRA, sob condições experimentais otimizadas.

5.3 Conclusões

Neste trabalho, uma nova geração de dispositivos BA μ E foi desenvolvida para introdução de um ciclo analítico inovador e simples, constituído por uma eficiente etapa de microextração, seguida da etapa de retroextração realizada num único passo. Com este propósito, diversas etapas de manipulação da amostra foram eliminadas, facilitando a combinação da BA μ E com sistemas instrumentais convencionais para o uso em rotina.

Para avaliar o desempenho analítico dos novos dispositivos BA μ E, quatro fármacos antidepressivos (bupropiona, trazodona, citalopram e amitriptilina) foram selecionados como compostos modelo. A metodologia proposta foi otimizada e validada, demonstrando excelente desempenho para a análise vestigial desses compostos em meio aquoso. Sob condições experimentais otimizadas, foram obtidas boas eficiências de extração para os quatro antidepressivos, assim como baixos LODs e LOQs e linearidade adequada numa gama linear alargada.

A fim de confirmar a aplicabilidade do método, os novos dispositivos BA μ E foram utilizados para a determinação dos analitos em estudo em fluidos biológicos como plasma e urina, tendo os resultados sido muito satisfatórios com

recurso ao método da adição de padrão. A metodologia proposta deu igualmente boa resposta na análise de urina de paciente sob tratamento.

Além de todas as vantagens já apresentadas pela BA μ E, como a possibilidade de escolher a fase sorvente mais adequada, a fácil preparação dos dispositivos analíticos, bem como o uso de volumes negligenciáveis de solventes orgânicos e a robustez, as inovações introduzidas neste trabalho fizeram desta técnica uma alternativa ainda mais promissora para análise de traços, sendo uma aborgadem com boa relação custo-benefício, amiga do ambiente e do usuário e ideal para uso em rotina.

5.4 Referências

- [1] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, New-generation bar adsorptive microextraction (BA μ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach—Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 153 (2018) 126–134.
- [2] J.M.F. Nogueira, Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques, *Anal. Chim. Acta.* 757 (2012) 1–10.
- [3] N.R. Neng, a. R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, Adsorptive micro-extraction techniques—Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7303–7310.
- [4] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Application of bar adsorptive microextraction (BA μ E) for anti-doping control screening of anabolic steroids in urine matrices, *J. Chromatogr. B.* 969 (2014) 35–41.
- [5] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction—Application to trace level analysis of fungicides in real matrices, *J. Chromatogr. A.* 1265 (2012) 7–16.
- [6] A.H. Ide, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Enhancement for trace analysis of sulfonamide antibiotics in water matrices using bar adsorptive microextraction (BA μ E), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 593–599.
- [7] J.M.F. Nogueira, Microextração adsortiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática, *Sci. Chromatogr.* 5 (2013) 275–283.
- [8] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique—Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices, *Talanta* 120 (2014) 126–134.
- [9] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Determination of trace levels of parabens in real matrices by bar adsorptive microextraction using selective sorbent phases, *J. Chromatogr. A.* 1348 (2014) 17–26.

- [10] OECD, Health at a Glance, OECD Indicators, OECD Publishing, 2015.
- [11] M.M. Zheng, S.T. Wang, W.K. Hu, Y.Q. Feng, In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography-mass spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma, *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 7493–7501.
- [12] J. Giebultowicz, G. Nałecz-Jawecki, Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata rivers and in tap water in Warsaw (Poland), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104 (2014) 103–109.
- [13] L.H. Sheng, H.-R. Chen, Y.B. Huo, J. Wang, Y. Zhang, M. Yang, H.X. Zhang, Simultaneous Determination of 24 Antidepressant Drugs and Their Metabolites in Wastewater by Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Molecules* 19 (2014) 1212–1222.
- [14] M.M. Schultz, E.T. Furlong, M.M. Schultz, E.T. Furlong, Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Aquatic Matrixes by LC/ESI/MS/MS, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1756–1762.
- [15] M.H. K. Jinno, M. Kawazoe, Solid-Phase Microextraction Coupled with Microcolumn Liquid Chromatography for the Analysis of Amitriptyline in Human Urine, *Chromatographia*. 52 (2000) 309–313.
- [16] A.R. Chaves, S.M. Silva, R.H.C. Queiroz, F.M. Lanças, M.E.C. Queiroz, Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 850 (2007) 295–302.
- [17] B.K. Logan, A.G. Costantino, E.F. Rieders, D. Sanders, Trazodone, meta-chlorophenylpiperazine (an hallucinogenic drug and trazodone metabolite), and the hallucinogen trifluoromethylphenylpiperazine cross-react with the EMIT®II ecstasy immunoassay in urine, *J. Anal. Toxicol.* 34 (2010) 587–589.

Capítulo 6

Determinação de filtros UV hidrofílicos em amostras ambientais aquosas e cremes de proteção solar por BA μ E(PS-DVB)/HPLC-DAD

A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, Determination of hydrophilic UV filters in real matrices using new generation bar adsorptive microextraction devices, submetido.

6.1 Considerações gerais

Nos últimos anos, o aumento dos problemas relacionados com a pele, nomeadamente queimaduras, envelhecimento precoce e cancro, devido à exposição solar, fez com que a radiação ultravioleta (UV) fosse considerada uma ameaça à saúde pública. A radiação UV pode atingir a superfície terrestre em forma de UVA (315-400 nm) ou UVB (280-315 nm), enquanto os raios UVC (200-280 nm) são absorvidos pelo ozono na estratosfera.

Os filtros UV são compostos capazes de oferecer proteção à nossa pele contra os raios UVA e UVB. Essas substâncias podem ser tanto de natureza orgânica quanto inorgânica e a diferença entre elas está no mecanismo de ação. Os filtros UV orgânicos atuam absorvendo os raios UV na estrutura molecular que contem anéis aromáticos, enquanto os filtros inorgânicos atuam dispersando e refletindo-os. A variedade de produtos contendo filtros UV atualmente no mercado é enorme, desde cremes de proteção solar, maquiagem, loções hidratantes, pós barba, protetores labiais, entre outros, sendo o uso principalmente associado a atividades de recreação aquáticas, mas também à crescente preocupação com o cuidado da pele, e conseqüentemente, o aumento do uso de produtos cosméticos.

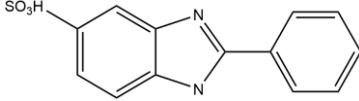
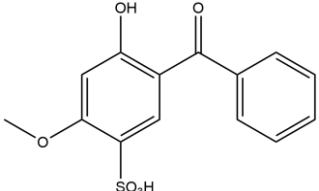
Desta forma, esses compostos são considerados poluentes emergentes, uma vez serem muito consumidos por grande parte da população e seus resíduos serem continuamente introduzidos no meio ambiente através de atividades aquáticas, bem como por efluentes domésticos e industriais. Como consequência, os filtros UV têm sido detetados ao nível de traços em diversas matrizes ambientais, principalmente águas superficiais [1], marítimas [2] e potáveis [3].

Os efeitos adversos face à presença desses compostos no ambiente são, portanto, um assunto de grande importância, sendo fundamental o desenvolvimento de métodos analíticos para monitorização de níveis de filtros UV em diferentes tipos de matrizes. Na literatura, diversas metodologias são utilizadas para a determinação de filtros UV lipofílicos por técnicas de microextração em matrizes ambientais [4–7]. Contudo, poucos estudos estão relacionados com a análise de filtros UV hidrofílicos, para além dos existentes serem quase todos baseados na utilização da tradicional SPE [8,9].

Neste contexto, a BAμE apresenta-se como uma técnica de microextração sortiva alternativa [10–12], tendo vindo a demonstrar grande desempenho analítico na determinação de diversas classes de compostos em vários tipos de matrizes reais [13–17]. No entanto, apesar do potencial analítico da BAμE, alguns aperfeiçoamentos foram recentemente introduzidos [18], como o desenvolvimento de uma nova geração de dispositivos, permitindo a introdução de um ciclo analítico inovador, simples, bem como amigo do utilizador e do ambiente, conforme discutido no Capítulo 5. O novo dispositivo BAμE, menor e mais flexível que a versão original, permite a realização da etapa de retroextração num único passo, que pode ser facilmente combinada com o uso de amostradores automáticos de sistemas instrumentais convencionais, favorecendo a aplicação em rotina.

O presente estudo propõe a aplicação de uma metodologia alternativa para a monitorização de dois filtros UV muito polares (ácido 2-fenil-5-benzimidazol sulfónico, PBS e ácido 5-benzoil-4-hidroxi-2-metóxi-benzeno sulfónico, BZ4; tabela 6.1), a fim de demonstrar a abrangência da aplicabilidade da nova geração de dispositivos BAμE, seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por rede de díodos (BAμE-μLD/HPLC-DAD). A otimização da metodologia proposta incluiu a comparação de sorventes e interações químicas, assim como a influência de diversos parâmetros experimentais nas etapas de extração e retroextração. A validação e a aplicação do método para a determinação dos dois filtros UV hidrofílicos em amostras aquosas ambientais e cremes de proteção solar é igualmente discutida.

Tabela 6.1. Estruturas químicas, log K_{ow} e p K_a dos filtros UV estudados.

Filtro UV	Estrutura química	Log K_{ow}	p K_a
PBS		-0,234	-0,87
BZ4		0,993	-0,70

6.2 Resultados e discussão

6.2.1 Otimização instrumental

A otimização instrumental teve início com a obtenção dos parâmetros de retenção dos dois filtros UV utilizados como compostos modelo neste estudo, PBS e BZ4. Para o efeito, foram inicialmente injetados padrões individuais dos analitos e, de seguida, padrões contendo a mistura de ambos. De acordo com os dados obtidos, o comprimento de onda selecionado foi de 300 nm, correspondendo ao máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) dos filtros UV em estudo. Foi utilizada uma fase móvel constituída por tampão acetato 20 mM (pH 4,75) e MeOH no modo isocrático, numa proporção 70:30. Uma vez os compostos alvo serem demasiado polares e ionizáveis (tabela 6.1) e o equilíbrio de ionização ser dependente da temperatura, a coluna foi mantida a 50 °C. Desta forma, foram obtidos picos mais simétricos e com menor largura de base. Sob condições instrumentais otimizadas, foram alcançadas boa seletividade e resolução num tempo total de análise de 11 min.

Posteriormente, a sensibilidade instrumental foi determinada por intermédio dos LODs e LOQs, através da injeção sucessiva de padrões de calibração dos filtros UV diluídos, calculados com recurso à razão S/N 3 e 10, respetivamente. Neste sentido, obtiveram-se valores de LODs de 20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de LOQs de 60 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o PBS e para o BZ4, respetivamente. De seguida, a calibração instrumental foi efetuada através da injeção de padrões de calibração constituídos pelos analitos em estudo abrangendo concentrações desde 60 a 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o PBS e 300 a 25.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o BZ4, num total de seis níveis de concentração. Na gama de concentrações estudada, obtiveram-se boas linearidades para ambos os filtros UV, com coeficientes de determinação (r^2) de 0,9982 para o PBS e 0,9996 para o BZ4.

6.2.2 Otimização do método analítico

6.2.2.1 Seleção da fase sorvente

Uma das principais vantagens da BA μ E consiste na possibilidade de utilizar a fase sorvente mais adequada para cada aplicação em particular, de acordo com as características dos analitos, de forma a obter máxima seletividade no processo de microextração. Neste sentido, a capacidade sortiva de dois polímeros (HLB e PS-DVB) e dois carvões ativados (CA1 e CN1) foi avaliada, sendo os resultados apresentados na figura 6.1, na qual se observa que a fase polimérica PS-DVB apresentou o maior valor de recuperação média.

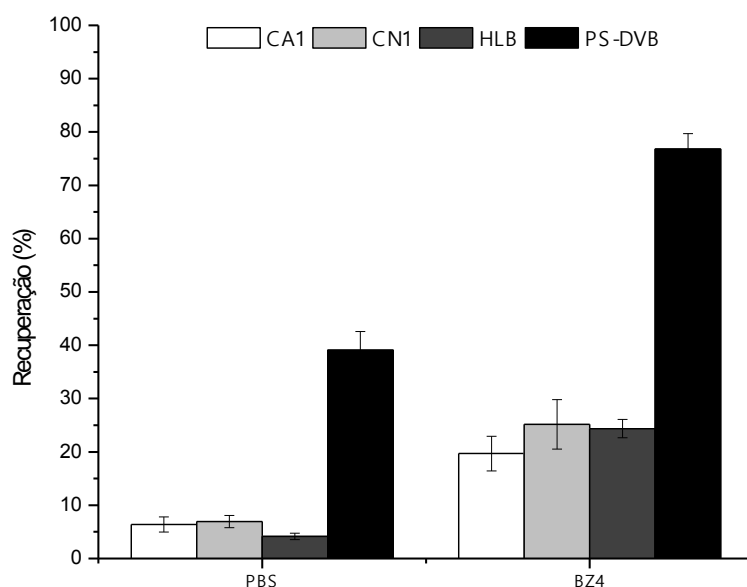


Figura 6.1. Efeito da variação da fase sorvente na microextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 2,0; retroextração, fase móvel (100 μ L), 30 min sob ultrassons.

Os ACs são materiais sólidos porosos retendo os analitos por meio de interações eletrostáticas e/ou dispersivas de acordo com propriedades texturais, nomeadamente área superficial e dimensão dos poros. As interações entre os ACs e os analitos são fortemente influenciadas pelo pH do meio. Quando o pH da matriz é igual ao pH_{pzc} , a superfície do AC encontra-se neutra. Se o pH for menor que o pH_{pzc} , ocorrerá a formação de cargas positivas e, em contrário, a superfície do AC ficará carregada negativamente. Portanto, a pH 2,0, os grupos

sulfônicos dos filtros UV encontram-se desprotonados ($pK_a < 1$), enquanto o carvão CA1 ficará neutro e o CN1, carregado positivamente, podendo ocorrer interações eletrostáticas entre os compostos alvo e o segundo sorvente. No entanto, em alguns casos, as interações podem ser tão intensas que os analitos continuam retidos nos poros do sorvente mesmo após a etapa de retroextração, levando conseqüentemente a baixos valores de recuperação.

Por outro lado, os Ps testados são do tipo fase reversa, retendo os analitos de acordo com o tamanho de partícula, área superficial e mecanismos envolvidos. Desta forma, a presença de anéis aromáticos tanto na estrutura polimérica quanto nas moléculas dos analitos alvos parece favorecer interações do tipo π - π , dipolo-dipolo e/ou ligações hidrogénio entre elas. Além disso, a fase PS-DVB provavelmente apresentou melhor eficiência na microextração dos filtros UV em estudo devido à sua maior área superficial ($1200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) quando comparada com a fase HLB ($810 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), tendo sido selecionada como fase sorvente para os estudos seguintes.

6.2.2.2 Etapa de retroextração

A retroextração foi desde sempre a etapa mais limitativa na BA μ E, uma vez requerer diversos passos de manipulação da amostra (ex. remover o dispositivo analítico do frasco de amostragem, transferi-lo para um *vial* contendo solvente orgânico para LD, tratamento ultrassónico, remoção do dispositivo BA μ E, evaporação do solvente, troca de solventes, etc). Contudo, no capítulo 5, propôs-se uma nova geração de dispositivos BA μ E, permitindo a introdução de um ciclo analítico inovador, cuja etapa de retroextração era realizada num único passo, para além de diversas vantagens analíticas evidenciadas.

Desta forma, no presente estudo, utilizou-se a tecnologia proposta no capítulo anterior para a análise dos filtros UV. Neste contexto, após a etapa de microextração, o novo dispositivo analítico foi transferido do frasco de amostragem para um *vial* contendo um *insert* e 100 μL da fase móvel. O *vial* foi selado, submetido ao tratamento ultrassónico por determinado tempo, ficando de imediato disponível para análise instrumental por HPLC-DAD. Foram avaliados diferentes tempos de ultrassons (10, 15, 30 e 60 min), tendo os

resultados obtidos (A.II.3) mostrados que 10 min eram suficientes para dessorver os analitos da fase PS-DVB.

A LD realizada num único passo demonstrou ser uma abordagem muito amigável do usuário e simples do ponto de vista prático, facilitando ainda mais o uso da técnica BA μ E. Uma vez os novos dispositivos analíticos apresentarem dimensões pequenas (7,5 × 10 mm) e grande flexibilidade, a operação de injeção ocorreu sem riscos de dano para a agulha, não se tendo observado qualquer tipo de problema técnico. Os novos dispositivos são, portanto, totalmente compatíveis com *autosamplers* convencionais de LC, comprovando-se novamente serem uma excelente alternativa para uso em rotina.

6.2.2.3 Etapa de microextração

O processo de microextração, que opera sob a tecnologia de amostragem por flutuação, é conduzido por diversos fatores que podem afetar a afinidade dos analitos com a fase sorvente. Neste sentido, os principais parâmetros que podem influenciar essa etapa, incluindo os cinéticos (tempo de extração e velocidade de agitação) e os termodinâmicos (pH, força iônica e polaridade da matriz), foram otimizados para maximizar a eficiência do método.

Uma vez os dois filtros UV em estudo serem compostos extremamente hidrofílicos, observou-se desde o início que o pH poderia ser um parâmetro determinante na microextração desses analitos. Assim, foram estudados valores de pH compreendidos entre 1,0 e 8,0. Os resultados obtidos e apresentados na figura 6.2 mostraram que houve acentuado decréscimo dos níveis de recuperação com o aumento do pH, tendo sido selecionado o pH 2,0 para os estudos posteriores.

De seguida, os parâmetros cinéticos como tempo de extração e velocidade de agitação foram avaliados. O tempo de extração, fator que pode limitar a distribuição dos analitos entre a matriz e a fase sorvente, foi estudado entre 1 e 16 h de extração. Na figura 6.3, é observado que o processo apresenta uma cinética lenta, sendo necessárias 16 h para atingir os maiores valores de recuperação. Por outro lado, foram realizados ensaios de velocidade de agitação (750, 1000 e 1250 rpm), a partir dos quais foram notados melhores resultados

para velocidades mais baixas (A.II.4), uma vez oferecerem maior estabilidade ao dispositivo BAμE.

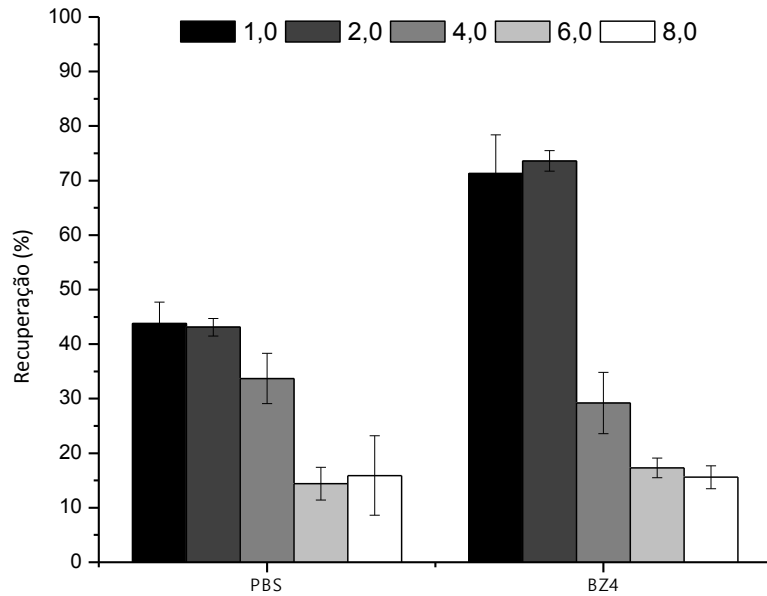


Figura 6.2. Efeito da variação do pH da matriz na microextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm); retroextração, fase móvel (100 μL), 10 min sob ultrassons.

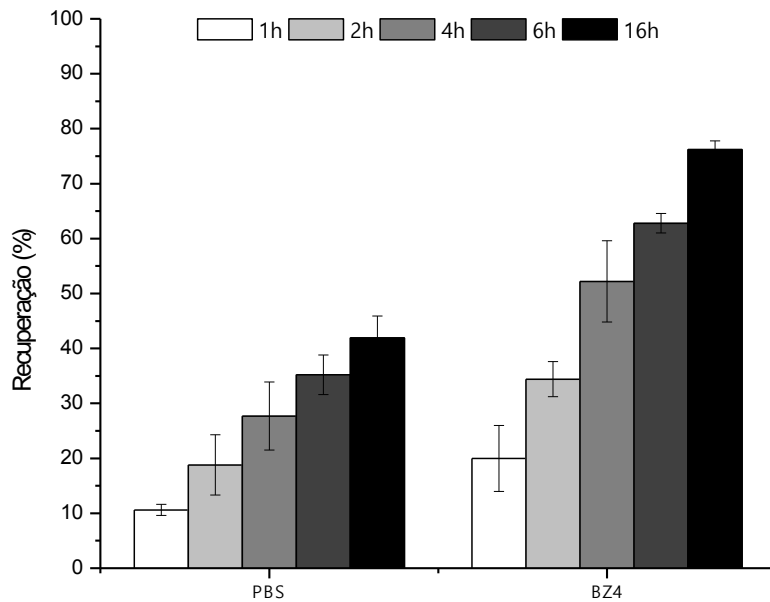


Figura 6.3. Efeito da variação do tempo de equilíbrio na microextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 2,0; retroextração, fase móvel (100 μL), 10 min sob ultrassons.

A força iônica foi igualmente estudada, com recurso à adição de NaCl (5, 10, 15, 20 e 30 %, m:v) à matriz. A adição de um eletrólito ao meio contribui para a redução da solubilidade dos analitos, fundamentalmente para compostos mais polares, como é o caso dos filtros UV em estudo, forçando-os a migrar em direção à fase extrativa e, conseqüentemente, aumentando os níveis de recuperação. Como mostrado na figura 6.4, o aumento da concentração de NaCl do meio ocasionou substancial incremento da recuperação para o composto PBS ($\approx 20\%$) e ligeira perda de eficiência na extração do BZ4 ($\approx 5\%$). Contudo, uma vez o benefício para o primeiro composto ser muito superior à desvantagem para o segundo, optou-se por utilizar a concentração de 20% de NaCl na matriz para os ensaios de validação do método.

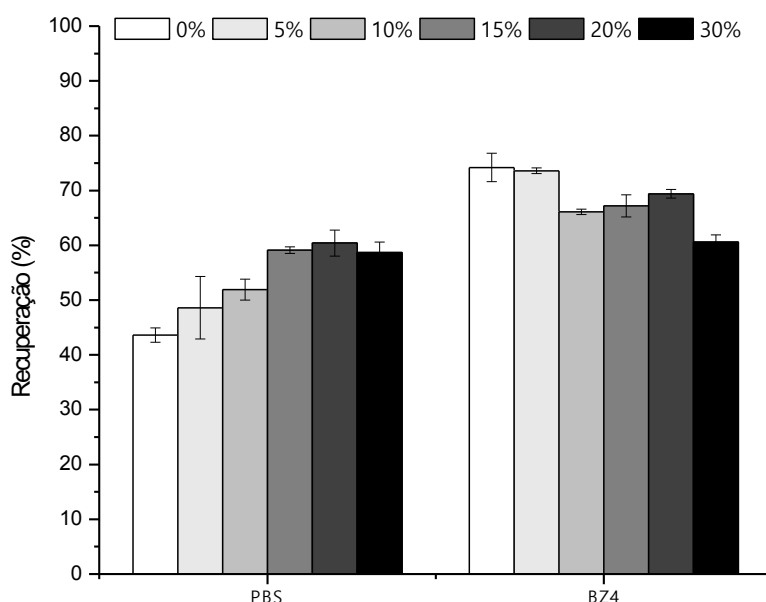


Figura 6.4. Efeito da variação da força iônica da matriz na microextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (750 rpm), pH 2,0; retroextração, fase móvel (100 μ L), 10 min sob ultrassons.

Por último, a modificação da polaridade da matriz foi testada com adição de MeOH (5, 10 e 15%, v:v) ao meio de extração. No entanto, a partir dos resultados obtidos, apresentados na figura 6.5, a adição do modificador orgânico à matriz influenciou negativamente o processo de microextração, comprometendo os níveis de recuperação, uma vez o MeOH provavelmente ter contribuído para o aumento da solubilidade dos filtros UV em meio aquoso.

