



Ana Rita
Silva

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS
PARA MONITORIZAÇÃO DE PPCPs EM MATRIZES REAIS

2010



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS
METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
MONITORIZAÇÃO DE PPCPs
EM MATRIZES REAIS**

Ana Rita Mendão Silva

DOUTORAMENTO EM QUÍMICA
(Química Analítica)

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS
METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
MONITORIZAÇÃO DE PPCPs EM
MATRIZES REAIS**

Ana Rita Mendão Silva

Tese Orientada pelo
Professor Doutor José Manuel F. Nogueira

DOUTORAMENTO EM QUÍMICA
(Química Analítica)

2010

Aos meus pais e irmão,
ao André e à minha filha.

Prefácio

A poluição ambiental tem vindo a crescer nos últimos anos, o que pode afectar a saúde ou o bem-estar de uma comunidade de diversas formas. Um grupo diversificado de substâncias químicas bioactivas que tem tido especial atenção como poluentes prioritários ambientais, é o dos produtos farmacêuticos, de higiene e cuidado pessoal (PPCPs). O elevado consumo destes compostos, a grande solubilidade que evidenciam em meio aquoso, assim como a incompleta remoção nas estações de tratamento de águas residuais, tem ocasionado a respectiva ocorrência no ambiente. Uma vez que os meios hídricos naturais são frequentemente utilizados como meios receptores e agentes de transporte dessas águas residuais, os sistemas aquáticos têm sido os mais vulneráveis a este tipo de poluição.

Face ao vasto número de PPCPs existentes, à diversidade de matrizes ambientais passíveis da sua presença e aos níveis de concentração vestigial, requer-se o desenvolvimento de metodologias analíticas sensíveis, selectivas, “amigas do ambiente” e que permitam adequação à correspondente monitorização.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novas metodologias que conseguem conjugar a miniaturização analítica com redução ou mesmo eliminação de solventes orgânicos tóxicos (“solventless”), para enriquecimento de compostos alvo em diversos tipos de matrizes, tem-se tornado uma tendência muito relevante em química analítica. No entanto, se focarmos a atenção para os compostos mais polares, como são o caso de muitos dos PPCPs, algumas destas metodologias evidenciam grandes limitações analíticas. Neste contexto e face às necessidades observadas por parte dos laboratórios analíticos, surge o desafio para desenvolvimento de métodos alternativos de enriquecimento prévio, combinados com técnicas cromatográficas adequadas, capazes de rastrear e quantificar estes compostos, dando assim resposta à problemática da qualidade dos sistemas hídricos na sociedade com eventuais implicações para a saúde pública e ambiental.

A presente dissertação, resulta do desenvolvimento de novas metodologias analíticas alternativas para a identificação e quantificação de diversos PPCPs em matrizes reais, que podem ser aplicadas em rotina. É proposta ainda uma abordagem analítica inovadora para enriquecimento vestigial de compostos com diferentes polaridades, designada por micro-extracção adsortiva em multi-esferas (MSA μ E), cuja invenção se encontra sob pedido provisório de patente nacional. A principal vantagem desta nova metodologia, para além da grande capacidade extractiva, é a possibilidade de se poder seleccionar a fase extractiva mais conveniente para cada aplicação em particular.

Prefácio

O trabalho aqui apresentado foi alvo de divulgação na comunidade científica, através de diversas comunicações em painel (“poster”) em encontros nacionais e internacionais, assim como de publicações em revistas internacionais da especialidade com arbitragem científica.

Comunicações em “poster”

- Ana Rita M. Silva, P.M. Branco, A.J.R. Teixeira, J.M.F. Nogueira, “Novel analytical procedures for screening antibiotics in environmental matrices”, 33rd International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda-Italy, 2010.

- Ana Rita M. Silva, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, “Adsorptive micro-extraction (A μ E) techniques: New technologies for trace analysis of polar compounds”, 33rd International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda-Italy, 2010.

- Ana Rita M. Silva, Fátima C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, “Novas estratégias para a determinação de hormonas sexuais esteróides em matrizes aquosas”, 6^o Encontro Nacional de Cromatografia, Funchal, 2009.

- Ana Rita M. Silva, Fátima C.M. Portugal, P.M. Branco, A.J.R. Teixeira, J.M.F. Nogueira, “Optimização do método de ensaio para análise de hormonas sexuais esteróides em amostras ambientais por LC-(ESI)-MS/MS”, 6^o Encontro Nacional de Cromatografia, Funchal, 2009.

- Ana Rita M. Silva, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, “Activated carbons for the adsorption of steroid sex hormones”, CESEP’09, Torremolinos-Spain, 2009.

- Ana Rita M. Silva, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, “Activated carbon for adsorptive extraction of caffeine and acetaminophen in environmental matrices”, Carbon 2009, Biarritz-France, 2009.

- Ana Rita M. Silva, J.M.F. Nogueira, “Optimisation of a stir bar sorptive extraction for the quantifications of synthetic musks fragrances in environmental matrices”, 32nd International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda-Italy, 2008.

- Ana Rita M. Silva, Fátima C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, Determination of anti-inflammatory and lipidic regulator in aqueous matrices by SBSE-LD-HPLC-DAD - a comparison of PDMS and a new polymeric phase”, 5^o Encontro Nacional de Cromatografia, SPQ, Aveiro, 2007.

- Ana Rita M. Silva, J.M.F. Nogueira, "Application of the SBSE-LD-HPLC-DAD method for triclosan determination in environmental and biological matrices", 6º Encontro de Química Analítica, SPQ, Lisboa, 2007.

- Ana Rita M. Silva, J.M.F. Nogueira, "Determination of triclosan in biological matrices by stir bar sorptive extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection", XX Encontro da Sociedade Portuguesa de Química, Monte da Caparica, 2006.

Comunicações orais

- Ana Rita M. Silva, P.M. Branco, A.J.R. Teixeira, J.M.F. Nogueira, "Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de antibióticos em amostras ambientais", 6º Encontro Nacional de Cromatografia, Funchal, 2009.

Artigos em revistas internacionais da especialidade com arbitragem científica

- N.R. Neng, Ana Rita M. Silva, J.M.F. Nogueira, "Adsorptive micro-extraction (A μ E) techniques: Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media", *J. of Chromatogr. A*, 1217 (2010) 7303.

- Ana Rita M. Silva, J.M.F. Nogueira, "Stir bar sorptive extraction and liquid desorption combined with large volume injection - gas chromatography – mass spectrometry for ultra-trace analyses of musk compounds in environmental samples", *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2010) 1853.

- Ana Rita M. Silva, Fátima C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, "Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water matrices: comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases", *J. of Chromatogr. A*, 1209 (2008) 10.

- Ana Rita M. Silva, J.M.F. Nogueira, "New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices", *Talanta*, 74 (2008) 1498.

Prefácio

Agradecimentos

A concretização deste trabalho deve-se à contribuição de várias pessoas e entidades a quem quero manifestar o meu agradecimento.

Começo por agradecer às instituições que apoiaram o trabalho desenvolvido, que resultou na elaboração da presente dissertação. À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e em particular ao Departamento de Química e Bioquímica agradeço as boas condições de acolhimento que possibilitou que o trabalho decorresse com êxito. À Fundação para a Ciência e Tecnologia pela bolsa de doutoramento concedida (SFRH/BD/BD 40926/2007), assim como o financiamento para participar em congressos internacionais onde parte deste trabalho foi divulgado.

Ao meu orientador, Professor Doutor José Manuel F. Nogueira agradeço de um modo especial a orientação incondicional do presente trabalho, e expresso o meu sincero reconhecimento pelo empenho sempre demonstrado em reunir todas as condições para a sua realização, pelas sugestões e conselhos sempre pertinentes ao longo do trabalho experimental e durante a leitura atenta desta dissertação. Agradeço ainda ter aceite a proposta que lhe dirigi para ser orientador desta dissertação, o seu grande profissionalismo, os conhecimentos científicos que me transmitiu, dedicação, incentivo, disponibilidade e paciência que sempre demonstrou.

À Professora Doutora Ana Paula Carvalho, agradeço o modo como me acolheu no seu grupo de trabalho, ao seu interesse, prontidão e auxílio prestado na realização de alguns ensaios da sua área, assim como na interpretação dos resultados. Gostaria de agradecer também a sua disponibilidade para discutir e melhorar parte da discussão apresentada nesta dissertação e a cedência de amostras de carvão. À Doutora Conchi Ania agradeço a realização dos ensaios de análise termogravimétrica.

À Doutora Ana Mestre, agradeço o interesse demonstrado pelo trabalho que desenvolvi, as suas sugestões e a sua disponibilidade permanente para discutir sobre os problemas que surgiam nos ensaios realizados com carvão foram uma mais valia para esta dissertação. À Mestre Marta Andrade, agradeço a realização das isotérmicas. Obrigada às duas pela vossa amizade e incentivo.

Quero expressar o meu agradecimento ao Director do Laboratório de Química Orgânica Analítica e de Síntese (LAQAS) do INETI, Doutor Adriano Teixeira, pela oportunidade em colaborar, nomeadamente na utilização de LC-MS. À Eng.^a Paula Branco, agradeço o apoio prestado nos ensaios realizados de LC-MS, a sua disponibilidade e o carinho demonstrado.

Agradecimentos

À Câmara Municipal do Cartaxo agradeço as águas residuais recolhidas nas ETARs do concelho. À Professora Doutora Maria do Rosário Bronze, agradeço os padrões de antibióticos cedidos.

Aos meus colegas doutorandos, Mestre Nuno Neng e Dr.^a Fátima Portugal, agradeço o carinho com que me receberam no grupo, a força e o apoio sempre transmitidos, a preciosa ajuda em todos os momentos e acima de tudo a vossa amizade. Aos colegas que passaram pelo Grupo de Ciência & Tecnologia de Separação, quero expressar o meu agradecimento pelo vosso interesse, compreensão, a força e o positivismo transmitidos. A todos os colegas de outros laboratórios, alguns já companheiros da licenciatura, agradeço o companheirismo e a amizade demonstrada ao longo destes anos, foi bom reencontrar-vos outra vez. Obrigada a todos pela vossa boa disposição e alegria fazendo muitas vezes esquecer todos os problemas inerentes a este trabalho.

Aos colegas da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (ESTM), que são muitos, agradeço a amizade e o encorajamento. Obrigada por me ouvirem nos momentos mais difíceis e por partilharem também os vossos problemas. À Susana Mendes, agradeço o auxílio nos testes estatísticos realizados com o SPSS.

Não posso também deixar de agradecer aos meus amigos, e a todas as pessoas que me deram uma palavra de amizade e incentivo.

À minha família, em especial aos meus pais, a minha gratidão pelo apoio e compreensão ao longo deste período. Ao meu irmão agradeço o interesse e preocupação demonstrada, assim como a sua amizade.

Ao André, meu marido pelo amor e amizade com que me presenteia já há alguns anos. Obrigada pela tua compreensão nos fins-de-semana e férias que não tive disponíveis para partilhar contigo, pelo estímulo permanente e ajuda incondicional ao longo destes anos. Obrigada por tudo... À minha filha Margarida, pela excelente gravidez que me deu, permitindo-me escrever estas linhas e pelo seu lindo sorriso com que me presenteia todos os dias, dando-me força para terminar esta dissertação.

... a todos o meu profundo obrigada!!!

Objectivos

A presente dissertação teve como principal objectivo o desenvolvimento de novas metodologias analíticas para a monitorização de PPCPs em matrizes ambientais.

Para a concretização dos objectivos propostos, foram necessárias diversas etapas, nomeadamente:

- Identificar quais os PPCPs prioritários
- Combinar a técnica prévia de preparação de amostras na análise de PPCPs prioritários com instrumentação convencional, nomeadamente, técnicas cromatográficas e hifenadas
- Aplicar novas fases extractivas para a extracção de PPCPs com características mais polares
- Desenvolver novas abordagens de técnicas de preparação de amostras
- Optimizar e validar as metodologias desenvolvidas
- Aplicar as novas metodologias para monitorização de PPCPs em diversos tipos de matrizes reais, com especial incidência em matrizes aquosas

Objetivos

Resumo

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de novas metodologias analíticas para monitorização vestigial de produtos farmacêuticos de higiene e cuidado pessoal (PPCPs) em matrizes reais. As classes de PPCPs estudadas como compostos modelo foram “musks”, anti-sépticos, analgésicos, anti-inflamatórios, reguladores lipídicos, antibióticos e hormonas esteróides sexuais.

Numa primeira abordagem, as técnicas cromatográficas e hifenadas seleccionadas demonstraram ser eficazes e versáteis na monitorização deste alargado grupo de PPCPs. No entanto, face às concentrações vestigiais geralmente observadas no ambiente, os procedimentos analíticos requerem um passo de enriquecimento como pré-requisito para eliminar possíveis interferentes e baixar os limites de detecção da instrumentação analítica. As metodologias desenvolvidas direccionaram-se no sentido de recuperar selectivamente os PPCPs alvo, reduzindo significativamente a quantidade de solventes e de amostra.

Neste contexto, a técnica de extracção sortiva em barra de agitação (SBSE) com fase polimérica à base de polidimetilsiloxano (PDMS) demonstrou ser adequada para a extracção de PPCPs com características mais apolares, caso dos “musks” e anti-sépticos, embora evidencie limitações para os mais polares. Assim, procedeu-se ao desenvolvimento de novas abordagens, tendo-se numa primeira fase utilizado SBSE com fase polimérica à base de poliuretano (PU). Dos dados obtidos, concluiu-se que esta nova fase era indicada para micro-extrair compostos com polaridade intermédia (anti-inflamatórios acídicos não esteróides e reguladores lipídicos), embora ainda evidenciasse algumas limitações para analitos com polaridade mais acentuada. Neste sentido, propôs-se uma técnica inovadora, a micro-extracção adsortiva em multi-esferas (MSA μ E), para análise de PPCPs com polaridade acentuada. A preparação, caracterização e testes de estabilidade destes novos micro-dispositivos são discutidos em detalhe. Esta metodologia provou ser económica, robusta, fácil de preparar e de utilizar, possibilitando a selecção da fase extractiva mais adequada para cada tipo de aplicação em particular. A utilização de MSA μ E com carvões activados (ACs) e copolímero poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB), evidenciou maior eficiência de recuperação de diversas classes de PPCPs relativamente às técnicas de SBSE(PDMS) e SBSE(PU), revelando maior eficácia para análise vestigial em amostras ambientais.

O desenvolvimento destas novas abordagens analíticas foi avaliado com recurso à optimização sistematizada dos parâmetros que influenciam o processo analítico, de forma a

Resumo

incrementar a sensibilidade e selectividade dos métodos envolvidos, assim como à validação e aplicação a matrizes reais com importância reconhecida.

Palavras-chave

PPCPs; Técnicas de extracção sortiva; SBSE; MSA μ E; Amostras reais

Abstract

The present work aims the development of novel analytical methodologies to monitor trace levels of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in real matrices. The PPCPs classes studied as model compounds were “musks”, anti-septics, analgesics, anti-inflammatory drugs, lipidic regulators, antibiotics and sexual steroid hormones.

In a first approach, the selected chromatographic and hyphenated techniques showed to be effective and versatile to monitor this wide range of PPCPs classes. However, due to the trace level contents usually achieved in the environment, the analytical procedures requires a previous enrichment step as a pre-requisite to eliminate possible interferences and decrease the detection limits of the analytical instrumentation. The developed methodologies focused on the selective recovery of target PPCPs with the maximum reduction of the amount of solvents and sample.

In this context, stir bar sorptive extraction technique (SBSE) with polydimethylsiloxane (PDMS) polymeric phase has demonstrated to be suitable to extract PPCPs with non-polar characteristics, such as musks and anti-septics, although showed limitations for the more polar ones. Thus, new methodologies were firstly proposed by using SBSE with polyurethane (PU) polymeric phase. From the data obtained, this novel extractive phase is much more indicated for compounds with medium polarity (non-steroidal acidic anti-inflammatory drugs and lipidic regulators), but still showed limitations for analytes with strong polarity. Therefore, a novel enrichment technique, multi-spheres adsorptive micro-extraction (MSA μ E), is proposed for the enrichment of PPCPs with strong polarity. The preparation, characterization and stability tests of these new micro-devices are fully discussed. This analytical methodology proved to be cost-effective, robustness and easy to work-up, enabling the selection of the most convenient extractive phase for each particular type of application. By comparing MSA μ E, using active carbons (ACs) and polystyrene divinylbenzene co-polymers (PS-DVB), with SBSE(PDMS) and SBSE(PU) techniques, the former showed much higher effectiveness for trace analyses in environmental samples.

The development of these new analytical approaches was evaluated through the optimization of systematic parameters that have influence in the analytical process, in order to increase the sensibility and selectivity of these methods, as well as the validation and application to real matrices with recognized relevance.

Abstract

Key-words

PPCPs; Sorptive extraction techniques; SBSE; MSA μ E; Real samples

Glossário de Abreviaturas

μLLE	Micro-extracção Líquido-Líquido (“Liquid-liquid micro-extraction”)
17β-E2	17β-estradiol
19-NOR	19-noretisterona
AμE	Micro-extracção adsortiva (“Adsorptive micro-extraction”)
AC	Carvão activado (“Activated carbon”)
ACA	Ácido acetilsalicílico (“Acetylsalicylic acid”)
ACF	Acetaminofeno
ACN	Acetonitrilo
ADBI	Celestolide
AHMI	Fantolide
AHTN	Tonalide
ANOVA	Análise de variância (Analysis of variance”)
API	Ionização à pressão atmosférica (“Atmospheric pressure ionization”)
BAμE	Micro-extracção adsortiva em barra (“Bar adsorptive micro-extraction”)
BET	Brunauer, Emmet e Teller
CAF	Cafeína
CE	Electroforese capilar (Capillary electrophoresis”)
CI	Ionização química (“Chemical ionization”)
CQB	Centro de Química e Bioquímica
DAD	Detector de rede de díodos (“Diode array detector”)
DBTL	Dilaurato de dibutilestanho (“Dibutyl tin dilaurate”)
DCM	Diclorometano
DES	Dietilstilbestrol
DIC	Diclofenac de sódio
DTG	Termogravimetria diferencial (“Differential thermogravimetric”)
E1	Estrona
E3	Estriol

Glossário de Abreviaturas

EDCs	Químicos desreguladores endócrinos (“Endocrine disrupters chemicals”)
EI	Ionização electrónica (“Electron ionization”)
ENR	Enrofloxacina
ESI	Ionização por “electrospray” (“Electrospray ionisation”)
ETARs	Estações de tratamento de águas residuais
EU	União Europeia (“European Union”)
GC	Cromatografia gasosa (“Gas chromatography”)
GEM	Gemfibrozil
GLC	Cromatografia gás-líquido (“Gas-liquid chromatography”)
HHCB	Galaxolide
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (“High performance liquid chromatography”)
HS	Espaço de cabeça (“Headspace”)
IBU	Ibuprofeno
INCAR	“Instituto Nacional del Carbón”
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
ITD	Analisador armadilha de iões (“Ion trap detector”)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (“International Union of Pure and Applied Chemistry”)
LC	Cromatografia líquida (“Liquid chromatography”)
LD	Dessorção líquida (“Liquid desorption”)
LLE	Extracção líquido-líquido (“Liquid-liquid extraction”)
LOD	Limite de detecção (“Limit of detection”)
LOQ	Limite de quantificação (“Limit of quantification”)
LVI	Injecção grandes volumes (“Large volume injection”)
MALDI	Ionização/dessorção laser em matriz assistida (“Matrix assisted laser desorption/ionisation”)
MDI	4,4’ -difenilmetanodiisocianato (“4,4’ - methylene bisphenyl diisocyanate”)
MEF	Ácido mefenâmico

MeOH	Metanol
MES	Mestranol
MIP	Impressão molecular em polímeros (“Molecular imprinted polymers”)
MK	“Musk” cetona
MS	Espectrometria de massa (“Mass spectrometry”)
MSAμE	Micro-extração adsortiva em multi-esferas (“Multi-spheres adsorptive micro-extraction”)
NAP	Naproxeno
NORG	D-(-)-norgestrel
NSAES	“Norit sae super”
NSAESox	“Norit sae super” oxidado
NSAIDs	Fármacos anti-inflamatórios ácidos não esteróides (“Non-steroidal acidic anti-inflammatory drugs”)
OVAT	Uma variável de cada vez (“One variable at time”)
PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (“Polycyclic aromatic hydrocarbons”)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PPCPs	Produtos farmacêuticos de higiene e cuidado pessoal (“Pharmaceuticals and personal care products”)
PPG	Polipropileno glicol
PROG	Progesterona
PS	Poliestireno
PS-DVB	Poliestireno-divinilbenzeno
PTV	Vaporização a temperatura programada (“Programmable temperature vaporizer”)
PU	Poliuretano
RAM	Material de acesso restrito (“Restricted access material”)
RSD	Desvio padrão relativo (“Relative standard deviation”)
SAM	Método de adição padrão (“Standard addition methodology”)
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação (“Strir bar sorptive extraction”)
SDM	Sulfadimetoxina

Glossário de Abreviaturas

SEM	Microscopia electrónica de varrimento (“Scanning electron microscopy”)
SIM	Monitorização de iões seleccionados (“Selected ion monitoring”)
SMX	Sulfametoxazol
SPE	Extracção em fase sólida (“Solid phase extraction”)
SPME	Micro-extracção em fase sólida (“Solid phase micro-extraction”)
STZ	Sulfatiazol
TCS	Triclosan
TD	Dessorção térmica (“Thermal desorption”)
TMP	Trimetoprim
TMPE	Trimetilpropanol etoxilato
USA	Estados Unidos da América (“United States of America”)
USEPA	Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (“United States Environmental Protection Agency”)
UV	Ultravioleta
vis	Visível

Glossário de Símbolos

λ	Comprimento de onda
α	Selectividade
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
A_{BET}	Área superficial específica determinada pelo método BET, área superficial aparente ou área BET
C_0	Concentração inicial do analito na amostra
C_{aq}	Concentração do soluto na fase aquosa
cm	Centímetro
C_{M}	Concentração de soluto na fase móvel
C_{org}	Concentração do soluto na fase orgânica
C_{PDMS}	Concentração do analito na fase de PDMS
C_{S}	Concentração de soluto na fase estacionária
C_{W}	Concentração do analito na fase aquosa
d	Diâmetro
Da	Dalton
eV	Electrões volt
g	Grama
H	Altura equivalente a um prato teórico
h	Hora
K	Coeficiente de partição
k'	Factor de capacidade
K_{D}	Coeficiente de distribuição
K_{fs}	Constante de distribuição entre o revestimento da fibra e a amostra
K_{OW}	Coeficiente de partição octanol - água

Glossário de Símbolos

$K_{\text{PDMS/W}}$	Coeficiente de partição PDMS - água
$K_{\text{PS-DVB/W}}$	Coeficiente de partição PS-DVB - água
$K_{\text{PU/W}}$	Coeficiente de partição PU - água
kV	Quilovolt
L	Litro
m	Massa
m/m	Razão massa / massa
m/z	Razão massa / carga
m_0	Quantidade de analito inicialmente na amostra
mAU	Miliunidade de absorvância
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m_{PDMS}	Massa do analito na fase de PDMS
m_{W}	Massa do analito na fase aquosa
N	Número de pratos teóricos
n_{ext}	Quantidade de analito extraída pelo revestimento da fibra
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
p	Pressão de equilíbrio
p^0	Pressão de saturação à temperatura a que o ensaio é realizado
pH_{PZC}	pH no ponto de carga zero
r	Coeficiente de correlação
rf	Radiofrequência
rpm	Rotações por minuto
R_s	Resolução
s	Segundo

S/N	Razão sinal / ruído
t_M	Tempo morto
t_R	Tempo de retenção
t_R'	Tempo de retenção ajustado
u_x	Velocidade linear da fase móvel
V	Volt
v	Volume
V_f	Volume do revestimento da fibra
V_M	Volume de soluto na fase móvel
V_{meso}	Volume mesoporoso
V_{micro}	Volume microporoso
V_s	Volume da amostra
V_S	Volume de soluto na fase estacionária
V_{total}	Volume poroso total (volume adsorvido a $p/p^0 = 0,95$)
W	Largura da base do pico
β	Razão de fases entre V _W e V _{PDMS}
μA	MicroAmpére

Glossário de Símbolos

Índice

Agradecimentos	ix
Objectivos	xi
Resumo	xiii
Abstract	xv
Glossário de Abreviaturas	xvii
Glossário de Símbolos	xxi
Índice de Figuras	xxxiii
Índice de Tabelas	xliii

Capítulo 1 Produtos Farmacêuticos de Higiene e Cuidado Pessoal	1
1.1 Introdução.....	3
1.2 Fontes de contaminação.....	4
1.3 Sub-classes de PPCPs.....	6
1.4 Efeitos na saúde humana e nos ecossistemas aquático e terrestres.....	8
1.5 O que são ECDs?.....	11
1.6 Metodologias analíticas para análise de PPCPs.....	14
1.7 Bibliografia.....	16
Capítulo 2 Técnicas Cromatográficas e Hifenadas	21
2.1 Cromatografia.....	23
2.1.1 Aspectos históricos.....	23
2.1.2 Generalidades.....	23
2.1.3 Aspectos teóricos.....	24
2.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	27
2.1.5 Cromatografia gasosa (GC).....	29

Índice

2.2	Espectrometria de massa (MS).....	33
2.2.1	Generalidades.....	33
2.2.2	Ionização.....	35
2.2.3	Analisador de massa.....	38
2.2.4	Detecção.....	40
2.3	Bibliografia.....	41
Capítulo 3 Técnicas de Preparação de Amostras		43
3.1	Introdução.....	45
3.2	Extracção líquido-líquido (LLE).....	46
3.3	Extracção em fase sólida (SPE).....	47
3.4	Técnicas de extracção sortiva.....	49
3.4.1	Micro-extracção em fase sólida (SPME).....	49
3.4.2	Extracção sortiva em barra de agitação (SBSE).....	52
3.5	Bibliografia.....	56
Capítulo 4 Técnicas Emergentes de Preparação de Amostras		59
4.1	Introdução.....	61
4.2	SBSE – Novas estratégias.....	61
4.3	Fases extractivas.....	63
4.3.1	Espumas de poliuretano (PU).....	63
4.3.2	Materiais adsorventes.....	65
4.3.2.1	Carvões activados (ACs).....	66
4.3.2.2	Poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB).....	67
4.4	Bibliografia.....	69
Capítulo 5 Parte Experimental		73
5.1	Material e equipamento.....	75