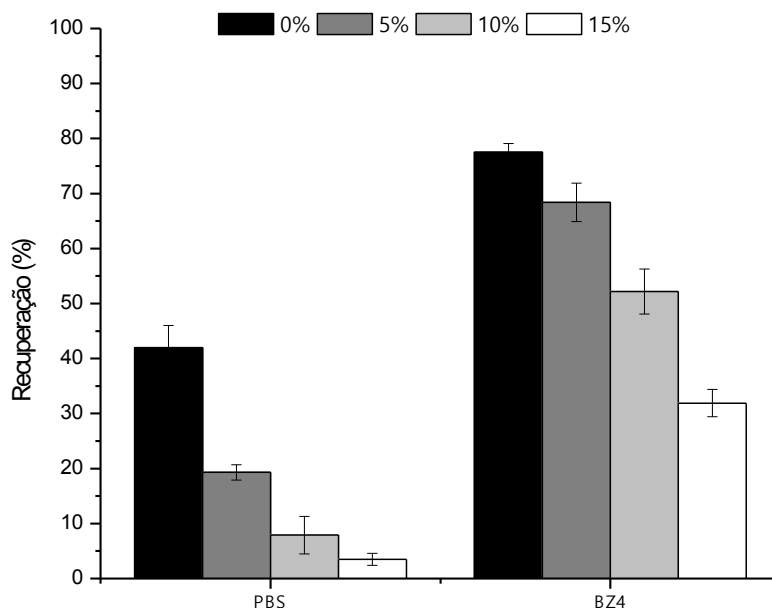


Figura 6.5. Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (750 rpm), pH 2,0; retroextração, fase móvel (100 μ L), 10 min sob ultrassons.

6.2.3 Validação do método analítico

Depois de otimizados os principais parâmetros que poderiam afetar os processos de microextração e retroextração, por forma a maximizar o desempenho analítico da metodologia BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD, estabeleceram-se as condições experimentais para prosseguir para a validação do método; microextração: PS-DVB, 16 h (750 rpm), pH 2,0 e 20 % de NaCl; retroextração: fase móvel (100 μ L), 10 min sob ultrassons.

Para avaliar a eficiência da metodologia proposta, foram realizados ensaios em 25 mL de água ultrapura fortificada com os analitos alvos, tendo as concentrações variando entre 0,16 - 16,00 μ g L⁻¹ para o PBS e 0,80 - 80,00 μ g L⁻¹ para o BZ4. A sensibilidade foi ainda avaliada por intermédio do cálculo dos LODs e LOQs obtidos da razão S/N a 3 e 10, respetivamente.

A tabela 6.2 resume todos os dados alcançados na validação do método, nomeadamente recuperações médias (61,8 \pm 9,1 % para o PBS e 69,5 \pm 4,8 % para o BZ4), LODs (0,04 μ g L⁻¹ para o PBS e 0,20 μ g L⁻¹ para o BZ4), LOQs (0,16 μ g L⁻¹ for PBS and 0,80 μ g L⁻¹ for BZ4) e coeficientes de determinação (r^2 = 0,9985 para o PBS e 0,9993 para o BZ4), sob condições experimentais

otimizadas. A partir dos resultados obtidos, foi observado bom desempenho analítico para a análise de ambos os filtros UV em matriz aquosa.

Tabela 6.2. Recuperações médias, LODs, LOQs, gama linear dinâmica e coeficientes de determinação para os dois filtros UV obtidos por BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD na validação do método analítico, sob condições experimentais otimizadas.

Filtro UV	Recuperação (%)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Gama linear dinâmica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2
PBS	61,8 \pm 9,1	0,04	0,16	0,16-16,0	0,9985
BZ4	69,5 \pm 4,8	0,20	0,80	0,80-80,0	0,9993

A presença dos grupos sulfônicos nas estruturas químicas de ambos os filtros UV faz com que as moléculas sejam muito solúveis em água, dificultando o processo de extração. Como consequência, poucos estudos são encontrados na literatura relacionados com a determinação destes analitos, sendo que a grande maioria utiliza SPE como método de preparação da amostra, uma técnica com custo elevado e pouco amigável ao ambiente, se comparada com métodos de microextração mais modernos. A única metodologia reportada na literatura baseada em microextração passiva para determinação de filtros UV hidrofílicos, *stir bar sorptive-dispersive microextraction* (SBSDME, recuperações médias de 58 \pm 2 e 55 \pm 5 % e LODs de 2,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o PBS e o BZ4, respectivamente) [19], apresentou valores de recuperação menores e LODs mais elevados que o presente estudo.

Neste sentido, a BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD provou ser uma excelente alternativa para a monitorização destes tipos de filtros UV em amostras aquosas, sendo uma abordagem com ótima relação custo-benefício, simples do ponto de vista prático, amigável ao ambiente e compatível com o uso em rotina.

6.2.4 Aplicação a matrizes reais

Para demonstrar a capacidade analítica da metodologia proposta, aplicou-se a BA μ E(PS-DVB)- μ LD/HPLC-DAD na monitorização dos dois filtros UV em diversas matrizes reais, como água potável, marítima, estuarina e efluentes de ETAR, bem como amostras de creme de proteção solar. Uma vez as amostras apresentarem elevada complexidade, o SAM foi utilizado para quantificação, no sentido de minimizar os possíveis efeitos de matriz. Assim, as amostras foram fortificadas com soluções padrões dos analitos por forma a se obter concentrações finais compreendidas entre 0,4 e 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o PBS e 2,0 a 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o BZ4, em quatro níveis. Ensaio em branco, sem fortificação, foram realizados em simultâneo para o máximo controlo do processo.

Dos resultados obtidos, os filtros UV estudados não foram detetados nas matrizes ambientais. Por outro lado, o creme de proteção solar analisado apresentou uma concentração de 5 % ($49,8 \pm 8,3 \text{ mg g}^{-1}$) do composto PBS, estando de acordo com o Regulamento (CE) N $^{\circ}$ 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de Novembro de 2009, relativo aos produtos cosméticos, o qual permite um nível máximo de concentração de 8 % deste composto.

Conforme reportado na literatura [19], alguns efeitos de matriz foram observados durante o estudo das amostras reais, embora boa linearidade tenha sido alcançada, com coeficientes de determinação superiores a 0,9940 (BZ4, efluente de ETAR), obtidos das curvas calibração (tabela 6.3). Face à elevada hidrofiliabilidade dos analitos, quanto mais complexa a matriz, maior a perda de sensibilidade analítica do método. Neste contexto, as amostras de água estuarina e marítima apresentaram cerca de três quartos da recuperação alcançada em água ultrapura, enquanto o efluente, cerca de um terço.

A figura 6.6 apresenta perfis cromatográficos relativos aos ensaios realizados em amostras de água ultrapura (a), potável (b), marítima (c), estuarina (d) e efluente de ETAR (e), assim como de creme de proteção solar, sob condições experimentais otimizadas, nos quais pode ser observada boa seletividade e sensibilidade adequada.

6. Determinação de filtros UV hidrofílicos em amostras ambientais aquosas e cremes de proteção solar por BAμE(PS-DVB)/HPLC-DAD

Tabela 6.3. Coeficientes de determinação e concentração detetada para os dois filtros UV obtidos por BAμE(PS-DVB)-μLD/HPLC-DAD nas matrizes reais analisadas, sob condições experimentais otimizadas.

Filtro UV	Água potável	Água do mar	Água estuarina	Efluente de ETAR	Creme de proteção solar
	r^2				
PBS	0,9999	0,9998	0,9975	0,9942	0,9983
BZ4	0,9998	0,9998	0,9994	0,9940	0,9988
	Concentração (mg g⁻¹)				
PBS	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	49,8±8,3
BZ4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

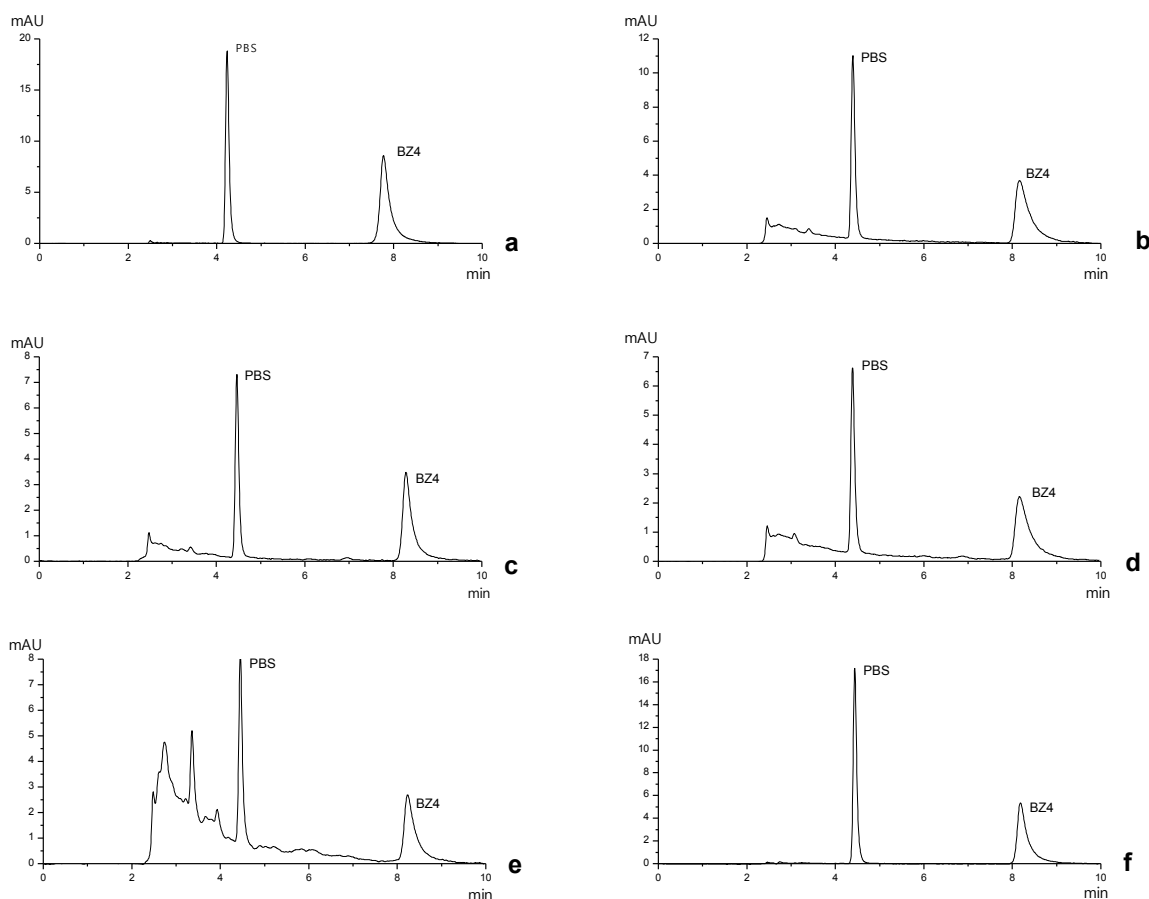


Figura 6.6. Cromatogramas obtidos por BAμE(PS-DVB)-μLD/HPLC na análise dos dois filtros UV nas amostras de água ultrapura (a), água potável (b), água do mar (c), água estuarina (d) e efluente de ETAR (e), bem como em creme de proteção solar (f), sob condições experimentais otimizadas.

6.3 Conclusões

Uma metodologia inovadora utilizando a nova geração de dispositivos BAμE foi desenvolvida para a monitorização de dois filtros UV hidrofílicos (PBS e BZ4) em matrizes aquosas ambientais e cremes de proteção solar. Sob condições experimentais otimizadas, o método proposto apresentou boas recuperações para ambos os filtros UV, assim como limiares analíticos adequados e excelente linearidade numa ampla gama de trabalho.

Do ponto de vista prático, para além de todas as vantagens já apresentadas, o uso dos novos dispositivos BAμE possibilitou a utilização de um ciclo analítico simples, amigável ao utilizador e ao ambiente e com excelente relação custo-benefício, fazendo desta abordagem uma ótima alternativa para a análise dos filtros UV hidrofílicos em matrizes aquosas, quando comparada a outras técnicas de enriquecimento de amostras.

6.4 Referências

- [1] Y. Kameda, K. Kimura, M. Miyazaki, Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 1570–1576.
- [2] M.M.P. Tsui, H.W. Leung, T.C. Wai, N. Yamashita, S. Taniyasu, W. Liu, P.K. Lam, M.B. Murphy, Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries, *Water Res.* 67 (2014) 55–65.
- [3] I.P. Román, A. Chisvert, A. Canals, Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography-mass spectrometry for UV-filter determination in water samples, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 2467–2475.
- [4] K.T.N. Nguyen, C. Scapolla, M. Di Carro, E. Magi, Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction, *Talanta* 85 (2011) 2375–2384.
- [5] Y. Zhang, H.K. Lee, Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in environmental water samples, *Anal. Chim. Acta.* 750 (2012) 120–126.
- [6] M. Vila, M. Celeiro, J.P. Lamas, T. Dagnac, M. Llompart, C. Garcia-Jares, Determination of fourteen UV filters in bathing water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods.* 8 (2016) 7069–7079.
- [7] C. Almeida, A. Stępkowska, A. Alegre, J.M.F. Nogueira, Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases, *J. Chromatogr. A.* 1311 (2013) 1–10.

- [8] N. Negreira, I. Rodríguez, M. Ramil, E. Rubí, R. Cela, Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of hydroxylated benzophenone UV absorbers in environmental water samples, *Anal. Chim. Acta.* 654 (2009) 162–170.
- [9] S. Bratkovics, Y. Sapozhnikova, Determination of seven commonly used organic UV filters in fresh and saline waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods.* 3 (2011) 2943.
- [10] N.R. Neng, a. R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, Adsorptive micro-extraction techniques-Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7303–7310.
- [11] J.M.F. Nogueira, Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques, *Anal. Chim. Acta.* 757 (2012) 1–10.
- [12] J.M.F. Nogueira, Microextração adsortiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática, *Sci. Chromatogr.* 5 (2014) 275–283.
- [13] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Development of a bar adsorptive micro-extraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1355–1364.
- [14] F.N. Andrade, A.H. Ide, N.R. Neng, F.M. Lanças, J.M.F. Nogueira, Determination of trace levels of triazines in corn matrices by bar adsorptive microextraction with a molecularly imprinted polymer, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 756–761.
- [15] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA μ E), *Talanta* 136 (2015) 145–154.
- [16] A.H. Ide, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Enhancement for trace analysis of sulfonamide antibiotics in water matrices using bar adsorptive microextraction (BA μ E), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 593–599.
- [17] S.M. Ahmad, A.H. Ide, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Application of bar adsorptive microextraction to determine trace organic micro-pollutants in environmental water matrices, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* (2017) 1–15.
- [18] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, New-generation bar adsorptive microextraction (BA μ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach—Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 153 (2018) 126–134.
- [19] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the extraction of hydrophilic organic compounds in aqueous media, *Anal. Chim. Acta.* 926 (2016) 63–71.

Capítulo 7

Microextração em fibra oca (HF μ E) - Aplicação para análise vestigial de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em matrizes reais

A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, Hollow fiber microextraction: a new hybrid microextraction technique for trace analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 2911–2920 [1].

7.1 Considerações gerais

Nas últimas décadas, as técnicas de microextração têm evidenciado grande desenvolvimento e demonstraram ser uma opção efetiva para a determinação vestigial de compostos prioritários em diferentes tipos de matrizes. As abordagens de microextração estática apresentam diversas vantagens quando comparadas com as técnicas de extração dinâmica, incluindo o uso de dispositivos analíticos miniaturizados e de fácil manipulação, baixo consumo de solventes orgânicos tóxicos, bem como elevada seletividade e sensibilidade, ideais para serem combinados com a grande capacidade da instrumentação analítica atual.

Neste contexto, a SPME [2], a SBSE [3] e, mais recentemente, a BA μ E [4] constituem técnicas sortivas alternativas introduzidas como etapa de enriquecimento de amostra previamente a análise cromatográfica. Complementarmente, abordagens baseadas em líquidos, como a SDME [5], HF-LPME [6] e DLLME [7] têm vindo a ser igualmente propostas. Em geral, as técnicas de microextração com solventes apresentam cinética rápida, requerem materiais simples e possuem bom custo-benefício. Contudo, não são consideradas amigas do usuário devido à dificuldade de manipulação. Por outro lado, as técnicas baseadas em sólidos são consideradas mais amigas do ambiente, fáceis de manusear e mais simples de se automatizar. Porém, essas abordagens requerem sempre a etapa de retroextração, efetuada por meio de TD ou LD, dependendo dos analitos e da instrumentação envolvida. Embora a LD seja mais abrangente, normalmente envolve diversos passos de manipulação, dificultando o uso em rotina [8]. Apesar de todas as técnicas de microextração citadas apresentarem vantagens e limitações, é difícil selecionar uma delas como sendo uma abordagem universal, devendo-se levar em conta as características dos analitos, bem como das amostras, para cada aplicação em particular. Assim, é imperativo o desenvolvimento de novos métodos analíticos, fundamentalmente envolvendo uma estratégia amiga do usuário e do ambiente, com boa relação custo-benefício e dedicada ao uso em rotina.

O presente estudo tem como foco a introdução de uma nova técnica híbrida, a microextração em fibra oca (HF μ E - *hollow fiber microextraction*), para a análise vestigial de compostos orgânicos em matrizes reais. Esta abordagem

é considerada híbrida uma vez reunir as principais vantagens das técnicas descritas anteriormente, em particular a SDME, a HF-LPME e a BA μ E, a fim de superar diversas limitações.

Na HF μ E, a etapa de microextração é realizada com um dispositivo analítico constituído por uma membrana oca de PP [conhecida por *hollow fiber* (HF)], com 10 mm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro interno, um material de baixo custo utilizado em HF-LPME], embebida com um solvente orgânico adequado (apresentando uma cinética rápida como em SDME) e operando sob a tecnologia de amostragem por flutuação (demonstrando a robustez da BA μ E). A etapa de retroextração é realizada num único passo e todo o processo analítico é muito simplificado, compatível com sistemas instrumentais convencionais e dedicado ao trabalho de rotina.

Para demonstrar o desempenho analítico da HF μ E, 18 PAHs foram selecionados como compostos modelo. Os PAHs são, por definição, compostos orgânicos binários formados por átomos de carbono e hidrogênio numa estrutura que consiste em 2 ou mais anéis aromáticos, de 5 ou 6 átomos de carbono condensados. Os PAHs são formados a partir da queima incompleta da matéria orgânica, podendo ser emitidos por fontes naturais ou antropogénicas. A contribuição das fontes naturais é muito limitada, restringindo-se aos processos biológicos como queima espontânea de florestas e atividade vulcânica. Por outro lado, a atividade humana representa a principal fonte de produção de PAHs, que são gerados na queima de combustíveis fósseis para produção de energia, incineração doméstica e industrial, fumo do tabaco, pirólise da madeira para produção de carvão, incêndios, entre outras operações. Neste contexto, os PAHs são dispersos pelo ar e distribuem-se para os ecossistemas terrestres e aquáticos por diversos mecanismos, sendo a presença desses compostos no meio ambiente ubíqua. A exposição aos PAHs ocorre por inalação, ingestão ou contato com a pele, sendo esses poluentes considerados compostos de alta toxicidade, interferindo nas funções das membranas celulares. Estudos realizados provaram que os PAHs podem ser carcinogénicos e mutagénicos e potentes imunodepressores.

Embora existam na literatura diversos métodos analíticos para a determinação de PAHs, como SPME [9], SBSE [10], SDME [11], DLLME [7] e HF-LPME [12], todos eles apresentam limitações principalmente no que diz

respeito à manipulação e ao custo associado à análise. Neste sentido, a HF μ E vem a ser uma técnica de microextração estática inovadora e alternativa para monitorização de analitos com características mais apolares em matrizes reais e dedicada ao trabalho de rotina.

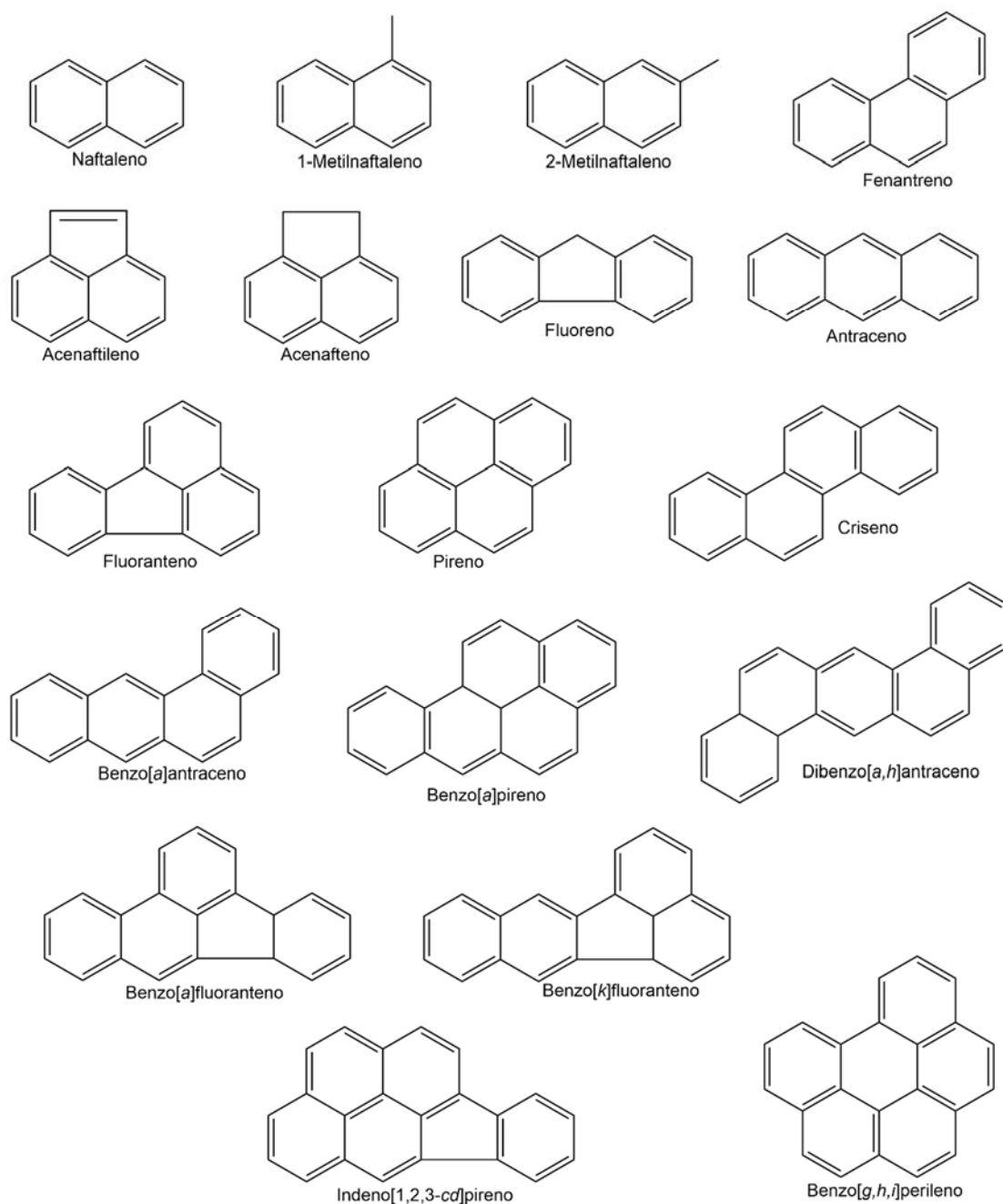


Figura 7.1. Estruturas químicas dos 18 PAHs estudados.

7.2 Resultados e discussão

7.2.1 Otimização instrumental

De forma a obter as melhores condições de operação instrumental para a análise dos 18 PAHs em estudo, o primeiro passo consistiu na injeção de uma solução padrão mistura contendo todos os analitos no sistema GC-MS operando no modo varrimento contínuo (*full-scan*). A partir dos dados obtidos, o padrão de fragmentação de cada PAH foi avaliado, tendo sido selecionado o íon alvo (pico base) e os principais fragmentos (tabela 7.1), com a finalidade de alcançar o compromisso entre a seletividade e a sensibilidade, para posterior operação no modo SIM.

Tabela 7.1. Coeficientes de partição octanol-água ($\log K_{ow}$), tempos de retenção e íões selecionados para a análise dos 18 PAHs por GC-MS(SIM).

PAH	Log K_{ow} ^a	t _R (min)	Grupo	Íon (m/z) ^b
Naftaleno	3,30	6,80	1	127, <u>128</u> , 129
1-Metilnaftaleno	3,87	7,96	2	115, 141, <u>142</u>
2-Metilnaftaleno	3,86	8,14		115, 141, <u>142</u>
Acenaftileno	3,93	9,51	3	151, <u>152</u> , 153
Acenafteno	3,92	9,83		152, <u>153</u> , 154
Fluoreno	4,18	10,72	4	165, <u>166</u> , 167
Fenantreno	4,46	12,38	5	176, <u>178</u> , 179
Antraceno	4,45	12,46		89, <u>178</u> , 179
Fluoranteno	5,16	14,48	6	201, <u>202</u> , 203
Pireno	4,88	14,80		201, <u>202</u> , 203
Benzo[a]antraceno	5,76	16,97	7	114, <u>228</u> , 229
Criseno	5,73	17,04		114, <u>228</u> , 229
Benzo[a]fluoranteno	6,11	19,10	8	126, <u>252</u> , 253
Benzo[k]fluoranteno	6,11	19,15		125, <u>252</u> , 253
Benzo[a]pireno	6,13	19,86		126, <u>252</u> , 253
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno	6,70	23,26	9	138, <u>276</u> , 227
Dibenzo[a,h]antraceno	6,50	23,31		139, <u>278</u> , 279
Benzo[g,h,i]perileno	6,63	24,20		138, <u>276</u> , 277

^a Cálculos efetuados utilizando o software Marvin 6.2.2, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)

^b Íões de quantificação (sublinhados) e íões qualificadores (fragmentos).

Operando nestas condições instrumentais, a monitorização dos iões selecionados mostrou resposta instrumental adequada para cada analito, assim como picos simétricos, em tempo analítico adequado (< 27 min). De seguida, foi avaliada a sensibilidade instrumental por intermédio dos LODs e LOQs, determinados pela injeção sucessiva de padrões de calibração diluídos, calculados com recurso à razão S/N 3 e 10, respetivamente. Neste sentido, obtiveram-se valores compreendidos entre 1,0 e 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os LODs, e de 5,0 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os LOQs. A calibração instrumental foi efetuada com recurso a injeção de padrões dos analitos abrangendo concentrações compreendidas entre 10,0 e 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, para nove níveis. Nesta gama de trabalho foram obtidas boas linearidades para todos os PAHs, com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,999.

7.2.2 Implementação de um novo ciclo analítico

A HF μ E pode ser entendida como uma abordagem híbrida uma vez reunir as principais vantagens de algumas importantes técnicas de microextração estática, nomeadamente a HF-LPME, a SDME e a BA μ E. Os métodos analíticos de microextração usando HFs presentes na literatura [13,14] envolvem sempre diversos passos de manipulação da amostra (como por exemplo a utilização de microseringas para inserir o solvente no lumen da HF, selar as pontas da membrana para a etapa de microextração, cortar umas das extremidades seladas para retirar alguns μL do solvente para injeção intrumental), não sendo práticos nem convenientes para o uso em rotina.

Neste contexto, o presente trabalho propõe um novo modo de utilização das HFs (figura 7.2), com dimensões de 10 mm em comprimento e 0,6 mm em diâmetro interno. O ciclo analítico proposto para a HF μ E, conforme ilustrado na figura 7.3, é composto por uma etapa de microextração efetiva e a retroextração realizada num único passo. Esta abordagem é, neste sentido, semelhante às apresentadas nos capítulos 5 e 6, embora recomendada para a análise de compostos semi-voláteis a voláteis (apolares).



Figura 7.2. Dispositivo HF μ E.

Desta forma, para a microextração, efetuada sob a tecnologia de amostragem por flutuação, a HF é imersa durante alguns segundos num solvente orgânico adequado, para que o mesmo migre por capilaridade para os poros da membrana. De seguida, a HF é imediatamente inserida no frasco de amostragem contendo 25 mL de amostra e uma barra comum de agitação magnética e o frasco é vedado. Face à elevada capacidade de partição dos analitos para o solvente, a cinética da etapa de microextração é muito rápida, sendo esta uma vantagem sobre os métodos de preparação de amostra baseados em sólidos. Após atingido o equilíbrio, o dispositivo analítico é removido do frasco de amostragem e inserido num *vial* contendo um *insert* e 100 μ L do mesmo solvente utilizado na microextração. O *vial* é selado, submetido ao tratamento ultrassónico por alguns minutos, ficando disponível para a análise por GC-MS.

Devido às reduzidas dimensões da HF, a retroextração pode ser realizada num único passo sem a necessidade de remoção do dispositivo, havendo espaço suficiente para a operação de injeção. Desta forma, a HF μ E pode ser facilmente combinada com o uso dum amostrador automático convencional de sistemas cromatográficos presentes em laboratórios de química analítica, sendo uma abordagem abrangente e dedicada ao uso em rotina.



Figura 7.3. Procedimento experimental proposto no ciclo HF μ E.

7.2.3 Otimização do método analítico

7.2.3.1 Seleção do solvente orgânico

O solvente orgânico utilizado para preencher as paredes das HFs determina a afinidade dos analitos da amostra com a fase extratora, por isso o mesmo deve ser cuidadosamente selecionado, devendo-se levar em conta duas características físicas fundamentais, a volatilidade e a respectiva solubilidade em água. Depois de impregnadas com o solvente, as HFs são inseridas no frasco de amostragem. Portanto, o solvente selecionado necessita de apresentar ponto de ebulição elevado o suficiente para não haver perdas por evaporação nesta etapa. Por outro lado, a solubilidade em água é outro fator importante, uma vez que se o solvente for muito miscível com a água, poderão ocorrer perdas para o seio da matriz durante a etapa de microextração, prejudicando a eficiência do processo. Neste sentido, foram avaliados sete diferentes solventes orgânicos (DCM, EtAc, MTBE, Tol, *n*-C7, *n*-C8 e *n*-C9) sob condições experimentais

padrões (microextração: 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração: 5 min sob tratamento ultrassônico), a fim de maximizar a seletividade do método.

As figuras 7.4a e b mostram os resultados obtidos para a microextração dos 18 PAHs com os diversos solventes, observando-se que as HFs impregnadas com Tol, *n*-C7, *n*-C8 e *n*-C9 apresentaram eficiências de extração muito superiores às obtidas com DCM, EtAc e MTBE. Conforme esperado, os solventes com menor miscibilidade em água e pontos de ebulição mais elevados (tabela 7.2) demonstraram vantagens como fase extrativas na HF μ E. A partir desses ensaios preliminares, o *n*-C9 foi o solvente que forneceu os melhores resultados de recuperações, sendo portanto selecionado para os estudos seguintes de otimização do método.

7.2.3.2 Etapa de retroextração

Para a etapa de retroextração, é proposta uma abordagem muito simples, na qual a LD é realizada num único passo. Neste sentido, após alcançado o equilíbrio na etapa de microextração, o dispositivo analítico foi cuidadosamente removido do frasco de amostragem e inserido num *vial* contendo um *insert* e 100 μ L do mesmo solvente orgânico utilizado para a microextração, ou seja, *n*-C9. O conjunto foi selado e submetido ao tratamento ultrassônico, estando de seguida preparado para a análise por GC-MS(SIM). Para alcançar o melhor desempenho na etapa de retroextração, diferentes tempos de ultrassons (2, 5 e 15 min) foram avaliados. De acordo com os resultados obtidos (A.II.5), foram suficientes 2 min para dessorver os PAHs da HF.

Do ponto de vista prático, a operação de retroextração, além de muito eficiente, é amigável ao ambiente, uma vez requerer apenas 100 μ L de solvente orgânico, muito simples e com pouca manipulação, sendo ainda compatível com sistemas instrumentais convencionais para uso em rotina.

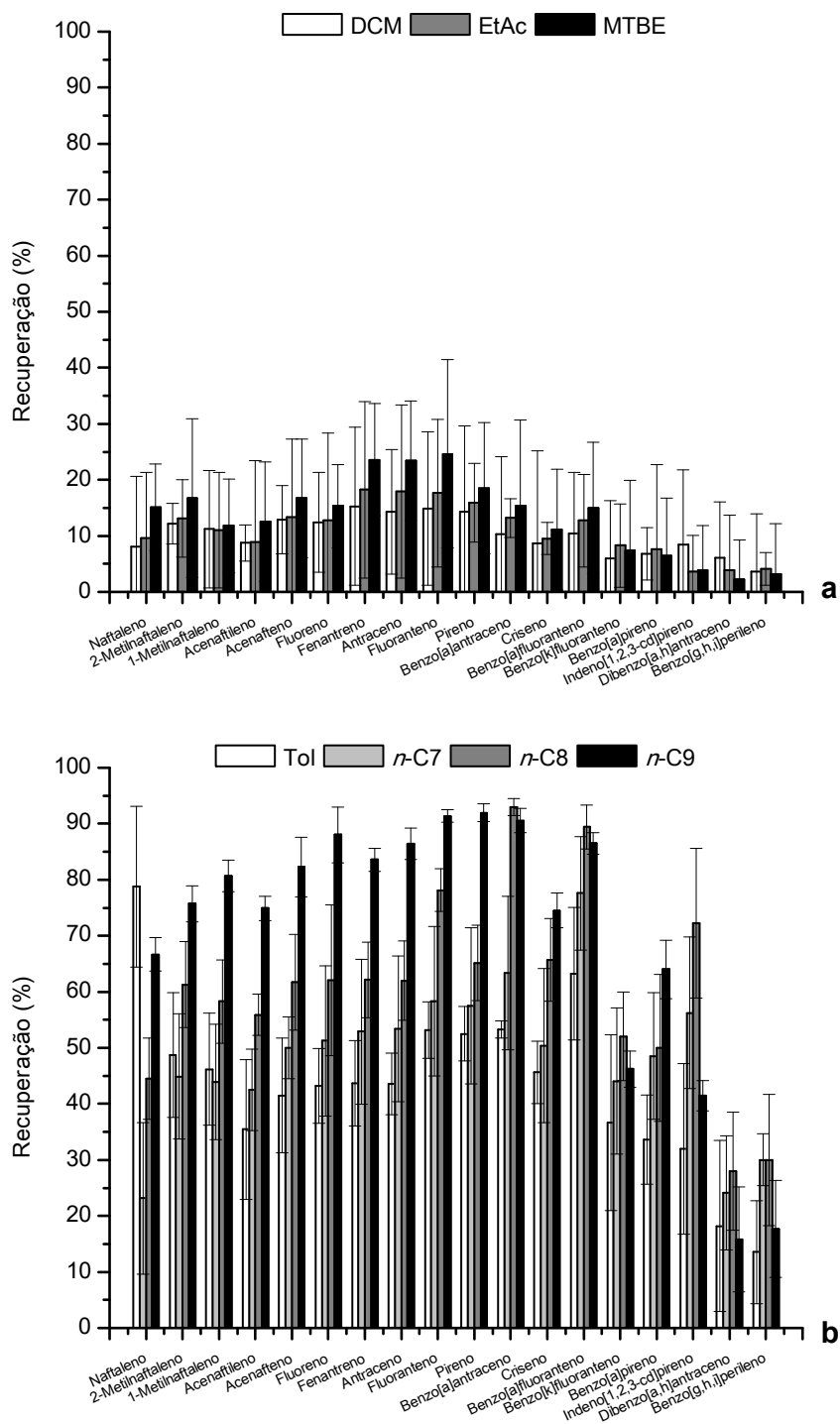


Figura 7.4. Efeito da variação do solvente orgânico na microextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração, 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons.

7.2.3.3 Etapa de microextração

A HF μ E, assim como a BA μ E, operam sob a tecnologia de amostragem por flutuação e, neste sentido, parâmetros que influenciam a cinética do processo, como o tempo de extração e a velocidade de agitação, devem ser avaliados, uma vez poderem afetar a transferência de massa e/ou difusão dos analitos entre a amostra e a fase extratora. Assim, o tempo de equilíbrio foi avaliado entre 30 e 120 min. A partir dos resultados obtidos apresentados na figura 7.5, 60 min de microextração foram suficientes para se obter boas recuperações médias para a maioria dos PAHs.

No que diz respeito à velocidade de agitação, foram realizados ensaios sob 500, 700 e 1000 rpm, sendo que rotações superiores foram evitadas, uma vez desestabilizarem o dispositivo analítico. Por outro lado, uma baixa velocidade de agitação (500 rpm) pareceu não ser suficiente para promover a difusão dos analitos em direção à HF, sendo obtidas baixas eficiências de extração, conforme observado na figura 7.6. Desta forma, optou-se por adotar 700 rpm para os ensaios subsequentes de otimização do método.

De seguida, as características da matriz, como pH, força iônica e modificador orgânico, foram igualmente avaliadas. O pH é um parâmetro que exerce importante efeito na extração de compostos ionizáveis, podendo influenciar os níveis de recuperação de acordo com a forma sob a qual a molécula se encontra. Contudo, para o caso dos PAHs, compostos não ionizáveis, ensaios realizados sob diferentes valores de pH (3,0; 5,5 e 10,0) não apresentaram diferenças relevantes (A.II.6), conforme já esperado, tendo sido mantido o pH 5,5 para os estudos subsequentes.

Os efeitos da força iônica e da polaridade foram estudados por meio da adição de NaCl e MeOH à matriz, respetivamente. De acordo com a literatura, a adição de um eletrólito a amostra pode reduzir a solubilidade dos analitos, forçando-os a migrarem para a fase extratora (*salting-out effect*). Por este motivo, o efeito da adição de sal (de 0 a 10%, m:v) foi avaliado, tendo-se observado que o aumento da força iônica prejudicava a extração dos PAHs, conforme mostrado na figura 7.7. Esse resultado pode ter ocorrido devido à diminuição da solubilidade dos PAHs no meio aquoso e pelo fato de o NaCl contribuir para a migração dos analitos em direção à superfície (*oil-effect*), reduzindo o contato

com o dispositivo analítico. Uma vez a presença de NaCl influenciar negativamente a microextração dos PAHs, a sua utilização foi rejeitada nos estudos posteriores.

Tabela 7.2. Pontos de ebulição e solubilidade em água dos solventes avaliados como fase extratora para HF μ E.

Solvente orgânico	Ponto de ebulição (°C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)
DCM	39,6	13000
MTBE	55,2	51000
EtAc	77,1	64000
Tol	110,6	526
<i>n</i> -C7	98,4	3,40
<i>n</i> -C8	125,0	0,66
<i>n</i> -C9	151,0	0,22

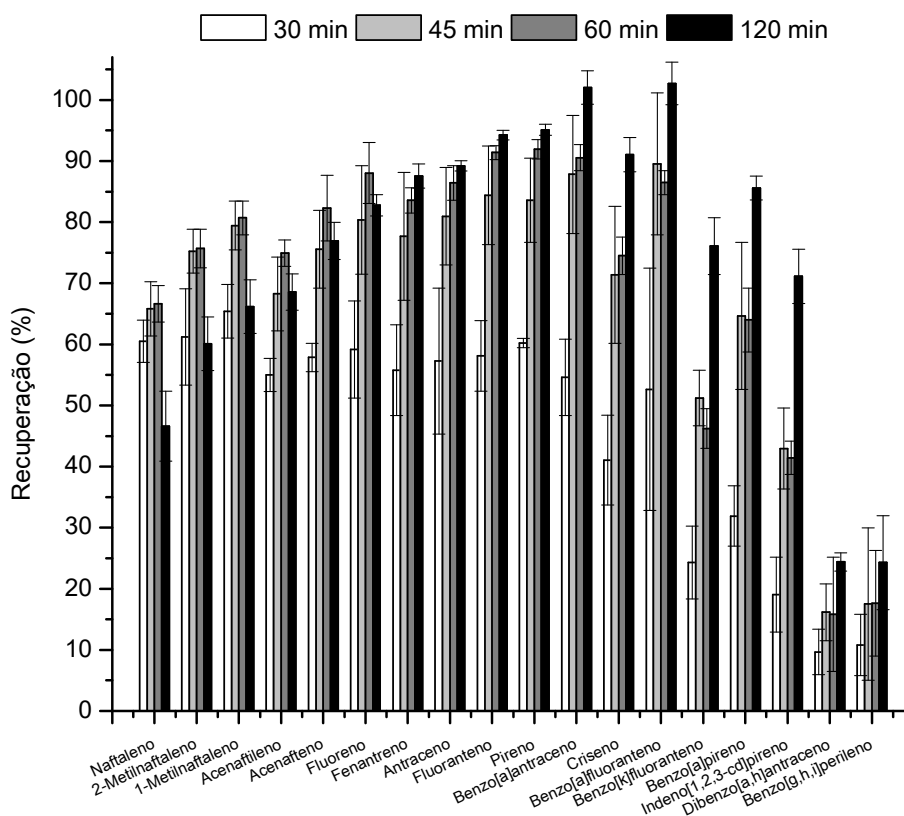


Figura 7.5. Efeito da variação do tempo de equilíbrio na microextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons.

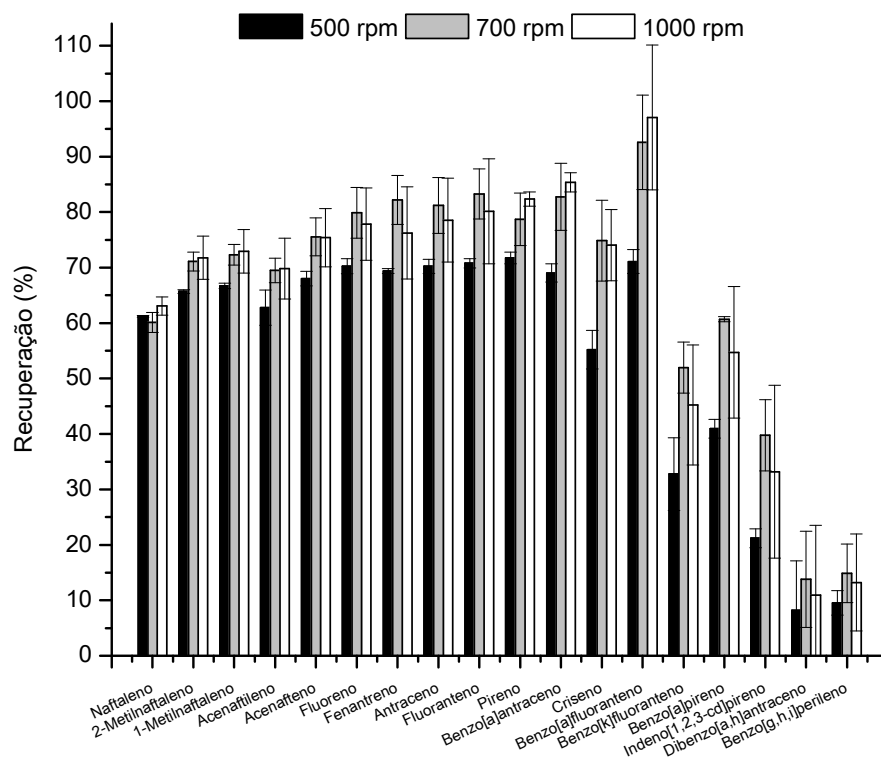


Figura 7.6. Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração, 1 h, pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons.

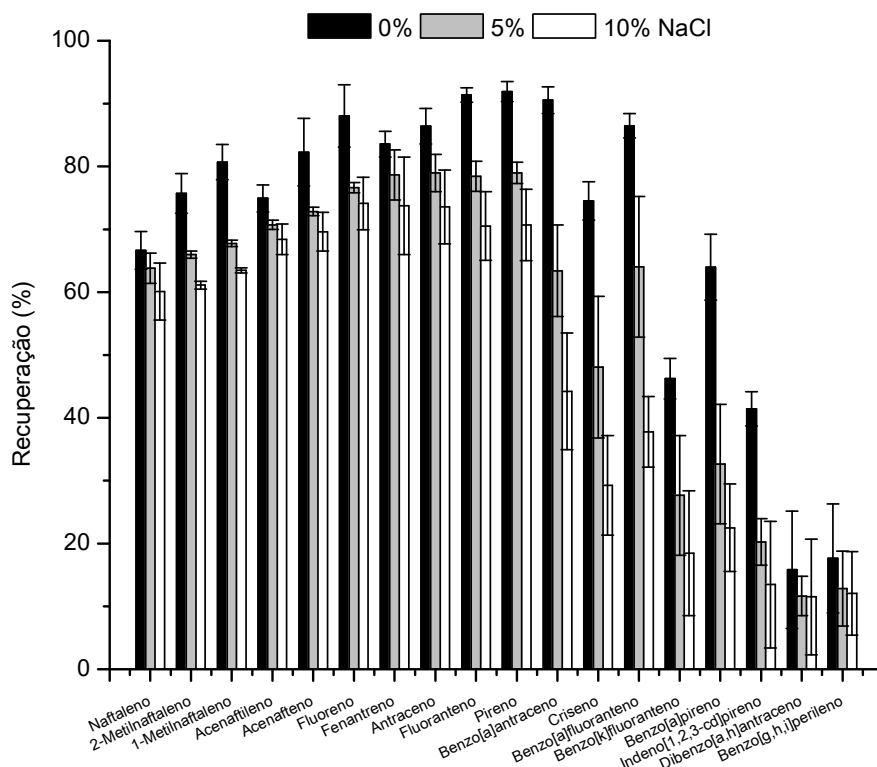


Figura 7.7. Efeito da variação da força iônica da matriz na microextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração, 1 h (700 rpm), pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons.

A adsorção dos analitos nas paredes dos vidros dos frascos de amostragem (*wall-effect*) é um fenômeno que pode ocorrer principalmente quando os compostos em estudo apresentam características mais apolares, como são o caso dos PAHs, comprometendo a eficiência do processo de extração, especialmente na análise de traços. Contudo, esse efeito pode ser minimizado por meio da adição de um modificador orgânico no meio aquoso, tendo como objetivo reduzir a polaridade da matriz. Desta forma, concentrações de MeOH variando entre 0 e 15% (v:v) foram testadas, tendo-se observado que a presença deste solvente polar traz vantagens para a microextração dos PAHs mais hidrofóbicos. Porém, concentrações mais elevadas de MeOH reduziram os níveis de recuperação dos PAHs menos hidrofóbicos, como apresentado na figura 7.8. Assim, concluiu-se que, quando o alvo da análise são os PAHs mais hidrofóbicos, o uso do modificador orgânico é recomendado, sendo seu contrário desprezível.

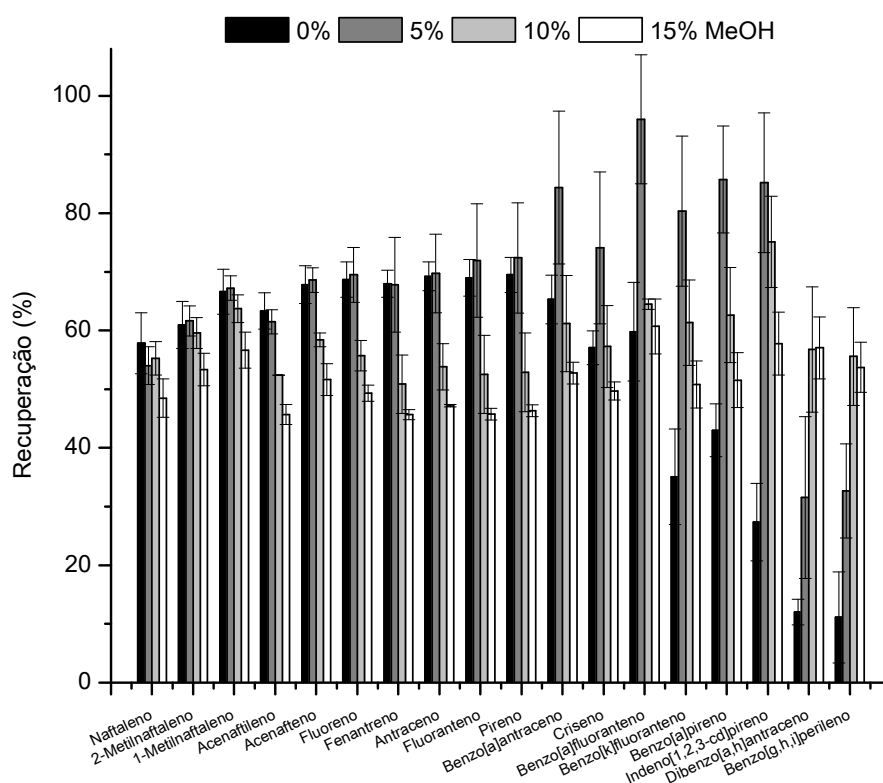


Figura 7.8. Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração 1 h (700 rpm), pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons.