5.2	Reagentes gerais.....	75
5.3	Padrões e preparação de soluções.....	76
5.3.1	“Musks”.....	76
5.3.2	Anti-sépticos.....	76
5.3.3	NSAIDs e reguladores lipídicos.....	77
5.3.4	Antibióticos.....	77
5.3.5	Hormonas esteróides sexuais.....	78
5.4	Preparação de materiais e micro-dispositivos para extracção.....	78
5.4.1	Espumas de poliuretano (PU).....	78
5.4.2	Micro-extracção adsortiva em barra (BA μ E).....	79
5.4.3	Micro-extracção adsortiva em multi-esferas (MSA μ E).....	79
5.5	Preparação das amostras.....	80
5.6	Processo de extracção / retro-extracção.....	81
5.7	Análise por GC-MS.....	82
5.7.1	Equipamento.....	82
5.7.2	Condições de instrumentais.....	83
5.8	Análise por HPLC-DAD.....	84
5.8.1	Equipamento.....	84
5.8.2	Condições instrumentais.....	84
5.9	Análise por LC-MS.....	85
5.9.1	Equipamento	85
5.9.2	Condições instrumentais.....	86
5.10	Microscopia electrónica de varrimento (SEM).....	87
5.11	Análise textural – Adsorção de azoto a - 196 °C.....	87
5.12	Análise termogravimétrica.....	87
5.13	Bibliografia.....	88

Capítulo 6	Resultados e Discussão	89
6.1	Introdução.....	91
6.2	Parâmetros que influenciam o processo de extracção/retro-extracção.....	91
6.3	“Musks”.....	93
6.3.1	Considerações gerais.....	93
6.3.2	Optimização e validação instrumental.....	94
6.3.3	Optimização da SBSE(PDMS)-LD.....	97
6.3.3.1	Dessorção líquida (LD).....	97
6.3.3.2	SBSE(PDMS).....	99
6.3.4	Validação do método SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS(SIM).....	101
6.3.5	Aplicação do método a amostras reais.....	103
6.4	Anti-sépticos.....	107
6.4.1	Considerações gerais.....	107
6.4.2	Optimização e validação instrumental.....	108
6.4.3	Optimização da SBSE(PDMS)-LD.....	108
6.4.3.1	Dessorção líquida (LD).....	109
6.4.3.2	SBSE(PDMS).....	110
6.4.4	Validação do método SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD.....	111
6.4.5	Aplicação do método a amostras reais.....	112
6.5	NSAIDs e reguladores lipídicos.....	115
6.5.1	Considerações gerais.....	115
6.5.2	Optimização e validação instrumental.....	116
6.5.3	Optimização da SBSE(PDMS)-LD e SBSE(PU)-LD.....	117
6.5.3.1	Dessorção líquida (LD).....	118
6.5.3.2	SBSE(PDMS) e SBSE(PU).....	119
6.5.4	Validação dos métodos SBSE(PDMS ou PU)-LD/HPLC-DAD.....	124
6.5.5	Aplicação dos métodos a amostras reais.....	125
6.6	Acetaminofeno (ACF) e cafeína (CAF).....	128

6.6.1	Considerações gerais.....	128
6.6.2	Optimização e validação instrumental.....	129
6.6.3	Desenvolvimento do método micro-extracção adsortiva em multi-esferas (MSA μ E).....	130
6.6.3.1	Preparação dos micro-dispositivos.....	131
6.6.3.2	Avaliação da robustez e estabilidade dos micro-dispositivos.....	132
6.6.3.3	Caracterização textural.....	133
6.6.3.4	Análise estrutural dos micro-dispositivos.....	134
6.6.4	Optimização da MSA μ E(AC)-LD.....	135
6.6.4.1	Dessorção líquida (LD).....	136
6.6.4.2	MSA μ E(AC).....	139
6.6.5	Análise termogravimétrica.....	145
6.6.6	Validação do método MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD.....	147
6.6.7	Aplicação do método a amostras reais.....	148
6.7	Antibióticos.....	150
6.7.1	Considerações gerais.....	150
6.7.2	Optimização e validação instrumental.....	151
6.7.3	Optimização da MSA μ E(PS-DVB)-LD	154
6.7.3.1	Dessorção líquida (LD).....	155
6.7.3.2	MSA μ E(PS-DVB).....	158
6.7.4	Validação do método MSA μ E(PS-DVB)-LD/LC-ESI/MS	162
6.7.5	Aplicação do método a amostras reais.....	163
6.8	Hormonas esteróides sexuais.....	164
6.8.1	Considerações gerais.....	164
6.8.2	Optimização da MSA μ E(PS-DVB)-LD	166
6.8.2.1	Dessorção líquida (LD).....	166
6.8.2.2	MSA μ E(PS-DVB).....	168
6.8.3	Comparação das técnicas SBSE(PDMS), SBSE(PU) e MSA μ E(PS-DVB)	171

Índice

6.9	Bibliografia.....	173
-----	-------------------	-----

Capítulo 7 Conclusões e Perspectivas Futuras 179

7.1	Conclusões.....	181
-----	-----------------	-----

7.2	Perspectivas Futuras.....	183
-----	---------------------------	-----

Anexos I

A	Espectros de Massa	III
----------	--------------------	-----

A1	“Musks”.....	III
----	--------------	-----

A2	Antibióticos.....	V
----	-------------------	---

B	Espectros UV-vis	IX
----------	------------------	----

C	Limites Analíticos	XIII
----------	--------------------	------

D	Precisão	XV
----------	----------	----

E	Método dos Mínimos Quadrados	XVII
----------	------------------------------	------

E1	“Musks”.....	XIX
----	--------------	-----

E2	Anti-sépticos.....	XIX
----	--------------------	-----

E3	NSAIDs e reguladores lipídicos.....	XX
----	-------------------------------------	----

E4	Acetaminofeno e cafeína.....	XXI
----	------------------------------	-----

E5	Antibióticos.....	XXII
----	-------------------	------

F	Análise de Resíduos	XXIII
----------	---------------------	-------

F1	“Musks”.....	XXIV
----	--------------	------

F2	Anti-sépticos.....	XXIV
----	--------------------	------

F3	NSAIDs e reguladores lipídicos.....	XXV
----	-------------------------------------	-----

F4	Acetaminofeno e cafeína.....	XXVI
----	------------------------------	------

F5	Antibióticos.....	XXVII
----	-------------------	-------

G	Análise da variância, ANOVA (“Analysis Of VAriance”)	XXIX
----------	--	------

G1	“Musks”.....	XXX
----	--------------	-----

G2	Anti-sépticos.....	XXXIV
G3	NSAIDs e reguladores lipídicos.....	XXXV
G4	Acetaminofeno e cafeína.....	XLV
G5	Antibióticos.....	L

Índice

Índice de Figuras

1.1	Principais fontes de introdução e distribuição de PPCPs no meio ambiente...	5
1.2	Proposta de percurso de transformação dos PPCPs.....	6
1.3	Principais parâmetros usados em estudos ecotoxicológicos, expressos em percentagem relativa (dados recolhidos de 94 artigos publicados entre 1996 e 2009).....	9
1.4	Sistema endócrino humano. Representação das glândulas endócrinas do homem e da mulher.....	13
1.5	Mecanismos de desregulação endócrina. Ligação receptor-hormona da qual resulta uma resposta exacta (a). Ligação EDC-receptor hormonal no qual resulta o bloqueio do sinal que seria esperado pela hormona – “efeito antagonista” (b). Ligação EDC-receptor hormonal na qual resulta o envio de um sinal superior ou inferior ao esperado e/ou fora de tempo – “efeito agonista” (c e d).....	14
2.1	Classificação dos métodos cromatográficos (abreviaturas dos termos anglo-saxónicos universalmente utilizados).....	24
2.2	Ilustração representativa do t_M , t_R e t_R' num cromatograma.....	25
2.3	Esquema simplificado de um sistema de HPLC convencional.....	28
2.4	Esquema simplificado de um cromatógrafo gasoso convencional (figura adaptada).....	30
2.5	Estrutura química geral de uma fase estacionária à base de polisiloxano.....	32
2.6	Diagrama simplificado dos principais componentes de um espectrómetro de massa.....	34
2.7	Representação esquemática simplificada do processo ESI.....	36
2.8	Esquema simplificado de ESI/MS.....	37
2.9	Representação esquemática simplificada (a) e imagem (b) de um quadrupolo.....	38

Índice de Figuras

2.10	Representação esquemática simplificada (a) e imagem (b) de um ITD.....	40
3.1	Processo de extracção e de dessorção no processo de SPME-GC, após amostragem por HS.....	50
3.2	Imagem da SBSE durante o processo de extracção (a) e representação esquemática da barra de agitação usada (b).....	53
3.3	Comparação da eficiência extractiva por SPME (PDMS: 0,5 µL) e SBSE (PDMS: 47 µL) em função $\log K_{OW}$, em idênticas condições experimentais...	55
4.1	Reacção genérica para a formação do grupo uretano.....	64
4.2	Estrutura química genérica do copolímero PS-DVB.....	67
5.1	Fotografia ilustrativa da barra de “teflon” revestida com o PU sintetizado.....	79
5.2	Representação esquemática e fotografia da barra de micro-extracção (a e b) e das multi-esferas de micro-extracção (c e d). 1 – barra de polipropileno; 2 – fase extractiva; 3 – esferas de poliestireno; 4 – linha.	80
5.3	Ilustração genérica do processo de pré-concentração dos analitos.....	82
5.4	Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrómetro de massa, Agilent Technologies. Legenda: 1 – cromatógrafo gasoso; 2 – amostrador automático; 3 – torre de injeção; 4 – detector selectivo de massa; 5 – computador com “software”.....	83
5.5	Cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series (Agilent Technologies). Legenda: 1 – desgaseificador; 2 – bomba quaternária; 3 – amostrador; 4 – coluna e termostato; 5 – detector de rede de díodos; computador com “software”.....	84
5.6	Cromatógrafo líquido (Waters) e espectrómetro de massa (Esquire 3000 Bruker).....	86
6.1	Influência da velocidade de fluxo (a) e da temperatura inicial do injector (b) na abundância dos quatro “musks” estudados por LVI-GC-MS(SIM).....	96
6.2	Efeito do tempo de LD na recuperação dos “musks” estudados por SBSE-LD/LVI-GC-MS(SIM) (extracção - 1 h (1000 rpm); retro-extracção sob tratamento ultrasónico em <i>n</i> -hexano).....	98

6.3	Efeito do pH (a), velocidade de agitação (b), tempo de extracção (c) e % de MeOH (d) na recuperação dos “musks” estudados por SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS(SIM) (retro-extracção em <i>n</i> -hexano (30 min) sob tratamento ultrasónico).....	100
6.4	Recuperação experimental e curva teórica para os quatro “musks” estudados por SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS (SIM), em condições experimentais optimizadas.....	101
6.5	Fragmentogramas obtidos para os ensaios realizados em água ultra-pura fortificada a 200 ng/L (a), residual (b), mar (c), água de abastecimento (d) e superficial (e), por SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais optimizadas.....	104
6.6	Comparação das recuperações obtidas em água ultra-pura, superficial, mar, rede pública e residual para um nível de fortificação de 200 ng/L por SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais optimizadas.....	105
6.7	Estrutura química do TCS.....	107
6.8	Efeito do solvente (a) e do tempo (b) de LD na recuperação do TCS por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD (extracção – 1 h (750 rpm).....	109
6.9	Efeito da velocidade de agitação (a), tempo de extracção (b), da adição de MeOH (c) e NaCl (d) na recuperação do TCS por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD (retro-extracção em ACN sob tratamento ultrasónico (15 min)).....	111
6.10	Perfis cromatográficos obtidos para os ensaios realizados em solução pasta de dentes comercial (a), saliva após a lavagem dos dentes com pasta de dentes comercial (b), saliva 12h após a lavagem dos dentes (c) e água residual (ETAR 1) (d), por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas.....	113
6.11	Comparação das recuperações médias de TCS obtidas em água ultra-pura, residual, saliva e solução de pasta de dentes comercial para um nível de fortificação de 10 µg/L por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas.....	115

Índice de Figuras

6.12	Efeito do solvente (a) e do tempo (b) de LD na recuperação dos fármacos acídicos estudados por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido por LD/HPLC-DAD (extracção - 1 h (750 rpm); pH - 2,0).....	118
6.13	Efeito do pH na recuperação dos fármacos acídicos estudados por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido de LD/HPLC-DAD (extracção - 1 h (750 rpm); retro-extracção sob tratamento ultrasónico durante 30 min para o PDMS e 15 min para o PU, em ACN).....	119
6.14	Efeito do tempo de extracção (a), modificador orgânico (b) e força iónica (c) na recuperação dos fármacos acídicos estudados por SBSE (PDMS) (extracção - 4 h(1000 rpm); pH - 2,0; retro-extracção (30 min) sob tratamento ultrasónico com ACN) e SBSE (PU) (extracção - 6 h (1250 rpm); pH - 2,0; retro-extracção (15 min) sob tratamento ultrasónico com ACN) seguido por LD/HPLC-DAD.....	121
6.15	Recuperação experimental e curva teórica para os fármacos acídicos estudados por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas.....	122
6.16	Perfis cromatográficos obtidos de uma mistura padrão (10 µg/L) contendo os seis fármacos acídicos após ensaios realizados por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido de LD/HPLC-DAD em água ultra-pura, bem como o respectivo controlo (a) e água superficial fortificada para um nível de concentração 24,0 µg/L (b), sob condições experimentais optimizadas.....	126
6.17	Representação esquemática e imagem do processo MSAµE.....	131
6.18	Curva termogravimétrica das esferas de PS.....	132
6.19	Imagens SEM da esfera de PS com uma ampliação de 35 x e 1000 x, sem fase extractiva (a), coberta com AC (b) ou PS-DVB (c).....	135
6.20	Efeito do solvente de LD na recuperação do ACF e CAF por MSAµE(AC)-LD/HPLC-DAD (extracção - 3 h (1000 rpm); retro-extracção (45 min) sob tratamento ultrasónico).....	136

6.21	Efeito do processo de lavagem do micro-dispositivo na recuperação do ACF e CAF por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD (extracção – 17 h (1000 rpm); retro-extracção em ácido fórmico (45 min) sob tratamento ultrasónico; lavagem com MeOH (a); lavagem em ultrasons durante 20 min (b)).....	137
6.22	Imagens SEM da esfera de PS cobertas com AC sem lavagem(a), após a lavagem na placa de agitação (b) e após lavagem em ultrasons (c) (ampliação 1000 \times).....	138
6.23	Efeito do tempo (a) e do solvente da LD (b) na recuperação do ACF e CAF por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD e MSA μ E(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD, respectivamente (extracção – 17 h (1000 rpm); retro-extracção sob tratamento ultrasónico).....	139
6.24	Efeito do pH na recuperação do ACF e CAF por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD, usando o AC Ridel, NSAES e NSAESox (extracção - 17 h (1000 rpm); retro-extracção em ácido fórmico (30 min), sob tratamento ultrasónico).....	140
6.25	Efeito da massa em AC (a), tempo de extracção (b), modificador orgânico (c) e força iónica (d) na recuperação do ACF e da CAF por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em ácido fórmico (30 min), sob tratamento ultrasónico; 2,1 mg de AC(Ridel)).....	142
6.26	Comparação as recuperações obtidas para o ACF e CAF pelas técnicas MSA μ E e BA μ E, seguido de LD-HPLC/DAD.....	143
6.27	Comparação da recuperação de ACF e CAF obtida após vários ensaios de reutilização do micro-dispositivo (a) e após o armazenamento do micro-dispositivo durante vários dias, com os analitos adsorvidos no AC (b) (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em ácido fórmico (30 min), sob tratamento ultrasónico; 2,1 mg de AC(Ridel)).....	144
6.28	Comparação da recuperação de ACF e CAF obtida antes e após os micro-dispositivos serem mergulhados em diferentes meios durante 48 h (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em ácido fórmico (30 min), sob tratamento ultrasónico; 2,1 mg de AC(Ridel)).....	144
6.29	DTG das esferas de PS, das esferas após serem submetidas a uma temperatura de 160 °C, do AC(Ridel) e dos micro-dispositivos preparados com o AC(Ridel) (a e b diferem na escala de DTG (% min)).....	145

Índice de Figuras

6.30	DTG dos micro-dispositivos depois da adsorção do ACF e da CAF para uma concentração de 10 µg/L.....	146
6.31	DTG do AC antes e depois da adsorção do ACF e da CAF para uma concentração de 120 mg/L.....	146
6.32	Perfis cromatográficos obtidos para o controlo (a) e ensaios realizados em água ultra-pura (b), superficial (c), mar (d) e residual (d), por MSAµE(AC)-LD/HPLC-DAD, para um nível de fortificação de 10 µg/L sob condições experimentais optimizadas.....	149
6.33	Estrutura química geral das sulfonamidas.....	152
6.34	Traçado de corrente iónica, com extracção dos iões precursores, de uma solução padrão conjunta em antibióticos (100 µg/L) analisada por LC-ESI/MS.....	154
6.35	Efeito do solvente e da fase extractiva na recuperação dos cinco antibióticos estudados por MSAµE-LD/HPLC-DAD (extracção - 15 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção (30 min) sob tratamento ultrasónico).....	155
6.36	Influência de vários ACs na recuperação dos antibióticos estudados por MSAµE-LD/HPLC-DAD (extracção - 15 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH (30 min) sob tratamento ultrasónico).....	156
6.37	Efeito do tempo de LD (a) e do volume de solvente (b) na recuperação dos antibióticos estudados por MSAµE (PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH para as sulfonamidas e ácido fórmico para o TMP e ENR, sob tratamento ultrasónico).....	157
6.38	Optimização da quantidade de PS-DVB necessária para a extracção (a) e efeito do pH (b) na recuperação dos antibióticos estudados por MSAµE(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm); retro-extracção em MeOH (45 min) para as sulfonamidas e ácido fórmico (30 min) para o TMP e ENR, sob tratamento ultrasónico).....	159
6.39	Efeito do tempo de extracção na recuperação dos antibióticos estudados por MSAµE(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (sulfonamidas: (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH (45 min); TMP e ENR: (1000 rpm, pH 4,0); retro-extracção em ácido fórmico (30 min), 2,6 mg PS-DVB).....	160

6.40	Efeito de MeOH (a) e NaCl (b) na recuperação dos antibióticos estudados por MSA μ E(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (sulfonamidas: extracção – 17,0 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH (45 min); TMP e ENR: extracção – 6,0 h (1000 rpm, pH 4,0); retro-extracção em ácido fórmico (30 min), 2,6 mg PS-DVB).....	160
6.41	Comparação da recuperação das sulfonamidas obtida após vários ensaios de reutilização do micro-dispositivo (a) antes e após os micro-dispositivos serem mergulhados em quatro solventes diferentes durante 48h (b).....	161
6.42	Efeito do solvente e do material de extracção na recuperação das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção (30 min) sob tratamento ultrasónico).....	166
6.43	Efeito da fase extractiva na recuperação das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH (30 min) sob tratamento ultrasónico).....	167
6.44	Efeito do tempo de LD (a) e do volume de solvente (b) na recuperação das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E (PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH, sob tratamento ultrasónico).....	168
6.45	Optimização da quantidade de PS-DVB necessária para a extracção das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E (PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH (15 min), sob tratamento ultrasónico).....	169
6.46	Efeito do pH na recuperação das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, 2,6 mg PS-DVB); retro-extracção em MeOH (15 min), sob tratamento ultrasónico).....	169
6.47	Efeito do tempo de extracção na recuperação das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E (PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção - 1000 rpm, 2,6 mg PS-DVB, pH 7,0; retro-extracção em MeOH (15 min), sob tratamento ultrasónico).....	170
6.48	Efeito do modificador orgânico (a) e força iónica (b) na recuperação das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção – 17 h (1000 rpm, pH 7,0, 2,6 mg PS-DVB); retro-extracção em MeOH (15 min), sob tratamento ultrasónico).....	170

Índice de Figuras

6.49	Recuperações experimentais obtidas para cada hormona esteróide estudada pelas técnicas SBSE(PDMS), SBSE(PU) e MSA μ E(PS-DVB), sob as condições experimentais apresentadas na tabela 6.27.....	172
A.1	Espectro de massa obtido em modo de varrimento contínuo para o ADBI.....	III
A.2	Espectro de massa obtido em modo de varrimento contínuo para o HHCB...	III
A.3	Espectro de massa obtido em modo de varrimento contínuo para o AHTN...	IV
A.4	Espectro de massa obtido em modo de varrimento contínuo para o MK.....	IV
A.5	Espectro de massa e espectros de massa tandem obtidos em modo de varrimento contínuo para o STZ.....	V
A.6	Espectro de massa e espectros de massa tandem obtidos em modo de varrimento contínuo para o SMX.....	V
A.7	Espectro de massa e espectros de massa tandem obtidos em modo de varrimento contínuo para o SDM.....	VI
A.8	Espectro de massa e espectros de massa tandem obtidos em modo de varrimento contínuo para o TMP.....	VI
A.9	Espectro de massa e espectros de massa tandem obtidos em modo de varrimento contínuo para o ENR.....	VII
B.1	Espectro UV-vis obtido experimentalmente para o TCS.....	IX
B.2	Espectros UV-vis obtidos experimentalmente para os fármacos ácidos.....	IX
B.3	Espectros UV-vis obtidos experimentalmente para o ACF e CAF.....	X
B.4	Espectros UV-vis obtidos experimentalmente para os antibióticos estudados.....	X
B.5	Espectros UV-vis obtidos experimentalmente para as hormonas esteróides sexuais estudadas.....	XI

E.1	Curvas de calibração para os “musks” estudados obtidas por SBSE(PDMS)-LD/GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.....	XIX
E.2	Curva de calibração para o TCS obtida por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.....	XIX
E.3	Curvas de calibração para os NSAIDs e regulador lipídico obtidas por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas....	XX
E.4	Curvas de calibração para os NSAIDs e regulador lipídico obtidas por SBSE(PU)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.....	XXI
E.5	Curvas de calibração para o ACF e CAF obtidas por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.....	XXI
E.6	Curvas de calibração para os antibióticos estudados obtidas por MSA μ E(PS-DVB))-LD/HPLC-MS/MS, sob condições experimentais otimizadas.....	XXII
F.1	Análise de resíduos da gama linear dinâmica estudada para os “musks”, sob condições experimentais otimizadas.....	XXIV
F.2	Análise de resíduos da gama linear dinâmica estudada para o TCS, sob condições experimentais otimizadas.....	XXIV
F.3	Análise de resíduos da gama linear dinâmica estudada para os NSAIDs e regulador lipídico utilizando como fase extractiva o PDMS, sob condições experimentais otimizadas.....	XXV
F.4	Análise de resíduos da gama linear dinâmica estudada para os NSAIDs e regulador lipídico usando como fase extractiva o PU, sob condições experimentais otimizadas.....	XXVI
F.5	Análise de resíduos da gama linear dinâmica estudada para o ACF e CAF, sob condições experimentais otimizadas.....	XXVI
F.6	Análise de resíduos da gama linear dinâmica estudada para os antibióticos, sob condições experimentais otimizadas.....	XXVII

Índice de Figuras

Índice de Tabelas

1.1	Exemplo da estrutura química de PPCPs.....	7
2.1	Detectores vulgarmente utilizados em GC.....	33
4.1	Exemplos de resinas constituídas por PS-DVB disponíveis comercialmente.....	68
5.1	Condições experimentais usadas para a análise de cada classe de analitos estudados por HPLC-DAD.....	85
5.2	Condições de análise por LC-MS para os antibióticos.....	86
6.1	Estruturas químicas e log K_{OW} para os “musks” estudados.....	94
6.2	Tempos de retenção (t_R) e valores de m/z característicos para cada “musk”, nas condições instrumentais optimizadas.....	95
6.3	Gama linear dinâmica, coeficiente de correlação (r), LODs, LOQs e precisão instrumental obtidos por LVI-GC-MS(SIM) para os “musks” estudados, sob condições instrumentais optimizadas.....	97
6.4	Recuperação teórica e experimental, LOD, LOQ, gama linear dinâmica e coeficiente de correlação (r) obtidos para os “musks” estudados por SBSE(PDMS)-LD/GC-MS(SIM) sob condições experimentais optimizadas.....	102
6.5	Estudo de precisão do método SBSE(PDMS)-LD/GC-MS(SIM), para três níveis de concentração ($n = 6$).....	102
6.6	Concentração (C_0 , ng/L) e coeficiente de correlação (r) obtidos pelo SAM para os quatro “musks” estudados em água superficial, mar, residual e rede de abastecimento pelo método SBSE(PDMS-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais optimizadas.....	106
6.7	Estudo de precisão do método SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, para três níveis de concentração ($n = 6$) em TCS.....	112

Índice de Tabelas

6.8	Coeficiente de correlação (r) e concentrações (C_0) obtidos pelo SAM para o TCS em diferentes matrizes com recurso a SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas.....	112
6.9	Estrutura química, $\log K_{OW}$ e pK_a para cada NSAIDs e regulador lipídico estudado.....	116
6.10	Gama linear dinâmica, coeficiente de correlação (r), LODs, LOQs e precisão instrumental obtidos por HPLC-DAD para os fármacos ácidos estudados sob condições experimentais optimizadas.....	117
6.11	Recuperação e coeficiente de partição (K) médio estimado para os seis fármacos ácidos estudados por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido de LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas.....	123
6.12	LODs, LOQs, gama linear dinâmica e coeficiente de correlação (r) obtidos para os seis fármacos ácidos estudados por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido de LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas.....	124
6.13	Estudo de precisão do método SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido de LD/HPLC-DAD, para três níveis de concentração ($n = 6$).....	125
6.14	Coeficiente de correlação (r) e % de recuperação obtida para os seis fármacos ácidos estudados em água residual, superficial e do mar pelo SAM, por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguida de LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas.....	127
6.15	Estrutura química, $\log K_{OW}$ e pK_a para o ACF e CAF.....	129
6.16	Caracterização textural do material sólido suportado nos micro-dispositivos e em pó.....	134
6.17	Caracterização textural dos ACs utilizados por MSA μ E.....	141
6.18	Estudo de precisão do método MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD, para três níveis de concentração ($n = 6$), sob condições experimentais optimizadas.....	147

6.19	Coeficiente de correlação (r) e % de recuperação para o ACF e CAF em água residual, superficial e do mar pelo SAM, por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.....	148
6.20	Estrutura química, log K_{OW} e pKa para cada antibiótico estudado.....	151
6.21	lão precursor e iões produto seleccionados para a monitorização dos antibióticos estudados.....	153
6.22	Gama linear dinâmica, coeficiente de correlação (r), LODs e LOQs obtidos por LC-ESI/MS sob condições seleccionadas para os antibiótiocs estudados.....	154
6.23	LOD, LOQ, gama linear dinâmica e coeficiente de correlação (r) obtidos para os antibióticos estudados por MSA μ E(PS-DVB)-LD/LC-ESI/MS sob condições experimentais otimizadas.....	162
6.24	Estudo de precisão do método MSA μ E(PS-DVB)-LD/LC-ESI/MS, para três níveis de concentração (n = 6).....	163
6.25	Coeficientes de correlação (r) e % de recuperação obtida para os antibióticos estudados em água superficial e de aquacultura por SAM, por MSA μ E(PS-DVB)-LD/LC-ESI/MS, sob condições experimentais otimizadas.....	164
6.26	Estrutura química e log K_{OW} para cada hormona esteróide sexual estudada.....	165
6.27	Comparação das condições experimentais obtidas para as técnicas SBSE(PDMS), SBSE(PU) e MSA μ E(PS-DVB), na análise de hormonas esteróides sexuais.....	171
G.1	Tabela ANOVA para o ADBI, no estudo de efeitos de matriz.....	XXX
G.2	Teste de comparações múltiplas Tukey para o ADBI, no estudo de efeitos de matriz	XXX
G.3	Tabela ANOVA para o HHCB, no estudo de efeitos de matriz.....	XXXI

Índice de Tabelas

G.4	Teste de comparações múltiplas Tukey para o HHCB, no estudo de efeitos de matriz.....	XXXI
G.5	Tabela ANOVA para o AHTN, no estudo de efeitos de matriz.....	XXXII
G.6	Teste de comparações múltiplas Tukey para o AHTN, no estudo de efeitos de matriz.....	XXXII
G.7	Tabela ANOVA para o MK, no estudo de efeitos de matriz.....	XXXIII
G.8	Teste de comparações múltiplas Tukey para o MK, no estudo de efeitos de matriz.....	XXXIII
G.9	Tabela ANOVA para o TCS, no estudo de efeitos de matriz.....	XXXIV
G.10	Teste de comparações múltiplas Tukey para o TCS, no estudo de efeitos de matriz.....	XXXIV
G.11	Tabela ANOVA para o ACA, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.....	XXXV
G.12	Teste de comparações múltiplas Tukey para o ACA, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.....	XXXV
G.13	Tabela ANOVA para o NAP, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.....	XXXVI
G.14	Teste de comparações múltiplas Tukey para o NAP, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.....	XXXVI
G.15	Tabela ANOVA para o NAP, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.....	XXXVII
G.16	Teste de comparações múltiplas Tukey para o NAP, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.....	XXXVII
G.17	Tabela ANOVA para o DIC, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.....	XXXVII
G.18	Tabela ANOVA para o DIC, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.....	XXXVIII

G.19	Teste de comparações múltiplas Tukey para o DIC, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.....	XXXVIII
G.20	Tabela ANOVA para o IBU, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.....	XXXIX
G.21	Teste de comparações múltiplas Tukey para o IBU, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.....	XXXIX
G.22	Tabela ANOVA para o IBU, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.....	XL
G.23	Teste de comparações múltiplas Tukey para o IBU, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.....	XL
G.24	Tabela ANOVA para o MEF, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.....	XLI
G.25	Teste de comparações múltiplas Tukey para o MEF, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.....	XLI
G.26	Tabela ANOVA para o MEF, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.....	XLII
G.27	Teste de comparações múltiplas Tukey para o MEF, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.....	XLII
G.28	Tabela ANOVA para o GEM, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.....	XLIII
G.29	Teste de comparações múltiplas Tukey para o GEM, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.....	XLIII
G.30	Tabela ANOVA para o GEM, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.....	XLIV
G.31	Teste de comparações múltiplas Tukey para o GEM, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.....	XLIV
G.32	Tabela ANOVA para o ACF, no estudo de reutilização dos micro-dispositivos.....	XLV

Índice de Tabelas

G.33	Tabela ANOVA para a CAF, no estudo de reutilização dos micro-dispositivos.....	XLV
G.34	Tabela ANOVA obtida no estudo do tempo de armazenamento do ACF nos micro-dispositivos.....	XLV
G.35	Tabela ANOVA obtida no estudo do tempo de armazenamento da CAF nos micro-dispositivos.....	XLV
G.36	Tabela ANOVA obtida no estudo da recuperação do ACF após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.....	XLVI
G.37	Teste de comparações múltiplas Tukey obtida no estudo da recuperação do ACF após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.....	XLVI
G.38	Tabela ANOVA obtida no estudo da recuperação da CAF após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.....	XLVII
G.39	Tabela ANOVA obtida no estudo de comparação da recuperação do ACF pelas técnicas MSA μ E e BA μ E.....	XLVII
G.40	Tabela ANOVA obtida no estudo de comparação da recuperação da CAF pelas técnicas MSA μ E e BA μ E.....	XLVII
G.41	Tabela ANOVA para o ACF, no estudo de efeitos de matriz.....	XLVII
G.42	Teste de comparações múltiplas Tukey para o ACF, no estudo de efeitos de matriz.....	XLVIII
G.43	Tabela ANOVA para a CAF, no estudo de efeitos de matriz.....	XLVIII
G.44	Teste de comparações múltiplas Tukey para a CAF, no estudo de efeitos de matriz.....	XLIX
G.45	Tabela ANOVA para o STZ, no estudo de reutilização dos micro-dispositivos.....	L
G.46	Tabela ANOVA para o SMX, no estudo de reutilização dos micro-dispositivos.....	L

G.47	Tabela ANOVA para o SDM, no estudo de reutilização dos micro-dispositivos.....	L
G.48	Tabela ANOVA obtida no estudo da recuperação do STZ após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.....	L
G.49	Teste de comparações múltiplas Tukey obtida no estudo da recuperação do STZ após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.....	LI
G.50	Tabela ANOVA obtida no estudo da recuperação do SMX após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.....	LI
G.51	Teste de comparações múltiplas Tukey obtida no estudo da recuperação do SMX após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.....	LII
G.52	Tabela ANOVA obtida no estudo da recuperação do SDM após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.....	LII
G.53	Teste de comparações múltiplas Tukey obtida no estudo da recuperação do SDM após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.....	LIII

Índice de Tabelas

Capítulo 1

Produtos Farmacêuticos de Higiene e Cuidado Pessoal

1.1 Introdução

A avaliação da qualidade do ambiente é hoje em dia dos mais relevantes tópicos de estudo em química analítica. Durante os últimos anos, o significativo conhecimento relativo à contaminação do ambiente por substâncias químicas, levou a sociedade a acentuar o interesse por novos poluentes emergentes ainda não regulamentados, que podem afectar a saúde e o bem-estar de uma comunidade de diversas formas. Estes poluentes emergentes podem ser candidatos a futuras regulamentações, estando apenas dependentes dos resultados das pesquisas relacionadas com os potenciais efeitos destes na saúde e com os dados de monitorização da respectiva ocorrência no meio ambiente. Um grupo diversificado de substâncias químicas bioactivas que tem recebido alguma atenção, como potenciais poluentes ambientais, é o grupo dos produtos farmacêuticos, de higiene e cuidado pessoal (PPCPs).

Embora já se tenha conhecimento da existência de PPCPs no ambiente aquático há cerca de trinta anos^{1,2,3}, a presença destes compostos em matrizes ambientais só despertou o interesse da comunidade científica na segunda metade dos anos noventa, inicialmente em 1998 por Ternes⁴ e mais tarde por Daughton e Ternes⁵. Neste sentido, a ocorrência de PPCPs em matrizes ambientais não é uma constatação recente, tendo-se tornado mais evidente na última década devido, principalmente à grande evolução das metodologias analíticas permitindo e/ou facilitando a detecção de baixas concentrações destes compostos. Nos últimos anos, estudos efectuados em diversos países da Europa e no continente Americano, evidenciaram a presença de mais de oitenta PPCPs diferentes em matrizes ambientais como efluentes, águas superficiais e subterrâneas, embora menos frequentemente em água de abastecimento^{3,6,7}.

As entidades oficiais têm demonstrado preocupação sobre esta classe de poluentes, traduzida no apoio a projectos que avaliem a extensão deste problema. Bons exemplos são o relatório desenvolvido por cientistas da Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), do “Institute for Water Research & Water Technology” (Alemanha)⁵, bem como do projecto POSEIDON financiado pelo “5th (EU) RTD Framework Programme” (1998-2002)⁸. A avaliação da extensão da contaminação por PPCPs tem, nos últimos anos, sido alvo de grande atenção por parte da comunidade científica, resultando num considerável número de publicações científicas⁹⁻¹³. Por outro lado, têm igualmente começado a surgir diversos livros que procuram reunir informação sobre a ocorrência, análise e remoção destes contaminantes do ambiente^{3,6}.

1.2 Fontes de contaminação

Anualmente, são produzidas diversas toneladas de fármacos em todo o mundo. Quando ministrados no Homem, estas substâncias são directamente absorvidas pelo organismo e sujeitas a diversas reacções metabólicas, sendo no entanto, uma quantidade significativa dessas substâncias originais e correspondentes metabolitos, excretados por via urinária e fecal, eliminadas como consequência pelos esgotos domésticos. A elevada polaridade e a baixa biodegradabilidade destes compostos conduz a uma ineficiente remoção nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs), contaminando assim as águas superficiais e subterrâneas, fonte usual de água destinada ao consumo humano. A USEPA já anunciou que as ETARs não estão preparadas para a remoção desta classe de compostos⁷.

Outra potencial fonte de contaminação ambiental, resulta da disposição de resíduos provenientes das indústrias farmacêuticas em aterros sanitários ou da deposição inapropriada dos medicamentos que estão fora do prazo de validade nos esgotos domésticos. As águas residuais hospitalares contribuem igualmente para a contaminação ambiental com esta classe de compostos¹³.

Os produtos de higiene e cuidado pessoal surgem como contaminantes ambientais, essencialmente, através das descargas de esgotos domésticos e industriais^{14,15} e diferem dos produtos farmacêuticos na medida em que, grandes quantidades podem ser introduzidas no meio ambiente, uma vez ainda não existir qualquer tipo de recomendação relativamente aos mesmos.

Na agricultura, a aplicação de estrumes fertilizantes com origem animal, previamente medicados, assim como de lamas de ETARs, podem igualmente contaminar as águas naturais, nomeadamente, subterrâneas e superficiais. Alguns PPCPs podem ainda ficar retidos nos solos, nos sedimentos ou ainda em partículas sólidas suspensas no ambiente aquático, havendo assim contaminação de amostras ambientais sólidas. Por outro lado, fármacos usados como promotores de crescimento na produção de gado bovino, ovino, caprino e avícola, bem como intensivamente usados como aditivo alimentar em aquacultura, podem igualmente ser potenciais fontes de contaminação ambiental¹³.

A figura 1.1 representa um esquema simplificado das principais fontes de introdução e distribuição de PPCPs no meio ambiente, quer por uso humano quer veterinário.

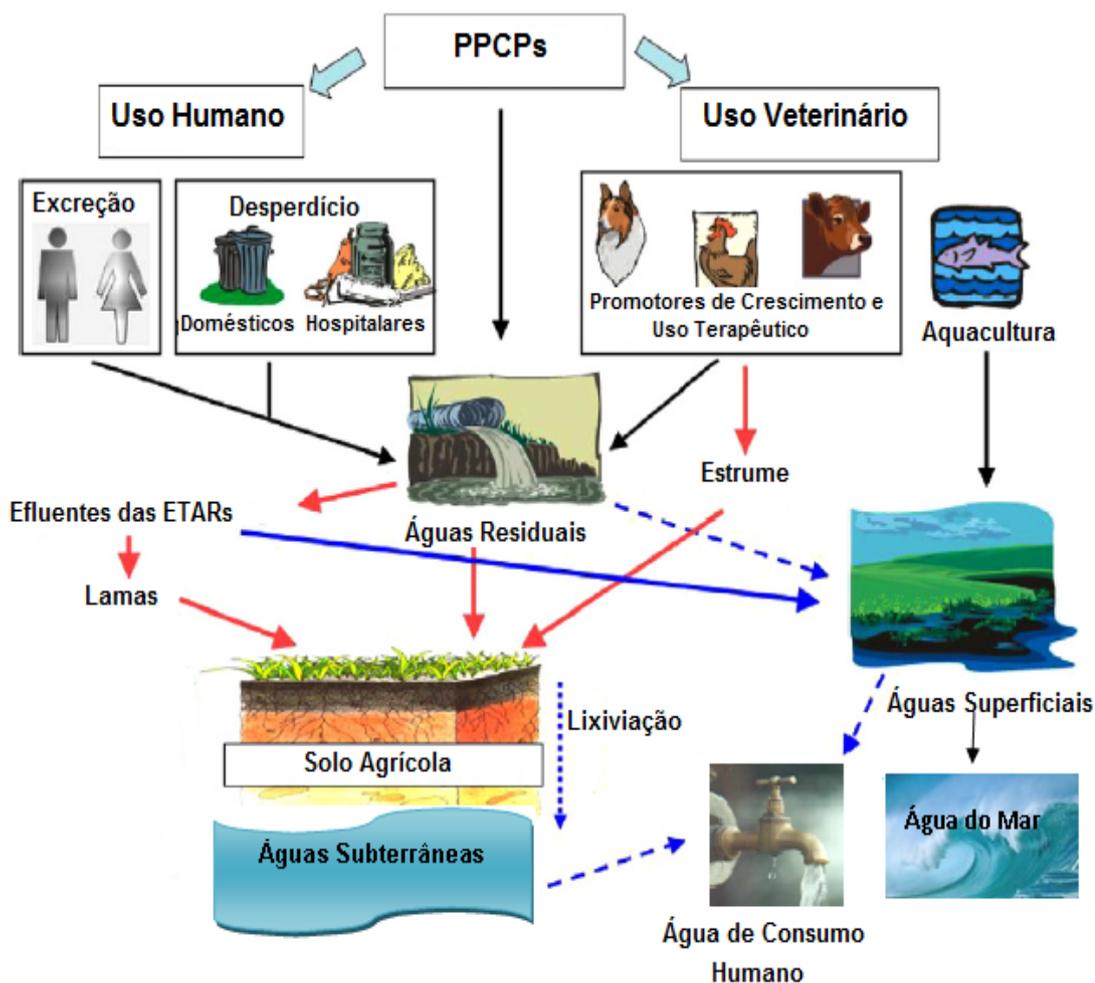


Figura 1.1 – Principais fontes de introdução e distribuição de PPCPs no meio ambiente¹⁶.

Embora alguns dos PPCPs sejam excretados sob a forma de compostos conjugados, diversos microrganismos possuem a capacidade de reactivar estes compostos, através de mecanismos de clivagem da sua forma conjugada, libertando estes compostos na forma livre no meio ambiente.

Uma vez presentes no ambiente, os PPCPs e respectivos metabolitos podem ainda sofrer degradação físico-química e biotransformação (figura 1.2), apesar deste tipo de compostos serem concebidos para possuir resistência microbiana e estabilidade química¹³. Alguns metabolitos e produtos resultantes da degradação dos PPCPs ainda pouco conhecidos podem, no entanto, ser mais tóxicos do que os compostos originais.

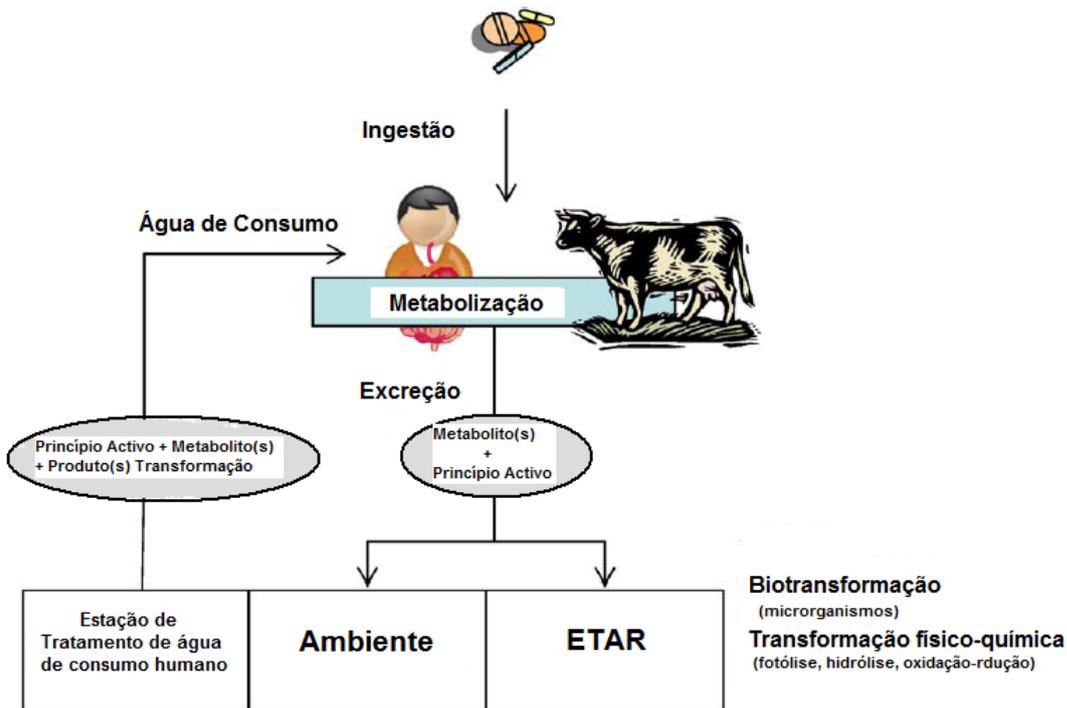


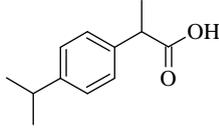
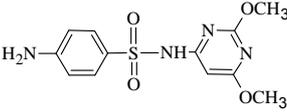
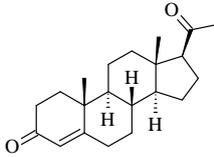
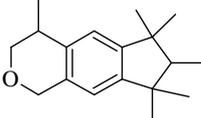
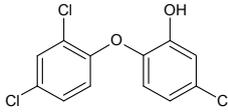
Figura 1.2 – Proposta de percurso de transformação dos PPCPs¹³.

1.3 Sub-classes de PPCPs

Nos últimos anos, a ocorrência de diversos tipos de PPCPs no meio ambiente tem sido alvo de diversos estudos em diferentes países. Os valores diferem de país para país, uma vez que a percentagem de venda de cada PPCP, bem como o processo de tratamento de águas residuais utilizado nas respectivas ETARs ser diferente. As zonas que têm demonstrado maior contaminação são as áreas urbanas, uma vez que é nestas que estão instalados os hospitais. No entanto, as zonas rurais também têm merecido alguma atenção devido às práticas agrícolas, assim como por possuírem terrenos destinados à pastagem do gado.

Os PPCPs podem ser classificados de acordo com o objectivo de utilização e respectiva actividade biológica. Abrangem um grupo bastante diversificado de compostos, de uso interno ou externo, tanto de aplicação veterinária como humana, podendo ser divididos em antibióticos, hormonas, anti-inflamatórios acídicos não esteróides (NSAIDs), reguladores lipídicos, agentes utilizados em diagnósticos (meios de contraste para raios-X), antidepressivos, estimulantes, muitos deles não prescritos, e até mesmo produtos químicos de utilização diária, como por exemplo cosméticos, excipientes, essências, “musks”, desinfetantes, entre outros. A tabela 1.1 exemplifica a estrutura química de alguns PPCPs.

Tabela 1.1 – Exemplo da estrutura química de PPCPs.

Classe	Nome	Estrutura química
NSAIDs	Ibuprofeno	
Antibióticos	Sulfadimetoxina	
Hormonas	Progesterona	
“Musks”	Galaxolide	
Anti-sépticos	Triclosan	

NSAIDs, como por exemplo ácido acetilsalicílico, naproxeno, diclofenac e ibuprofeno, são a classe de PPCPs mais frequentemente mencionada como contaminante ambiental, surgindo muitas vezes acima dos $\mu\text{g/L}^3$. Estes fármacos são vulgarmente usados para alívio de sintomas gripais, artrite, gota entre outros, podendo a prescrição anual atingir as centenas de toneladas.

Os reguladores lipídicos, são drogas que regulam o metabolismo lipídico e que são frequentemente prescritas para diminuir a concentração de colesterol e triglicéridos no sangue. Os fibratos são os reguladores lipídicos que surgem mais frequentemente no ambiente¹⁷.

As hormonas controlam diversas funções do corpo humano, de modo a manter todo o organismo em equilíbrio, principalmente quando sujeito a factores externos adversos. A resposta do sistema hormonal a estas perturbações é efectuada por glândulas específicas, as quais produzem e libertam as hormonas para o fluxo sanguíneo por células especializadas. Essas glândulas não só as produzem, mas também as armazenam, esperando por um sinal apropriado para a sua libertação. As hormonas esteróides podem ser divididas em hormonas naturais ou sintéticas. As hormonas naturais incluem as

hormonas sexuais (estrógenos, progesterona e testosterona) e fitoestrógenos. Por outro lado, as hormonas sintéticas incluem por exemplo o contraceptivo 17 α -etinilestradiol³. Os estrógenos sintéticos são usados como contraceptivos, no tratamento de certos cancros e desordem hormonal comum da menopausa, contribuindo assim indirectamente para o aumento das contaminações ambientais.

Antibióticos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, que têm a capacidade de destruir ou impedir a multiplicação de bactérias, sem ter efeitos tóxicos para o homem ou animal. Anti-microbiano é um termo genérico que pretende englobar todas as substâncias químicas com actividade sobre os diferentes microrganismos: antibióticos ou antibacterianos - quando actuam em bactérias; antivirais - quando actuam em vírus; antifúngicos - quando actuam em fungos e antiparasitários - quando actuam em parasitas. Os antibióticos e as hormonas são as classes de PPCPs presentes no ambiente que mais preocupações têm causado.

Triclosan é um anti-microbiano usado em muitos produtos de higiene e cuidado pessoal, como por exemplo, desodorizantes, sabonetes, pasta dentífrica, desinfectantes domésticos e médicos. De acordo com a directiva 76/768/CEE a quantidade máxima permitida de triclosan nesses produtos é de 0,3 % (m/m)¹⁸. Devido à vasta aplicação e como consequência das características lipofílicas, este composto encontra-se disseminado no ambiente, principalmente em águas residuais e superficiais¹⁹, bem como no corpo humano essencialmente em plasma e leite materno²⁰.

Fragrâncias são ingredientes de produtos de higiene e cuidado pessoal comuns, que possuem na sua formulação uma mistura de diversos compostos, nomeadamente terpenos, ésteres e “musks”. Há três grandes grupos de “musks”, nomeadamente, sintéticos, nitro, macrocíclicos e policíclicos. Os musks nitro e os policíclico são muito usados na indústria, tendo os últimos vindo a substituir os primeiros devido à respectiva toxicidade. Resultante da sua grande utilização e lenta velocidade de degradação, este tipo de compostos surge frequentemente em amostras ambientais, principalmente o tonalide e o galaxolide^{14,15}.

1.4 Efeitos na saúde humana e nos ecossistemas aquáticos e terrestres

Os PPCPs são especificamente concebidos para alterar funções biológicas, pelo que podem provocar uma série de efeitos secundários em organismos, os quais não era suposto estarem expostos a estes compostos¹⁰. Este grupo de contaminantes não necessita de possuir longos períodos de persistência no meio ambiente para causar efeitos negativos nos

ecossistemas, uma vez as suas rápidas taxas de transformação/remoção poderem ser compensadas pela contínua introdução no meio ambiente⁹.

Para avaliar os efeitos tóxicos destes poluentes sobre os ecossistemas terrestres e aquáticos deverão ser efectuados testes específicos que avaliem os efeitos agudos (nos quais a velocidade de mortalidade é muitas vezes registada) e os efeitos crónicos (exposição do componente químico em diversas concentrações sobre um período de tempo prolongado). Os efeitos são medidos com recurso a parâmetros específicos, nomeadamente, índice de crescimento ou velocidade de reprodução (figura 1.3). No entanto, os estudos de toxicidade aguda em organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos (algas, zooplâncton, peixes, entre outros) predominam relativamente aos de toxicidade crónica. Os testes de biocumulação e toxicidade crónica são escassos provavelmente devido ao complexo trabalho experimental envolvido¹⁷.

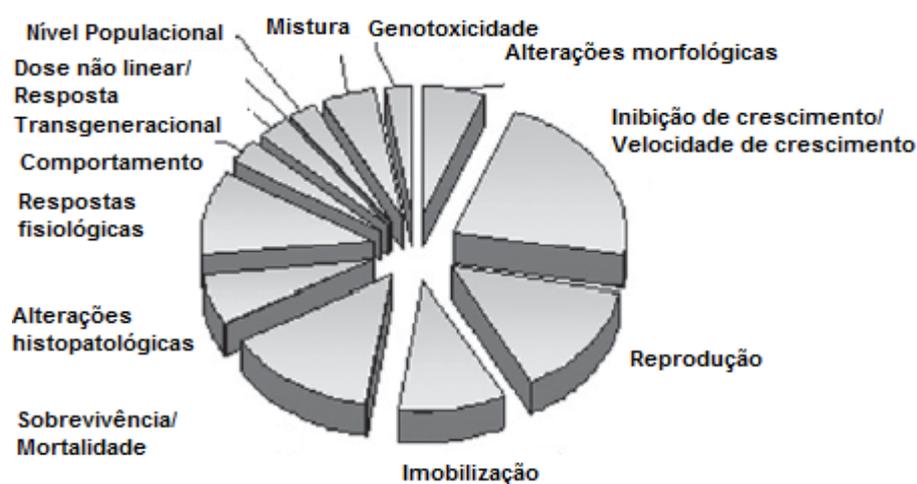


Figura 1.3 – Principais parâmetros usados em estudos ecotoxicológicos, expressos em percentagem relativa (dados recolhidos de 94 artigos publicados entre 1996 e 2009)¹⁷.

Através da realização de testes toxicológicos, a comunidade científica tem-se centrado nas classes de PPCPs mais prescritas e consumidas e que provavelmente surgem mais frequentemente no ambiente, nomeadamente os NSAIDs, reguladores lípidicos, antibióticos e hormonas sexuais¹⁷. A título de exemplo, mencionam-se alguns dos efeitos tóxicos causados por alguns PPCPs em diversos organismos.

Entre os NSAIDs, o diclofenac é o que tem revelado uma maior toxicidade aguda, demonstrando efeitos para concentrações inferiores a 100 mg/L. Os testes de toxicidade crónica realizados em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) revelaram alterações no fígado,

rins e guelras desta espécie, após 28 dias de exposição a 1 µg/L de diclofenac^{21,22}. O ibuprofeno é outro NSAID que tem apresentado toxicidade crónica, sendo um bom exemplo a fêmea do peixe-do-arroz japonês (ou do inglês “Japanese medaka”, *Oryzias latipes*) que quando exposta a diferentes concentrações deste fármaco, durante seis semanas, demonstra redução do número de desovas e aumento do peso do fígado²³.