7.2.4 Validação do método analítico

Após determinadas as condições ótimas para a análise dos 18 PAHs, a etapa seguinte consistiu na validação da metodologia proposta. Para o efeito, os ensaios foram realizados em 25 mL de água ultrapura sob as condições experimentais otimizadas; microextração: *n*-C9, 60 min (700 rpm), pH 5,5; retroextração: *n*-C9 (100 μ L), 2 min de tratamento ultrassónico. As amostras foram fortificadas com soluções padrões dos analitos por forma a obter concentrações finais compreendidas entre 20,0 e 2000,0 ng L⁻¹. A figura 7.9 exemplifica um cromatograma referente a um ensaio realizado em água ultrapura fortificada (1,0 μ g L⁻¹) obtido por HF μ E(*n*-C9)- μ LD/GC-MS(SIM), sob condições experimentas otimizadas, no qual são observadas boa seletividade e sensibilidade

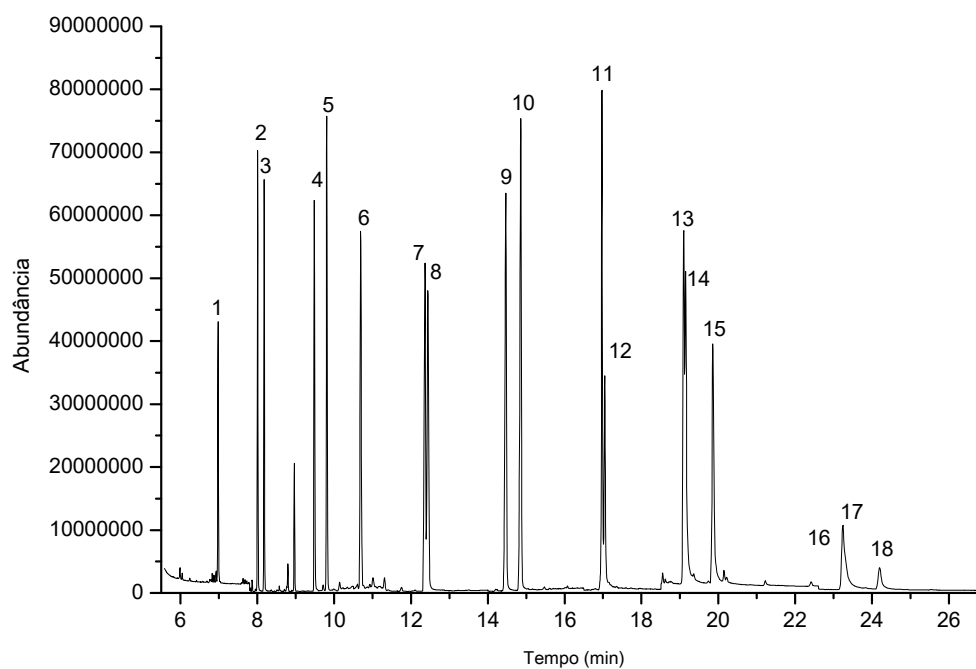


Figura 7.9. Cromatograma obtido por HF μ E(*n*-C9)- μ LD/GC-MS(SIM) na análise dos 18 PAHs numa amostra aquosa fortificada (1,0 μ g L⁻¹) sob condições experimentais otimizadas. 1, naftaleno; 2, 2-metilnaftaleno; 3, 2-metilnaftaleno; 4, acenaftileno; 5, acenafteno; 6, fluoreno; 7, fenantreno; 8, antraceno; 9, fluoranteno; 10, pireno; 11, benzo[*a*]antraceno; 12, criseno; 13, benzo[*a*]fluoranteno; 14, benzo[*k*]fluoranteno; 15, benzo[*a*]pireno; 16, indeno[1,2,3-*cd*]pireno; 17, dibenzo[*a,h*]antraceno e 18, benzo[*g,h,i*]perileno.

A sensibilidade foi averiguada através da determinação dos limiares analíticos, tendo os LODs e LOQs sido calculados com recurso à razão S/N 3 e 10, respetivamente. A metodologia proposta foi igualmente avaliada em relação a repetibilidade, por meio de ensaios no mesmo dia (cinco replicados) e em dias diferentes (três replicados em três dias consecutivos), tendo sido obtidos desvios padrão relativos inferiores a 15 %.

A tabela 7.3 apresenta todos os resultados obtidos na validação do método. As recuperações médias variaram entre 14,5 \pm 8,2 % a 90,4 \pm 8,4 %, os LODs entre 2,5 e 6,0 ng L⁻¹ e os LOQs entre 10,0 e 20,0 ng L⁻¹, numa ampla gama linear (20,0 e 2000,0 ng L⁻¹) com coeficientes de determinação superiores a 0,9905.

Tabela 7.3. Recuperações médias, LODs, LOQs, gama linear dinâmica e coeficientes de determinação para os 18 PAHs obtidos por HF μ E(*n*-C9)- μ LD/GC-MS(SIM) na validação do método analítico, sob condições experimentais otimizadas.

PAHs	Recuperação (% \pm RSD)	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	Gama linear dinâmica (ng L ⁻¹)	r ²
Naftaleno	63,3 \pm 6,9	2,50	10,00	20,00 - 2000,00	0,9979
1-Metilnaftaleno	73,5 \pm 10,5				0,9986
2-Metilnaftaleno	75,5 \pm 10,0				0,9984
Acenaftileno	69,2 \pm 8,6				0,9989
Acenafteno	76,6 \pm 9,4				0,9997
Fluoreno	79,9 \pm 10,9				0,9979
Fenantreno	81,7 \pm 10,6				0,9978
Antraceno	81,5 \pm 9,3				0,9968
Fluoranteno	84,6 \pm 10,7				0,9979
Pireno	85,0 \pm 9,1				0,9987
Benzo[a]antraceno	90,4 \pm 8,4	5,00	15,00	20,00 - 2000,00	0,9955
Criseno	73,6 \pm 5,0				0,9987
Benzo[a]fluoranteno	84,2 \pm 7,5				0,9905
Benzo[k]fluoranteno	48,8 \pm 4,9				0,9956
Benzo[a]pireno	56,9 \pm 5,4	6,00	20,00	20,00 - 2000,00	0,9965
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno	37,1 \pm 5,7				0,9995
Dibenzo[a,h]antraceno	14,5 \pm 8,2				0,9993
Benzo[g,h,i]perileno	15,7 \pm 3,2				0,9984

Conforme discutido anteriormente, a recuperação dos PAHs mais hidrofóbicos foi influenciada positivamente pela adição de um modificador orgânico, como o MeOH, à matriz, reduzindo o fenômeno do *wall-effect*. No entanto, como a recuperação da grande maioria dos PAHs não foi afetada por esse parâmetro, a validação do método foi realizada na ausência de MeOH.

A metodologia proposta demonstrou excelente desempenho analítico na determinação vestigial dos 18 PAHs em meio aquoso, além de ser uma abordagem muito simples do ponto de vista prático. O ciclo analítico proposto apresenta fácil manipulação e é totalmente compatível com sistemas de GC-MS convencionais, sendo amplamente recomendado para o uso de rotina.

7.2.5 Comparação com outras técnicas de microextração

O desempenho analítico da metodologia proposta foi comparado com algumas técnicas de microextração mais recorrentes para a análise de traços de PAHs reportadas na literatura, como SPME [9], SBSE [10], SDME [11], HL-LPME [12] e DLLME [7] (tabela 7.4), em combinação com sistemas instrumentais similares.

Tabela 7.4. Comparação entre as técnicas de microextração mais utilizadas para a análise de PAHs.

	SPME	SBSE	SDME	DLLME	HF-LPME	HF μ E
Tempo de equilíbrio	70 min	4 h	30 min	Alguns segundos	30 min	1 h
LODs (ng L⁻¹)	0,1-0,8	2,0-10,0	10,0-30,0	7,0-30,0	6,0-10,0	2,5-6,0
Recuperação (%)	17,5-65,7	19-108	36-152	60,3-111,3	10,2-18,9	14,5-90,4
Observações^a						
Amiga do usuário	+	+	-	-	-	+
Amiga do ambiente	+	+	+	-	+	+
Custo-benefício	-	-	-	+	+	+
Uso em rotina	+	+	+	+	-	+
Referência	[9]	[10]	[11]	[7]	[12]	Este trabalho

^a O sinal + significa que a técnica possui a característica ou é adequada e o sinal - significa que a técnica não possui a característica ou não é adequada.

A SPME, utilizando fibras cobertas com PDMS, apresentou LODs mais baixos (0,1 - 0,8 ng L⁻¹) e recuperações médias similares (17,5 - 65,7 %), no entanto a aplicação desta metodologia implica a aquisição de um dispendioso módulo *combi-PAL*. Na SBSE(PDMS), sensibilidades (2,0 < LOD < 10,0 ng L⁻¹) e recuperações médias (19 - 108 %) comparáveis foram alcançadas, embora um tempo de equilíbrio muito superior (4 h) tenha sido necessário para alcançar a máxima eficiência do método. Na abordagem usando SDME, o tempo de extração foi menor que na HF μ E, embora os LODs obtidos tenham sido superiores (10,0 a 30,0 ng L⁻¹), assim como no método por DLLME (tempo de equilíbrio de apenas alguns segundos e LODs de 7,0 a 30,0 ng L⁻¹). Apesar de a HF-LPME ter apresentado cinética mais rápida (30 min), evidenciou recuperações médias muito inferiores (10,2 - 18,9 %).

Neste contexto, além da excelente performance analítica demonstrada pela HF μ E quando comparada com outras técnicas de microextração estática, a presente metodologia pode ser considerada amiga do usuário e do ambiente, apresenta boa relação custo-benefício e é apropriada para o uso em rotina, utilizando instrumentação convencional de laboratórios de química analítica. Por outro lado, apesar de a SPME e a SBSE serem igualmente amigas do usuário e do ambiente, apresentam custos mais elevados por utilizarem dispositivos analíticos comerciais. As demais abordagens, baseadas em líquidos, não podem ser consideradas como técnicas amigas do usuário, uma vez requerem demasiada manipulação da amostra. A SDME tem como principal desvantagem a instabilidade da gota e, para uso de rotina, exige a aquisição de um módulo específico para automatização. A DLLME, apesar de ser entre as demais a técnica com a cinética mais rápida, requer após a etapa de microextração diversos passos para a separação do extrato, como centrifugação, além de utilizar maior volume de solvente orgânico (1 mL) quando comparada com as outras abordagens. Finalmente, a HF-LPME, embora tenha superado o problema da instabilidade da gota de solvente por meio da sua imobilização numa membrana, requer a manipulação do mesmo com o uso de microseringas, não sendo definitivamente uma abordagem amiga do usuário, especialmente para o uso em rotina.

7.2.6 Aplicação a matrizes reais

Para demonstrar a capacidade analítica da nova metodologia proposta, a HF μ E(*n*-C9)/GC-MS(SIM) foi aplicada para a monitorização dos 18 PAHs em diversos tipos de matrizes reais, nomeadamente água superficial, efluentes, solo, chá e fígado de peixe. O SAM foi utilizado para fins de quantificação para evitar possíveis efeitos de matriz, causados por potenciais interferentes nas amostras. Assim, as amostras foram fortificadas com soluções padrão contendo os analitos por forma a obter concentrações finais compreendidas entre 0,08 e 2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a água superficial e o efluente, 0,01 e 0,10 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o solo e chá e 0,07 e 0,70 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o fígado de peixe. Ensaio em branco, sem fortificação foram igualmente realizados para maior controlo do processo.

De modo geral, os resultados obtidos demonstraram boa performance analítica para todos os tipos de matrizes, com coeficientes de determinação entre 0,9820 (solo) e 0,9999 (água superficial), não sendo os PAHs detetados em nenhuma das amostras ($< \text{LOD}$). No entanto, observou-se ligeira perda de sensibilidade do método para a determinação dos compostos mais hidrofóbicos, principalmente nas matrizes mais complexas.

A figura 7.10 exemplifica perfis cromatográficos obtidos a partir dos ensaios realizados em amostras de efluente (a), solo (b), chá (c), bem como fígado de peixe (d) por HF μ E(*n*-C9)/GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas, na qual são observadas boa seletividade e sensibilidade.

7.3 Conclusões

No presente trabalho, uma nova técnica híbrida foi proposta, HF μ E, combinando as principais vantagens de algumas das abordagens modernas para microextração estática. A metodologia proposta foi otimizada, validada e aplicada a diversas matrizes reais, nomeadamente água superficial, efluentes, solo, chá e fígado de peixe, utilizando 18 PAHs como compostos modelo. A partir dos resultados obtidos, sob condições experimentais otimizadas, observou-se boa resposta analítica, com eficiências de extração satisfatórias, LODs da ordem de ng L^{-1} e linearidades convenientes numa alargada gama de trabalho.

Além disso, o ciclo analítico adotado é muito simplificado do ponto de vista prático, os dispositivos analíticos utilizados apresentam baixo custo e o volume de solventes orgânicos requeridos é mínimo, de acordo com os princípios da GAC. Desta forma, esta nova técnica apresenta boa relação custo-benefício, é amiga do usuário e do meio ambiente, podendo ser facilmente conciliada com o uso de rotina, sendo uma excelente alternativa analítica quando comparada a outras técnicas bem estabelecidas para enriquecimento de amostras.

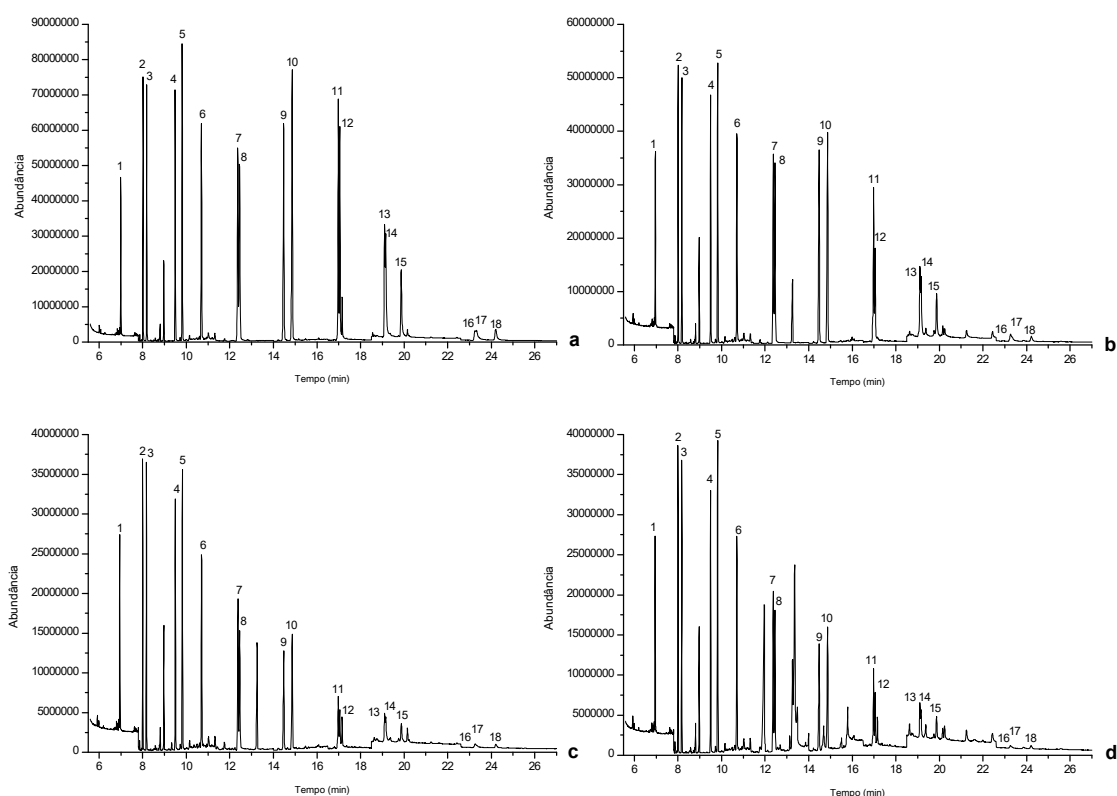


Figura 7.10. Cromatogramas obtidos por HF μ E(*n*-C9)/GC-MS(SIM) na análise dos 18 PAHs em amostras de efluente (a), solo (b), chá (c) e fígado de peixe, sob condições experimentais otimizadas. 1, naftaleno; 2, 2-metilnaftaleno; 3, 2-metilnaftaleno; 4, acenaftileno; 5, acenafteno; 6, fluoreno; 7, fenantreno; 8, antraceno; 9, fluoranteno; 10, pireno; 11, benzo[*a*]antraceno; 12, criseno; 13, benzo[*a*]fluoranteno; 14, benzo[*k*]fluoranteno; 15, benzo[*a*]pireno; 16, indeno[1,2,3-*cd*]pireno; 17, dibenzo[*a,h*]antraceno e 18, benzo[*g,h,i*]perileno.

7.4 Referências

- [1] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, Hollow fiber microextraction : a new hybrid microextraction technique for trace analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 2911–2920.
- [2] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [3] E. Baltussen, P. Sandra, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, *J. Microcolumn.* 11 (1999) 737–747.
- [4] N.R. Neng, A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, Adsorptive micro-extraction techniques-Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7303–7310.
- [5] M. A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236–2240.
- [6] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-Liquid- Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650–2656.
- [7] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1116 (2006) 1–9.
- [8] J.M.F. Nogueira, Stir-bar sorptive extraction : 15 years making sample preparation, *Trends in Analytical Chemistry* 71 (2015) 214–223.
- [9] A. Kremser, M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, PAL SPME Arrow - Evaluation of a novel solid-phase microextraction device for freely dissolved PAHs in water, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 943–952.
- [10] N. Barco-Bonilla, R. Romero-González, P. Plaza-Bolaños, J.L. Fernández-Moreno, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, Comprehensive analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater using stir bar sorptive extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 693 (2011) 62–71.
- [11] L.O. Santos, J.P. dos Anjos, S.L.C. Ferreira, J.B. de Andrade, Simultaneous determination of PAHS, nitro-PAHS and quinones in surface and groundwater samples using SDME/GC-MS, *Microchem. J.* 133 (2017) 431–440.
- [12] M. Hyder, L.L. Aguilar, J. Genberg, M. Sandahl, C. Wesén, J.K. Jönsson, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from organic aerosols using hollow fiber micro - Porous membrane liquid - Liquid extraction (HF-MMLLE) followed by gas chromatography-mass spectrometry analysis, *Talanta* 85 (2011) 919–926.
- [13] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction, *J. Chromatogr. A.* 1184 (2008) 132–142.
- [14] X. Jiang, H.K. Lee, Solvent bar microextraction, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5591–5596.

Capítulo 8

Microextração em fibra oca dupla - Aplicação para determinação vestigial de pesticidas organoclorados em matrizes reais

A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, Dual-hollow fiber microextraction - Application for trace analysis of organochlorine pesticides in real matrices, submetido.

8.1 Considerações gerais

Os pesticidas constituem um grupo de substâncias químicas utilizadas para matar, repelir ou controlar pragas na agropecuária e na saúde pública, sendo genericamente conhecidos por herbicidas, inseticidas, fungicidas, bactericidas ou rodenticidas, de acordo com seu uso em particular. Os pesticidas são geralmente formulados para afetar o sistema fisiológico dos organismos alvo, levando-os à disfunção e morte.

Embora o controlo químico de pragas tenha contribuído para o crescimento da agricultura e redução de casos de doenças em humanos e animais, com o uso desmedido dos pesticidas na produção alimentar, estamos continuamente a ser expostos aos resíduos desses compostos em diversos alimentos consumidos diariamente [1]. Além disso, a aplicação de pesticidas nos cultivos agrícolas é uma grande fonte de contaminação dos ecossistemas, uma vez esses agentes poderem atingir o solo, sendo depois percolados para as águas subterrâneas ou, ainda, lixiviados pela ação das chuvas alcançando águas superficiais e podendo posteriormente chegar ao mar [2].

Entre os pesticidas mais utilizados encontram-se os pesticidas organoclorados (OCPs - *organochlorine pesticides*), compostos com estruturas químicas relacionadas, formados por anéis alifáticos ou aromáticos substituídos por átomos de cloro, conforme mostrado na figura 8.1. Devido às suas semelhanças estruturais, estes compostos partilham algumas características físico-químicas como hidrofobicidade, persistência, bioacumulação, assim como elevada toxicidade [3]. Os OCPs foram amplamente utilizados durante e após a Segunda Guerra Mundial com o objetivo de combater vetores de doenças como a malária, tendo sido posteriormente banidos em muitos países, face aos riscos que causam à saúde. Atualmente, diversos OCPs têm o uso controlado pela Convenção de Estocolmo (1972) sobre 'Poluentes Orgânicos Persistentes', embora ainda sejam muito utilizados em países em desenvolvimento, principalmente na Ásia, face ao baixo custo e eficiência de curto prazo.

A exposição aguda e crônica dos humanos aos pesticidas está associada a casos de cancro, desregulação hormonal, diabetes, bem como doenças neurológicas e respiratórias [4]. Assim, dado ao elevado potencial de toxicidade desses compostos, aliado ao fato de que muitos produtos consumidos no mundo

serem oriundos de países como China e Índia, é relevante o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de monitorizar diversos OCPs em diferentes tipos de matrizes.

Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo aplicar a inovadora técnica HF μ E [5], proposta e descrita no capítulo 7, na análise vestigial de 17 OCPs (figura 8.1) como compostos modelo, a fim de demonstrar a ampla capacidade analítica e ainda introduzir avanços como o uso simultâneo de dois dispositivos por amostra para aumento da sensibilidade e seletividade. Neste sentido, a metodologia proposta foi desenvolvida, otimizada e validada, assim como aplicada a diversas matrizes reais das áreas ambiental e alimentar.

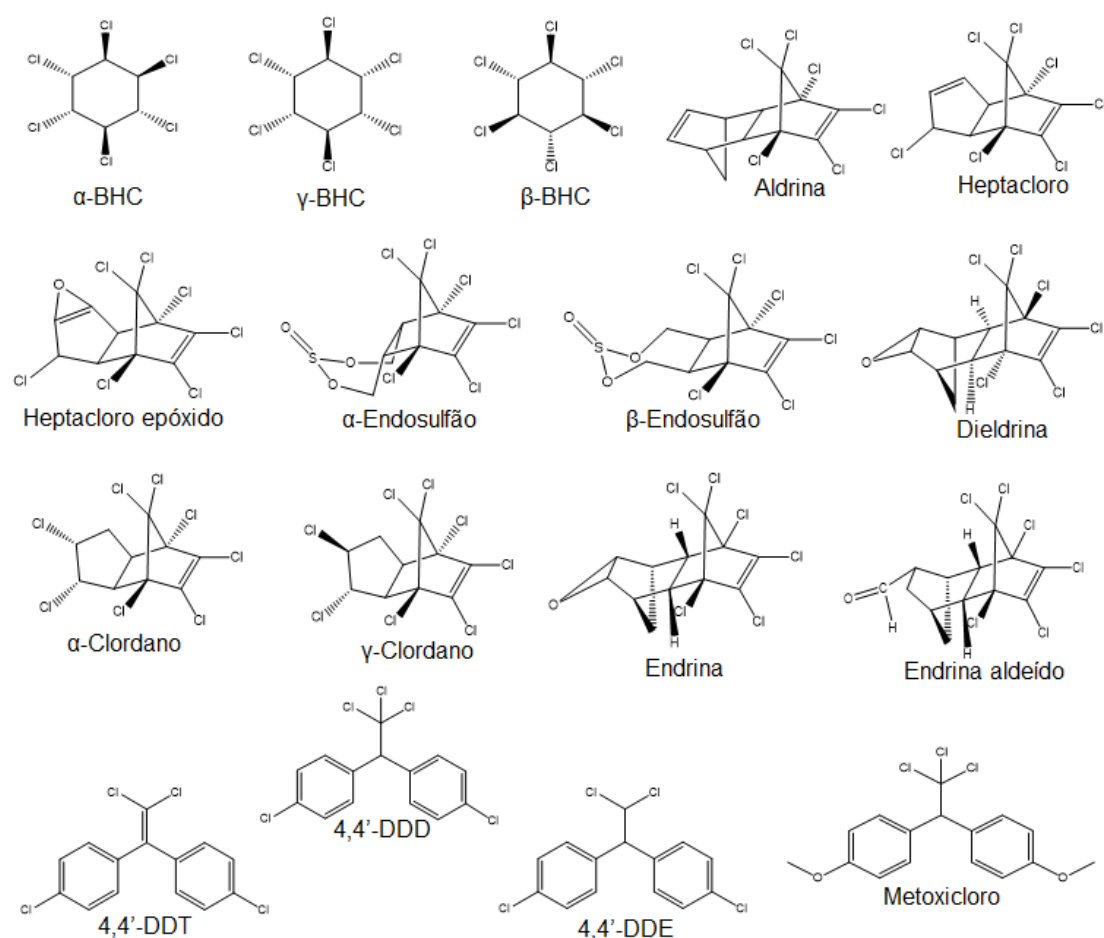


Figura 8.1. Estruturas químicas dos 17 OPCs estudados.