A exposição da espécie *Carassius auratus* a 1,5 µg/L de gemfibrozil durante 14 dias origina decréscimo do teor de testosterona presente no seu sangue em mais de 50 %, provando que este regulador lipídico pode actuar como potencial químico desregulador endócrino (EDC)²⁴.

O maior efeito da presença de antibióticos no ambiente está associado ao desenvolvimento de mecanismos resistentes a bactérias, os quais podem comprometer a saúde pública. Os antibióticos podem ser classificados como extremamente tóxicos para microrganismos e muito tóxicos para algas²⁵. Os testes de toxicidade crónica realizados em algas têm demonstrado diversos efeitos adversos, nomeadamente a inibição do seu crescimento²⁶. Quando se estudou o efeito destes fármacos em vertebrados (como por exemplo peixes) não se observou qualquer efeito. No entanto, a presença de antibióticos no ambiente afecta indirectamente estas espécies, uma vez que as algas constituem a base da cadeia alimentar e o declínio da sua população afecta o equilíbrio do sistema aquático¹⁷.

Os antibióticos usados em medicina veterinária são excretados na urina e nas fezes dos animais, surgindo frequentemente no estrume utilizado como fertilizante. Assim, estes fármacos podem trazer sérios problemas para o ecossistema terrestre, como por exemplo efeitos nas bactérias de nitrificação ou inibição no crescimento de plantas por biocumulação. A presença de antibióticos nos influentes das ETARs pode igualmente prejudicar os processos de tratamento que utilizam bactérias, provocando efeitos tóxicos nos ecossistemas aquáticos e terrestres¹⁷.

Algumas hormonas esteróides podem induzir alterações nas respostas estrogénicas, assim como no desenvolvimento reprodutor, sendo consideradas EDCs. O 17α-etinilestradiol é um estrogéneo sintético utilizado como contraceptivo oral que apresenta efeitos estrogénicos nos peixes. Expondo algumas espécies de peixes a concentrações de 17α-etinilestradiol inferiores a 1 ng/L durante o seu ciclo de vida, verificou-se uma significativa redução no sucesso de fertilização, assim como uma diminuição das características sexuais masculinas.²⁷ O estrogéneo natural 17β-estradiol pode também ter efeitos negativos em peixes, mesmo quando presente em baixas concentrações.

Devido ao elevado potencial de biocumulação dos “musks” no ambiente, os potenciais efeitos tóxicos em diversos organismos têm também despertado o interesse da comunidade científica. Nos últimos anos a discussão tem-se centrado na possibilidade destes compostos serem prováveis EDCs^{28,29}.

As concentrações detectadas no ambiente para a maioria dos PPCPs são da mesma ordem de magnitude das concentrações que causam efeitos secundários nos organismos. Assim, a presença de PPCPs no ambiente representa efectivamente uma ameaça para os ecossistemas^{17,30}.

A maioria dos riscos estudados baseia-se na exposição a um só composto. No entanto, os PPCPs não ocorrem isolados no ambiente, mas normalmente em misturas de multi-componentes. Em geral, o conhecimento sobre a toxicidade de misturas de compostos ainda é limitado. Cleuvers³¹ avaliou o efeito de exposição da mistura de NSAIDs (diclofenac, ibuprofeno, naproxeno e ácido acetilsalicílico) em diferentes organismos aquáticos. A mistura destes fármacos demonstrou toxicidade para concentrações inferiores às encontradas nos compostos testados isoladamente. Os efeitos das misturas podem provavelmente seguir o conceito de adição de concentração, ou seja, a toxicidade global é o resultado da soma das concentrações individuais de cada composto³².

Os efeitos adversos para a saúde humana devido à ingestão de PPCPs presentes em água para consumo humano são ainda desconhecidos, permanecendo algumas dúvidas, nomeadamente se os efeitos secundários serão os mesmos durante o uso terapêutico (pouco tempo de exposição, elevadas concentrações) e na ingestão ao longo da vida, através da água e dos alimentos (longo tempo de exposição, baixas concentrações); se os efeitos serão os mesmos nos fetos, bebés, crianças, adultos e idosos; se os riscos de exposição de um só composto serão comparáveis aos de uma mistura¹².

Muitos PPCPs ainda necessitam de mais estudos científicos relativamente aos efeitos toxicológicos, principalmente, associados à exposição prolongada e de misturas destes compostos. Consequentemente, enquanto não estiver completamente compreendido qual o impacto na saúde humana e no ambiente provocado por estes poluentes, não será possível proceder à elaboração da respectiva legislação.

1.5 O que são EDCs?

Na secção anterior foi referido que alguns dos PPCPs, nomeadamente, as hormonas, quando presentes no meio ambiente podem interferir com o sistema endócrino. Neste

sentido, poder-se-á abordar de forma sintética a definição de sistema endócrino e como os EDCs actuam efectivamente sobre este sistema.

O sistema endócrino (do grego “endos” (dentro) e “krynos” (secreção)) é formado por um conjunto de glândulas produtoras de hormonas, muitas das quais reguladas por hormonas tróficas (estimuladoras) segregadas pela hipófise, a qual estabelece a ligação entre o sistema endócrino e o sistema nervoso (hipotálamo). É uma complexa rede de sinais e mensageiros químicos que controlam as funções e reacções corporais interagindo directamente com o sistema nervoso³³.

A diversidade de glândulas e tipo de hormonas é elevada, desempenhando um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento, na reprodução, na diferenciação sexual e ainda, na formação do sistema quer nervoso quer imunológico. A alteração da concentração destas substâncias no organismo pode originar disfunções de órgãos e sistemas, principalmente em períodos críticos do crescimento e de formação dos órgãos e tecidos, nomeadamente, durante a fase embrionária e nos primeiros anos de vida do indivíduo³⁴.

Normalmente, uma determinada hormona actua sobre um número limitado de células, denominadas por células alvo. Estas células possuem, na membrana ou no citoplasma, proteínas denominadas receptores hormonais, capazes de se combinar especificamente com as hormonas. Apenas quando ocorre a combinação correcta, as células alvo exibem respostas características da acção hormonal. Assim, as hormonas podem actuar em locais distantes do local onde são segregadas, tendo no local de actuação um receptor específico. Esta é a forma do organismo reconhecer a substância, uma espécie de mecanismo vulgarmente designado por “chave-fechadura”³⁴.

A figura 1.4 ilustra a localização das várias glândulas do sistema endócrino humano, nomeadamente, hipófise, paratiróides, tiróide, supra-renais, pâncreas e gónadas (ovários e testículos).

Nos organismos vertebrados existe uma elevada semelhança entre as hormonas existentes nas diversas espécies, quer nas suas características estruturais quer na função que desempenham. Nos vegetais, embora existam diferenças de estrutura e função, o mecanismo de acção é semelhante. Esta é a razão pela qual, qualquer substância que interfere no mecanismo de acção hormonal poder alterar o desenvolvimento, a reprodução e outras funções dos seres vivos das diversas espécies.

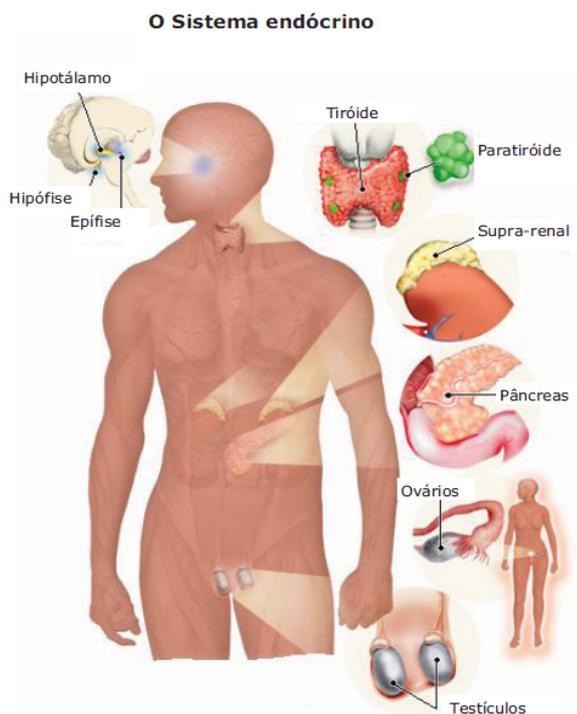


Figura 1.4 – Sistema endócrino humano. Representação das glândulas endócrinas do homem e da mulher³⁵.

Os EDCs estão definidos como substâncias, ou compostos exógenos, capazes de perturbar o funcionamento do sistema endócrino mascarando as hormonas naturais, bloqueando os receptores numa célula, activando a síntese e a secreção de hormonas naturais, desactivando enzimas responsáveis pela secreção de hormonas e/ou estimulando a capacidade das hormonas em interagir com os receptores celulares³⁴. A alteração do sistema endócrino ocorre quando uma determinada substância interage com os receptores hormonais, alterando a sua resposta. A desregulação do sistema endócrino pode ocorrer principalmente por dois processos diferentes, desencadeando efeitos distintos, designados por agonista e antagonista. A substância química pode ligar-se ao receptor hormonal, mascarando a hormona natural e produzir uma resposta inexacta, designada por “efeito agonista”. Se o composto se ligar ao receptor e impedir a ligação hormona-receptor actua como um bloqueador, impedindo a resposta, sendo designado por “efeito antagonista”^{33,34}. A figura 1.5 exemplifica o efeito antagonista e agonista resultantes da interacção do ECD no receptor hormonal.

Os EDCs têm a capacidade de alterar as funções do sistema endócrino e consequentemente, prejudicar a saúde num organismo intacto, a descendência ou (sub) populações. Deste modo, estas substâncias podem causar alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução e comportamento dos organismos. Deve salientar-se que o sistema hormonal nos organismos é estimulado com pequeníssimas concentrações de

esteróides, da ordem dos baixos $\mu\text{g/L}$ ou ng/L , sendo essa a principal razão porque teores vestigiais de poluentes químicos exógenos apresentam efeitos tão nocivos³³.

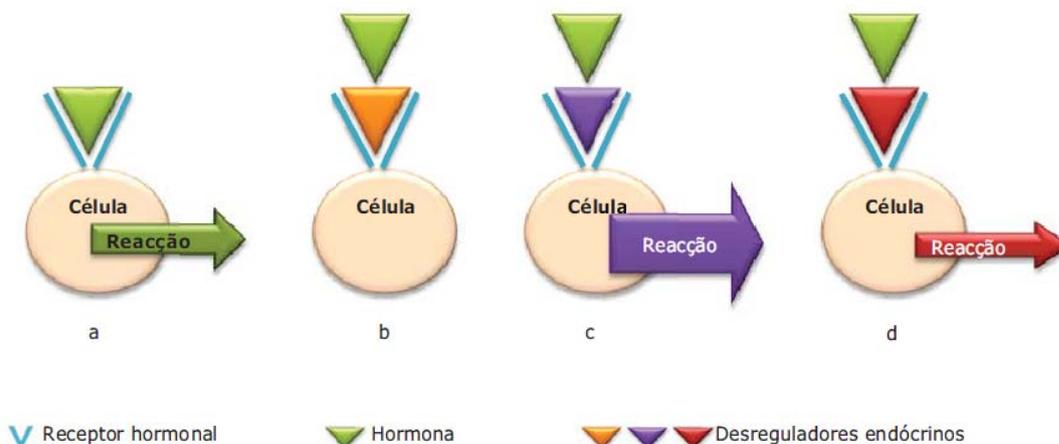


Figura 1.5 – Mecanismos de desregulação endócrina. Ligação receptor-hormona da qual resulta uma resposta exacta (a). Ligação EDC-receptor hormonal no qual resulta o bloqueio do sinal que seria esperado pela hormona – “efeito antagonista” (b). Ligação EDC-receptor hormonal na qual resulta o envio de um sinal superior ou inferior ao esperado e/ou fora de tempo – “efeito agonista” (c e d)³⁴.

O início do estudo dos EDCs foi desencadeado pelo aparecimento de acontecimentos invulgares na vida selvagem, relacionados com vários tipos de alterações nas espécies animais, nomeadamente, órgãos sexuais defeituosos, alterações comportamentais, infertilidade, aumento da mortalidade juvenil e o declínio de populações inteiras. A maior parte destas alterações incidiram na região dos grandes lagos, nos Estados Unidos da América (USA), zona de grande desenvolvimento industrial e agrícola na década de 40. Com o tempo, parte dos problemas observados nos animais selvagens começaram também a ser observados no ser humano, nomeadamente, diminuição da produção de esperma nos homens, aumento de casos de cancro sobretudo ao nível dos órgãos genitais, disfunções ao nível dos ovários, infertilidade nas mulheres e malformações congénitas nos fetos³³.

1.6 Metodologias analíticas para análise de PPCPs

A baixa concentração de PPCPs tipicamente encontrada em amostras ambientais ($\mu\text{g/L}$ ou ng/L), a complexidade das matrizes e as diferentes propriedades físico-químicas destes solutos tornam difíceis quer a detecção quer a quantificação, constituindo quase sempre um desafio analítico. Deste modo, métodos extremamente sensíveis e selectivos são desejáveis para a monitorização de PPCPs em amostras ambientais.

Do ponto de vista analítico, os métodos mais adequados para a monitorização de PPCPs em amostras ambientais incluem, genericamente, métodos de separação, com particular incidência para as técnicas cromatográficas e hífenadas, as quais têm demonstrado ser eficazes e versáteis na monitorização de um alargado grupo de PPCPs⁷. À excepção de alguns dos fármacos e ingredientes de fragrâncias (“musks”), a maioria dos PPCPs são regra geral compostos polares, não voláteis e termicamente instáveis, tornando-os inapropriados para análise por cromatografia gasosa (GC), a menos que se proceda à derivatização prévia³⁶. Neste sentido, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tornou-se a técnica analítica de excelência para monitorizar esta classe de compostos.

Face às baixas concentrações verificadas no ambiente, os procedimentos analíticos incluem um passo de enriquecimento e concentração dos analitos da matriz original, como pré-requisito de eliminação de potenciais interferentes e baixar os limites de detecção do método⁷. Deste modo, o tratamento prévio das amostras ambientais para análise cromatográfica de PPCPs tem-se direccionado no sentido de se adoptarem técnicas de extracção e concentração que permitem alcançar limites de detecção ultra-vestigial, recuperar e isolar selectivamente analitos com diversa polaridade, minimizando interferentes e reduzindo ao máximo a quantidade de solventes e de amostra utilizada.

1.7 Bibliografía

- [1] E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Fanelli, G. Reitano, R. Bagnati, C. Chiabrando, F. Pomati, C. Rossetti, D. Calamari, "Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control", *Environ Sci & Pollut Res* **13** (2006) 15.
- [2] K. Fent, A. Weston, D. Caminada, "Ecotoxicology of human pharmaceuticals", *Aquatic Toxicology* **76** (2006) 122.
- [3] D.S. Aga, "Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems", CRC Press Taylor & Francis Group (2008).
- [4] T.A. Ternes, "Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers", *Water Res.* **32** (1998) 3245.
- [5] C.G. Daughton, T.A. Ternes, "Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change", *Environ. Health Perspect.* **107** (1999) 907.
- [6] K. Kümerer; "Pharmaceuticals in the environmental – sources, fate, effects and risks", Springer, 2nd Ed. (2004).
- [7] A. Kot-Wasik, J. Dębska, J. Namieśnik, "Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products", *Trends in Analytical Chemistry* **26** (2007) 557.
- [8] POSEIDON, "Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse", "Final Report" (2004). (<http://poseidon.bafg.de/servlet/is/2888> - consultado em 17 de Abril de 2010).
- [9] M.S. Díaz-Cruz, M. J. L. Alda, D. Barceló, "Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge", *Trends Anal. Chem.* **22** (2003) 340.
- [10] O.V. Enick, M.M. Moore, "Assessing the assessments: pharmaceuticals in the environment", *Environ. Impact Asses.* **27** (2007) 707.
- [11] F. Hernández, J. V. Sancho, M. Ibáñez, C. Guerrero, "Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS", *Trends Anal. Chem.* **26** (2007) 466.

- [12] K. Kümmerer, "The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges" *J. Env. Man.* **90** (2009) 2354.
- [13] S. Mompelat, B. LeBot, O. Thomas, "Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water", *Environ. Inte.* **35** (2009) 803.
- [14] X. Zeng, G. Sheng, H. Gui, D. Chen, W. Shao, J. Fu, "Preliminary study on the occurrence and distribution of polycyclic musks in a wastewater treatment plant in Guandong, China", *Chemosphere* **69** (2007) 1305.
- [15] K. Bester, "Analysis of musk fragrances in environmental samples", *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 470.
- [16] V. Andreu, C. Blasco, Y. Picó, "Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment", *Trends Anal. Chem.* **26** (2007) 534.
- [17] L. H.M.L.M. Santos, A.N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro, "Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment", *J. Hazard. Mater.* **175** (2010) 45.
- [18] A. Piccoli, J. Fiori, V. Andrisano, M. Orioli, "Determination of triclosan in personal health care products by liquid chromatography (HPLC)", *Il Farmaco* **57** (2002) 369.
- [19] W. Hua, E.R. Bennett, R.J. Letcher, "Triclosan in waste and surface waters from the upper Detroit River by liquid chromatography-electrospray-tandem quadrupole mass spectrometry", *Environ. Int.* **31** (2005) 621.
- [20] M. Allmyr, M. Adolfsson-Erici, M.S. McLachlan, G. Sandborgh-Englund, "Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products", *Sci. Total Environ.* **372** (2006) 87.
- [21] J. Schwaiger, H. Ferling, U. Mallow, H. Wintermayr, R.D. Negele, "Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout", *Aquat. Toxicol.* **68** (2004) 141.
- [22] R. Triebkorn, H. Casper, A. Heyd, R. Eikemper, H.-R. Köhler, J. Schwaiger, "Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Aquat. Toxicol.* **68** (2004) 151.
- [23] J. L. Flippin, D. Huggett, C. M. Foran, "Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*", *Aquat. Toxicol.* **81** (2007) 73.

- [24] C. Mimeault, A.J. Woodhouse, X.-S. Miao, C.D. Metcalfe, T.W. Moon, V.L. Trudeau, "The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*", *Aquat. Toxicol.* **73** (2005) 44.
- [25] O.A.H. Jones, N. Voulvoulis, J.N. Lester, "Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals", *Water Res.* **36** (2002) 5013.
- [26] H.-C. Holten Lützhøft, B. Halling-Sørensen, S. E. Jørgensen, "Algal toxicity of antibacterial agents applied in danish fish farming", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **36** (1999) 1.
- [27] J.L. Parrott, B.R. Blunt, "Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and desmasculinizes males", *Environ. Toxicol.* **20** (2005) 131.
- [28] G. Carlsson, L. Norrgren, "Synthetic musk toxicity to early life stages of Zebrafish (*Danio rerio*)", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **46** (2004) 102.
- [29] R.H.M.M. Schreurs, J. Legler, E. Artola-Garicano, T.L. Sinnige, P.H. Lanser, W. Seinen, B. Van Der Burg, "In vitro and in vivo antiestrogenic: effects of polycyclic musks in Zebrafish", *Environ. Sci. Technol.* **38** (2004) 997.
- [30] M.D. Hernando, M. Mezcua, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló, "Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments", *Talanta* **69** (2006) 334.
- [31] M. Cleuvers, "Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid", *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **59** (2004) 309.
- [32] K. Fent, A. A. Weston, D. Caminada, "Ecotoxicology of human pharmaceuticals", *Aquat. Toxicol.* **76** (2006) 122.
- [33] J.M.F. Nogueira, "Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos", *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química* **88** (2003) 65.
- [34] M. Henriques, "Homonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: optimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS", Tese de mestrado em controlo da qualidade e toxicologia dos alimentos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (2008).
- [35] http://www.emedicinehealth.com/anatomy_of_the_endocrine_system/article_em.htm (consultado em 8 de Abril de 2010).

[36] C. Hao, X. Zhao, P. Yang, “GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices”, Trends in Analytical Chemistry, *Trends Anal. Chem.* **26** (2007) 569.

Capítulo 2

Técnicas Cromatográficas e Hifenadas

2.1 Cromatografia

2.1.1 Aspectos históricos

O botânico russo Mikhail S. Tswett (1903) foi quem primeiro usou o termo cromatografia. Esta designação foi utilizada para descrever a separação de pigmentos de plantas – clorofilas e xantófilas em colunas de vidro contendo carbonato de cálcio. Os diversos compostos eluíram como bandas coradas na coluna, justificando a escolha do nome do método (do grego: cor – “chroma” e escrita – “graphein”). Tswett designou de cromatograma a série de bandas que se formavam na coluna cromatográfica quando realizou a separação de pigmentos de plantas¹.

No entanto, os princípios teóricos da cromatografia só foram estabelecidos entre 1940 – 1950, pela dupla científica Martin e Singe, tendo dado uma contribuição importante para a compreensão dos métodos cromatográficos. A teoria dos pratos teóricos proposta foi então reconhecida pela atribuição do prémio Nobel em 1957, que levou à introdução da GC de partição e que permitiu estabelecer as condições necessárias para a HPLC².

2.1.2 Generalidades

A cromatografia é largamente utilizada para a separação, identificação e/ou determinação de componentes químicos em misturas simples e complexas, que através de outras técnicas ou meios se tornam impossíveis. O termo cromatografia pode ser aplicado a diversos métodos, os quais têm em comum a utilização de uma fase estacionária, que pode ser líquida, sólida ou um gel e uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico que interaccua e é insolúvel com a primeira. Geralmente, a mistura é dissolvida na fase móvel, sendo seguidamente forçada a passar através da fase estacionária, dependendo das propriedades físico-químicas dos compostos e do grau de interacção destes com a fase estacionária, resultando em mobilidades distintas e, conseqüentemente, na separação física. As técnicas cromatográficas podem ser classificadas tendo em consideração três critérios, nomeadamente, a natureza física da fase móvel, o suporte da fase estacionária e a natureza do processo de distribuição, como é apresentado no esquema da figura 2.1.

De todas as possibilidades apresentadas, a GC e a cromatografia líquida (LC), ambas de partição, são sem dúvida das técnicas de separação analítica mais usadas.

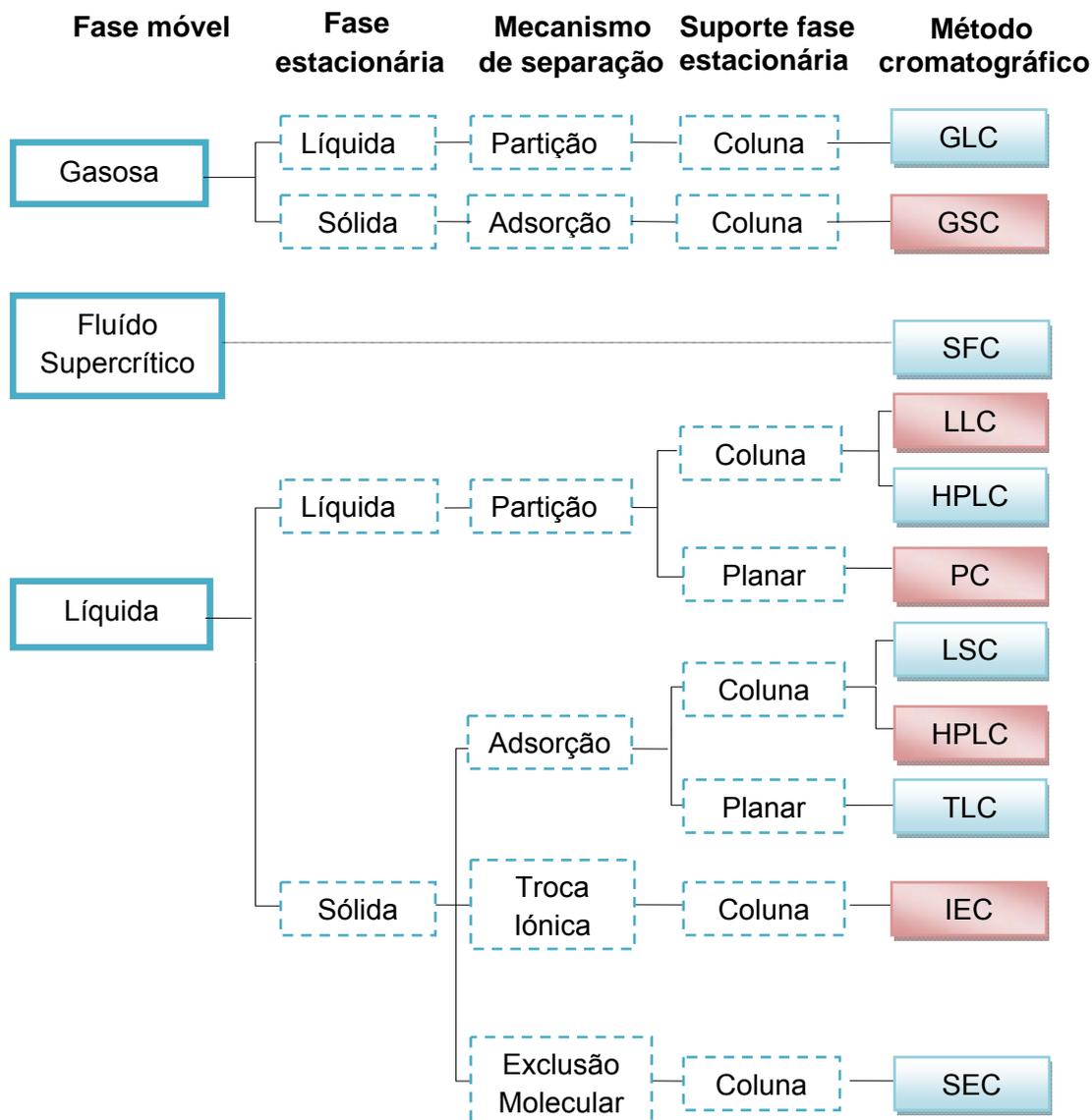


Figura 2.1 – Classificação dos métodos cromatográficos (abreviaturas dos termos anglo-saxónicos universalmente utilizados).

2.1.3 Aspectos teóricos

Há uma série de conceitos básicos cuja assimilação é imprescindível para o entendimento dos métodos cromatográficos, assim como das suas potencialidades. Nesta secção, discutem-se alguns dos aspectos teóricos mais relevantes em cromatografia em coluna.

Diversos processos físico-químicos ocorrem em cromatografia, por vezes em simultâneo, nomeadamente, a interação do analito com as fases móvel e estacionária, a

natureza do processo de distribuição em causa (partição, adsorção,...), processos estes que são também influenciados por diversos parâmetros experimentais (temperatura, composição da fase móvel,...), todos condicionando a eficiência e a selectividade cromatográfica e como consequência a resolução.

A cromatografia de partição é um processo em que ocorre a distribuição dos solutos entre a fase estacionária e a fase móvel sendo o coeficiente de distribuição (K_D) a razão entre a concentração em ambas as fases. Quando K_D aumenta, a concentração do soluto na fase estacionária aumenta, ou seja, aumenta o tempo de permanência do soluto na fase estacionária, sendo o tempo de retenção do soluto directamente dependente do correspondente tempo de permanência nesta fase. A constante de distribuição depende do tipo da fase estacionária, das condições experimentais e da natureza do soluto¹.

O tempo requerido por um composto para alcançar o detector, desde a injeção, é designado por tempo de retenção (t_R), sendo este parâmetro importante qualitativamente. O tempo que os solutos dispõem exclusivamente na fase móvel é equivalente ao tempo de retenção de uma substância que não sofra qualquer tipo de interacção com a fase estacionária, designado por tempo morto (t_M). O tempo de retenção ajustado (t_R') corresponde ao tempo de permanência na fase estacionária¹. A figura 2.2 representa um cromatograma – registo do sinal em função do tempo – reproduzindo os conceitos anteriormente descritos.

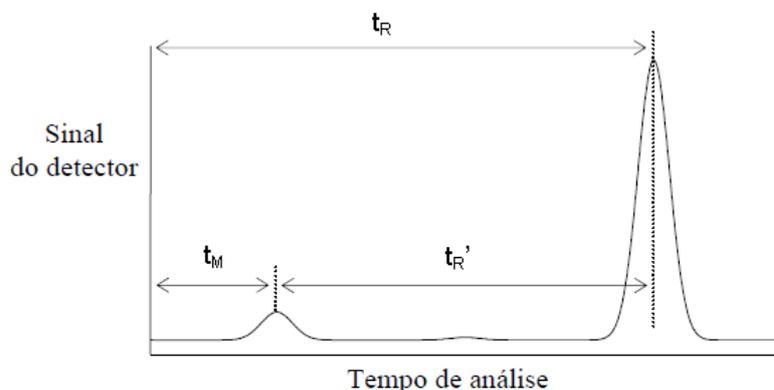


Figura 2.2 – Ilustração representativa do t_M , t_R e t_R' num cromatograma.

O factor de capacidade (k') é um parâmetro geralmente usado para descrever a velocidade de migração dos analitos num processo cromatográfico. Este parâmetro pode ser calculado através da equação 2.1:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K_D \frac{V_S}{V_M} \quad \text{equação 2.1}$$

onde, para além dos parâmetros já introduzidos, C_S é a concentração do soluto na fase estacionária, C_M a concentração do soluto na fase móvel, V_S o volume do soluto na fase estacionária e V_M o volume do soluto na fase móvel. Esta grandeza é proporcional ao tempo que um soluto dispende na fase estacionária relativamente ao tempo que percorre na fase móvel.

O factor de separação ou selectividade (α) é a medida do afastamento relativo entre dois picos adjacentes ou reflecte a selectividade da fase estacionária num dado processo cromatográfico, sendo calculado pela equação 2.2:

$$\alpha = \left(\frac{k_2'}{k_1'} \right) \quad \text{equação 2.2}$$

onde k_1' é o factor de capacidade do pico que elui mais cedo e k_2' o factor de capacidade do pico que elui mais tarde, podendo ser maior ou igual à unidade.

A eficiência da coluna pode definir-se como a capacidade de eluição com o mínimo de dispersão para um dado soluto. Quanto menor for a largura da banda, melhor será a resolução ou maior a capacidade de resolver compostos que eluam muito próximos¹. De acordo com a teoria dos pratos teóricos desenvolvida por Martin e Singe, a eficiência pode ser expressa como o número de pratos teóricos (N) gerados por uma dada coluna, podendo ser determinada para bandas simétricas pela equação 2.3:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad \text{equação 2.3}$$

onde N é o número de pratos teóricos, t_R o tempo de retenção e W a largura da base do pico. 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. Colunas muito eficientes terão obviamente valores de H mais pequenos.

A teoria dos pratos teóricos possibilita uma descrição aproximada da separação cromatográfica. Contudo, não considera a contribuição de alguns mecanismos para a dispersão do pico, podendo estes ser descritos por modelos matemáticos mais realistas, denominados modelos cinéticos. Um destes modelos conduz à equação de "Van Deemter" que resume os fenómenos que ocorrem na coluna e que contribuem para a dispersão da banda:

$$H = A + \frac{B}{u_x} + Cu_x \quad \text{equação 2.4}$$

Estando o termo A 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 desprezável 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 tempo necessário para o equilíbrio eluição-retenção do soluto entre a fase móvel e a estacionária dá origem ao termo Cu_x na equação de “van Deemter”, sendo directamente proporcional à velocidade linear ou ao fluxo.

Finalmente, a resolução (R_s) é uma medida quantitativa de separação entre dois picos adjacentes, em tempo analítico aceitável, sendo o principal objectivo de qualquer processo cromatográfico. É normalmente calculada com recurso à equação 2.5:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \times \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \times \left(\frac{k_2'}{k_2' + 1} \right) \quad \text{equação 2.5}$$

na qual se α , k_2' e N forem bem conjugados, a resolução ou separação completa entre componentes cromatográficos pode ser conseguida.

2.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A popularidade da HPLC deve-se às vantagens que apresenta face à LC clássica. As separações cromatográficas que ocorriam durante horas ou mesmo dias utilizando a LC clássica, podem actualmente demorar apenas minutos ou segundos com recurso à HPLC. Nesta técnica, a fase móvel utilizada é líquida, havendo a possibilidade de seleccionar diversos tipos de processos de distribuição, dependendo da natureza da fase estacionária, conforme foi discutido na secção anterior e observar no esquema da figura 2.1. Sendo, no entanto, a cromatografia de partição ou fase reversa a mais vulgarmente usada.

A instrumentação da técnica de HPLC consiste num conjunto de dispositivos sofisticados, com características próprias e absolutamente necessários para a execução conveniente, como mostra a figura 2.3. 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 direcção da coluna, um sistema de injeção para a introdução da amostra, uma coluna onde ocorre a separação e um detector, controlados com “software” para aquisição e tratamento dos dados analíticos³.

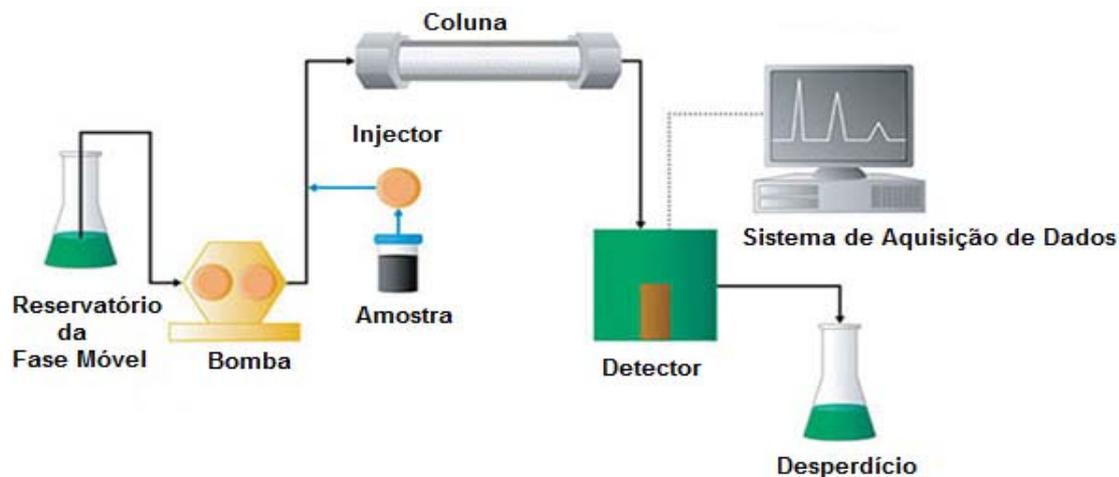


Figura 2.3 – Esquema simplificado de um sistema de HPLC convencional⁴.

Os reservatórios que contêm a fase móvel são constituídos por materiais inertes, geralmente à base de vidro, podendo os equipamentos de HPLC possuírem até quatro reservatórios. A extremidade do tubo imerso em cada reservatório e que é responsável pelo transporte da fase móvel é composta por um filtro poroso, o qual filtra a fase móvel por forma a evitar que micro-partículas sólidas entrem no sistema de HPLC, entupindo ou danificando a bomba, o sistema de injeção ou bloqueando a coluna cromatográfica³.

A fase móvel ao ser bombeada para a coluna atravessa uma unidade de desgaseificação, para remover eventuais gases dissolvidos, principalmente ar. Estes gases podem causar a formação de bolhas no sistema cromatográfico, perturbando essencialmente a estabilidade do sinal do detector. No entanto, é aconselhável que antes de qualquer aplicação todos os eluentes a serem utilizados sejam previamente filtrados. As análises cromatográficas por HPLC podem ser efectuadas mantendo a composição da fase móvel constante ou variável, designada por eluição isocrática ou por gradiente, respectivamente. O modo de eluição por gradiente pode conter dois, três ou mesmo quatro solventes com diferente polaridade e composição, podendo variar linearmente ou por degraus¹.

A fase móvel é impulsionada por bombas apropriadas, que se podem classificar, segundo o funcionamento, por deslocamento, pneumáticas ou recíprocas, sendo as últimas as mais vulgares. Como consequência das elevadas pressões requeridas num sistema de HPLC convencional, principalmente devido ao tamanho das partículas da fase estacionária usada nas colunas, as bombas devem de ter a capacidade de alcançar fluxos aceitáveis e velocidades constantes, normalmente entre 0,20 e 2,0 mL/min³.

No sistema de injeção, a amostra é introduzida com o auxílio de uma seringa e de válvulas apropriadas que permitem obter grande precisão e exactidão. O modo de injeção mais usado em HPLC consiste no sistema de “loops”, que permite a injeção de amostras com volumes compreendidos entre 5 a 500 μL ¹. Na actualidade, o sistema de injeção de amostra já se encontra vulgarmente automatizado.

É nas colunas cromatográficas que é efectuada a separação dos solutos da amostra, sendo normalmente construídas em aço inoxidável e desenvolvidas para suportar pressões que podem ir até 400 bar. A maioria das colunas convencionais possui um comprimento compreendido entre 10 e 30 cm, um diâmetro interno de 4 a 10 mm e um tamanho de partícula que pode ir até 10 μm ¹. Actualmente, estão disponíveis diversas fases estacionárias para colunas de HPLC, de acordo com o processo de distribuição que se pretende entre o analito e a fase estacionária. Na cromatografia de fase reversa, a mais vulgarizada, a fase estacionária apresenta características apolares e a fase móvel polares. Na grande maioria, a fase estacionária é constituída por partículas de sílica, estando a designação da coluna, muitas vezes, associado ao tamanho da cadeia carbonada, como por exemplo, C8 (octilsilano), C18 (octadecilsilano), entre outras³. Por vezes são usadas pré-colunas que são colocadas no topo da coluna analítica, contendo a mesma fase estacionária que a coluna analítica, com a finalidade de aumentar o tempo de vida da mesma, uma vez que retêm eventuais contaminações da coluna. Estes equipamentos podem possuir um termóstato ou forno que condiciona a temperatura da coluna.

Em HPLC, a função do detector é analisar a solução que eluí da coluna e originar um sinal proporcional à concentração de cada componente presente na mistura. Há uma grande variedade de sistemas de detecção que se baseiam tanto em propriedades físicas, como químicas dos analitos, podendo ainda basear-se nas propriedades físicas da fase móvel. Um dos detectores mais comuns em HPLC é o detector ultravioleta-visível (UV-vis) podendo operar com comprimento de onda fixo ou variável, assim como a rede de díodos (DAD) com varrimento espectral simultâneo. O detector de fluorescência, electroquímico e índice de refração também são utilizados em HPLC³. A HPLC pode ainda ser acoplada a outras técnicas analíticas, assumindo especial relevo a espectrometria de massa (MS), com vantagens acrescidas em termos da identificação espectral, sensibilidade e selectividade.

2.1.5 Cromatografia gasosa (GC)

A GC é uma técnica instrumental de análise muito utilizada para separação e identificação de compostos, exigindo no entanto, que estes apresentem volatilidade

adequada. Esta técnica tem uma vasta aplicação em diversas áreas, nomeadamente, ambiental, alimentar, petroquímica, farmacêutica, entre outras.

A amostra é vaporizada e misturada na fase móvel (gás), sendo seguidamente forçada através da fase estacionária imiscível que está fixa numa coluna. Existem dois tipos de cromatografia em fase gasosa, consoante a fase estacionária seja líquida ou sólida, sendo a primeira muito utilizada e vulgarmente designada por cromatografia gás-líquido (GLC). Os factores que influenciam a velocidade de migração dos analitos (e conseqüentemente o tempo de retenção) são o fluxo do gás de arraste, a temperatura da coluna (condicionada pelo forno) e o tipo de fase estacionária envolvida.

Os principais componentes de um cromatógrafo gasoso são o sistema de injeção, a coluna cromatográfica colocada num forno, o detector e o sistema de aquisição e tratamento de dados (figura 2.4).

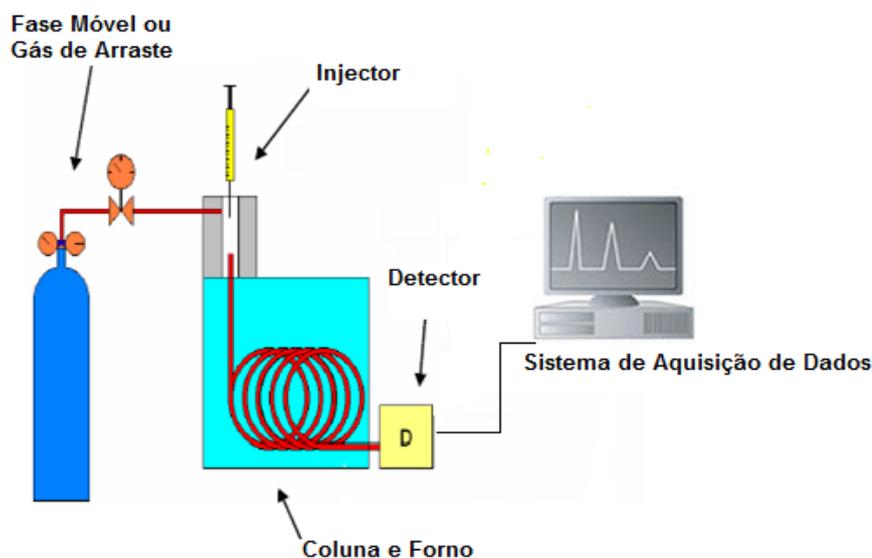


Figura 2.4 – Esquema simplificado de um cromatógrafo gasoso convencional ⁵ (figura adaptada).

Os gases de arraste devem ser puros e quimicamente inertes, podendo ser utilizado o hélio, azoto ou hidrogénio, evidenciando cada um vantagens e inconvenientes do ponto de vista do custo, rapidez da análise e segurança. Para colunas empacotadas o fluxo do gás de arraste encontra-se compreendido entre 25 e 150 mL/min, enquanto para colunas capilares situa-se entre 1 e 25 mL/min⁵.

O método mais comum de injeção envolve uma microseringa que injecta a amostra através de um septo para uma câmara de vaporização localizada no topo da coluna. A qualidade da injeção é crítica para a qualidade dos resultados analíticos, sendo a forma e a largura dos picos cromatográficos fortemente influenciados pela eficiência do processo de

injecção. Imediatamente após a injecção, a amostra deverá ocupar quanto possível o menor comprimento da coluna.

Os injectores de vaporização em particular, operam segundo o mesmo princípio, ou seja, a amostra é introduzida no injector que se encontra a uma temperatura suficientemente elevada para volatilizar instantaneamente os compostos sem os degradar. Seguidamente, o gás de arraste que flui na câmara de vaporização (“liner”) transporta a amostra para a coluna dando início ao processo cromatográfico. A câmara de vaporização é construída por materiais inertes e condutores de calor (usualmente borosilicato) e tem uma geometria que promove a vaporização e completa homogeneização da amostra antes da sua entrada na coluna. Geralmente, a temperatura de vaporização da amostra deve situar-se 50 °C acima do ponto de ebulição do composto menos volátil¹.

Existem diversos tipos de sistemas de injecção, sendo que cada um evidencia vantagens e inconvenientes. Os sistemas de injecção que utilizam colunas capilares operaram frequentemente com e sem repartição de fluxo (“split/splitless”) ou sob vaporização com temperatura programada (PTV).

A injecção “split” surgiu com a necessidade de limitar a quantidade de amostra que entra na coluna capilar, visto a capacidade de carga ser substancialmente inferior quando comparada com as colunas empacotadas convencionais. A amostra, imediatamente após a introdução e vaporização no injector, é repartida em duas fracções, entrando a mais pequena na coluna, sendo a maior eliminada através de uma válvula. A forma como a amostra é dividida é determinada através da relação entre a quantidade de gás de arraste que deixa o injector pela válvula de “split” e o fluxo na coluna (razão de “split”).

Na injecção de “splitless” toda a amostra injectada é introduzida na coluna, o que a torna apropriada para análise vestigial de amostras complexas. As variáveis mais importantes na injecção “splitless” são o tamanho da amostra, o solvente, a temperatura inicial da coluna, a temperatura do injector, a técnica de injecção, o tempo de activação da purga e o fluxo do gás de arraste.

O modo de operação PTV oferece uma maior sensibilidade analítica devido à possibilidade de injecção de grandes volumes de amostra e uma melhor detectabilidade dos analitos, tornando assim este modo de injecção importante para análise vestigial⁷. Enquanto um injector “split/splitless” opera a uma temperatura constante, um injector PTV pode operar com temperatura programada⁷. A amostra é injectada num injector frio (normalmente 10 - 40 °C abaixo do ponto de ebulição do solvente⁸), sendo o arrefecimento do “liner” efectuado por ar comprimido ou azoto líquido. Posteriormente, o solvente é eliminado via “split”, enquanto

os analitos são retidos no “liner”, o injector é rapidamente aquecido, sendo os analitos retidos transferidos para a coluna analítica, mantendo-se o forno a uma baixa temperatura para focar os analitos no início da coluna⁷.

É a coluna cromatográfica que contém a fase estacionária que influencia a quantidade de amostra que pode ser injectada, a quantidade de analitos que podem ser separados, a eficiência da separação e o tempo requerido para a separação. Em GC podem ser utilizadas colunas empacotadas ou colunas capilares⁵. A constituição das colunas pode ser em aço inoxidável, vidro ou sílica fundida. Nas colunas empacotadas, o enchimento é geralmente à base de “terra de diatomáceas” revestida pela fase estacionária⁵.

As colunas capilares são constituídas por três partes ou camadas distintas, nomeadamente, tubo de sílica fundida, com revestimento exterior em poliimida e a fase estacionária a revestir a parede interna. As colunas disponíveis comercialmente apresentam comprimentos que variam entre os 5 e os 100 metros, com diâmetros internos compreendidos entre 0,1 e 0,75 mm¹. Em GLC a fase estacionária de uma coluna capilar consiste num filme de polímero fino e uniforme, depositado na superfície interior do tubo de sílica fundida. A espessura e a natureza química desta fase desempenham um papel muito importante para o comportamento global da coluna.

As fases estacionárias mais comuns são constituídas por polisiloxanos (figura 2.5), uma vez este tipo de polímeros serem considerados mais resistentes e suportarem tempos de vida mais elevados. O tipo e a percentagem de grupos substituintes diferenciam cada fase e ditam as características de polaridade.

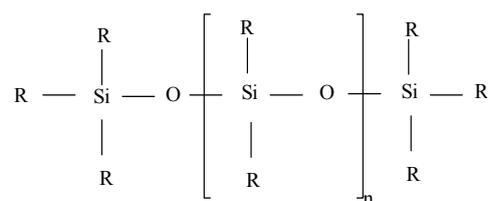


Figura 2.5 – Estrutura química geral de uma fase estacionária à base de polisiloxano¹.

A substituição dos grupos R por grupos metilo dá origem à fase com características mais apolares, na qual as interações entre o soluto e a fase se restringem a forças dispersivas. Neste tipo de arranjo, os analitos são eluídos por ordem crescente dos respectivos pontos de ebulição. Para componentes cuja separação não seja conseguida (pontos de ebulição semelhantes) são requeridas diferentes fases estacionárias. A selectividade da fase estacionária é controlada pela substituição, na estrutura de

polidimetilsiloxano, dos grupos metilo por grupos fenilo, cianopropilo e/ou trifluoropropilo, aumentando esta substituição a polaridade do líquido em diversos graus¹.

A introdução das colunas capilares, que contrapõem às colunas empacotadas uma maior eficiência e superior selectividade, impulsionou grandemente a GC de alta resolução e estimulou uma vasta aplicação desta técnica.

A coluna encontra-se localizada num forno com temperatura programada que permite a separação dos vários compostos podendo esta separação desenvolver-se a temperatura constante (isotérmica) ou de acordo com um gradiente de temperaturas ao longo do tempo.

O detector ideal para GC deve apresentar como características principais, o facto de poder proporcionar uma sensibilidade adequada, boa estabilidade e precisão e dar resposta linear numa gama alargada de concentrações para os analitos em estudo. Deve apresentar uma vasta gama de temperatura de funcionamento, ser de fácil utilização, o seu tempo de resposta deve ser reduzido e independente do fluxo. A sua resposta deve ser equivalente para todos os analitos ou em alternativa, uma resposta selectiva para determinadas classes de compostos¹. Para além da GC ter a possibilidade de hifenação (por exemplo a um espectrómetro de massa), existem diversos detectores convencionais, sendo os mais comuns apresentados na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Detectores vulgarmente utilizados em GC¹.

Detector	Tipo	Aplicações
Ionização chama	Universal	Análise de compostos com cadeias carbonadas
Condutividade térmica	Universal	Análise de compostos gasosos
Captura electrónica	Selectivo	Compostos com elevada afinidade electrónica
Azoto-fósforo	Selectivo	Compostos contendo azoto e/ou fósforo

2.2 Espectrometria de massa (MS)

2.2.1 Generalidades

Como referido anteriormente, a cromatografia é uma técnica para separação de constituintes de misturas, permitindo a identificação e/ou quantificação de alguns ou de todos esses componentes. A identificação é efectuada com base nos t_R apresentados por cada componente, em condições experimentais optimizadas. No entanto, este parâmetro não é suficiente para permitir uma identificação inequívoca, devido à possibilidade de mais do que um analito poder apresentar a mesma retenção. Neste sentido, informação adicional

pode ser obtida por é acoplamento a uma técnica auxiliar – geralmente as espectroscópicas, como é o caso da MS⁹.

Diversos detectores convencionais foram indicados anteriormente para ambas as técnicas quer de HPLC quer de GC. No entanto, comparando esses detectores com um detector de MS, constata-se que este último evidencia vantagens na sua utilização compensando largamente o custo associado. A MS fornece não só informação estrutural, como também a massa molecular dos solutos em estudo. Outra vantagem é a sensibilidade do espectrómetro de massa, permitindo obter informação quantitativa em análise vestigial, com elevada precisão e exactidão⁹.

A GC foi a primeira técnica a ser acoplada à MS, uma vez que ambas são claramente compatíveis quer na quantidade de amostra necessária à análise (mesma ordem de grandeza) quer na operação em fase gasosa. O problema de maior importância na tecnologia instrumental de GC-MS é a incompatibilidade entre um sistema que trabalha sob pressão – o cromatógrafo – e um sistema cuja operação ocorre sob vácuo – o espectrómetro de massa. Assim, afim de hifenar ambos os instrumentos num sistema integrado, teve de ser desenvolvida uma interface entre ambos que permitisse reduzir a pressão do gás de arraste em cerca de oito ordens de grandeza.

Por outro lado, o acoplamento LC-MS só foi conseguido mais tarde, uma vez estes dois sistemas apresentarem maior incompatibilidade. Para além das diferenças de pressão, existe o problema da fase móvel ser um líquido, que muitas vezes contém quantidades significativas de água, fluindo frequentemente a velocidades entre 0, 2 e 2,0 mL/min.

Os sistemas de MS são basicamente constituídos por sistema de introdução de amostra (“inlet”), interface, fonte de iões, analisador de massa, detector de iões e sistema para controlo e aquisição de dados. A interface pode estar antes ou após a fonte de iões, dependendo se os sistemas são desenvolvidos para GC ou LC.

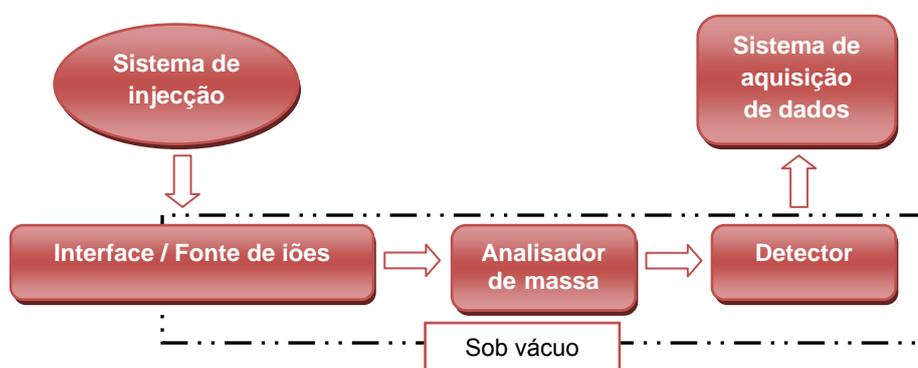


Figura 2.6 – Diagrama simplificado dos principais componentes de um espectrómetro de massa.

2.2.2 Ionização

Durante a ionização um dado analito é convertido numa espécie carregada por um de vários processos de ionização existentes, sob condições adequadas estabelecidas na fonte de iões. Os principais factores 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 ionizado¹⁰.

Durante várias décadas, a MS foi restrita à análise de compostos voláteis. Na realidade, as técnicas de ionização convencionais, nomeadamente a ionização electrónica (EI) ou a ionização química (CI) requerem que o analito esteja no estado de vapor para uma interacção efectiva com um feixe electrões, normalmente com 70 eV, ou com agentes químicos.