8.2 Resultados e discussão

8.2.1 Otimização instrumental

Com a finalidade de se obter as melhores condições de operação instrumental para a análise dos 17 OCPs, começou por se injetar uma solução padrão mistura contendo todos os analitos no sistema GC-MS operando no modo varrimento contínuo (*full-scan*). Desta forma, avaliou-se o padrão de fragmentação de cada OCP, tendo sido selecionado o íon alvo (pico base) e os principais fragmentos (tabela 8.1), com o objetivo de se atingir máxima seletividade e sensibilidade para posterior operação no modo SIM.

Tabela 8.1. Coeficientes de partição octanol-água ($\log K_{OW}$), tempos de retenção e íões selecionados para a análise dos 17 OCPs por GC-MS(SIM).

OCP	Log K_{OW} ^a	t _R (min)	Grupo	Íon (m/z) ^b
α-BHC	3,99	10,43	1	111, <u>181</u> , 219
γ-BHC	3,99	11,08		109, <u>183</u> , 219
β-BHC	3,99	11,23		111, <u>181</u> , 219
Heptacloro	5,46	13,02	2	100, <u>272</u> , 274
Aldrina	5,32	13,93		66, <u>263</u> , 265
Heptacloro epóxido	5,47	14,97		81, 263, <u>353</u>
γ-Clordano	5,57	15,59	3	<u>237</u> , <u>272</u> , <u>373</u>
α-Clordano	5,57	15,93		<u>237</u> , <u>272</u> , <u>373</u>
α-Endosulfão	3,13	15,99		195, <u>241</u> , 265
4,4'-DDE	6,37	16,51		176, <u>246</u> , 318
Dieldrina	4,88	16,61		<u>79</u> , 263, 277
Endrina	4,88	17,15		<u>243</u> , <u>263</u> , 281
β-Endosulfão	3,13	17,38		159, <u>195</u> , 237
4,4'-DDD	5,39	17,55	4	165, <u>235</u> , 237
Endrina aldeído	2,76	17,83		67, 250, <u>345</u>
4,4'-DDT	5,92	18,38		165, <u>235</u> , 237
Metoxicloro	4,56	19,58	5	152, <u>227</u> , 212

^a Cálculos efetuados utilizando o software Marvin 6.2.2, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

^b Íões de quantificação (sublinhados) e íões qualificadores (fragmentos).

Posteriormente, recorreu-se a injeção de grandes volumes (LVI) operando no modo *solvent vent* por GC-MS(SIM) para o aumento da sensibilidade, tendo sido selecionado um volume de injeção de 10 µL. Operando nestas condições instrumentais, a monitorização dos iões selecionados demonstrou boa resposta para cada analito, assim como picos simétricos em tempo analítico adequado (< 25 min). De seguida, a sensibilidade instrumental foi avaliada por intermédio dos LODs e LOQs, calculados com recurso a razão S/N 3 e 10, respetivamente, gerando valores compreendidos entre 6,0 e 12,0 µg L⁻¹ e 20,0 e 40,0 µg L⁻¹. A calibração instrumental foi efetuada com recurso a injeção de padrões dos analitos abrangendo concentrações compreendidas entre 40,0 a 1000,0 µg L⁻¹. Nesta gama de trabalho, foram ainda obtidas boas linearidades para todos os OCPs, com coeficientes de determinação (*r*²) superiores a 0,999.

8.2.2 Otimização do método analítico

8.2.2.1 Seleção do solvente orgânico

O solvente orgânico a ser imobilizado nas paredes porosas das HFs exerce um papel fundamental no processo de enriquecimento por HFµE, uma vez determinar a afinidade dos analitos da amostra com o dispositivo analítico. Conforme descrito com detalhe no capítulo anterior, o solvente deve ser criteriosamente selecionado, sendo que idealmente deve apresentar ponto de ebulição elevado e baixa solubilidade em água. Neste sentido, cinco solventes orgânicos (Clor, Tol, *n*-C6, *n*-C7 e *n*-C8) foram testados para maximizar a seletividade do método proposto.

A figura 8.2 mostra os resultados obtidos para a microextração dos 17 OCPs utilizando os diversos solventes orgânicos. Apesar do Clor parecer uma opção promissora por apresentar átomos de Cl na sua estrutura, semelhante aos analitos em estudo, este é um solvente com elevada densidade, agregando peso à HF. Desta forma, o dispositivo analítico deixava de flutuar na amostra, comprometendo a eficiência do processo. O Tol, um solvente com ponto de ebulição elevado e baixa solubilidade em água, extraiu com boa eficiência apenas os pesticidas menos voláteis, como é o caso dos BHCs. Por outro lado,

para a grande maioria dos analitos alvo, o *n*-C7 forneceu as maiores recuperações e portanto foi o solvente selecionado para os ensaios posteriores.

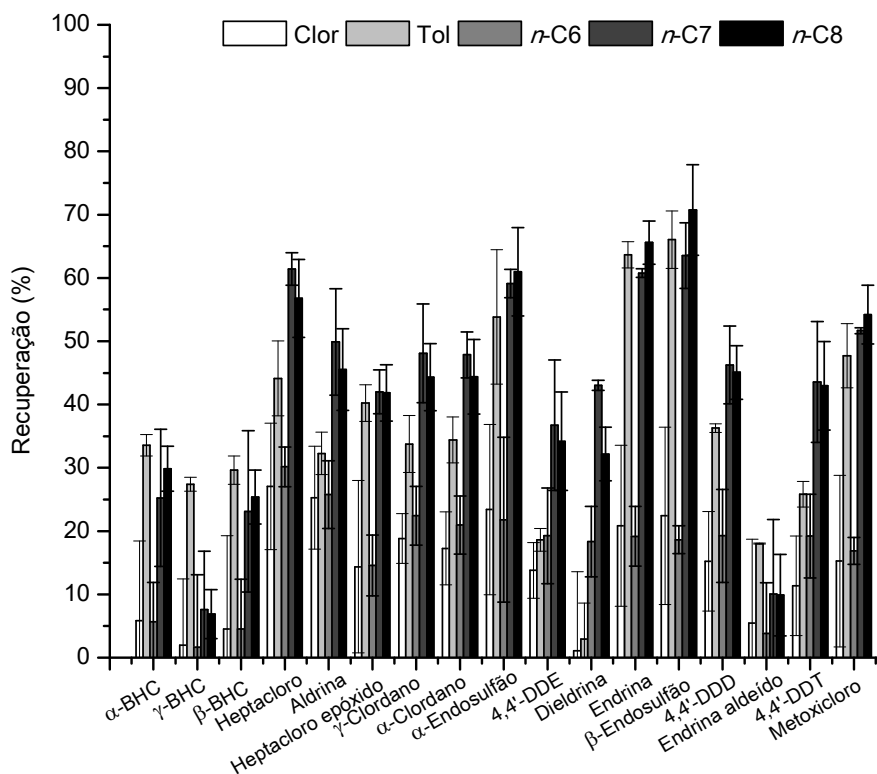


Figura 8.2. Efeito da variação do solvente orgânico na microextração dos 17 OCPs estudados. Condições experimentais: microextração 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons.

8.2.2.2 Etapa de retroextração

Conforme proposto no Capítulo 7, a etapa de retroextração consiste numa estratégia muito simples na qual a LD é realizada num único passo [5]. Desta forma, no final de cada ensaio de microextração, o dispositivo analítico foi cuidadosamente removido do frasco de amostragem e inserido num *vial* contendo um *insert* e 100 µL do mesmo solvente orgânico utilizado na etapa de microextração, ou seja, *n*-C7. O conjunto foi selado e submetido a tratamento ultrassônico, estando de seguida disponível para a análise por GC-MS(SIM). Com o objetivo de se conseguir o melhor desempenho na etapa de retroextração, diferentes tempos de ultrassons (2, 5 e 10 min) foram testados (figura 8.3). De

acordo com os dados obtidos, 5 min demonstraram serem suficientes para dessorver os analitos da HF.

A operação envolvida na etapa de retroextração é muito simples, com reduzida manipulação, requer um volume negligenciável de solventes orgânicos e é completamente compatível com sistemas instrumentais convencionais, facilitando a aplicação para uso de rotina.

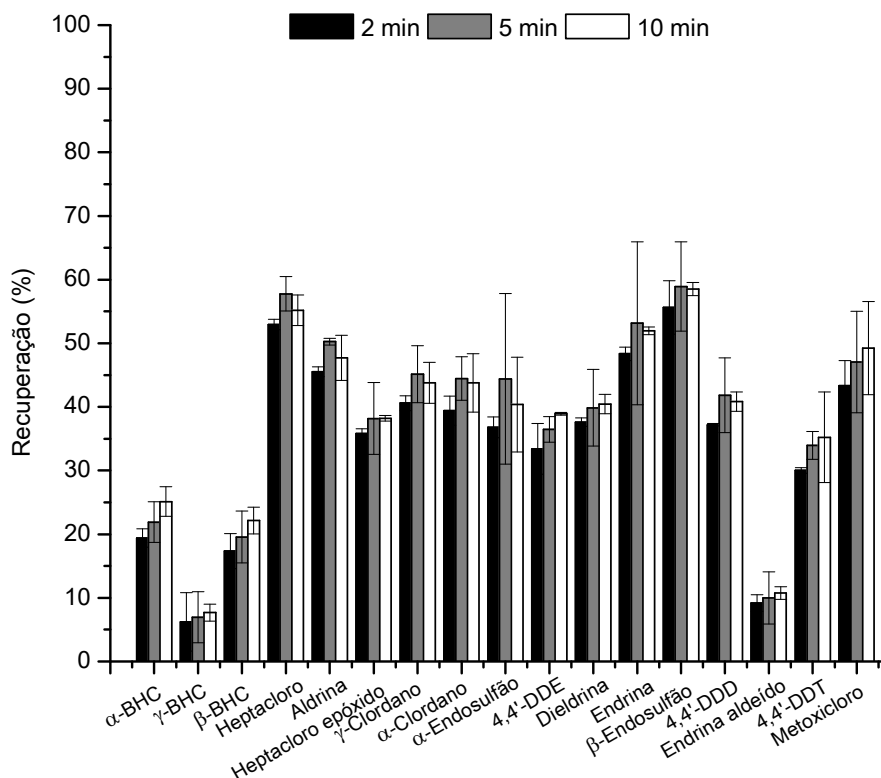


Figura 8.3. Efeito da variação do tempo de tratamento ultrassônico na retroextração dos 17 OCPs estudados. Condições experimentais: microextração 1 h (1000 rpm), pH 5,5.

8.2.2.3 Etapa de microextração

Uma vez a HF μ E operar sob a tecnologia de amostragem por flutuação, à semelhança da BA μ E [6,7], parâmetros cinéticos que podem afetar a transferência de massa e/ou difusão dos analitos entre o seio da amostra e o dispositivo analítico, como tempo de extração e velocidade de agitação, devem ser cuidadosamente estudados. Neste sentido, foram realizados ensaios considerando tempos de extração compreendidos entre 1 e 4 h, tendo sido

observado (figura 8.4) que o processo alcança o equilíbrio ao fim de 3 h para praticamente todos os OCPs em estudo. Para o caso específico dos BHCs, a eficiência de extração diminuiu com o aumento do tempo, porém, como para a maioria dos compostos as maiores recuperações foram alcançadas ao fim de 3 h, tendo sido o tempo adotado para os estudos posteriores.

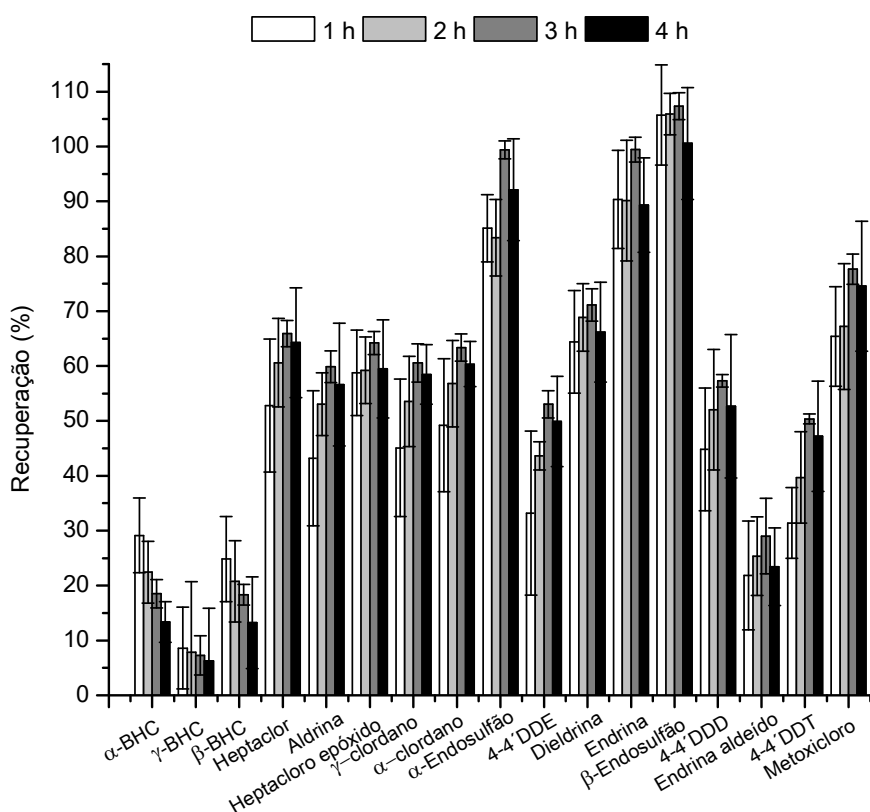


Figura 8.4. Efeito da variação do tempo de equilíbrio na microextração dos 17 OCPs estudados. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons.

De seguida, foram avaliadas diferentes velocidades de agitação da amostra (800, 1000 e 1200 rpm), tendo sido observado (figura 8.5) que a microextração de todos os OCPs foi muito favorecida com o aumento da velocidade de agitação. Neste sentido, a velocidade máxima que manteve a estabilidade do dispositivo analítico, 1200 rpm, foi selecionada para os ensaios subsequentes.

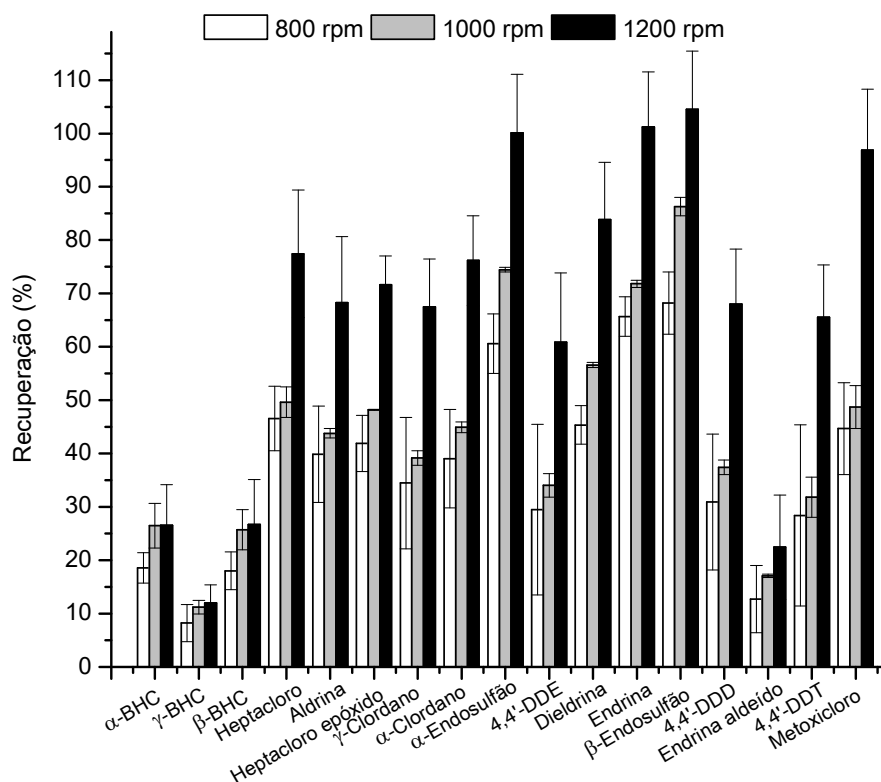


Figura 8.5. Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos 17 OCPs estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h, pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons.

As características da matriz, como pH, força iônica e polaridade exercem grande influência na termodinâmica do processo de microextração, conforme concluído anteriormente [8,9], tendo sido igualmente estudadas. O pH tem efeito sobretudo na extração de compostos ionizáveis, uma vez poder afetar os níveis de recuperação de acordo com a forma sob a qual os analitos se encontram. Dado que os OCPs consistem em compostos não ionizáveis, a alteração do pH da matriz não refletiu em resultados relevantes (A.II.7), tendo sido mantido o pH 5,5 para os estudos seguintes.

Para os estudos dos efeitos da força iônica e da polaridade da matriz, foram realizados ensaios na presença de NaCl e MeOH, respetivamente. A adição de um eletrólito à amostra pode contribuir para a redução da solubilidade dos analitos no meio, forçando-os a migrar para a fase extratora (*salting-out effect*). Desta forma, foram adicionadas concentrações de sal até 10 % (m:v), tendo-se observado um decréscimo da recuperação de todos os pesticidas com o aumento da concentração de sal no meio (figura 8.6), que pode estar associado

à ocorrência do *oil-effect*, ou seja, a migração dos analitos em direção à superfície face à diminuição da solubilidade no meio.

Durante a extração de compostos apolares pode ocorrer adsorção dos analitos às paredes dos materiais de vidro utilizados (*wall-effect*), comprometendo os níveis de recuperação dos compostos alvos. Este efeito pode ser reduzido adicionando-se um modificador orgânico ao meio aquoso, com a finalidade de se reduzir a polaridade da matriz. Neste sentido, foram realizados ensaios contendo MeOH até 10 % (v:v) no meio aquoso. Contudo, por observação dos resultados obtidos, o aumento da concentração deste modificador resultou em perdas significativas de eficiência de extração (A.II.8). Nesta perspectiva, o método proposto foi otimizado na ausência de NaCl e MeOH.

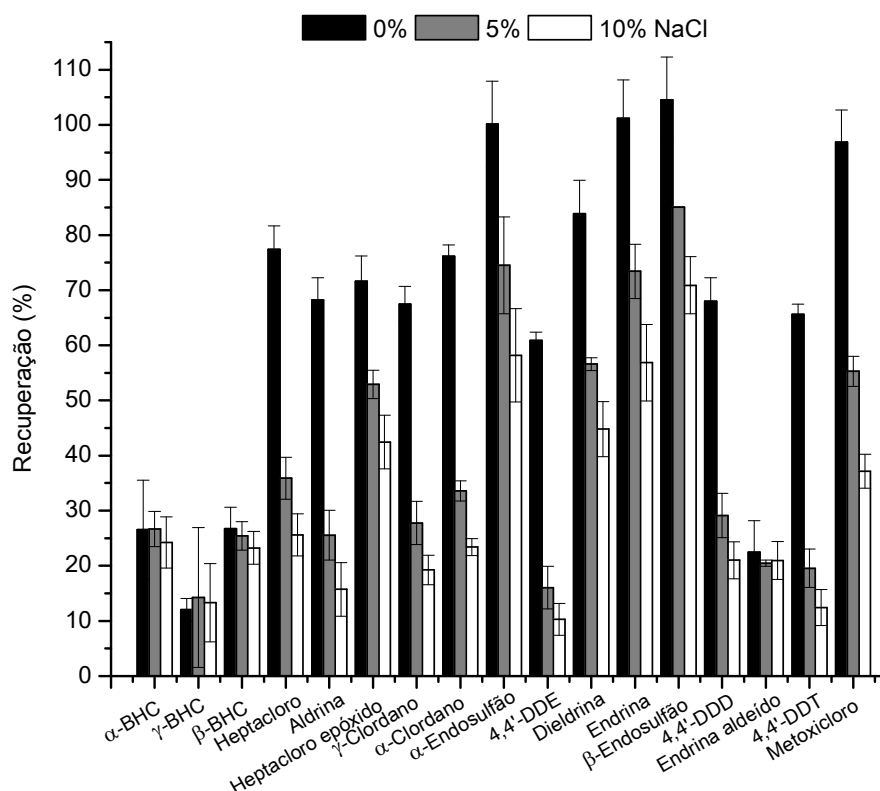


Figura 8.6. Efeito da variação da força iônica da matriz na microextração dos 17 OCPs estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h (1200 rpm), pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrassons.

8.2.3 Modificações na HF μ E

Com a finalidade de tentar reduzir o tempo de equilíbrio da etapa de microextração, decidiu-se explorar o uso simultâneo de duas HFs por amostra. Neste sentido, foram realizados ensaios, sob condições otimizadas, utilizando duas HFs contendo ambas o solvente *n*-C7, a fim de aumentar a cinética do processo. A partir dos resultados obtidos (figura 8.7a), observou-se que com esta estratégia foi possível reduzir o tempo de equilíbrio de 3 para 2 h com ganho de recuperação de todos os analitos em estudo.

Contudo, uma vez o Tol ter apresentado boa resposta na microextração dos BHCs, decidiu-se realizar um ensaio utilizando duas HFs com solventes diferentes, sendo que a primeira continha *n*-C7 e a segunda, Tol, para aumentar a seletividade do método. A retroextração foi realizada com uma mistura (1:1; v:v) de ambos os solventes. Desta forma, conforme apresentado na figura 8.7b, obteve-se aumento da recuperação dos BHCs, sem comprometer a microextração dos demais analitos.

8.2.4 Validação do método analítico

Com as condições ótimas definidas para a análise dos 17 OCPs, a metodologia proposta foi validada com a realização de ensaios em 25 mL de água ultrapura sob as seguintes condições experimentais otimizadas; microextração: duas HFs, *n*-C7+Tol, 2 h (1200 rpm), pH 5,5; retroextração: *n*-C7+Tol (100 mL; 1:1) 5 min tratamento ultrassônico. As amostras foram fortificadas com soluções padrões dos analitos por forma a se obter concentrações finais compreendidas entre 0,07 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A sensibilidade do método foi igualmente avaliada por meio dos LODs e LOQs, sendo calculada com recurso à razão S/N 3 e 10, respetivamente. A figura 8.9 exemplifica um cromatograma referente a um ensaio realizado em água ultrapura fortificada (5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) obtido por HF μ E(*n*-C7+Tol)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas, no qual se observa boa seletividade e sensibilidade.

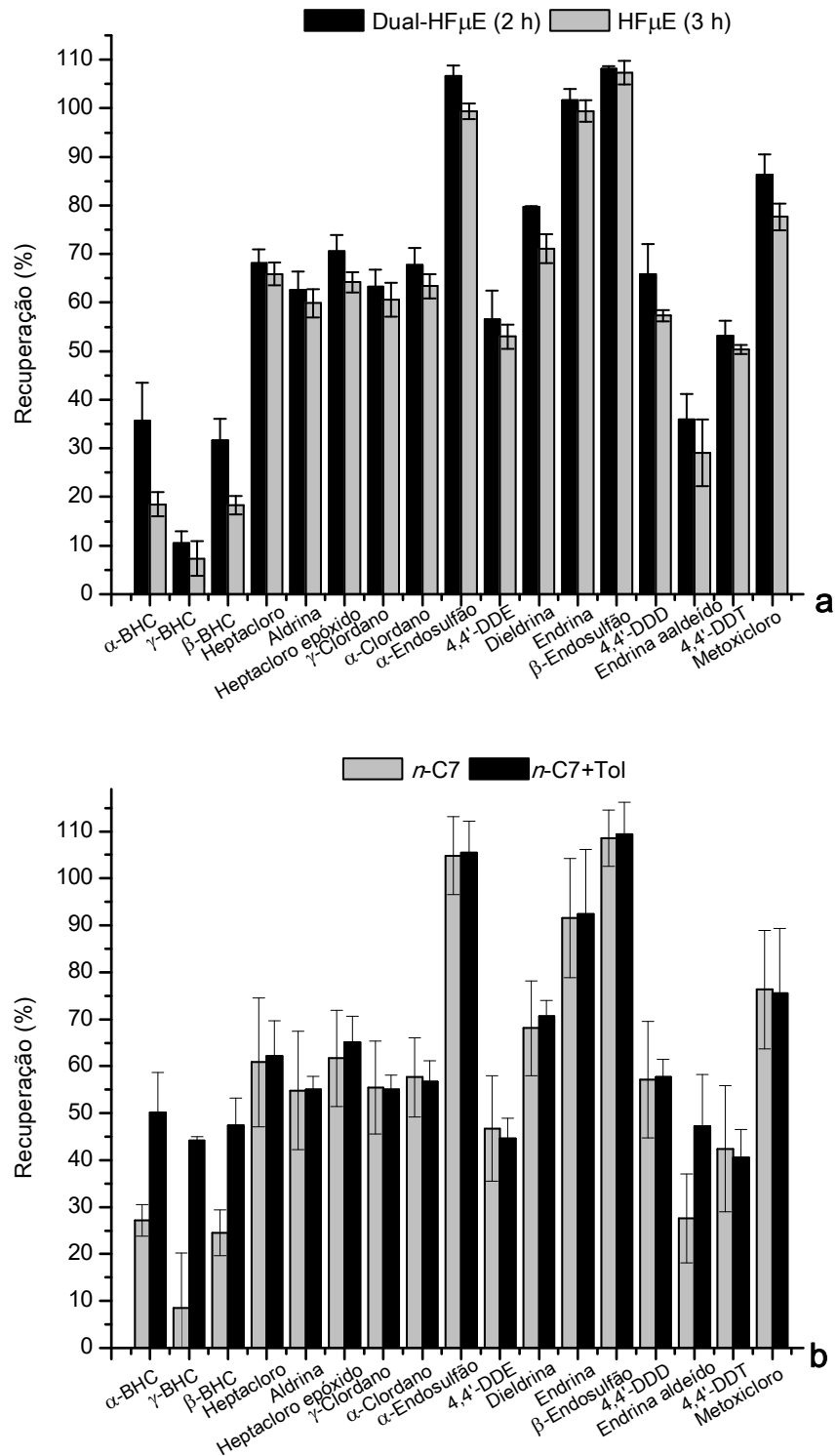


Figura 8.7. Efeito do uso de duas HF's (*n*-C7) no tempo (a) e na eficiência (*n*-C7+Tol) de microextração dos 17 OCPs estudados. Condições experimentais: microextração, 1200 rpm, pH 5,5; retroextração, 5 min sob ultrasons.

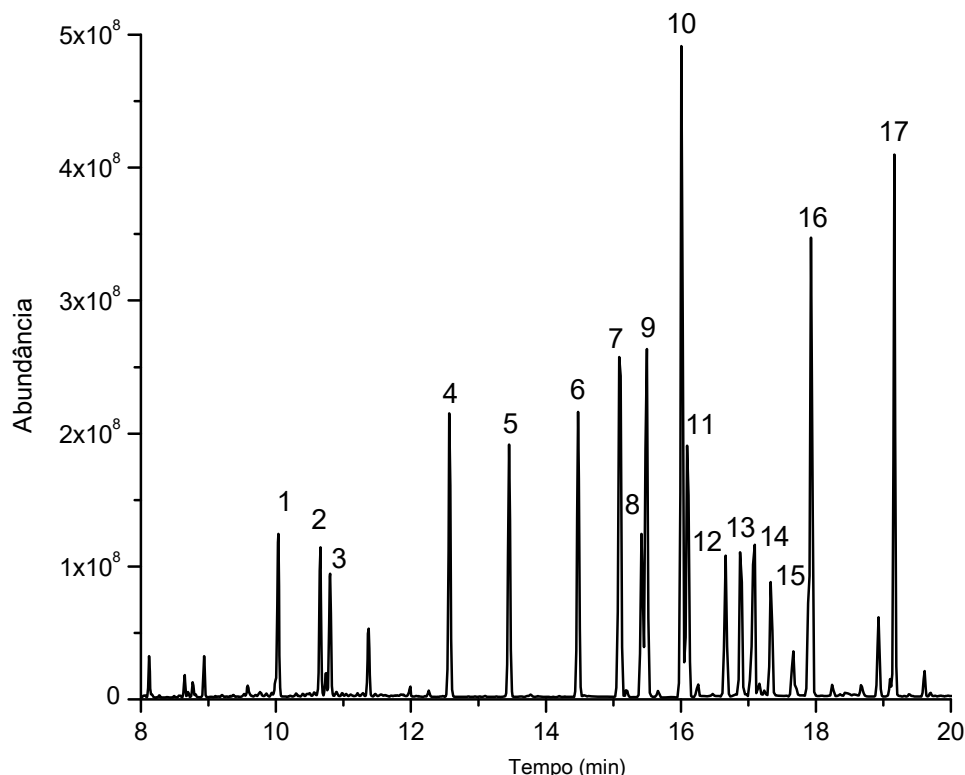


Figura 8.8. Cromatograma obtido por dual-HF μ E(*n*-C7+Tol)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM) na análise dos 17 OCPs numa amostra aquosa fortificada ($5,0 \mu\text{g L}^{-1}$), sob condições experimentais otimizadas. 1, α -BHC; 2, γ -BHC; 3, β -BHC; 4, heptacloro; 5, aldrina; 6, heptacloro epóxido; 7, γ -clordano; 8, α -clordano; 9, α -endossulfão; 10, 4,4'-DDE; 11, dieldrina; 12, endrina; 13, β -endossulfão; 14, 4,4'-DDD; 15, endrina aldeído; 16, 4,4'-DDT e 17, metoxicloro.

A tabela 8.2 resume todos os resultados obtidos na validação do método. As recuperações médias variaram entre $40,6 \pm 6,8$ e $101,7 \pm 8,0 \mu\text{g L}^{-1}$, os LODs entre $0,01$ e $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ e os LOQs entre $0,05$ e $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$, numa ampla gama linear ($0,07$ a $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$) com coeficientes de determinação superiores a $0,9941$. Relativamente à repetibilidade, foram conduzidos ensaios no mesmo dia (cinco replicados) e em dias diferentes (três replicados em três dias consecutivos), gerando desvios padrões relativos sempre inferiores a 16% .

Além das vantagens da HF μ E já demonstradas, as modificações introduzidas, possibilitando o uso simultâneo de duas fibras com solventes diferentes contribuíram para o aumento da seletividade do método, assim como a redução do tempo de análise, sem comprometer o ciclo analítico envolvido.

Tabela 8.2. Recuperações médias, LODs, LOQs, gama linear dinâmica e coeficientes de determinação para os 17 OCPs obtidos por HF μ E(*n*-C7+Tol)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM) na validação do método analítico, sob condições experimentais otimizadas.

OCPs	Recuperação (% \pm RSD)	LOD (μ g L ⁻¹)	LOQ (μ g L ⁻¹)	Gama linear dinâmica (μ g L ⁻¹)	r ²
α -BHC	47,8 \pm 8,5	0,02	0,07	0,07-10,0	0,9982
γ -BHC	46,8 \pm 9,8	0,02	0,07		0,9944
β -BHC	48,7 \pm 7,3	0,02	0,07		0,9962
Heptacloro	58,8 \pm 9,1	0,02	0,07		0,9990
Aldrina	49,7 \pm 9,8	0,02	0,07		0,9979
Heptacloro epóxido	59,6 \pm 5,9	0,02	0,07		0,9996
γ -Clordano	48,9 \pm 6,3	0,02	0,07		0,9985
α -Endossulfão	95,1 \pm 9,0	0,02	0,07		0,9966
α -Clordano	50,9 \pm 9,5	0,02	0,07		0,9997
4,4'-DDE	40,6 \pm 6,8	0,01	0,05		0,9955
Dieldrina	68,9 \pm 3,5	0,02	0,07		0,9996
Endrina	91,2 \pm 7,9	0,02	0,07		0,9987
β -Endossulfão	101,7 \pm 8,0	0,02	0,07		0,9964
4,4'-DDD	51,7 \pm 9,3	0,01	0,05		0,9992
Endrina aldeído	48,8 \pm 3,7	0,02	0,07		0,9993
4,4'-DDT	42,2 \pm 8,3	0,01	0,05		0,9982
Metoxicloro	74,1 \pm 9,1	0,01	0,05		0,9941

A metodologia proposta neste estudo demonstrou desempenho analítico adequado, num curto tempo de análise, para a determinação vestigial dos 17 OCPs em meio aquoso, provando que a HF μ E é uma técnica de microextração estática promissora para a análise de compostos apolares.

Quando comparada com outras técnicas para determinação de OCPs presentes na literatura, a HF μ E destaca-se por apresentar boa relação custo-benefício, ser amiga do usuário e do ambiente e totalmente compatível com sistemas instrumentais correntes para o uso em rotina. Os métodos convencionais mais utilizados nesta aplicação, como a LLE e SPE, exigem grandes quantidades de solventes orgânicos, em discordância com os princípios da GAC, assim como elevado volume de amostra, além do tempo e trabalho despendidos na análise serem muito superiores.

Com relação às técnicas de microextração baseadas em sólidos, a SPME e a SBSE, quando combinadas com TD, requerem um módulo específico para o sistema de GC. Gutiérrez-Serpa [10] usou a SPME para a monitorização de 14 OCPs em matrizes ambientais e obteve LODs superiores ($0,13$ a $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$) que a presente metodologia. Por outro lado, Pérez-Carrera [11], utilizando SBSE, alcançou LODs da ordem ng L^{-1} de para a análise de 16 OCPs, tendo, contudo, o tempo de equilíbrio sido de 14 h, ou seja, muito superior ao tempo de extração obtido por HF μ E.

Relativamente às abordagens miniaturizadas baseadas em líquidos, Liu [12] desenvolveu uma metodologia para a determinação de 12 OCPs por microextração por gota diretamente suspensa (DSDME - *directly suspended droplet microextraction*), uma variante da SDME, tendo alcançado LODs compreendidos entre $0,01$ e $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$. Apesar da simplicidade da técnica, o fato do solvente orgânico ficar suspenso gera instabilidade da fase extratora durante o processo de microextração e ainda dificulta o uso em rotina. Basheer [13] utilizou a HF-LPME para a análise de 12 OCPs em matrizes aquosas ambientais, tendo obtido LODs similares aos do presente estudo ($0,013$ a $0,059 \mu\text{g L}^{-1}$), sendo, contudo, o uso de microseringas uma desvantagem desta técnica.

Neste contexto, a metodologia proposta, HF μ E(*n*-C7+Tol)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), pode ser considerada uma excelente alternativa para a monitorização de OCPs em matrizes reais, utilizando materiais simples e de baixo custo, volumes negligenciáveis de solventes orgânicos, assim como envolvendo reduzida manipulação.

8.2.5 Aplicação a matrizes reais

Para demonstrar o desempenho analítico da metodologia proposta, foram realizados ensaios com recurso ao SAM em diversas matrizes reais das áreas ambiental e alimentar, nomeadamente, água potável, efluente, solo, chá e tomate. As amostras aquosas foram fortificadas no sentido de se obter concentrações finais em OCPs compreendidas entre $0,10$ e $10,00 \mu\text{g L}^{-1}$ e, as amostras sólidas, entre $0,02$ e $2,00 \mu\text{g g}^{-1}$, em quatro níveis. Foram ainda

realizados ensaios em branco sem a adição de padrão para maior controle do processo.

De forma geral, os resultados obtidos demonstraram boa capacidade analítica para todos os tipos de matrizes, com coeficientes de determinação compreendidos entre 0,9887 (solo) e 0,9996 (água potável). Nos ensaios efetuados não foram detetados OCPs ($< \text{LOD}$) em nenhuma das matrizes analisadas, circunstância que se justifica uma vez estes pesticidas terem sido banidos da União Europeia.

A figura 8.9 exemplifica perfis cromatográficos obtidos a partir de ensaios realizados em amostras de efluente (a), solo (b), chá (c) e tomate (d), sob condições experimentais otimizadas, na qual podem observadas excelentes seletividade e sensibilidade.

8.3 Conclusões

No presente estudo, a técnica híbrida proposta no capítulo 7, HF μ E, foi aplicada na determinação vestigial de 17 OCPs em diversos tipos de matrizes reais, com a finalidade de demonstrar sua capacidade analítica para uma ampla gama de analitos e amostras. A metodologia proposta, HF μ E(*n*-C7+Tol)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), foi otimizada e validada, tendo fornecido resultados muito satisfatórios, com eficiências de extração e sensibilidades convenientes.

O presente estudo introduziu ainda uma melhoria na HF μ E, pelo uso de duas HFs por amostra contendo solventes diferentes, no sentido de aumentar a seletividade da extração e reduzir o tempo de equilíbrio envolvido. Por outro lado, o uso de dois dispositivos analíticos não condicionou o ciclo analítico.

As vantagens práticas já observadas anteriormente, como a simplicidade, o custo-benefício, a reduzida manipulação e consumo negligenciável de solventes orgânicos, assim como a compatibilidade com instrumentação analítica convencional, foram uma vez mais confirmadas, fazendo desta nova abordagem uma excelente técnica alternativa para a monitorização vestigial de compostos apolares em matrizes reais com origem diversa.

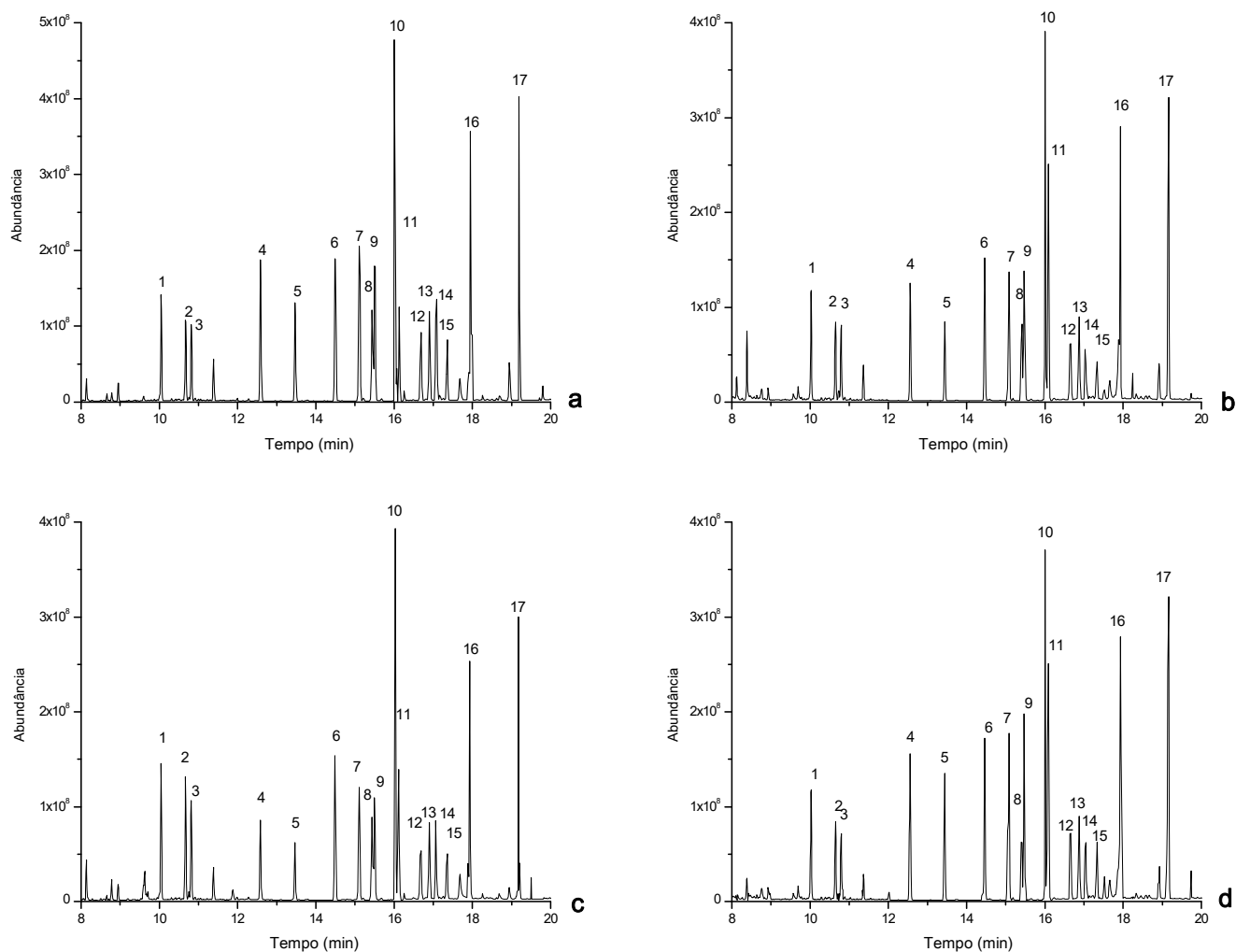


Figura 8.9. Cromatogramas obtidos por dual-HF μ E(*n*-C7+Tol)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM) na análise dos 17 OCPs em amostras fortificadas de efluente (a), solo (b), chá (c) e tomate, sob condições experimentais otimizadas. 1, α -BHC; 2, γ -BHC; 3, β -BHC; 4, heptacloro; 5, aldrina; 6, heptacloro epóxido; 7, γ -clordano; 8, α -clordano; 9, α -endossulfão; 10, 4,4'-DDE; 11, dieldrina; 12, endrina; 13, β -endossulfão; 14, 4,4'-DDD; 15, endrina aldeído; 16, 4,4'-DDT e 17, metoxicloro.

8.4 Referências

- [1] M.C.R. Alavanja, J.A. Hoppin, F. Kamel, Health Effects of Chronic Pesticide Exposure: Cancer and Neurotoxicity, *Annu. Rev. Public Health.* 25 (2004) 155–197.
- [2] A. Samsidar, S. Siddiquee, S.M. Shaarani, A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs, *Trends Food Sci. Technol.* 71 (2018) 188–201.
- [3] R. Jayaraj, P. Megha, P. Sreedev, Review Article. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment, *Interdiscip. Toxicol.* 9 (2016) 90–100.
- [4] K.H. Kim, E. Kabir, S.A. Jahan, Exposure to pesticides and the associated human health effects., *Sci. Total Environ.* 575 (2016) 525–535.
- [5] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, Hollow fiber microextraction: a new hybrid microextraction technique for trace analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 2911–2920.
- [6] N.R. Neng, A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, Adsorptive micro-extraction techniques-Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7303–7310.
- [7] J.M.F. Nogueira, Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques, *Anal. Chim. Acta.* 757 (2012) 1–10.
- [8] N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, Powdered activated carbons as effective phases for bar adsorptive micro-extraction (BA μ E) to monitor levels of triazinic herbicides in environmental water matrices, *Talanta* 83 (2011) 1643–9.
- [9] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique-Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices, *Talanta* 120 (2014) 126–134.
- [10] A. Gutiérrez-Serpa, P. Rocío-Bautista, V. Pino, F. Jiménez-Moreno, A.I. Jiménez-Abizanda, Gold nanoparticles based solid-phase microextraction coatings for determining organochlorine pesticides in aqueous environmental samples, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 2009–2021.
- [11] E. Pérez-Carrera, V.M.L. León, A.G. Parra, E. González-Mazo, Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1170 (2007) 82–90.
- [12] D. Liu, S. Min, Rapid analysis of organochlorine and pyrethroid pesticides in tea samples by directly suspended droplet microextraction using a gas chromatography-electron capture detector, *J. Chromatogr. A.* 1235 (2012) 166–173.
- [13] C. Basheer, H.K. Lee, J.P. Obbard, Determination of organochlorine pesticides in seawater using liquid-phase hollow fibre membrane microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 968 (2002) 191–199.

Capítulo 9

Conclusões finais e perspetivas futuras

9.1 Conclusões finais

A presente dissertação propõe o desenvolvimento e a aplicação de metodologias inovadoras para a análise vestigial de compostos prioritários, nomeadamente antibióticos, antidepressivos, filtros UV, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e pesticidas organoclorados, em diversos tipos de matrizes reais com reconhecida importância.

Numa primeira fase, demonstrou-se o potencial da microextração adsortiva em barra (BA μ E), uma técnica sortiva estática que opera sob a tecnologia de amostragem por flutuação e apresenta como principal vantagem a possibilidade de selecionar o melhor sorvente de acordo com as características dos analitos para cada aplicação particular. A BA μ E, seguida de μ LD e combinada com HPLC-DAD, foi aplicada na análise vestigial de antibióticos (sulfatiazol, sulfametoxazol, sulfadimetoxina e trimetoprim) em matrizes ambientais aquosas. A metodologia proposta provou excelente desempenho analítico, demonstrando ser uma alternativa a outras técnicas de microextração bem estabelecidas.

Apesar de todas as vantagens apresentadas pela BA μ E, a etapa de retroextração tornava esta técnica limitativa, uma vez incluir diversos passos nem amigos do usuário, nem compatíveis com trabalho de rotina. Neste sentido, foi desenvolvida uma nova geração de dispositivos BA μ E, permitindo a introdução de um ciclo analítico inovador, simples e com vantagens efetivas. Os novos dispositivos são menores e mais flexíveis que os originais, podendo a LD ser realizada num único passo, sendo compatível com amostradores automáticos de sistemas cromatográficos convencionais.

Para avaliar o desempenho analítico desses avanços propostos, o novo dispositivo BA μ E, combinado com sistemas de LC, foi utilizado na determinação de quatro fármacos antidepressivos (bupropiona, trazodona, citalopram e amitriptilina) em fluidos biológicos e dois filtros UV hidrofílicos (ácido 2-fenil-5-benzimidazol sulfónico e ácido 5-benzoil-4-hidroxi-2-metóxi-benzeno sulfónico) em matrizes aquosas ambientais e cremes de proteção solar. Os resultados obtidos em ambas as metodologias desenvolvidas demonstraram excelente desempenho analítico, indicando que a redução da quantidade de sorvente usada não comprometia a eficiência do processo de microextração. Do ponto de

vista prático, as inovações introduzidas simplificaram ainda mais a técnica BA μ E, com a eliminação de diversos passos de manipulação da amostra, fazendo desta abordagem uma alternativa notável para a monitorização de compostos prioritários em matrizes reais para uso em rotina.

Uma nova técnica híbrida de microextração estática foi igualmente proposta, a microextração em fibra oca (HF μ E), uma abordagem baseada em líquidos e desenvolvida para a extração de compostos mais apolares. O dispositivo analítico consiste numa membrana contendo solvente orgânico imobilizado nas suas paredes porosas, que opera por flutuação. Ao contrário de outros métodos anteriormente propostos utilizando fibras ocas, a HF μ E opera num ciclo analítico simples, com reduzida manipulação, sendo facilmente combinada com sistemas instrumentais convencionais para trabalho de rotina. Foram ainda introduzidas melhorias a HF μ E com o uso simultâneo de duas fibras por amostra com diferentes solventes a fim de aumentar a seletividade do método, assim como a cinética de microextração, sem comprometer o ciclo analítico envolvido.

Com a finalidade de demonstrar o desempenho analítico da nova técnica, a HF μ E combinada com GC-MS foi utilizada para a determinação vestigial de 18 PAHs e 17 OCPs em diversos tipos de matrizes reais das áreas ambiental e alimentar, nomeadamente águas potáveis e superficiais, efluentes, solo, chá, tomate e fígado de peixe. Os dados obtidos foram muito satisfatórios, com baixos limiares analíticos, assim como recuperações e precisões adequadas. Para além do notável desempenho analítico, a cinética de microextração é muito rápida, face à elevada capacidade de partição dos analitos para o solvente e à simplicidade da operação laboratorial.

Em resumo, os métodos desenvolvidos na presente dissertação apresentam elevada simplicidade e custo-benefício, são amigos do usuário e do ambiente, podendo ser facilmente combinados com instrumentação corrente para o uso em rotina. Face ao baixo custo de todos os apparatus envolvidos, os materiais são utilizados apenas uma vez por amostra, evitando problemas de contaminação. Por fim, a BA μ E e a HF μ E provaram ser alternativas analíticas credíveis para a microextração vestigial de compostos prioritários, quer polares, quer apolares, em matrizes reais com grande complexidade e origem diversa, tendo os objetivos propostos neste trabalho sido claramente alcançados.