A EI é o método normalmente utilizado em GC-MS para a formação de iões positivos do composto a analisar e que é considerada uma técnica de ionização “dura”. Um filamento incandescente de tungsténio ou rénio emite electrões que são focados e direccionados para a câmara de ionização por um eléctrodo de potencial positivo colocado na extremidade oposta. O percurso dos electrões e das moléculas é feito perpendicularmente, intersectando-se no centro da fonte, onde ocorre a interacção e a ionização¹¹. A colisão provoca uma transferência de energia superior à necessária para a ionização das moléculas que, geralmente, é usada pelos iões para se fragmentarem de uma forma característica^{10,11}.

Por outro lado, a CI consiste na ionização de um gás reagente por acção de um feixe de electrões que origina iões reagentes, que vão interactuar com as moléculas do analito culminando na sua ionização (“suave”). O gás é introduzido na fonte de ionização a uma pressão relativamente elevada¹⁰. A calibração dos parâmetros instrumentais, o tipo e a pureza do gás reagente utilizado, a limpeza da fonte iónica, a pressão e a temperatura são factores que influenciam a eficiência do método de CI.

Utilizando EI pode ocorrer uma extensa fragmentação dos analitos e como resultado a informação relativa à massa molecular encontra-se ausente. A fragmentação sob condições EI fornece informação estrutural, enquanto que CI geralmente fornece pouca ou mesmo nenhuma informação estrutural porque origina poucos iões fragmentos. Actualmente, ambas as técnicas ainda são utilizadas como fontes de ionização. EI é o tipo de ionização mais utilizado em GC-MS, sendo a CI utilizada quando é necessária informação sobre a massa molecular dos analitos alvo.

Contudo, outros métodos de ionização que permitem a introdução de amostras líquidas, análise de grandes moléculas ou moléculas que podem sofrer degradação térmica durante a

vaporização em GC-MS, são actualmente muito utilizados. Bons exemplos são os métodos de ionização alternativos, nomeadamente as técnicas de ionização por “electrospray” (ESI) e ionização/dessorção laser em matriz assistida (MALDI).

ESI é uma técnica de ionização à pressão atmosférica (API), em maior expansão e como o próprio nome sugere é um processo de ionização que produz um “spray” constituído por gotas finamente divididas e muito carregadas sob a influência de um campo eléctrico forte. A evaporação do solvente converte estas gotas carregadas em iões em fase gasosa, sendo o mecanismo básico de formação de iões em ESI esquematicamente representado na figura 2.7.

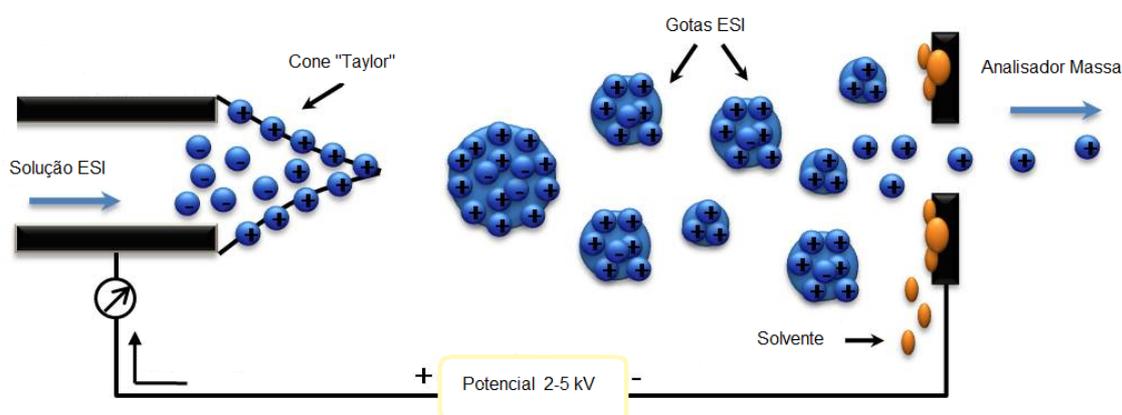


Figura 2.7 – Representação esquemática simplificada do processo ESI¹².

A solução contendo o analito é introduzida a um fluxo constante num capilar de aço-inoxidável, mantido a um potencial relativamente elevado (tipicamente 2 - 5 kV) em relação a um contra-eléctrodo. O campo eléctrico aplicado é suficientemente forte que provoca a saída da solução líquida do capilar sob a forma de um cone (“cone de Taylor”), com pulverização e formação de gotas pequenas e muito carregadas, sendo o sinal do potencial aplicado que determina a polaridade das gotas e dos iões formados¹². A nebulização da solução é nalguns casos facilitada com ajuda de um gás nebulizador.

Posteriormente, as moléculas de analito devem de alguma forma ser separadas do solvente na forma de iões. Este passo de formação dos iões ainda não é completamente compreendido e geralmente pode ser descrito por dois modelos: o de resíduo de carga e o da evaporação iónica. No modelo de resíduo de carga de Dole¹³, é considerado que à medida que o solvente se evapora, a densidade de carga à superfície aumentará até que as forças repulsivas de Coulomb entre as cargas superficiais excederão a tensão superficial levando à divisão da gota inicial (o limite de “Rayleigh” é excedido). Se este processo de divisão continuar e se a solução original for suficientemente diluída será alcançado um

estado no qual cada gota conterá uma única molécula que reterá parte da carga inicial, ou seja formar-se-ão macro iões¹⁴⁻¹⁶. Um outro modelo, para a geração de iões pequenos, o da evaporação iónica foi proposto, por Iribarne e Thomson¹⁷, que sugerem que a evaporação do solvente conduz a uma instabilidade das gotas com razões elevadas de densidade de carga superficial/raio da gota. A energia electrostática associada com a gota carregada torna-se então suficientemente grande para desadsorver iões do analito para a fase gasosa¹⁴⁻¹⁶.

As fontes iónicas dos espectrómetros de massa estão em geral situadas numa região de alto vácuo. No caso da fonte de ionização por “electrospray” ela encontra-se à pressão atmosférica e a evaporação do solvente é muitas vezes completada por intermédio de um fluxo contra corrente de um gás, em geral, azoto. Os iões gerados são depois transferidos desta zona de alta pressão para a zona de alto vácuo do analisador de massa. A redução da pressão é efectuada gradualmente, o “spray” produzido é transferido do capilar para o contra-eléctrodo sendo em seguida os iões amostrados através de um cone ou orifício passando a uma zona intermédia mantida a uma pressão mais baixa por meio de uma bomba rotatória. Posteriormente, os iões atravessam um “skimmer” em direcção ao analisador que se encontra sob alto vácuo. O “skimmer” funciona como um separador de momento sendo que os iões mais pesados passam através dele enquanto que as moléculas mais leves de gás e solvente são bombeadas (figura 2.8)¹⁴. Para melhorar a eficiência da transmissão dos iões multipolos radiofrequências (rf) (quadrupolos, hexapolos ou octopolos) são colocados entre a fonte ESI e o analisador de massa¹⁸.

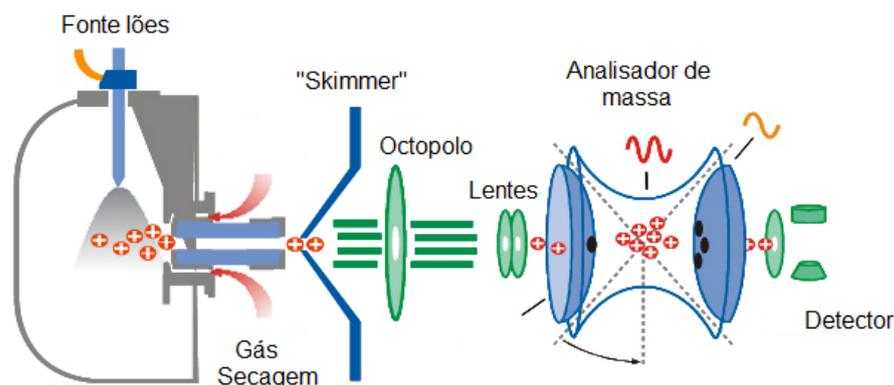


Figura 2.8 – Esquema simplificado de ESI/MS¹⁹.

A ESI requer um fornecimento constante de líquido, sendo por isso facilmente acoplada a um sistema de separação, nomeadamente a um cromatógrafo líquido. São no entanto vários os parâmetros que afectam a estabilidade do “spray”, nomeadamente a tensão

superficial, constante dielétrica, viscosidade, condutividade e velocidade de fluxo do solvente. Conseguem-se, no entanto, condições estáveis do “spray” com uma gama alargada de solventes principalmente através de misturas¹⁴. Com o enorme desenvolvimento instrumental, a LC-MS tornou-se numa técnica que pode ser aplicada em diversas áreas, nomeadamente ambiente²⁰ e bioanálise²¹.

2.2.3 Analisador de massa

Em MS, após a produção de iões será necessário efectuar a sua separação com base na sua razão massa/carga (m/z). Actualmente, há vários dispositivos que permitem efectuar esta separação, designados por analisadores de massa, tendo cada um vantagens e inconvenientes. Nos diversos tipos de analisadores existentes, os iões são separados por acção de campos magnéticos, eléctricos e também de acordo com o tempo que os mesmos levam a percorrer um determinado percurso até ao detector. As características principais de um analisador são o seu limite superior de massa, a transmissão e a resolução. O limite superior de massa determina o maior valor da m/z que pode ser medido. A transmissão é a razão entre o número de iões que chegam ao detector e o número de iões produzidos na fonte. A resolução é a capacidade de distinguir o sinal de dois iões com uma diferença de massa muito pequena⁹.

Os analisadores de sector magnético, tempo de voo, quadrupolo, e armadilha de iões (ITD) são alguns bons exemplos de analisadores de massa, sendo os dois últimos os mais frequentemente usados.

Um quadrupolo é um analisador de massa que utiliza quatro pólos eléctricos (figura 2.9) tendo sido desenvolvido por W. Paul que recebeu o Nobel da Física em 1989 pela concepção do instrumento.

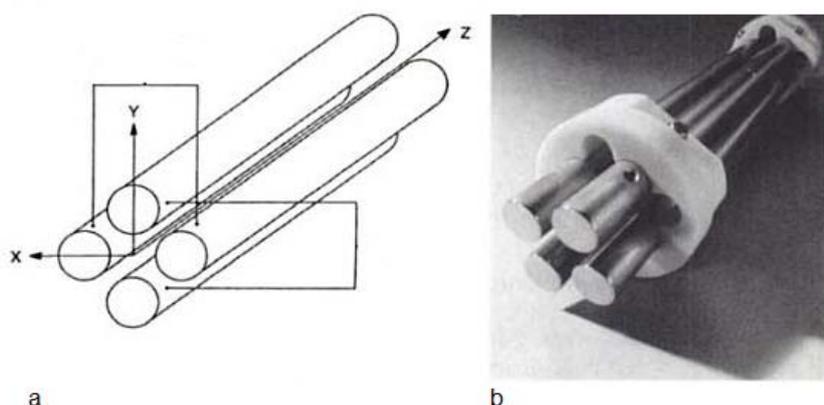


Figura 2.9 – Representação esquemática simplificada (a) e imagem (b) de um quadrupolo¹⁸.

No espectrómetro de massa contendo um quadrupolo o feixe de iões proveniente da câmara de ionização transita pelo centro de um conjunto de quatro barras metálicas paralelas, de secção recta hiperbólica ou circular, posicionadas paralelamente ao longo do eixo dos z . Um potencial com duas componentes, uma de corrente contínua e outra de rádio-frequência, é aplicado entre barras adjacentes⁹. Para uma determinada razão rádio-frequência/corrente contínua, somente iões com um valor de m/z estipulado passam pelo interior do quadrupolo sem com ele chocar, conseguindo atingir o detector. Os restantes iões são desviados do eixo e embatem no quadrupolo. O varrimento de uma gama de massas é conseguido fazendo variar a corrente contínua e a rádio-frequência, mas mantendo constante a sua razão, existindo assim uma relação linear entre as massas que passam através do quadrupolo e a amplitude da voltagem.

Pode afirmar-se que o quadrupolo é essencialmente um filtro de massa com baixa resolução. São instrumentos compactos, relativamente baratos, de fácil manutenção, exigindo experiência relativamente baixa ao operador. Apresentam ainda duas vantagens importantes, nomeadamente a facilidade de controlo através de sistemas de aquisição de dados e a facilidade de hifenação, nomeadamente a técnicas cromatográficas.

O ITD foi desenvolvido por Paul e Steinwedel na Universidade de Bonn em 1953²². Este tipo de analisador tem nos últimos anos ganho uma popularidade significativa, sobretudo, devido à sua versatilidade na análise. Um ITD tem na sua constituição três eléctrodos, sendo dois designados por “end caps”, como pode ser observado na figura 2.10, assumindo posições axiais no dispositivo, enquanto um terceiro eléctrodo, em forma de anel (“eléctrodo anelar”) se encontra a uma distância precisa dos primeiros, por intermédio de espaçadores de cerâmica ou de quartzo. Os eléctrodos “end caps” são geometricamente semelhantes, distinguidos apenas ao nível dos orifícios existentes na sua estrutura para permitir a entrada e a saída de iões. Em regra, o eléctrodo “end cap” de entrada possui apenas um orifício, que possibilita a entrada de iões, provenientes da fonte de ionização, ao passo que o eléctrodo de saída possui vários orifícios, responsáveis pela saída dos iões do analisador para a zona do detector de massa.

Aplica-se uma voltagem de rádio-frequência no eléctrodo anelar e a diferença de potencial estabelecida entre o eléctrodo anelar e os eléctrodos “end caps” origina a formação de um campo quadrupolar tridimensional. Este campo quadrupolar aprisiona os iões no espaço físico do analisador, forçando-os continuamente na direcção do centro do dispositivo. Deste modo, a força de um ião é linearmente proporcional à distância do ião ao centro do ITD. A gama de massas de iões que são armadilhados depende do valor da

rádiofrequência aplicada. Posteriormente, os iões armadilhados são eliminados pelo eléctrodo “end cap” de saída em direcção ao detector⁹.

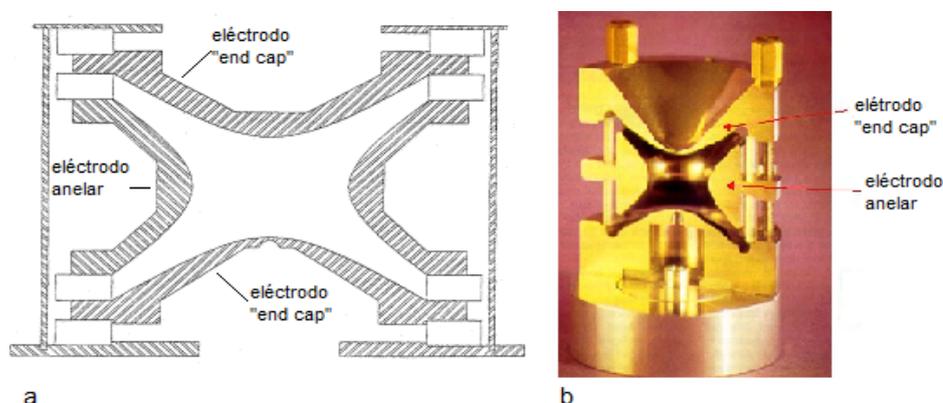


Figura 2.10 – Representação esquemática simplificada (a) e imagem (b) de um ITD²².

Uma característica importante do ITD é a possibilidade de proporcionar MS “tandem” (MS^n). Geralmente, o ião precursor é isolado e uma voltagem adicional é aplicada para facilitar colisões com um gás inerte, o qual origina a respectiva fragmentação.

2.2.4 Detecção

O detector de iões mais comumente usados em MS é o multiplicador de electrões, que apresenta um tempo de resposta rápido (da ordem dos nanosegundos), capaz de adquirir elevadas correntes, utiliza uma tensão de aceleração a fim de transformar a corrente iónica numa corrente electrónica susceptível de ser medida. Este sistema baseia-se no princípio de emissão secundária de electrões, isto é, quando o ião atinge a superfície do dínodo de conversão ocorre a libertação de alguns electrões que sofrem aceleração e colidem com o novo dínodo, iniciando outro ciclo. Deste modo, o sinal é ampliado $10^3 - 10^8$ vezes.

O multiplicador de electrões de dínodo pode ser de dois tipos, discreto ou contínuo. O discreto é constituído por cerca de 12 a 20 dínodos ligados electricamente através de uma rede de resistências, geralmente o material de que são feitos é uma liga de cobre - berílio por ter boas propriedades de emissão secundária. O contínuo é constituído por um tubo feito de vidro revestido interiormente por um material electricamente resistente e com boas propriedades de emissão secundária.

2.3 Bibliografia

- [1] D. Skoog, D. West, F. Holler, S. Crouch, "Analytical chemistry – an introduction", Saunders Coll. Pub., 7th Ed. (1999).
- [2] A. Braithwaite, F. Smith, "Chromatographic methods", Kluwer Academic Publishers, 5th Ed. (1999).
- [3] J. Kenkel, "Analytical chemistry for technicians", Lewis Publishers, 3th Ed. (2003).
- [4] http://www.comsol.com/industry/htmlpaper/waters_corp_hplc_systems/ (consultado em 6 de Janeiro de 2010).
- [5] D. Harvey, "Modern analytical chemistry", Mc Graw Hill, (2000).
- [6] <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschr.htm> (consultado em 13 de Janeiro de 2010).
- [7] E. Hoh, K. Mastovska, "Large volume injection techniques in capillary gas chromatography", *J. Chromatogr. A* **1186** (2008) 2.
- [8] S. Koning, M. Kurano, H. Janssen, U. Brinkman, "At-column, a novel concentrating technique for large-volume injections in gas chromatography", *J. Chromatogr. A* **1023** (2004) 165.
- [9] B. Ardrey, "Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction", Wiley – VCH Inc. (2003).
- [10] E. Hoffmann, V. Stroobant, "Mass spectrometry: principles and applications", Wiley – VCH Inc., 3rd Ed. (2007).
- [11] D. Skoog, D. West, F. Holler, T. Nieman, "Principles of instrumental analysis", Saunders Coll. Pub., 4th Ed. (1992).
- [12] N. Cech, C. Enke, "Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals", *Mass Spectrometry Reviews* **20** (2001) 362.
- [13] M. Dole, L. Mack, R. Hines, R. Mobley, L. Ferguson, M. Alice, "Molecular beams of macroions", *J. Chem. Phys.* **49** (1968) 2240.
- [14] M.F. Duarte, "Espectrometria de massa de electrospray – Técnica do presente e do futuro", *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química* **80** (2001) 36.
- [15] S. Gaskell, "Electrospray: principles and practice", *J. Mass Spectrom.* **32** (1997) 677.
- [16] M. Vestal, "Methods of ions generation", *Chem. Rev.* **101** (2001) 361.

[17] J. Iribarne, B. Thomson, “On the evaporation of small ions from charged droplets”, *J. Chem. Phys.* **64** (1976) 2287.

[18] C. Dass, “Fundamentals of contemporary mass spectrometry”, Wiley – VCH Inc., 1st Ed. (2007).

[19] <http://www.proteomics.be/> (consultado em 25 de Janeiro de 2010)

[20] W. Buchberger, “Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, wastewater, sediment and sludge”, *Anal. Chim. Acta* **593** (2007) 129.

[21] J. Xing, C. Xie, H. Lou, “Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in natural products bioanalysis”, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **44** (2007) 368.

[22] R. March, “Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century”, *Int. J. Mass Spectrom.* **200** (2000) 285.

Capítulo 3

Técnicas de Preparação de Amostras

3.1 Introdução

Qualquer método analítico é geralmente constituído por diversas etapas, incluindo a amostragem, preparação de amostra, selecção da técnica ou instrumentação, assim como análise e avaliação estatística. Estas etapas são sucessivas e cada uma é fundamental para a fiabilidade dos resultados obtidos¹.

O passo de preparação de amostra é, geralmente, o passo limitante de todo o processo analítico, demorando em média até cerca de dois terços do tempo total de análise, sendo ainda o principal responsável por eventuais erros ocorridos, assim como na discrepância de alguns valores vulgarmente encontrados entre laboratórios. Em regra, o seu principal objectivo é transformar a amostra laboratorial em amostra analítica, ou seja, para uma forma mais adequada de introdução na instrumentação. Envolve diversos passos, nomeadamente extracção dos analitos da matriz, remoção de interferentes e concentração, permitindo alcançar menores limites de detecção. Em alguns casos o passo de derivatização pode igualmente ser importante².

A escolha do método de preparação de amostra depende principalmente da natureza dos analitos (por exemplo, volatilidade ou polaridade), da natureza da matriz e do nível de concentração pretendida. A extracção líquido-líquido (LLE) durante alguns anos foi a técnica de eleição em química analítica, surgindo em muitos métodos oficiais devido à elevada simplicidade². Porém, esta técnica requer grandes volumes de amostra e de solvente orgânico, para ganho de sensibilidade com diminuição dos limites de detecção, o que não é compatível com a tendência dominante de miniaturização, com vista a maior eficácia no trabalho laboratorial, redução dos volumes de solvente orgânico e de amostra³.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novas metodologias que conseguem conjugar a miniaturização com redução ou mesmo eliminação do consumo de solventes orgânicos (“solventless”), para enriquecimento de compostos alvo em diversos tipos de matrizes, tem-se tornado uma tendência em química analítica⁴. Estas metodologias incluem a micro-extracção líquido-líquido (μ LLE), a extracção em fase sólida (SPE) que já se encontra largamente estabelecida e mais recentemente, as técnicas de extracção sortiva, incluindo a micro-extracção em fase sólida (SPME) e a extracção sortiva em barra de agitação (SBSE)³.

Qualquer técnica de preparação de amostra deverá apresentar um bom desempenho analítico, incluindo eficiência, selectividade, sensibilidade e aplicabilidade para diversos tipos de analitos e matrizes. Idealmente, deverá ser de fácil manipulação, económica e compatível com os equipamentos analíticos mais comuns¹.

3.2 Extracção líquido-líquido (LLE)

A LLE tem sido particularmente utilizada no enriquecimento de compostos orgânicos semi-voláteis, onde o fenómeno de distribuição ou partição é descrito por diferenças de polaridade ou solubilidade dos solutos entre a amostra em estudo, geralmente uma matriz aquosa e uma fase orgânica imiscível (*n*-hexano, diclorometano (DCM), entre outros)³. Para além da afinidade do analito para o solvente, a selectividade e a eficiência da extracção também dependem da razão de volume para cada fase e do número de passos de extracção².

O coeficiente de distribuição análogo a uma constante de equilíbrio (também designado por coeficiente de partição) pode ser definido como:

$$K_D = C_{org}/C_{aq} \quad \text{equação 3.1}$$

onde K_D é o coeficiente de distribuição, C_{org} e C_{aq} a concentração do soluto na fase orgânica e na fase aquosa, respectivamente. Muitas vezes K_D é igual à razão de solubilidades do soluto em cada uma das fases⁵.

Para operação laboratorial, a LLE recorre às tradicionais ampolas de decantação, requerendo genericamente volumes de amostra consideráveis (0,2 - 2 L) para ganho de sensibilidade e de solvente orgânico (5 - 100 mL), no sentido de recuperar eficazmente os solutos com interesse³.

Após a adição das duas fases na ampola inicia-se a agitação vigorosa da mistura, que pode ser manual ou mecânica. A agitação permite maximizar o contacto entre as duas fases, permitindo assim uma eficiente partição dos analitos. Depois de um tempo adequado de repouso o solvente orgânico é retirado e adiciona-se novamente solvente, sendo o processo repetido. O processo deverá ser repetido pelo menos três vezes, adicionando-se no final todos os extractos recolhidos.

Terminado o procedimento de extracção, a concentração do analito no extracto recolhido poderá não ser suficiente para ser susceptível de detecção pela instrumentação seleccionada. Desta forma, é necessário evaporar algum solvente para concentrar o analito num pequeno volume de solução. Esta evaporação pode ser efectuada sob corrente de azoto ou com recurso a equipamentos para o efeito⁵. Podem, no entanto, ocorrer perdas ou degradação dos analitos durante o passo de evaporação, sendo por isso necessário efectuar alguns ensaios prévios para verificar se algum destes problemas ocorre².

A principal vantagem da LLE é a simplicidade de execução sendo o equipamento requerido simples e económico. Um outro argumento muitas vezes utilizado a favor da LLE

é o de os solutos poderem ser extraídos tanto de matrizes aquosas como de matrizes sólidas².

Como principais desvantagens enunciam-se a possibilidade de ocorrer emulsões (principalmente em amostras que contenham surfactantes ou matéria gorda), as quais são muitas vezes difíceis de eliminar; a evaporação de solventes muitas vezes tóxicos e inflamáveis; a exposição do analista aos solventes; os solventes usados terem de possuir pureza adequada (o processo de concentração também concentra as impurezas); o material ter de ser lavado e armazenado sob condições rigorosas por forma a evitar contaminações; grandes quantidades de amostras terem de ser transportadas e armazenadas no laboratório; a velocidade de extracção poder diferir para o mesmo soluto de matriz para matriz; por vezes ser difícil comparar recuperações obtidas por diferentes laboratórios devido às diferentes condições de extracção (pH, razão de fases, número e tempo das extracções, salinidade), para além de não ter possibilidade de automatização².

3.3 Extracção em fase sólida (SPE)

A SPE tornou-se numa técnica de preparação de amostra de eleição para a extracção, concentração e purificação de muitos solutos em diversos tipos de matrizes. Os solutos são removidos da matriz por contacto desta com uma fase sólida (técnica dinâmica) e consequente remoção dos solutos com um solvente adequado².

O conhecimento das propriedades adsorptivas das superfícies sólidas remonta a várias décadas atrás, tendo a utilização do carvão activado (AC) no tratamento e purificação de água na década de 50 incentivado a aplicação da técnica de SPE⁶. O desenvolvimento de novos materiais com a capacidade para reter os solutos com diferente polaridade, a capacidade de automatização e a possibilidade de acoplar a SPE a uma técnica de separação incentivou ao desenvolvimento da SPE e tornou-a numa técnica de preparação de amostra de eleição para diversos tipos de aplicações².

O formato dos dispositivos de SPE pode variar, sendo o mais usual o cartucho em polipropileno, podendo ser usado também o de vidro ou politetrafluoretileno. Outro formato são os discos, que surgiram mais tarde, e apresentam aproximadamente 0,5 mm de espessura e um diâmetro compreendido entre 47 e 70 mm. Tanto os cartuchos como os discos apresentam vantagens e desvantagens, como por exemplo, a fina camada de fase extractiva e a grande área superficial presente no disco permite uma elevada velocidade de fluxo de solvente. No entanto, elevadas velocidades de fluxo podem resultar em menor percentagem de recuperação, devido ao menor tempo de contacto soluto/adsorvente⁷.