9.2 Perspetivas futuras

Como perspetivas futuras, propõem-se a aplicação das tecnologias propostas a outras classes de compostos emergentes e em diferentes matrizes reais, com a finalidade de expandir ainda mais a área de atuação.

Sugere-se ainda para a BA μ E, testar novas fases sorventes, com características físico-químicas distintas, assim como materiais resultantes da modificação química com propriedades superficiais e texturais inovadoras para aumento da seletividade e/ou sensibilidade. Outra vertente que pode ser estudada diz respeito à redução do tempo de equilíbrio com o aumento da área de contato entre o sorvente e a matriz.

Sendo a HF μ E uma nova abordagem, muitas possibilidades podem ainda ser exploradas, como por exemplo a utilização de outros solventes orgânicos, o uso do dispositivo no modo HS e a redução do tamanho da HF para uma diminuição ainda maior do volume de solvente usado na LD, com consequente aumento do fator de concentração e da sensibilidade do método.

Por fim, a combinação das técnicas propostas com sistemas hifenados e/ou *tandem*, ou mesmo com instrumentação de alta resolução, é uma possibilidade que deve ser considerada no sentido de incrementar a seletividade e a sensibilidade, fundamentalmente na identificação de analitos desconhecidos em matrizes com elevada complexidade.

Anexos

Anexo I - Técnicas cromatográficas e hifenadas

As técnicas cromatográficas constituem um importante conjunto de métodos de separação com grande aplicação em diversas áreas da ciência. Face aos avanços desenvolvidos nas últimas décadas, essas técnicas são amplamente utilizadas para a separação de componentes em matrizes de elevada complexidade.

A.1 Breve nota histórica

Os métodos de separação têm sido amplamente utilizados durante quase toda a história da humanidade, em operações como filtração, destilação, extração com solvente e amalgamação. Em meados do século XIX, alguns cientistas já usavam sólidos para filtração e fracionamento de líquidos e separações em papel com o desenvolvimento em modo circular e ascendente. No final do século XIX, cientistas utilizaram sólidos dispostos em colunas para fracionar petróleo. Apesar de todos esses processos de separação terem ocorrido face a um mecanismo hoje consagrado em cromatografia, naquela época o fenômeno não foi propriamente reconhecido nos experimentos realizados [1].

Esse reconhecimento aconteceu somente no início do século XX, quando o botânico russo Michael Tswett identificou o mecanismo do seu processo de separação como o de adsorção e introduziu a palavra cromatografia. Tswett usou a técnica para separar diversos pigmentos de plantas, como clorofilas e xantofilas, dissolvidos em éter de petróleo, através de uma coluna empacotada com carbonato de sódio. As espécies separadas apareciam como bandas coradas na coluna resultando assim o termo “cromatografia” escolhido para o método (do grego *chroma* que significa cor e *graphein* que significa escrita) [1–2].

Alguns anos mais tarde surgiram novos desenvolvimentos, quando Izmailov e Schraiber introduziram a cromatografia em camada fina (1938), sendo mais tarde melhorada por Stahl em 1958. Martin e Synge desenvolveram a cromatografia em fase gasosa (GC) de partição em 1941, tendo ganho o prémio

Nobel em 1957. Inicialmente a cromatografia líquida (LC) era realizada em colunas de vidro com diâmetro alargado e operando à pressão atmosférica sob gravidade, sendo a análise lenta e o procedimento laborioso. A partir do final da década de 60, ocorreu maior desenvolvimento da LC, como técnica complementar ao GC, surgindo então a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Com o intenso avanço tecnológico em instrumentação para GC e HPLC, estas técnicas apresentam elevado potencial ao nível das separações finas. Nos dias atuais ainda se encontram sob constante desenvolvimento, sendo técnicas utilizadas em rotina em diversas áreas, como química, biologia, medicina, farmacêutica, ambiental, controlo de qualidade, entre outras.

A.2 Conceitos teóricos fundamentais

A cromatografia abrange uma série de técnicas de separação nas quais os constituintes da amostra a serem separados são distribuídos entre uma fase estacionária, que encontra-se suportada numa coluna e pode ser líquida, sólida ou um gel e e uma fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou um fluido supercrítico e é imiscível com a fase estacionária. Desta forma, numa separação cromatográfica, a amostra introduzida na coluna é transportada pela fase móvel, interagindo com a fase estacionária ao ser forçada a passar pela mesma. A eluição de cada componente da mistura injetada é alcançada por meio da otimização da velocidade de fluxo da fase móvel, a qual realiza o transporte e proporciona a interação dos componentes da amostra com a fase estacionária [3–4].

Uma vez a separação na coluna cromatográfica depender do grau de interação do analito com ambas as fases, as concentrações relativas de um componente na fase estacionária (c_S) e na fase móvel (c_M) relacionam-se por meio do coeficiente de distribuição (K), dado pela equação 1:

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad (1)$$

Desta forma, quanto maior o valor de c_s , mais elevado será o valor de K , significando que maior será a interação com a fase estacionária. Os componentes com um valor de K elevado movem-se mais lentamente ao longo da coluna, podendo assim ser separados dos componentes com um valor de K menor. Uma separação não pode ser efetuada se não houver diferenças na distribuição entre os componentes. A migração diferencial dependerá, portanto, das variáveis experimentais que afetam a distribuição, isto é, das características das fases móvel e estacionária envolvidas, assim como de outros fatores experimentais.

Outro parâmetro com grande importância em cromatografia é o tempo de retenção (t_R), definido como o tempo que um dado analito necessita para percorrer todo o trajeto da coluna desde a injeção até ser detetado. Por outro lado, o tempo morto (t_M) consiste no tempo que uma espécie demora a percorrer a fase móvel não apresentando qualquer tipo de interação com a fase estacionária e o tempo de retenção ajustado (t_R'), o tempo que um analito depende apenas na fase estacionária, conforme ilustrado na figura A.I.1.

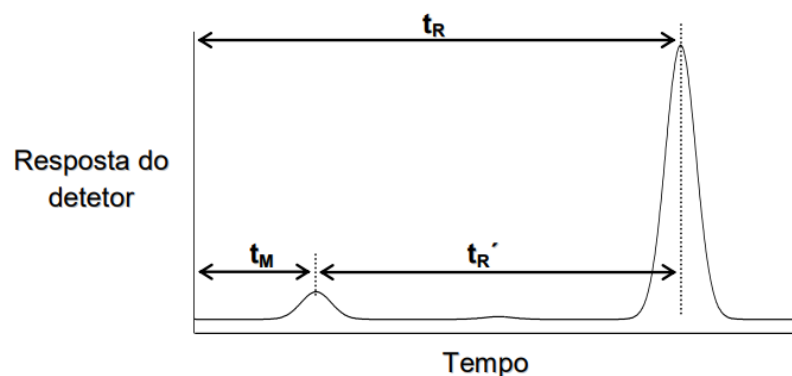


Figura A.I.1. Ilustração do tempo morto (t_M), retenção ajustado (t_R') e do tempo de retenção (t_R) num cromatograma típico.

Assim, componentes muito retidos, ou seja, com elevada interação com a fase estacionária, deslocam-se mais lentamente com o fluxo da fase móvel e apresentam um t_R mais elevado. Por outro lado, componentes pouco retidos, ou com pouca interação com a fase estacionária, deslocam-se rapidamente com a fase móvel e apresentam t_R mais baixo.

Neste sentido, a velocidade de migração de um analito num sistema cromatográfico pode ser definida por outro parâmetro denominado fator de capacidade (k') ou fator de retenção ajustado, que pode ser definido pela expressão 2:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M} \quad (2)$$

Uma vez este parâmetro relacionar o t_R' com o t_M , ele nos indica se análise é lenta ou rápida. Assim, para valores reduzidos de k' , os componentes são pouco retidos na fase estacionária, enquanto que para valores elevados de k' , os componentes da mistura são fortemente retidos, originando tempos de análise elevados.

Outro parâmetro importante consiste na seletividade (α), que está relacionada com a fase estacionária e as condições de operação, traduzindo-se pela razão entre os fatores de capacidade de dois compostos adjacentes 1 e 2, conforme a equação 3 indica:

$$\alpha = \frac{k'_1}{k'_2} \quad (3)$$

Considerando que o analito 1 é o mais fortemente retido na fase estacionária, α irá sempre possuir um valor superior ou igual à unidade.

Sendo a cromatografia um fenómeno de transferência de massa, a eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser expressa pelo número de pratos teóricos (N) e correspondente altura equivalente (H). Prato teórico pode ser definido como o segmento de coluna onde é atingido, a cada instante, o equilíbrio do analito a ser analisado entre as fases móvel e estacionária. Assim, a eficiência pode ser calculada pela expressão 4:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (4)$$

na qual N representa o número de pratos teóricos, t_R o tempo de retenção e W a respetiva largura na base do pico simétrico.

Assim, quanto maior for o número de pratos teóricos, maior será a eficiência e, portanto, o potencial para separar dois solutos. O número de pratos teóricos depende do comprimento da coluna e de H , podendo entender-se este último parâmetro como o segmento da coluna no qual o soluto alcança o equilíbrio termodinâmico entre as fases móvel e estacionária.

A teoria dos pratos teóricos possibilita uma descrição aproximada da separação cromatográfica. Contudo, na prática, pode ocorrer o alargamento dos picos ou bandas devido a diversos processos de transporte de massa, os quais alteram a velocidade de migração das moléculas dos compostos no interior da coluna cromatográfica. Assim, a equação de “Van Deemter” resume os fenômenos que ocorrem na coluna e que contribuem para a dispersão da banda:

$$H = A + \frac{B}{u_x} + C u_x \quad (5)$$

Na equação acima, o termo A está relacionado com as diferentes vias migratórias que um analito pode percorrer ao atravessar o empacotamento da fase estacionária, sendo significativo quando se usam colunas empacotadas e desprezível quando se usam colunas capilares abertas. A razão B/u_x resulta da difusão molecular longitudinal, ou seja, da dispersão do soluto ao longo do comprimento da coluna – maioritariamente por difusão na fase móvel, sendo inversamente proporcional à velocidade linear. O termo $C u_x$ consiste no tempo necessário para o equilíbrio eluição/retenção do soluto entre as fases móvel e a estacionária, sendo diretamente proporcional à velocidade linear ou ao fluxo.

Por fim, o objetivo das técnicas cromatográficas reside na separação de todos os componentes duma amostra, sendo a medida de separação completa entre dois picos adjacentes designada por resolução (R_s). Desta forma, pode se recorrer a uma expressão que exprime a R_s em termos dos três fatores fundamentais, a seletividade (α), o fator de capacidade (k') e a eficiência (N), como representado na equação 6:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \times \left(\frac{k'_B}{k'_B+1} \right) \quad (6)$$

Para que ocorram separações completas entre dois picos adjacentes, a R_s deve ser superior a 1,5. A R_s pode ser incrementada por alteração da seletividade da coluna e/ou de parâmetros operacionais. No entanto, se a eficiência da coluna for constante, a R_s só é incrementada com o aumento do comprimento da coluna alargando, conseqüentemente, o tempo de análise.

De forma geral, os processos de separações cromatográficas podem ser classificados tendo em consideração três critérios, nomeadamente, a natureza física da fase móvel, o suporte da fase estacionária e a natureza do mecanismo de separação. A figura A.I.2 resume a classificação dos métodos cromatográficos mais comumente utilizados em química analítica.

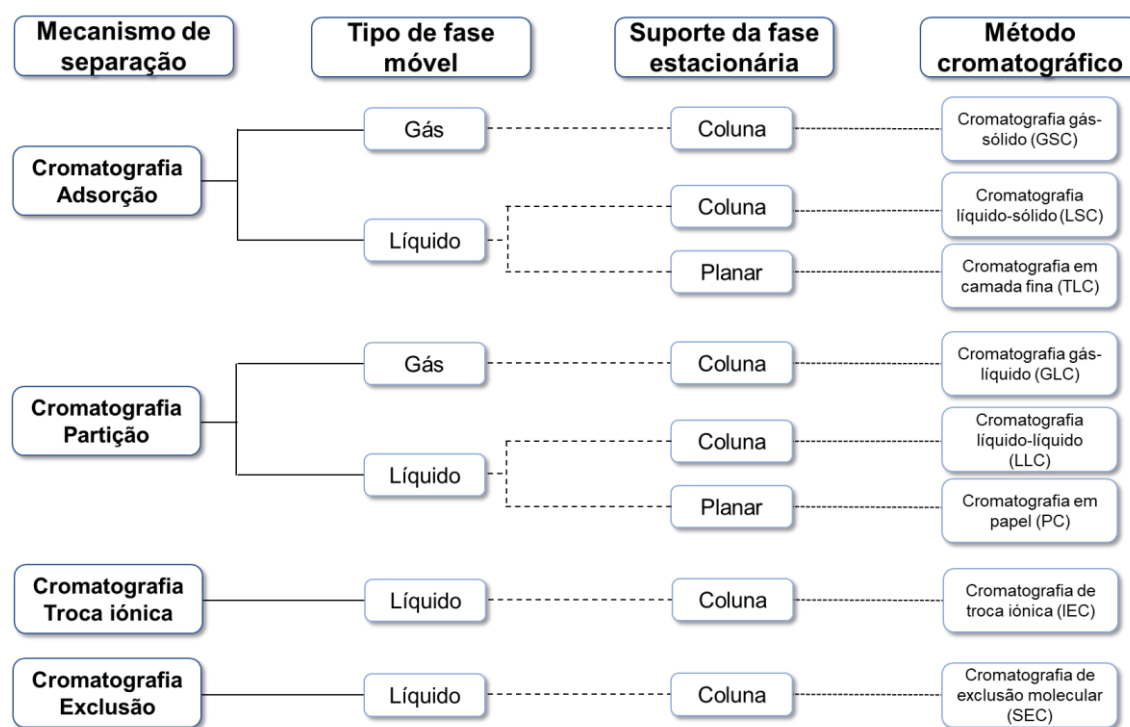


Figura A.I.2. Classificação dos principais métodos cromatográficos.

A.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Em LC, a fase móvel utilizada consiste num líquido, tendo sido sua primeira aplicação realizada em forma de coluna clássica, na qual o eluente percorria a mesma por ação da gravidade, sendo uma separação lenta e trabalhosa. No entanto, com recurso à moderna instrumentação cromatográfica, a HPLC permite alcançar melhor resolução e análises mais rápidas.

A instrumentação utilizada em HPLC consiste num conjunto de módulos com características próprias e necessários para a execução da técnica, como representado na figura A.I.3. Os principais componentes deste sistema são um reservatório que contém a fase móvel ou eluente, uma bomba que impulsiona a fase móvel dos reservatórios na direção da coluna, um sistema de injeção para a introdução da amostra, uma coluna na qual ocorre a separação e um detetor, controlados por um *software* para aquisição e tratamento dos dados analíticos.

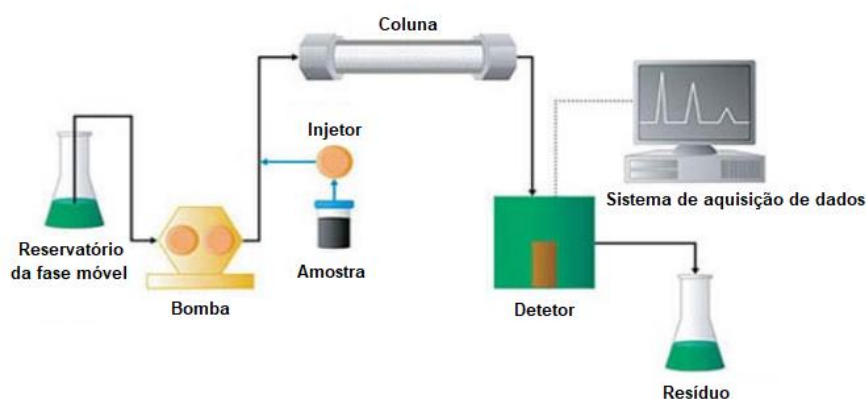


Figura A.I.3. Esquema simplificado de um sistema de HPLC convencional.

Na HPLC, o(s) reservatório(s) para a fase móvel devem ser o mais inertes possíveis, tendo nas extremidades dos tubos imersos em cada frasco um filtro poroso de modo a evitar que partículas sólidas entrem no sistema de HPLC. De seguida, a fase móvel atravessa uma unidade de degaseificação, uma vez a análise ser prejudicada pela presença de gases dissolvidos. As separações cromatográficas por HPLC podem ser efetuadas mantendo a composição da fase móvel constante ou variável, designando-se por eluição isocrática ou por gradiente, respetivamente. A fase móvel é impulsionada por bombas, podendo o sistema de funcionamento ser isocrático, binário ou até mesmo quaternário.

No sistema de injeção, a amostra é introduzida com o auxílio de uma seringa convencional e válvulas especiais que permitem grande precisão e exatidão. Existem dois modos de injeção, na injeção *stop-flow* o fluxo de solvente é parado por momentos e só depois dum ajuste da coluna a amostra é injetada para a mesma. O modo de injeção mais usado em HPLC consiste no sistema de *loops*, que atualmente se encontra perfeitamente automatizado.

Na coluna cromatográfica ocorre a separação dos analitos presentes na amostra, sendo normalmente em aço inoxidável e desenvolvidas para suportar pressões elevadas. As colunas possuem geralmente um comprimento compreendido entre 5 e 25 cm, sendo o tamanho mais usual de 10 a 15 cm. O diâmetro interno comum está compreendido entre 2 a 5 mm, com tamanhos de partículas entre 2 e 5 μm . O uso de pré-colunas, colocadas antes da coluna analítica, tem como finalidade aumentar o tempo de vida da mesma, retendo purezas indesejadas. A coluna pode ainda estar inserida num compartimento com termóstato ou forno para controlo da temperatura de operação. O tipo de recheio a ser utilizado numa coluna para HPLC dependerá principalmente do tipo de substâncias a serem introduzidas no sistema, sendo chamadas de fase normal quando apresentam características polares e fase reversa no caso de características não polares. A separação por fase reversa é das mais usadas em HPLC, sendo as colunas geralmente constituídas por metil, octil e octadecilsilica.

Os compostos separados na coluna cromatográfica são posteriormente detetados por um dispositivo que converte uma mudança de concentração na fase móvel num sinal, sendo registado por um processador de dados com recurso a um *software*. A interpretação destes dados produz resultados qualitativos e quantitativos sobre os componentes de uma amostra. O detetor a ser usado deve ser selecionado levando-se em conta a natureza das substâncias a serem analisadas. Existem disponíveis comercialmente diversos tipos de detetores para HPLC, sendo os mais utilizados o detetor de ultravioleta-visível (UV/Vis) que pode operar com comprimento de onda variável ou múltiplo e o de rede de díodos (DAD) com varrimento espectral simultâneo. Outros detetores podem ser de fluorescência, eletroquímicos, condutividade, dispersão de luz e ainda por hifenção a espectrometria de massa (MS) [3–6].

A.4 Cromatografia em fase gasosa (GC)

Em GC, a fase móvel consiste num gás inerte que transporta a amostra através da coluna contendo a fase estacionária sem interagir com a mesma, sendo os gases normalmente utilizados o hélio, o azoto e o hidrogénio. Um sistema de GC é basicamente constituído por um injetor, uma coluna cromatográfica inserida num forno e um detetor, controlados por *software* adequado. A figura A.I.4 ilustra um esquema simplificado dos componentes básicos de um sistema de GC.

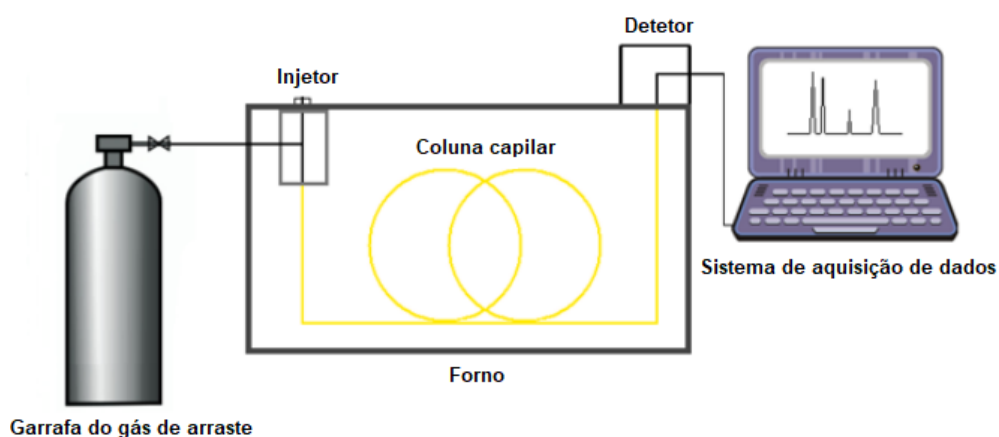


Figura A.I.4. Esquema simplificado de um sistema de GC convencional.

Para a introdução da amostra em GC existem diferentes tipos de sistemas de injeção. Numa injeção típica, a amostra líquida, ao ser introduzida no injetor, é vaporizada e misturada com o gás de arraste, empurrando os componentes da mistura para a coluna. Entre os modos de injeção, os mais usados são os sistemas por temperatura constante (isotérmica), com (*split*) ou sem (*splitless*) repartição da amostra e o modo de vaporização com temperatura programada (PTV). No modo *split*, por intermédio dum sistema de válvulas, somente uma parte da amostra é introduzida na coluna, sendo a forma como a amostra é dividida determinada por meio da relação entre a quantidade de gás de arraste que deixa o injetor pela válvula de *split* e o fluxo na coluna (razão de *split*). No modo *splitless*, toda a amostra injetada é arrastada para a coluna, tornando-a apropriada para análise vestigial de amostras complexas. O volume de injeção usado no injetor *split/splitless* é normalmente compreendido entre 0,2 e 2,0 μL .

Por outro lado, o modo de injeção PTV oferece uma maior sensibilidade analítica devido à possibilidade de injeção de grandes volumes (LVI - *large volume injection*) de amostra (geralmente até 100 µL), sendo uma ferramenta importante em análise vestigial. Na injeção no modo PTV, a amostra é introduzida no injetor frio (normalmente 10-40 °C, abaixo do ponto de ebulição do solvente), sendo o arrefecimento realizado por ar comprimido ou azoto líquido. Após a injeção e evaporação do solvente, a câmara do injetor é subitamente aquecida a temperaturas elevadas e os analitos da amostra transferidos quantitativamente para a coluna, na qual ocorre a separação dos componentes da amostra.

Relativamente às colunas para GC, existem dois tipos, as de empacotamento e as capilares, sendo que as capilares vem substituindo as colunas de empacotamento face à elevada eficiência e resolução. As colunas capilares são constituídas por um tubo de sílica fundida, com revestimento exterior em polimida e a fase estacionária a revestir a parede interna. As fases estacionárias líquidas mais utilizadas são baseadas em polisiloxano, sendo que o tipo e a percentagem de grupos substituintes diferenciam cada fase e ditam as características de polaridade. O polidimetilsiloxano (PDMS), com características apolares, consiste na fase estacionária mais comum. As colunas capilares disponíveis comercialmente têm cerca de 5 a 60 m em comprimento, com diâmetros internos compreendidos entre 0,10 e 0,75 mm. Uma vez as interações dos analitos com a fase estacionária serem dependentes da temperatura, a coluna encontra-se localizada dentro dum forno com temperatura programável, podendo operar no modo isotérmico ou em gradiente de temperaturas. O modo de operação mais utilizado é com rampas de temperatura, no qual ocorre aumento térmico progressivo constante ou a diferentes velocidades e tempos distintos com possibilidade de etapas isotérmicas no início, meio ou no fim da análise.

O último componente essencial para operação do sistema de GC é o detetor, que é responsável pela emissão do sinal, traduzindo a variação da resposta em função da composição e/ou propriedades dos componentes eluídos. Atualmente, uma ampla gama de detetores está disponível conforme as necessidades de aplicações pretendidas, destacando-se os detetores de ionização de chama, de condutividade térmica, de captura eletrónica, de azoto-fósforo e ainda o detetor de massa (MS) [7–8].