Após o desenvolvimento e a vasta aplicação desta técnica, ficou bem claro que não existe uma fase extractiva universal capaz de extrair analitos significativamente distintos nas mais diversas aplicações. Será necessário fazer uma selecção das fases sólidas consoante a área de trabalho ou famílias particulares de compostos que se pretendam analisar³. O tipo de enchimento sólido deve ser seleccionado de acordo com os mecanismos de retenção pretendidos e pode ser classificado como fase normal, possuindo grupos funcionais polares (ciano, amino, diol, entre outros); fase reversa, possuindo grupos funcionais apolares (octadecil, octil, metil, entre outros); troca-iónica, podendo conter grupos funcionais aniónicos ou catiónicos (trimetilaminopropil, carboximetil, entre outros)⁷.

Nos enchimentos apolares ou de fase reversa, ocorrem interacções devido às forças de “van der Waals” de tipo hidrofóbico e nos polares ou de fase normal, interacções de tipo hidrofílico através de dipolos instantâneos ou induzidos e por pontes de hidrogénio. Nos enchimentos de troca iónica, ocorrem atracções electrostáticas entre os solutos e o grupo carregado da fase sólida³.

Independentemente do formato do dispositivo, disco ou cartucho, o modo de operação é o mesmo e pode ser dividido em cinco etapas. Num primeiro passo é necessário proceder à selecção do enchimento que conduza à retenção dos analitos em estudo, sendo determinado pela natureza do analito, aplicando-se o princípio de “polar dissolve polar” e “apolar dissolve apolar”. Um segundo passo consiste no condicionamento do enchimento com a finalidade de o activar. Num terceiro passo, a amostra cujo volume pode ser de alguns mililitros até algumas centenas de mililitros, é adicionada ao dispositivo de SPE, podendo ser ainda vantajoso o controlo do pH ou da força iónica para a retenção mais efectiva dos analitos. A passagem da amostra pelo dispositivo deverá de ser efectuada sob vácuo, sendo necessário controlar a velocidade do fluxo, uma vez esta poder influenciar o fenómeno de retenção associado. Devido à possibilidade de ocorrer retenção de interferentes na fase sólida, principalmente com compostos de estrutura química semelhante à dos analitos alvo, um quarto passo tem por objectivo a eliminação dos mesmos, utilizando solventes adequados, sem influenciar a retenção dos analitos em estudo. Após secagem, procede-se ao último passo que consiste na eluição dos analitos alvo, com recurso a um solvente com polaridade adequada, cujo volume pode variar entre algumas centenas de microlitros a alguns mililitros, consoante o teor e as características de polaridade dos compostos envolvidos. Após concentração para eliminação do solvente por forma a baixar os limites de detecção dos analitos em estudo, parte do extracto é submetido a análise cromatográfica^{3,7}.

A SPE tem vindo a substituir a LLE devido às vantagens que apresenta, nomeadamente redução da quantidade de solventes orgânicos, não forma emulsões, precisa e geralmente apresenta níveis de recuperação mais elevados. No entanto, apesar das vantagens apresentadas as técnicas de preparação de amostras direccionam-se cada vez mais para a diminuição do volume de amostra, redução do número de passos analíticos, isenção de solventes orgânicos tóxicos, miniaturização dos sistemas extractivos, sendo estas características inerentes às inovadoras técnicas de extracção sortiva.

3.4 Técnicas de extracção sortiva

As técnicas de extracção sortiva surgiram no final do século passado⁴ e têm despertado grande interesse nos últimos anos, uma vez apresentarem elevado potencial de recuperação analítico, serem “amigas do ambiente” e estarem integradas na designada “química verde”, mostrando ser uma alternativa clara à LLE e SPE, principalmente em análise vestigial.

A fase de extracção mais utilizada é o polidimetilsiloxano (PDMS), bem conhecida pela sua utilização como fase estacionária em GC, sendo termoestável, mais inerte que os adsorventes convencionais, podendo ser usada a temperaturas compreendidas entre 220 e 320 °C, contendo importantes propriedades de difusão⁸. Uma vez que no processo de extracção o que ocorre é a absorção e não a adsorção dos analitos, este material não promove a degradação dos analitos com interesse e devido às fracas interacções que se estabelecem os analitos podem ser dessorvidos com elevada facilidade⁹.

A extracção sortiva é por natureza um fenómeno de equilíbrio, no qual o processo de enriquecimento é controlado pelo coeficiente de partição dos analitos entre a fase polimérica e a matriz da amostra, integrando actualmente estas técnicas para além de outras, a micro-extracção em fase sólida (SPME) e a extracção sortiva em barra de agitação (SBSE)³.

3.4.1 Micro-extracção em fase sólida (SPME)

No final da década de oitenta Pawliszyn e colaboradores introduziram uma nova técnica analítica de extracção, a SPME baseada na sorção dos analitos presentes por exemplo numa matriz aquosa para uma camada polimérica^{1,10}.

O modo de operação da SPME está ilustrada na figura 3.1. Uma fibra de sílica fundida (1cm em comprimento e um diâmetro interno com $\approx 150 \mu\text{m}$) revestida com um material

solvente contendo uma espessura de 5 a 100 μm , está ligada a um êmbolo de aço inoxidável, o qual está inserido num suporte semelhante a uma micro-seringa modificada. O êmbolo movimenta a fibra de sílica fundida para dentro e fora de uma agulha oca. Para utilizar este sistema, o utilizador recolhe a fibra para dentro da agulha, passa a agulha através do septo do frasco de amostragem, faz descer o êmbolo e expõe a fibra no espaço de cabeça (“headspace”, HS) ou mergulha-a na amostra. Subsequentemente, compostos orgânicos são sorvidos pelo revestimento da fibra e após se alcançar o tempo de equilíbrio recolhe-se a fibra para dentro da agulha e retira-se a agulha do frasco de amostragem. Por fim a agulha é inserida no injector do cromatógrafo gasoso ou líquido, onde os analitos sofrem dessorção térmica ou líquida, respectivamente, sendo libertados para a coluna do cromatográfica¹¹.

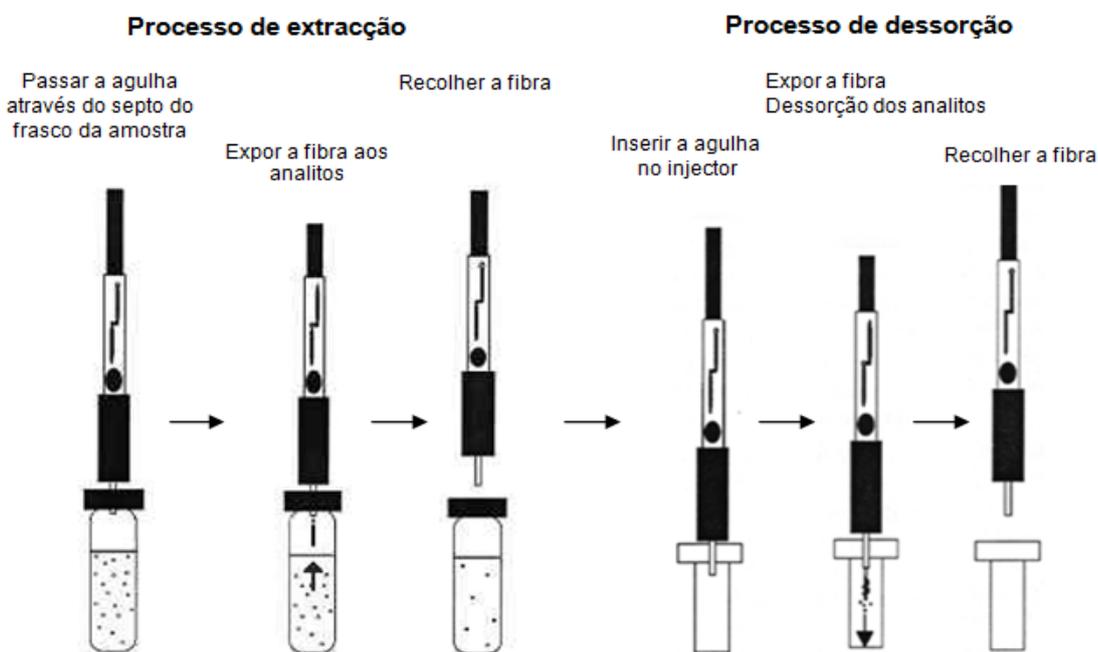


Figura 3.1 – Processo de extração e de dessorção no processo de SPME-GC, após amostragem por HS¹¹.

Na SPME em que a fibra está imersa na amostra, os analitos difundem-se directamente da matriz da amostra para o revestimento da fibra no qual são concentrados. Sem agitação da amostra o tempo requerido para alcançar o equilíbrio é limitado pela difusão da fase líquida, pelo que a extração é geralmente efectuada sob agitação. Na HS-SPME ocorre partição dos analitos voláteis entre a fase vapor e a matriz da amostra, o que permite diminuir significativamente o tempo de extração, uma vez a velocidade de difusão em fase gasosa ser maior do que em fase líquida³. A temperatura tem um efeito significativo na

cinética do processo de extracção por HS, uma vez que determina a pressão de vapor dos analitos. Uma das vantagens da extracção por HS é a protecção da fibra dos efeitos adversos causados pelas substâncias não voláteis com elevado peso molecular presentes na matriz das amostras, nomeadamente, proteínas, permitindo ainda modificações na matriz, incluindo ajustes de pH, sem afectar a fibra¹⁰.

O transporte dos analitos da matriz para o revestimento da fibra começa assim que esta é colocada em contacto com a amostra. O processo da SPME considera-se completo quando a concentração do analito alcança o equilíbrio de distribuição entre a matriz e o revestimento da fibra. Isto significa que, uma vez alcançado o equilíbrio, a quantidade extraída é constante dentro de limites de erro tolerável. A condição de equilíbrio, a temperatura constante, pode ser descrita através da equação:

$$n_{\text{ext}} = \frac{K_{\text{fs}} V_f V_s C_0}{K_{\text{fs}} V_f + V_s} \quad \text{equação 3.2}$$

onde n_{ext} é a quantidade de analito extraída pelo revestimento da fibra, K_{fs} é a constante de distribuição entre o revestimento da fibra e a amostra, V_f é o volume do revestimento da fibra, V_s é o volume da amostra e C_0 é a concentração inicial de um dado analito na amostra. A quantidade de analito extraída depende da espessura da fibra e da constante de distribuição. A equação 3.2 mostra que existe uma relação de proporcionalidade directa entre a concentração da amostra e a quantidade de analito extraído. No entanto, quando o volume da amostra é substancialmente maior ($V_s \gg K_{\text{fs}} V_f$), a equação 3.2 pode simplificar-se:

$$n_{\text{ext}} = K_{\text{fs}} V_f C_0 \quad \text{equação 3.3}$$

Na equação 3.3, a quantidade de analito extraída é directamente proporcional à concentração na matriz e independente do volume de amostra. Daí que na prática a fibra pode ser exposta directamente no meio a analisar (ar, água, entre outros)¹.

O processo de optimização consiste na selecção do tipo e espessura da fibra, optimização do tempo e temperatura de dessorção, optimização do processo de extracção, nomeadamente tempo de extracção, velocidade de agitação, temperatura, modificador do meio, pH e força iónica².

Um dos aspectos críticos na optimização da SPME é a selecção do tipo de fibra específica para os compostos com interesse analítico. Actualmente, as fibras disponíveis apresentam diferentes combinações de revestimento, misturas ou copolímeros, espessura do filme, porosidade, superfície activa de modo a abranger diversas áreas de aplicação. As

fibras comercialmente disponíveis são à base de PDMS, poliacrilato, carboxen-PDMS, carbowax-divinilbenzeno, divinilbenzeno-carboxen-PDMS e PDMS-divinilbenzeno. Em geral, os revestimentos apolares, como o PDMS, apresentam excelente sensibilidade para analitos apolares, enquanto revestimentos polares como o poliacrilato são mais adequados para a extracção de analitos polares. Os revestimentos mistos proporcionam extracção de analitos com características de polaridade intermédia ou quando os compostos alvo têm uma alargada gama de polaridade.

Esta técnica é caracterizada por elevada simplicidade, baixo custo, facilidade de automatização, pequeno volume de amostra, grande eficiência, redução do tempo de análise, elevada selectividade, possibilidade de pré-tratamento da amostra *in situ* e, não menos importante, a capacidade simultânea de extrair, concentrar e introduzir na instrumentação os analitos em estudo, sem a utilização de solventes orgânicos².

Na SPME, as fibras apresentam como vantagem o facto de poderem ser reutilizadas, dependendo, no entanto, do tipo de aplicação a que as mesmas são sujeitas, da complexidade da matriz da amostra, das condições experimentais e cuidados no respectivo manuseamento uma vez serem frágeis, exigindo ainda condicionamento e optimização antes da respectiva utilização³. Actualmente, apesar da técnica de SPME já permitir automatização, a grande limitação que apresenta é a reduzida quantidade de fase extractiva utilizada. Consequentemente, a eficiência de extracção de analitos ao nível vestigial em matrizes complexas pode ser drasticamente limitada. Com base nestas considerações, foi recentemente concebida e desenvolvida a SBSE, como técnica inovadora, muito sensível e poderosa no enriquecimento de compostos orgânicos vestigiais em análise cromatográfica^{2,3}.

3.4.2 Extracção sortiva em barra de agitação (SBSE)

A SBSE foi introduzida em 1999 por Pat Sandra e seus colaboradores⁹, como uma técnica de preparação de amostra baseada na extracção sortiva, na qual os analitos são extraídos para um polímero que reveste uma barra magnética, tendo a técnica sido designada comercialmente por “twister” (Gerstel). Esta técnica baseia-se nos mesmos princípios de equilíbrio da SPME, embora apresente maior capacidade e portanto grande sensibilidade⁴.

Cada dispositivo utilizado na SBSE (figura 3.2) é constituído por uma barra magnética que promove o movimento rotacional da placa de agitação para a matriz aquosa, envolta por uma fina película de vidro revestida com PDMS que é responsável pela extracção dos

analitos. A película de vidro é essencial, pois previne a decomposição do PDMS catalisada pelo metal do magnete⁸. A quantidade de PDMS pode variar com o comprimento da barra (1 a 2 cm), estando comercialmente disponíveis barras revestidas com 0,5 a 1 mm em PDMS⁴.

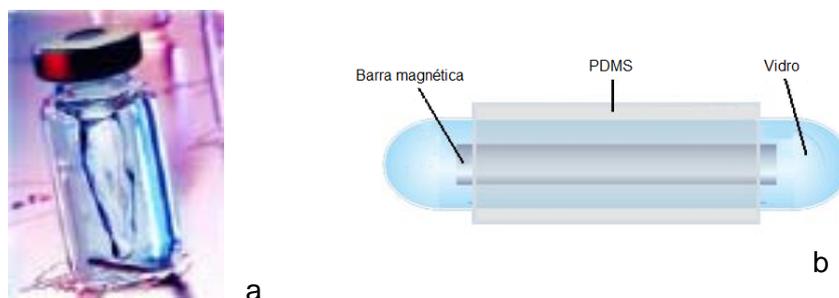


Figura 3.2 – Imagem da SBSE durante o processo de extracção (a) e representação esquemática da barra de agitação usada (b)¹².

Num ensaio típico, a barra é introduzida na amostra aquosa e a extracção começa a ocorrer durante a agitação. O tempo de extracção é controlado cineticamente, determinado pelo volume de amostra, velocidade de agitação e quantidade em PDMS, devendo de ser optimizado para cada aplicação. Deverá ainda ser optimizado o pH, polaridade e força iónica do meio aquoso. Após um determinado tempo de agitação, a barra é removida da amostra, limpa para remover gotas de água e introduzida num tubo de vidro para dessorção térmica (TD). Em alguns casos é recomendada a lavagem da barra com água destilada para remover eventuais interferentes. Finalmente os analitos são termicamente dessorvidos numa unidade de TD, “online” com um injector PTV, sendo posteriormente criofocados e analisados por GC. As temperaturas de dessorção são dependentes da volatilidade dos analitos alvo, variando vulgarmente entre 150 e 300 °C. A dessorção pode demorar entre 5 a 15 min utilizando um fluxo de hélio de 10-50 mL/min⁸. Alternativamente a dessorção líquida (LD) pode ser igualmente uma opção, na qual a barra é agora colocada num “via” (2 mL), sendo o processo efectuado com um solvente adequado, como por exemplo metanol (MeOH) ou acetonitrilo (ACN), seguido de análise por GC¹³⁻¹⁵, HPLC¹⁶ ou ainda electroforese capilar (CE)¹⁷.

A teoria da SBSE é semelhante à da SPME, partindo do pressuposto que o coeficiente de partição entre o PDMS e a água ($K_{PDMS/W}$) é aproximado do coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}), para um dado soluto. O coeficiente $K_{PDMS/W}$ é por definição a razão entre a concentração do analito na fase de PDMS (C_{PDMS}) e na fase aquosa (C_W), após o equilíbrio ser alcançado. Este parâmetro pode ser calculado através da razão entre a massa do analito na fase de PDMS (m_{PDMS}) e na fase aquosa (m_W), multiplicada pela razão de fase (β),

que relaciona o volume de amostra aquosa (V_W) e o volume em PDMS (V_{PDMS}), como é expresso na equação 3.4:

$$K_{O/W} \approx K_{PDMS/W} = \frac{C_{PDMS}}{C_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \times \frac{V_W}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \times \beta \quad \text{equação 3.4}$$

A eficiência da extracção ou recuperação expressa em percentagem, pode ser calculada através da razão entre quantidade de analito extraída (m_{PDMS}) e a quantidade de analito presente inicialmente ($m_0 = m_W + m_{PDMS}$). Esta relação permite ainda estimar a recuperação para um dado analito, sabendo o respectivo $K_{O/W}$ e β envolvida, como mostra a equação 3.5. Com esta equação pode-se estimar a recuperação teórica para um determinado soluto⁸:

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{m_{PDMS}}{m_0} \times 100 = \frac{\frac{K_{O/W}}{\beta}}{1 + \frac{K_{O/W}}{\beta}} \times 100 \quad \text{equação 3.5}$$

Dependendo do $K_{O/W}$, os compostos são extraídos em maior ou menor extensão e quanto maior for a quantidade de PDMS, menor é a relação de fase e conseqüentemente, mais elevada será a eficiência de extracção^{3,8}.

A figura 3.3 ilustra a influência do $K_{O/W}$ e β na eficiência da extracção para a SPME e SBSE, evidenciando que a recuperação obtida por SBSE é quantitativamente superior à obtida por SPME, em idênticas condições experimentais. Deste modo, verifica-se um aumento de sensibilidade de um factor de 50 a 250 vezes devido ao maior conteúdo de PDMS envolvido⁸. De acordo com a literatura, para analitos com valores de $\log K_{O/W}$ superiores a 3,0, são normalmente obtidas recuperações quantitativas por SBSE⁸. No entanto, a calibração continua a ser possível, mesmo após extracção incompleta, que pode ocorrer para analitos com $\log K_{O/W}$ inferior a 3 ou ainda em situações de não equilíbrio³.

Por vezes as recuperações calculadas afastam-se das recuperações obtidas experimentalmente, o que pode ser explicado pelo facto do $K_{O/W}$ ser apenas uma aproximação grosseira do $K_{PDMS/W}$, o equilíbrio não ter sido alcançado e/ou poder ocorrer adsorção dos analitos nas paredes do frasco de amostragem⁹. Este efeito (“wall-effect”) ocorre essencialmente para analitos mais apolares, minimizando-se com recurso à adição de um modificador orgânico à amostra, como por exemplo o MeOH. O modificador orgânico vai afectar a partição PDMS-água, embora nestas situações o efeito normalmente resulte num compromisso com maior percentagem de recuperação⁴.

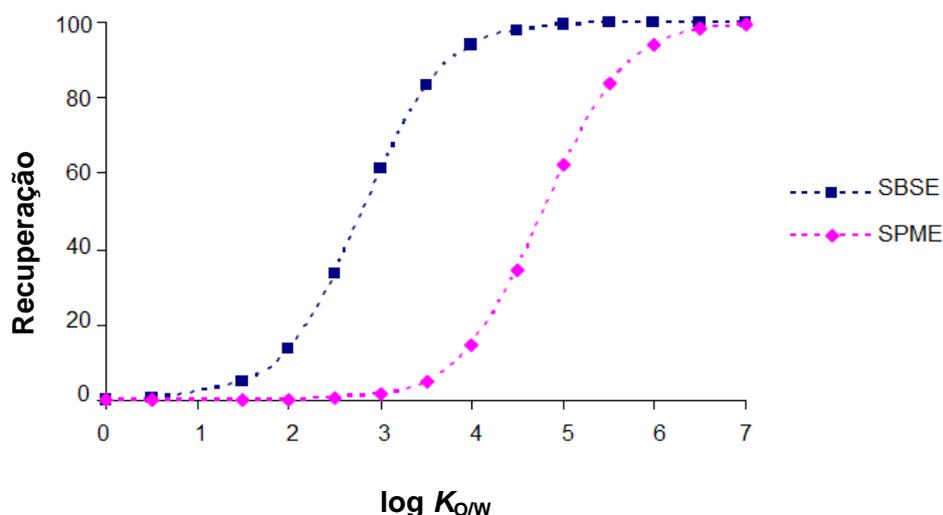


Figura 3.3 – Comparação da eficiência extractiva por SPME (PDMS: 0,5 μ L) e SBSE (PDMS: 47 μ L) em função $\log K_{OW}$, em idênticas condições experimentais³.

Em suma, a SBSE é uma técnica de extracção e concentração que pode ser usada com sucesso para a determinação de compostos orgânicos ao nível vestigial em matrizes aquosas e alimentares, fluidos biológicos, entre outras. Em condições não agressivas, as barras de agitação apresentam como grande vantagem o facto de poderem efectuar dezenas ou mesmo centenas de extracções consecutivas sem manifestarem sinais de deterioração, podendo a SBSE ser genericamente aplicada directamente na matriz da amostra ou alternativamente no HS³.

Contrariamente à SPME, para a qual já existem no mercado diversos tipos de revestimentos poliméricos, na SBSE apenas se encontram comercializadas barras de agitação revestidas com PDMS, o que limita na extracção de analitos mais polares, a menos que se proceda a estratégias de derivatização. Neste sentido, tem-se assistido recentemente ao desenvolvimento de novos materiais poliméricos para sorção e conceitos inovadores em relação às técnicas de preparação de amostra, com a finalidade de recuperar analitos mais polares, pelo que este assunto irá ser abordado no próximo capítulo.

3.5 Bibliografia

- [1] J. Pawliszyn, "Solid Phase Microextraction – Theory and practice", Wiley – VCH Inc. (1997).
- [2] D. Barceló, M. Hennion, "Trace determination of pesticides and their degradation products in water", Elsevier 2nd Ed. (2003).
- [3] C. Almeida, P. Rosário, P. Serôdio, J.M.F. Nogueira, "Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica", Boletim da Sociedade Portuguesa de Química **88** (2003) 65.
- [4] F. David, P. Sandra, "Stir bar sorptive extraction for trace analysis", *J. Chromatogr. A* **1152** (2007) 54.
- [5] J. Kenkel, "Analytical chemistry for technicians", Lewis Publishers, 3th Ed. (2003).
- [6] I. Liška, "Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview", *J. Chromatogr. A* **885** (2000) 3.
- [7] J. Dean, "Extraction methods for environmental analysis", Wiley – VCH Inc. (1998).
- [8] F. David, B. Tienpont, P. Sandra, "Stir bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrices", *LC-GC Europe* **16** (2003) 410.
- [9] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, "Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous sample: theory and principles", *J. Microcolumn. Sep.* **11** (1999) 737.
- [10] C. Arthur, J. Pawliszyn, "Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers", *Anal. Chem.* **62** (1990) 2145.
- [11] Supelco, "Solid phase microextraction: theory and optimization of conditions", Bulletin **923** (1998).
- [12] J. Stoutjesdijk, A. Hoffmann, "Stir bar sorptive extraction (SBSE) – Technique and instrumentation", Gerstel GmbH & Co.KG (2005).
- [13] P. Serôdio, J.M.F. Nogueira, "Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography–mass spectrometry detection", *Anal. Chim. Acta* **517** (2004) 21.
- [14] P. Serôdio, J.M.F. Nogueira, "Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water", *Water Res.* **40** (2006) 2572.

- [15] P. Serôdio, M. Salomé Cabral, J.M.F. Nogueira, "Use of experimental design in the optimization of stir bar sorptive extraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers in environmental matrices", *J. Chromatogr. A* **1141** (2007) 259.
- [16] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, "Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection", *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 1303.
- [17] P. Rosário, J.M.F. Nogueira, "Combining stir bar sorptive extraction and MEKC for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in environmental and biological matrices", *Electrophoresis* **27** (2006) 4694.

Capítulo 4

**Técnicas Emergentes de
Preparação de Amostras**

4.1 Introdução

A extracção de compostos polares ($\log K_{OW} < 3$) de diversos tipos de matrizes continua ainda hoje a ser um desafio para os químicos analíticos. Nos últimos anos, diversos grupos de investigação têm centrado a sua atenção no desenvolvimento de novas fases extractivas por forma a melhorar o processo de extracção deste tipo de compostos. No caso da SPE, as novas fases têm sido testados nos cartuchos ou nos discos; na SPME têm sido preparadas fibras cobertas com novas fases poliméricas; e na SBSE têm sido propostas novas fases no sentido de colmatar as limitações do PDMS para a extracção de compostos polares. Para além do desenvolvimento e aplicação de novas fases extractivas, alguns grupos também têm dispendido algum do seu tempo no desenvolvimento de novos dispositivos, criando assim conceitos inovadores e diferentes abordagens para as técnicas de enriquecimento.

Neste capítulo irá ser dada uma visão global sobre novas abordagens que têm surgido para a extracção de compostos polares, por forma a garantir uma melhoria na selectividade e sensibilidade durante a análise. É de salientar que, apesar do desenvolvimento que tem ocorrido até ao momento, ainda é necessário dar continuidade à investigação nesta área, de modo a simplificar a extracção dos compostos mais polares, particularmente em matrizes complexas.

4.2 SBSE - Novas estratégias

Conforme referido na secção anterior, a SBSE é uma técnica integrada na designada “química verde”, que oferece elevada sensibilidade para a extracção de compostos apolares, embora evidencie limitações para os mais polares. Neste sentido, novas estratégias ou novas fases extractivas são requeridas para ultrapassar diversas contrariedades, alargando assim a maior aplicabilidade da SBSE.