A.5. Espectrometria de massa (MS)

A cromatografia é uma técnica importante para a separação de constituintes de misturas, permitindo a identificação e/ou quantificação desses componentes, conforme já referido. A identificação é dada com base nos t_R apresentados por cada composto, em condições experimentais otimizadas. No entanto, este parâmetro nem sempre é suficiente para permitir uma identificação inequívoca, devido à possibilidade de mais do que um analito apresentar a mesma retenção. Por outro lado, a MS fornece informação estrutural dos compostos, além de elevada sensibilidade. Neste sentido, apesar de diversos detetores convencionais terem sido indicados anteriormente para ambas as técnicas, quer de HPLC quer de GC, o acoplamento das técnicas cromatográficas com a MS permite a obtenção de informação quantitativa em análise vestigial com elevada seletividade, precisão e exatidão.

Os sistemas de MS são basicamente constituídos por sistema de introdução de amostra (*inlet*), interface/fonte de iões, analisador de massa, detetor de iões e sistema para controlo e aquisição de dados, conforme mostrado na figura A.II.5. A interface pode estar antes ou após a fonte de iões, dependendo se os sistemas são desenvolvidos para GC ou LC [9].

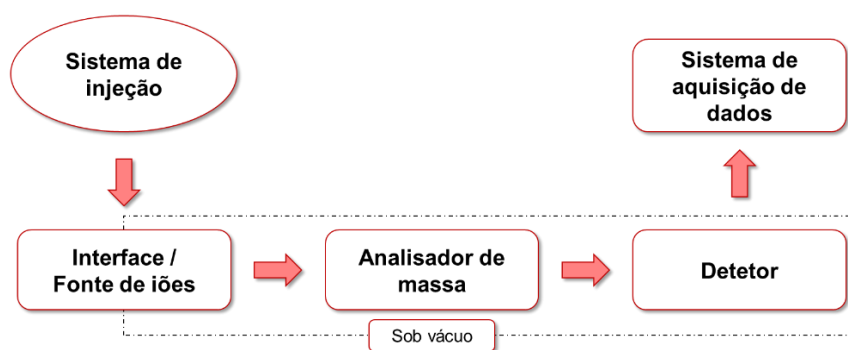


Figura A.I.5. Diagrama simplificado com os principais componentes de um espectrómetro de massa.

A.5.1 Ionização

No processo de ionização, o analito é convertido numa espécie carregada, sob condições adequadas estabelecidas na fonte de iões. Os principais fatores a ter em conta na escolha do processo de ionização são a energia interna transferida durante o processo e as propriedades físico-químicas do analito que pode ser ionizado.

A ionização eletrônica (EI) é o método normalmente utilizado em GC-MS para a formação de iões positivos do composto a ser analisado. Esta fonte consiste num filamento aquecido que emite eletrões, os quais são acelerados em direção ao ânodo e colidem com as moléculas gasosas da amostra analisada. Neste processo ocorre a ionização das moléculas com consequente quebra de ligações químicas e formação de fragmentos iónicos característicos [7–8].

Em LC, o modo de ionização mais comumente usado é a ionização por *electrospray* (ESI). De forma geral, os analitos em solução que saem da coluna são pressurizados em um capilar metálico, no qual é aplicada uma voltagem. O líquido sai do capilar na forma de um *spray* de gotas carregadas. No processo de ionização em modo positivo, é aplicada ao capilar uma voltagem positiva, da ordem de 0.5 - 4 kV, que tem como objetivo neutralizar os contra-iões negativos. Como resultado, ao fim do capilar são geradas pequenas gotas que contém além da fase móvel, iões carregados positivamente em excesso. De seguida, é aplicado um gás (gás de dessolvatação), normalmente N₂, em elevado fluxo e temperatura, para eliminar as moléculas de solvente, sendo então ejetadas cargas positivas das gotas, levando a formação dos iões positivos de interesse que entram no espectrómetro de massa [10].

A.5.2 Analisador de massa

Em MS, depois que os iões são formados, a separação com base na razão massa/carga (m/z) é efetuada pelo analisador de massa, sendo alguns exemplos os analisadores de sector magnético, tempo de voo, quadrupólo e armadilha de iões. O quadrupólo é o analisador de massa mais usado em análise quantitativa,

face ao baixo custo, robustez, versatilidade e grande simplicidade, operando no entanto a baixa resolução. O quadrupólo consiste basicamente de quatro barras paralelas, sendo as barras opostas conectadas ao mesmo potencial elétrico. A essas barras paralelas são aplicadas dois tipos de voltagens diferentes, causando uma transmissão seletiva dos iões de acordo com a m/z . Essas voltagens podem ser ajustadas para serem varridas, de modo a se obter um espectro de massas (modo varrimento contínuo ou *full-scan*) ou para transmissão de somente um ião de interesse (modo SIM - *single ion monitoring*).

No modo *full-scan*, o espectrómetro de massa analisa todos os iões com uma gama abrangente de m/z , detetados e registados. Este modo de operação é genericamente usado na análise de amostras desconhecidas, para identificação dos analitos e caracterização das mesmas, recorrendo-se normalmente a bibliotecas espectrais de referência (Wiley Mass Spectral Library, NIST, etc.). No modo de operação SIM, de acordo com a informação espectral prévia e característica de cada composto, são selecionados até três iões característicos para cada analito, baseados na sua abundância e especificidade. No modo SIM, o ganho em sensibilidade e seletividade é maior, uma vez o espectrómetro de massa monitorizar somente os iões pré-selecionados dentro dum intervalo de tempo previamente estabelecido e de acordo com o tempo de retenção de cada analito. Este modo é especialmente útil na análise quantitativa de analitos alvo em concentrações vestigiais, dado os baixos limiares analíticos alcançados, obtendo-se ganho em sensibilidade e seletividade.

A.5.3 Detetor

O detetor de iões mais comumente usado em MS é o multiplicador de eletrões, que apresenta um tempo de resposta rápido (da ordem dos nanosegundos), capaz de adquirir elevadas correntes, utilizando uma tensão de aceleração a fim de transformar a corrente iónica numa corrente eletrónica suscetível de ser medida, originando um gráfico (espetro) da abundância em função da m/z .

A.6 Espectrometria de massa *tandem* (MS/MS)

A espectrometria de massa sequencial (MS/MS), conhecida também como *tandem* MS consiste numa sequência de análise envolvendo três estágios. No primeiro ocorre a seleção de um ião precursor, no segundo este ião precursor será rompido para gerar iões-fragmentos. O terceiro estágio compreende a análise e detecção destes fragmentos formados. As configurações mais comuns são os triplo quadrupólos, equipamentos que apresentam três componentes em sequência, sendo dois analisadores separados por uma câmara de fragmentação. Para fins quantitativos, é utilizado o modo de aquisição conhecido como Monitorização de Reações Múltiplas (MRM - *multiple reaction monitoring*), no qual ambos os quadrupólos operam no modo mais sensível (seleção) [11].

No desenvolvimento de um método por MRM, inicia-se com a determinação das melhores condições de análise dos compostos alvo com recurso à infusão do padrão de interesse no MS. De seguida, são determinadas as massas dos fragmentos e as condições que maximizem o sinal. Geralmente são monitorados dois fragmentos por analito para maior confiabilidade na identificação do composto.

A.7 Referências

- [1] C.H. Collins, I. Michael Tswett e o “nascimento” da Cromatografia, *Sci. Chromatogr.* 1 (2009) 7-20.
- [2] L.S. Ettre, M.S. Tswett and the invention of chromatography, *LCGC North America*, 21 (2003) 458-467.
- [3] D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 6ª ed. W. H. Freeman, 2003.
- [4] D.A. Skoog; F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, 6ª ed. Thomson & Brooks/Cole, 2007.
- [5] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2ª ed. Wiley-Blackwell, 1997.
- [6] R. Ciola, *Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho*. Editora Edgard Blücher, 1998.

-
- [7] H.J. Hübschmann, Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications, 2^a ed. Wiley, 2008.
- [8] Sparkman, O. D.; Penton, Z. E.; Kitson, F. G.; Gas Chromatography and Mass Spectrometry: a practical guide. Elsevier, 2011.
- [9] E. Hoffmann, V. Stroobant, Mass spectrometry: principles and applications, 3^a ed. Wiley-VCH Inc., 2007.
- [10] S. Gaskell, Electrospray: principles and practice, J. Mass Spectrom. 32 (1997) 677-688.
- [11] C. Dass, Fundamentals of contemporary mass spectrometry, 1^a ed. Wiley-VCH Inc., (2007).

Anexo II – Gráficos suplementares de otimização dos métodos

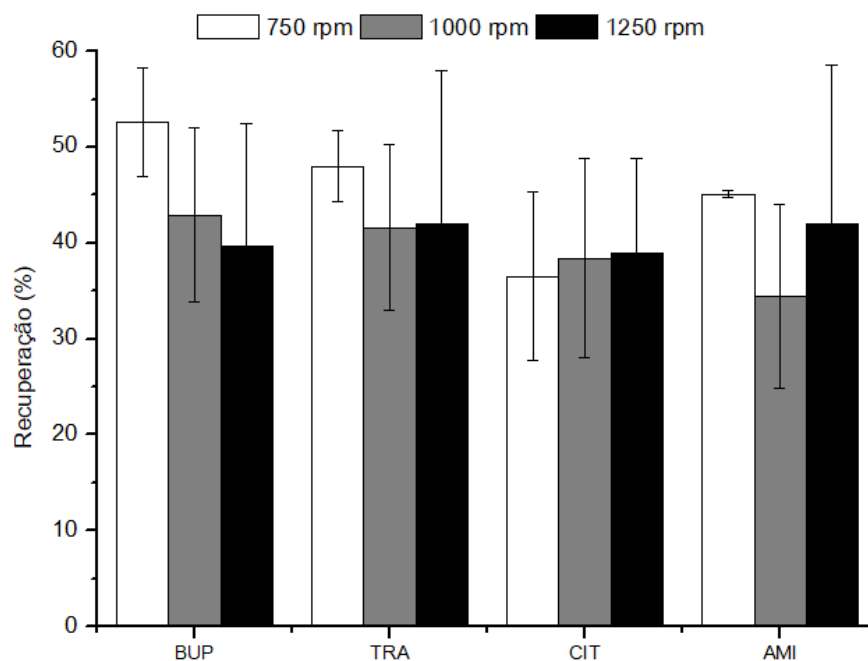


Figura A.II.1. Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h, pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob ultrassons.

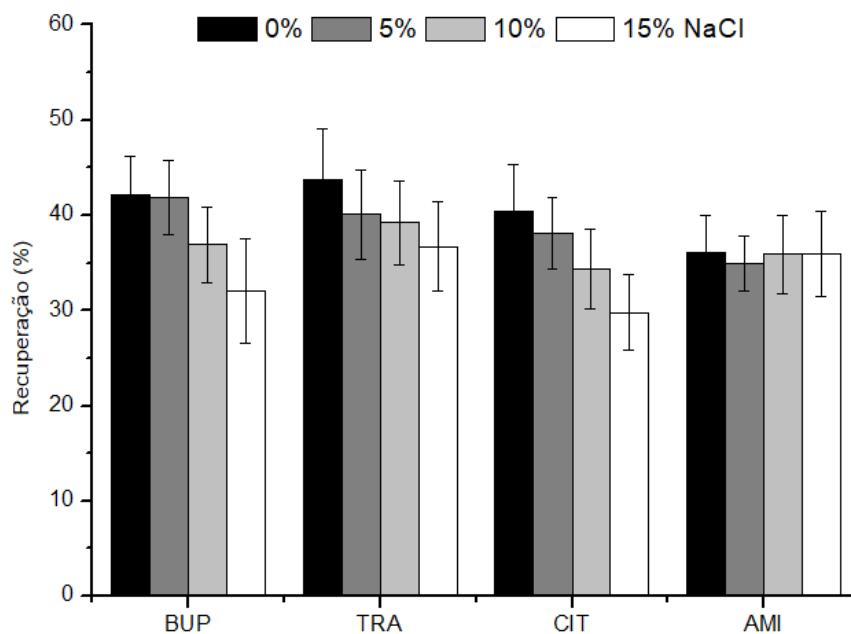


Figura A.II.2. Efeito da variação da força iônica da matriz na microextração dos quatro antidepressivos estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h (750 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob ultrassons.

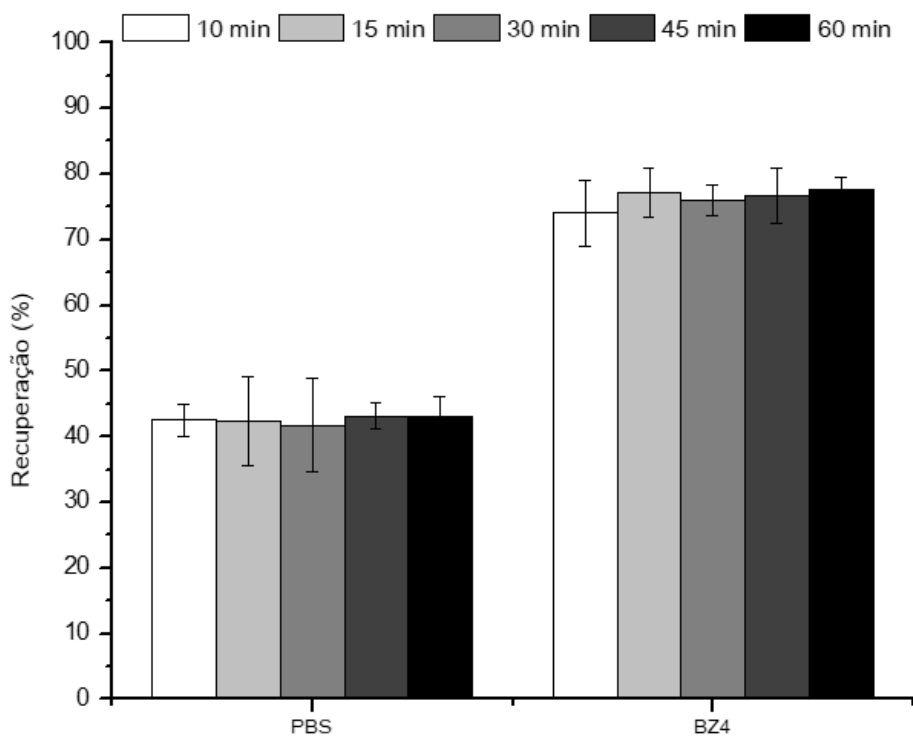


Figura A.II.3. Efeito da variação do tempo de tratamento ultrassónico na retroextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 2,0; retroextração, fase móvel (100 μ L).

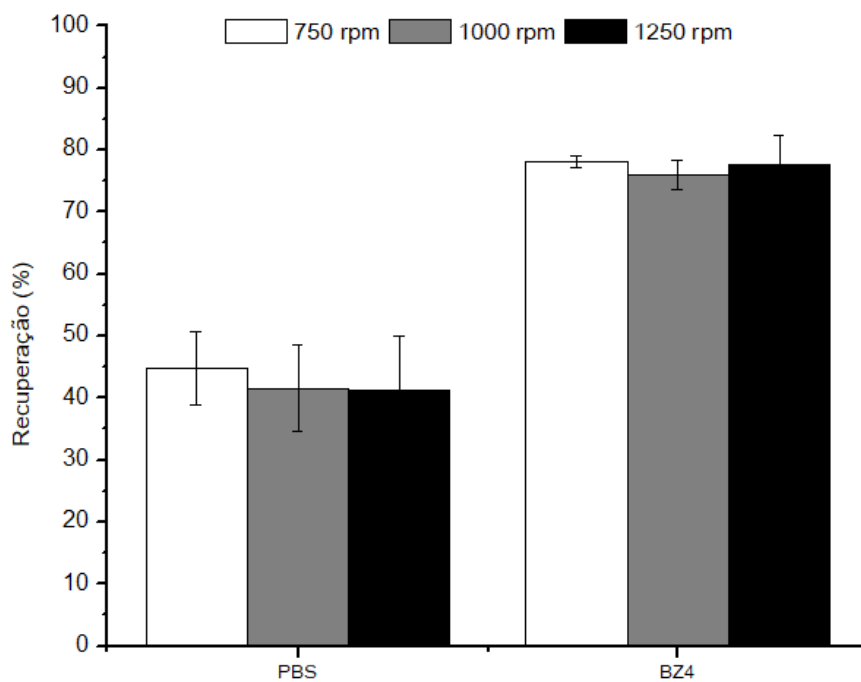


Figura A.II.4. Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos dois filtros UV estudados. Condições experimentais: microextração, 16 h, pH 2,0; retroextração, fase móvel (100 μ L), 10 min sob ultrassons.

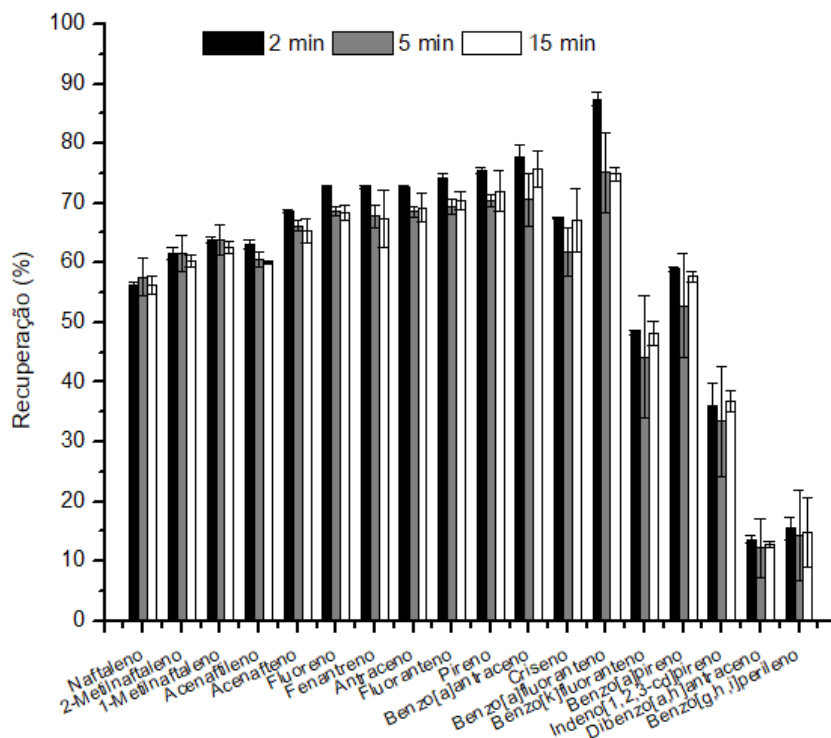


Figura A.II.5. Efeito da variação do tempo de tratamento ultrassónico na retroextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração, 1 h (1000 rpm), pH 5,5.

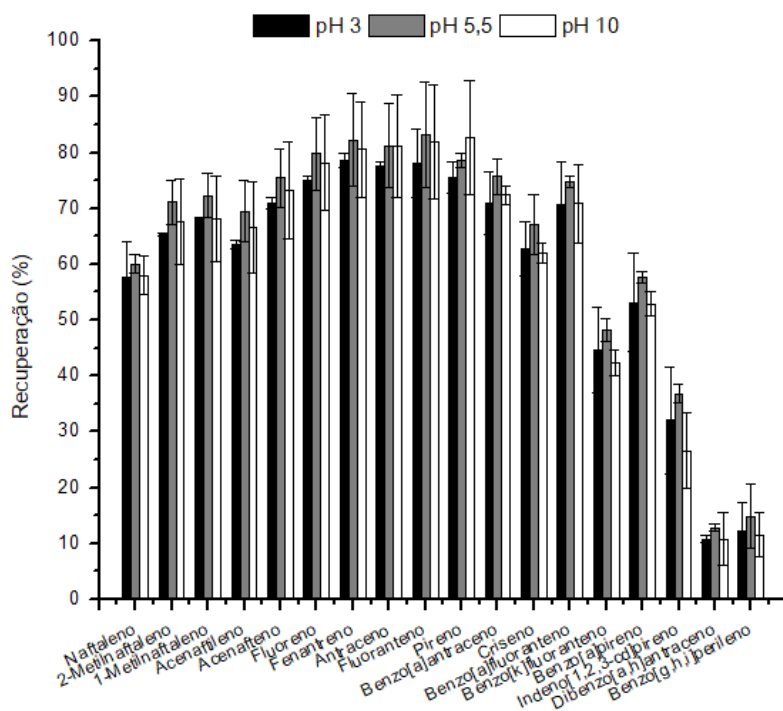


Figura A.II.6. Efeito da variação pH na microextração dos 18 PAHs estudados. Condições experimentais: microextração, 1 h (700 rpm); retroextração, 2 min sob ultrassons.

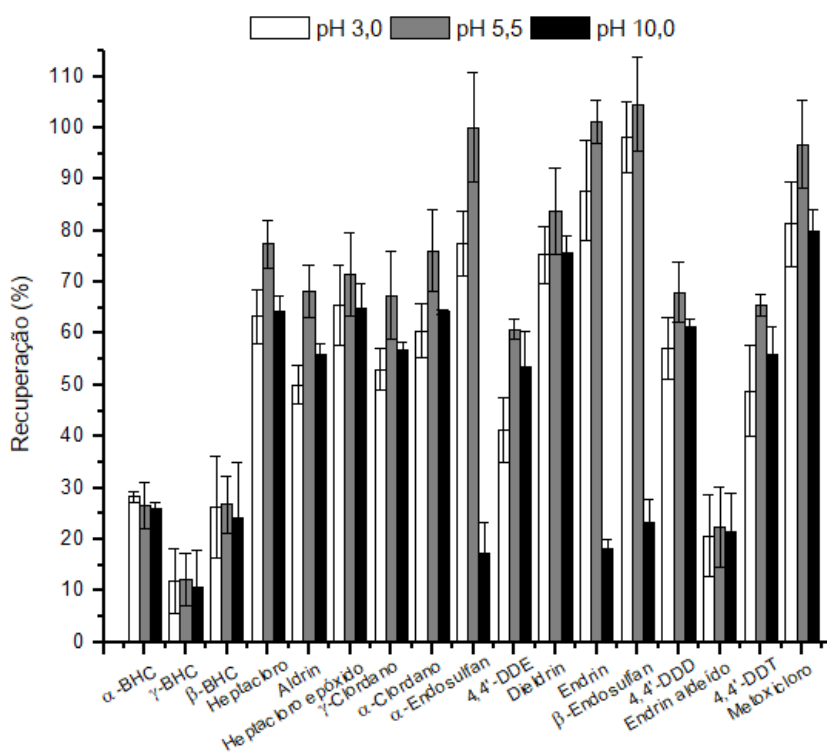


Figura A.II.7. Efeito da variação pH na microextração dos 17 OCPs estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h (1200 rpm); retroextração, 2 min sob ultrassons.

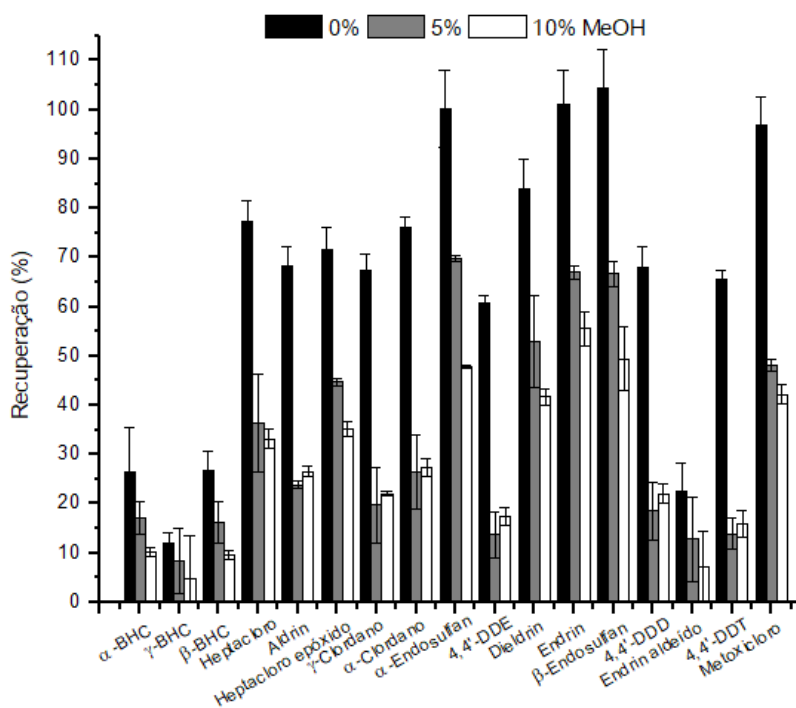


Figura A.II.8. Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos 17 OCPs estudados. Condições experimentais: microextração, 3 h (1200 rpm), pH 5,5; retroextração, 2 min sob ultrassons.