Uma das propostas iniciais para responder a estas limitações foi introduzida por Bichi e colaboradores¹, com o desenvolvimento de uma barra de agitação inovadora constituída por um tubo à base de PDMS, que contém no seu interior um material adsorvente, por exemplo AC, sendo fechado por dois magnetes que possibilitam a agitação durante o processo de extracção. Esta barra combina o processo de adsorção e de absorção, revelando uma maior capacidade de extracção para compostos voláteis e mais polares, quando comparado com as convencionais barras de PDMS. Contudo, esta nova abordagem continua a depender da afinidade do analito para o PDMS, uma vez que a extracção com esta barra envolve a sorção dos analitos da matriz para o PDMS, seguido da sua difusão pela camada polimérica e finalmente a adsorção no sólido^{1,2}.

Por outro lado, dispositivos alternativos também têm sido propostos^{3,4,5}, como por exemplo cilindros de PDMS, embora continuem a evidenciar limitações para a extracção de compostos mais polares, uma vez a fase utilizada para a extracção ser PDMS. Apresentam como principal vantagem a robustez e o baixo custo, uma vez que muitos destes dispositivos não necessitam de unidade de TD.

Na última década, diversos autores têm apresentado novas fases poliméricas como alternativa ao PDMS, no entanto muitas das propostas apresentadas são apenas aplicadas a uma gama muito restrita de analitos, não conseguindo igualar a robustez e a abrangência demonstrada por aquele polímero. Em 2005, foi preparado um material de acesso restrito (RAM) para revestir as barras de agitação. Neste trabalho, cafeína e diversos metabolitos foram extraídos de fluidos biológicos, sendo este passo de extracção muito mais simples relativamente aos métodos já implementadas para amostras biológicas⁶. Outra técnica que tem sido proposta para a síntese de novos revestimentos para a SBSE inclui a impressão molecular em polímeros (MIP). Em 2006, X. Zhu e colaboradores prepararam uma barra de extracção usando como revestimento um filme “imprinted nylon-6” para a análise de pesticidas organofosforados, obtendo recuperações superiores a 80 %⁷. Considerando que os MIP podem ser sintetizados usando diversas moléculas modelo, uma vasta gama de filmes selectivos podem ser preparados por forma a estender a aplicação da SBSE.

A tecnologia sol-gel também tem sido proposta para preparar novos revestimentos para a SBSE. Liu e colaboradores descreveram a utilização desta tecnologia na preparação de barras para a extracção de *n*-alcanos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e pesticidas organofosforados⁸. Mais recentemente, Hu e colaboradores usaram a tecnologia sol-gel para a preparação de barras de agitação revestidas com compósitos de PDMS/ β -ciclodextrina, a qual foi testada na análise de estrógenos e bisfenol A, apresentando uma maior selectividade para os compostos mais polares relativamente ao PDMS⁹.

Huang e colaboradores, desenvolveram novas fases à base de poliácrlato para a extracção de PAHs, hormonas esteróides e fenóis em diversas matrizes ambientais e biológicas. Estas fases poliméricas demonstraram ser eficazes para a extracção de analitos tanto polares como apolares¹⁰⁻¹³. Lanças e colaboradores modificaram o PDMS e revestiram as barras de agitação com este material modificado. As novas fases foram aplicadas na extracção de diversas classes de analitos, tendo provado uma maior capacidade de extracção relativamente ao PDMS convencional¹⁴.

Um novo revestimento polimérico constituído por uma dupla fase, PDMS/polipirrol foi igualmente desenvolvido para SBSE de antidepressivos em amostras de plasma. Este

revestimento demonstrou elevada eficiência de extracção com boa sensibilidade e selectividade para aqueles analitos alvo¹⁵.

Nos últimos anos, Nogueira e colaboradores têm vindo a utilizar espumas de poliuretano (PU) como fase extractiva para SBSE. Numa primeira abordagem, testaram e compararam este polímero na extracção de três compostos com diferentes características de polaridade (triazina, 2,3,4,5-tetraclorofenol e fluoreno) com o revestimento convencional de PDMS, tendo também dopado o PU com diversos materiais adsorventes¹⁶. Após terem verificado que os resultados preliminares eram muito promissores, optimizaram o processo de síntese do PU e demonstraram que o polímero seleccionado apresentava uma notável estabilidade e excelente resistência mecânica e que poderia ser utilizado para o enriquecimento de pesticidas e metabolitos em matrizes aquosas^{17,18}. Em todos estes estudos obtiveram uma percentagem de recuperação mais elevada com o PU relativamente ao PDMS.

Posteriormente, Lanças e seus colaboradores também desenvolveram e aplicaram um revestimento de PU dopado com AC, tendo sido testada a extracção de diversos compostos farmacêuticos de amostras de plasma. Provaram que o adsorvente adicionado ao PU aumentava o número de sítios activos que participa no processo de extracção, melhorando a difusão das moléculas nos poros¹⁴.

4.3 Fases extractivas

A aplicação da SBSE(PDMS) para a monitorização vestigial de PPCPs em diferentes matrizes ambientais evidencia limitações quando estes poluentes prioritários apresentam características polares. Neste sentido, surge a necessidade de proceder a novos desenvolvimentos para micro-extracção recorrendo a fases extractivas aplicadas à SBSE (por exemplo espumas de PU) ou suportadas em dispositivos mais adequados^{19,20} por forma a colmatar as desvantagens apresentadas pelas técnicas já existentes.

4.3.1 Espumas de poliuretano (PU)

A primeira publicação que relata a utilização de espumas de PU num processo de extracção de compostos orgânicos e inorgânicos de uma matriz aquosa data de 1970²¹. Desde então, os PUs têm sido alvo de diversas aplicações para a separação, remoção ou concentração de poluentes orgânicos e inorgânicos de diversos tipos de matrizes. Braun e Farag publicaram a primeira aplicação de PU para separação cromatográfica em 1972^{22,23}. A título de exemplo, estes polímeros também têm sido usados para a concentração de

metais²⁴, remoção de poluentes orgânicos em fase gasosa^{25,26}, bem como na monitorização de amostras de ar²⁷.

O processo mais usado para produção de PUs é o que envolve a reacção de um composto, com dois ou mais grupos funcionais álcool, nomeadamente um poliálcool poliéter ou poliálcool poliéster, com um isocianato di ou polifuncional, na presença de um agente de expansão, agente nucleador ou tensoactivo e de um catalisador específico. Quimicamente, os PUs são caracterizados pela presença da ligação uretano, a qual aparece repetida várias vezes, não necessariamente de forma regular. A figura 4.1 ilustra a reacção para formação do grupo uretano. Para além do grupo uretano outros grupos funcionais podem fazer parte do monómero do polímero, nomeadamente, grupos éster, éter, amida ou aromáticos²⁸.

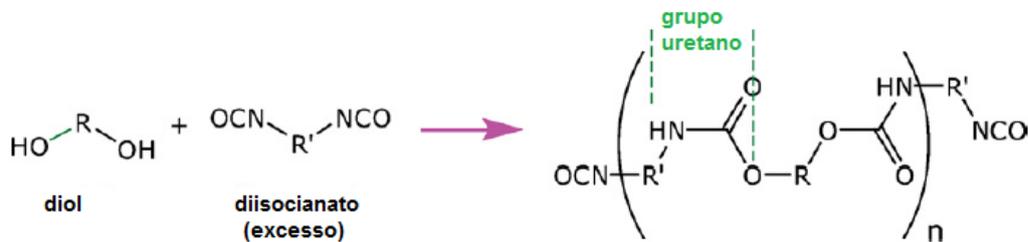


Figura 4.1 – Reacção genérica para a formação do grupo uretano²⁹.

Entre os processos que têm lugar durante a reacção, destacam-se dois fundamentais, nomeadamente, a formação da matriz sólida de PU e a expansão que conduz à formação de uma espuma. A formação da matriz sólida resulta da reacção química, a qual é por vezes designada de gelificação, entre um álcool polifuncional ou poliálcool e um poliisocianato de forma a dar origem a um PU ramificado. A expansão resulta essencialmente da formação de um gás no seio da mistura reaccional, conduzindo assim ao aumento do volume global com paragem de crescimento, quando a pressão interior das células iguala a tensão resistente das paredes da célula da espuma²⁸.

A catálise é de importância vital na produção de PUs, uma vez que afecta a velocidade das reacções químicas responsáveis pela propagação, extensão e ramificação da estrutura molecular do polímero. Os catalisadores mais activos são as bases de Lewis e diversos compostos organometálicos²⁸.

A presença de um tensoactivo na mistura reaccional é essencial para o controlo do processo de expansão. Este componente tem três funções: (i) obtenção de uma mistura homogénea de todos os componentes; (ii) nucleação mais rápida e fácil formação das bolhas; (iii) estabilização das bolhas durante a expansão, evitando a sua coalescência e o

consequente colapso da espuma antes de se atingir um grau de polimerização adequado. Os tensioactivos mais usados são óleos de silicone específicos justamente para essa aplicação²⁸.

Através da síntese reaccional, um material muito versátil pode ser obtido, cujo grau de rigidez e propriedades químicas dependem da aplicação desejada. A versatilidade deste material deve-se à flexibilidade da selecção dos reagentes para a sua síntese (exemplo di-/tri-isocianato, polióis), formando-se um monómero que pode conter diferentes grupos funcionais²⁹. A presença destes grupos funcionais origina interacções específicas com os analitos³⁰. Os PUs podem apresentar elevada estabilidade química, simplicidade e baixo custo na síntese, conferindo assim as características de uma fase polimérica muito atractiva para as técnicas de extracção, particularmente SPE³¹⁻³³ e SBSE¹⁶⁻¹⁸.

4.3.2 Materiais adsorventes

É do conhecimento geral que os compostos polares são facilmente adsorvidos em materiais sólidos constituídos por estruturas porosas contendo sítios activos, nos quais ocorre interacções físicas e/ou ligações químicas. Na forma de pó, estes materiais apresentam elevadas áreas específicas ($\approx 1000 \text{ m}^2/\text{g}$), contribuindo para uma notável capacidade de adsorção ($\approx 100\text{-}500 \text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$), dependendo principalmente da química superficial e da sua textura³⁴.

Do ponto de vista experimental, é difícil manipular estes sólidos após o processo de enriquecimento, uma vez que são constituídos por partículas microscópicas ($< 30 \text{ }\mu\text{m}$). No entanto, se for possível desenvolver um modo de fixar convenientemente estes materiais a substratos adequados, sem perda das propriedades texturais e da química superficial, seria um passo de grande relevância para a análise de traços.

Recentemente, desenvolveram-se novas técnicas de micro-extracção adsortiva (A μ E), as quais representam uma alternativa para a monitorização de diversos analitos polares em matrizes reais. As novas abordagens de A μ E recorrem a pequenos micro-dispositivos analíticos que apresentam tamanho e geometria adequada, nos quais sólidos porosos, nomeadamente, AC e o copolímero poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) são facilmente suportados^{19,20,35}.

4.3.2.1 Carvões activados (ACs)

Os ACs são materiais adsorventes que já há alguns anos têm vindo a ter uma importância fundamental na sociedade, uma vez que são muito utilizados na área de protecção ambiental, nomeadamente, no processo de remoção de contaminantes presentes em águas naturais e residuais, assim como matéria orgânica que causa odor e sabor à água, produtos resultantes do processo de desinfecção e poluentes orgânicos, como são o caso dos pesticidas³⁶. Os ACs podem ser preparados a partir de qualquer matéria-prima rica em carbono. Devido ao factor económico, muitas vezes este tipo de adsorvente é produzido a partir de desperdícios agrícolas ou industriais.

Os ACs têm uma estrutura porosa constituída essencialmente por carbono e também por pequenas quantidades de heteroátomos como o oxigénio e o hidrogénio. Estes materiais contêm ainda quantidades apreciáveis de minerais (conteúdo em cinzas) dependendo do material de partida usado como precursor. A vasta aplicação como adsorventes deve-se ao facto destes materiais apresentarem elevado volume poroso e área superficial específica ($\approx 1000 \text{ m}^2/\text{g}$), estabilidade térmica e mecânica e ainda à química superficial. Todas estas características podem ser adaptadas às necessidades do processo desejado, mostrando assim a versatilidade destes materiais³⁷.

O conhecimento das propriedades físicas e químicas é essencial para compreender o comportamento dos ACs em processos de adsorção e desadsorção. A presença ou ausência de grupos superficiais (grupos ácidos carboxílicos, fenólicos, carbonílicos, entre outros) formados pelos heteroátomos que se podem ligar aos átomos de carbono, dá origem a ACs com diferentes propriedades químicas. Esta estrutura química determina o grau de interacção da superfície do carvão com o meio, podendo torná-lo mais ou menos adequado para a extracção de compostos polares. A estrutura porosa, principal propriedade física dos ACs, é constituída por poros com diferentes dimensões que dão origem a diferentes áreas específicas e capacidades de adsorção^{34,38}.

A estrutura porosa apresenta poros de diferentes dimensões que são classificados como microporos (< 2 nm), mesoporos (2-50 nm) e macroporos (> 50 nm), segundo a classificação da União Internacional de Química Pura e Aplicada, IUPAC³⁷. A porosidade dos ACs é comparada a uma rede de túneis que se encontram interligados.

Os microporos constituem a parte principal da área interna dos ACs, contribuindo maioritariamente para a capacidade de adsorção dos mesmos. Os mesoporos permitem que os analitos adsorvidos atinjam os microporos, sendo por isso designados também por poros de transição. Os macroporos actuam como poros transportadores, permitindo que os

analitos alcancem os poros mais pequenos situados no interior do AC. Estes poros apresentam uma área superficial reduzida e são os responsáveis pela velocidade de difusão das moléculas para os meso e microporos³⁴.

Durante o processo de adsorção podem-se estabelecer diferentes ligações entre o material sólido e os analitos que nele se adsorvem, isto é interações físicas, que incluem forças dispersivas ou electrostáticas e/ou ligações químicas, que diferem com os grupos funcionais presentes no AC. Embora esta distinção entre adsorção física e química seja amplamente aceite, na prática existem muitos tipos de adsorção intermédia que não se incluem em nenhum dos tipos de interacção mencionados anteriormente. A maior parte dos fenómenos de adsorção nos quais estão envolvidas moléculas orgânicas ocorrem devido a interações específicas entre os elementos estruturais do analito e do adsorvente³⁴.

Devido ao facto das ligações que se estabelecem entre o material e o analito poderem ser ligações muito fortes, a extracção adsortiva é muitas vezes combinada com desadsorção líquida, uma vez que a desadsorção térmica não consegue quebrar essas ligações. Por outro lado, quando se ensaiam misturas multicomponentes também deve ser tida em atenção a adsorção competitiva entre os analitos (adsorvatos), o que afecta não só a capacidade de adsorção, mas também a difusão dentro do adsorvente.

4.3.2.2 Poliestireno - divinilbenzeno (PS-DVB)

O PS-DVB é um material polimérico tradicional, que tem sido vastamente utilizado como fase extractiva quer em SPE quer em SPME. Devido às características hidrofóbicas que apresenta, interacciona com os analitos principalmente através de forças de “Van der Waals” e interações π - π do anel aromático presente na estrutura deste material (figura 4.2)³⁹.

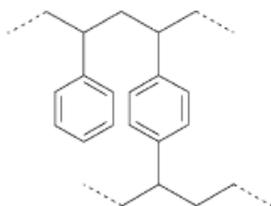


Figura 4.2 – Estrutura química genérica do copolímero PS-DVB.

Usando este material hidrofóbico para a extracção de compostos polares, um dos parâmetros mais importantes é a área superficial específica que apresenta, uma vez que quanto maior for, maior é o número de ligações π - π disponíveis para interaccionar com os analitos. Neste sentido, a forma de melhorar a eficiência de extracção, usando este tipo de

material, é aumentar a área superficial específica, que pode ser conseguida através da produção desta resina com ligações cruzadas, resultando áreas superficiais acima dos 800 m²/g. Alguns exemplos de resinas de PS-DVB são apresentados na tabela 4.1³⁹.

O LiChrolut EN é um PS-DVB que apresenta área superficial elevada, estrutura estável de poros, elevada robustez para vários valores de pH, sendo muito utilizado em SPE. De acordo com a literatura⁴⁰, esta resina apresenta pequenas partículas de forma irregular, sendo classificado como um material micro/mesoporoso. Comparando o LiChrolut EN com os ACs verificam-se semelhanças nos valores da área superficial, volume e distribuição do tamanho de poros, embora com diferenças na estrutura química e espacial. É caracterizado pela presença de poros com formas mais complexas relativamente aos ACs, devido às cadeias poliméricas que contêm ligações cruzadas formando estruturas desordenadas.

Tabela 4.1 – Exemplos de resinas constituídas por PS-DVB disponíveis comercialmente.

Denominação comercial	Área superficial (m ² /g)
XAD-1	100
XAD-2	300
XAD-4	≥750
XAD-16	800
PLRP-S-10	500
PLRP-S-30	375
Styrosorb 2m	910
Styrosorb MN-150	1070
Amberchrom GC-161m	900
Envi-Chrom P	800-950
Bakerbond SDB-1	1060
LiChrolut EN	1200
Chromabond HR-P	1200

4.4 Bibliografia

- [1] C. Bicchi , C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, F. David, P. Sandra, “Dual-phase twisters: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction”, *J. Chromatogr. A* **1094** (2005) 9.
- [2] C. Bicchi , C. Cordero, E. Liberto, B. Sgorbini, F. David, P. Sandra, P. Rubiolo, “Influence of polydimethylsiloxane outer coating and packing material on analyte recovery in dual-phase headspace sorptive extraction”, *J. Chromatogr. A* **1164** (2007) 33.
- [3] L. Montero, P. Popp, A. Paschke, J. Pawliszyn, “Polydimethylsiloxane rod extraction, a novel technique for the determination of organic micropollutants in water samples by thermal desorption–capillary gas chromatography–mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A* **1025** (2004) 17.
- [4] J. Pettersson, A. Kloskowski, C. Zaniol and J. Roeraade, “Automated high-capacity sorption probe for extraction of organic compounds in aqueous samples followed by gas chromatographic analysis”, *J. Chromatogr. A* **1033** (2004) 339.
- [5] B.V. Burger, B. Marx, M. le Roux and W.J.G. Burger, Simplified analysis of organic compounds in headspace and aqueous samples by high-capacity sample enrichment probe”, *J. Chromatogr. A* **1121** (2006) 259.
- [6] J.-P. Lambert, W. M. Mullett, E. Kwong, D. Lubda, “Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids”, *J. Chromatogr. A* **1075** (2005) 43.
- [7] X. Zhu, J. Cai, J. Yang, Q. Su, Y. Gao, “Films coated with molecular imprinted polymers for the selective stir bar sorption extraction of monocrotophos”, *J. Chromatogr. A* **1131** (2006) 37.
- [8] W. Liu, H. Wang, Y. Guan, “Preparation of stir bars for sorptive extraction using sol–gel technology”, *J. Chromatogr. A* **1045** (2004) 15.
- [9] Y. Hu, Y. Zheng, F. Zhu, G. Li , “Sol–gel coated polydimethylsiloxane/ β -cyclodextrin as novel stationary phase for stir bar sorptive extraction and its application to analysis of estrogens and bisphenol A “, *J. Chromatogr. A* **1148** (2007) 16.
- [10] X. Huang, D. Yuan, “Preparation of stir bars for sorptive extraction based on monolithic material”, *J. Chromatogr. A* **1154** (2007) 152.

- [11] X. Huang, D. Yuan, B. Huang, "Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection", *Talanta* **75** (2008) 172.
- [12] X. Huang, J. Lin, D. Yuan, R. Hu, "Determination of steroid sex hormones in wastewater by stir bar sorptive extraction based on poly(vinylpyridine-ethylene dimethacrylate) monolithic material and liquid chromatographic analysis", *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 3508.
- [13] X. Huang, N. Qiu, D. Yuan, "Direct enrichment of phenols in lake and sea water by stir bar sorptive extraction based on poly (vinylpyridine-ethylene dimethacrylate) monolithic material and liquid chromatographic analysis", *J. Chromatogr. A* **1194** (2008) 134.
- [14] F. M. Lanças, M.E.C. Queiroz, P. Grossi I. R. B. Olivares, "Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction", *J. Sep. Sci.* **32** (2009) 813.
- [15] L.P. Melo, A.M. Nogueira, F.M. Lanças, M.E.C. Queiroz, "Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples" *Anal. Chim. Acta* **633** (2009) 57.
- [16] N.R. Neng, M.L. Pinto, J. Pires, P.M. Marcos and J.M.F. Nogueira, "Development, optimisation and application of polyurethane foams as new polymeric phases for stir bar sorptive extraction", *J. Chromatogr. A* **1171** (2007) 8.
- [17] F.C.M. Portugal, M.L. Pinto, J.M.F. Nogueira, "Optimization of polyurethane foams for enhanced stir bar sorptive extraction of triazinic herbicides in water matrices", *Talanta* **77** (2008) 765.
- [18] F.C.M. Portugal, M.L. Pinto, J.M.F. Nogueira, "Potentialities of polyurethane foams for trace level analysis of triazinic metabolites in water matrices by stir bar sorptive extraction", *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 3707.
- [19] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, INPI, Portugal, PPP20091000096389 (2009).
- [20] A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, INPI, Portugal, PPP20091000114179 (2009).
- [21] H.J.M. Bowen, "Absorption by polyurethane foams; new method of separation", *J. Chem Soc.*, **A** (1970) 1082.
- [22] T. Braun, A.B. Farag, "Foam chromatography, solid foams as supports in column chromatography", *Talanta* **19** (1972) 828.

- [23] T. Braun, A.B. Farag, "Reversed-phase foam chromatography. Separation of paladium, bismuth and nickel in the tributyl-phosphate-thiourea-perchloric acid system", *Anal. Chim. Acta* **61** (1972) 265.
- [24] V.A. Lemos, M.S. Santos, E.S. Santos, M.J.S. Santos, W.N.L. Santos, A.S. Souza, D.S. de Jesus, C.F. Virgens, M.S. Carvalho, N. Oleszczuk, M.G.R. Vale, B. Welz, S.L.C. Ferreira, "Application of polyurethane foam as a sorbent for trace metal pre-concentration — A review", *Spectrochim. Acta Part B* **62** (2007) 4.
- [25] M. L. Pinto, J. Pires, A. P. Carvalho, M. B. Carvalho, J. C. Bordado, "Sorption isotherms of organic vapors on polyurethane foams", *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 13813.
- [26] M.L. Pinto, J. Pires, A.P. Carvalho, M.B. de Carvalho, J.C. Bordado, "Synthesis and regeneration of polyurethane/adsorbent composites and their characterization by adsorption methods", *Micropor. Mesopor. Mater.* **89** (2006) 260.
- [27] G. Ouyanga, J. Pawliszyn, "Configurations and calibration methods for passive sampling techniques", *J. Chromatogr. A* **1168** (2007) 226.
- [28] J.S.S. Melo, M.J. Moreno, H.D. Burrows, M.H. Gil, "Química de polímeros", Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra (2004).
- [29] D.K. Chattopadhyay, D.C. Webster, "Thermal stability and flame retardancy of polyurethanes", *Prog. Polym. Sci.* **34** (2009) 1068.
- [30] P.T. Sukhanov, S.P. Kalinkina, Y.I. Korenman, "Extraction preconcentration of naphthols and phenol with solvent mixtures impregnated into polyurethane foam", *J. Anal. Chem.* **59** (2004) 1153.
- [31] S.G. Dmitrienko, E.Y. Gurariy, R.E. Nosov, Y.A. Zolotov, "Solid phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous samples using polyurethane foams in connection with solid-matrix spectrofluorimetry" *Anal. Lett.* **34** (2001) 425.
- [32] D. Bohrer, M. V. Santos, A. G. Ramirez, P.C. Nascimento, L. M. Carvalho "Performance of polymeric materials for solid phase extraction prior to chromatographic analysis", *J. Chromatogr. B* **877** (2009) 277.
- [33] M.F. El-Shahat, N. Burham, S.M. A. Azeem, "Flow injection analysis–solid phase extraction (FIA–SPE) method for preconcentration and determination of trace amounts of penicillins using methylene blue grafted polyurethane foam", *J. Hazard. Mater.* **177** (2010) 1054.

[34] A.S. Mestre, “Carvões activados a partir da cortiça – avaliação das potencialidades para o tratamento e análise de águas contaminadas”, Tese de Doutoramento em Química Tecnológica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (2009).

[35] N.R. Neng, A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira. “Adsorptive micro-extraction (A μ E) techniques - novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media”, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 7303.

[36] P.C. To, B.J. Mariñas, V. L. Snoeyink, W. Jern, “Effect of pore-blocking background compounds on the kinetics of trace organic contaminant desorption from activated carbon”, *Environ. Sci. Technol.* **42** (2008) 4825.

[37] B. Sakintuna, Y. Yürüm, “Templated porous carbons: A Review Article”, *Ind. Eng. Chem Res.* **44** (2005) 2893.

[38] A. Gierak, M. Seredych, A. Bartnicki, “The preparation, properties and application of carbon fibers for SPME”, *Talanta* **69** (2006) 1079.

[39] N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, “New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds”, *J. Chromatogr. A* **1152** (2007) 14.

[40] V.M. Gun’ko, V.V. Turov, V.I. Zarko, Y.M. Nychiporuk, E.V. Goncharuk, E.M Pakhlov, G.R. Yurchenko, T.V. Kulik, B.B. Palyanytsya, T.V. Borodavka, T.V. Krupskaya, R. Leboda, J. Skubiszewska-Zięba, V.D. Osovskii, Y.G. Ptushinskii, A.V. Turov, “Structural features of polymer adsorbent LiChrolut EN and interfacial behavior of water and water/organic mixtures”, *J. Colloid Interface Sci.* **323** (2008) 6.

Capítulo 5

Parte Experimental

5.1 Material e equipamento

Nesta secção descreve-se o material e equipamento de uso geral, comum a todas as metodologias desenvolvidas, não se apresentando o material de uso corrente de laboratório.

- “Vials” de 30 e 10 mL, Macherey-Nagel (Düren, Alemanha)
- “Vials” de 1,5 mL, VWR International (West Chester, PA, USA)
- “Inserts” de 0,25 mL, VWR International (West Chester, PA, USA)
- Tampas d=20 mm, Macherey-Nagel (Düren, Alemanha)
- Tampas d=11 mm, VWR International (West Chester, PA, USA)
- Encapsuladores manuais:
 - 30 mL, Macherey-Nagel (Düren, Alemanha)
 - 1,5 mL, Agilent Technologies (Little Falls, DE, USA)
- Microseringas de alta precisão e de êmbolo flexível de 10, 50, 100, 500 e 1000 μL (Hamilton, USA)
- Barras de agitação de “Teflon” 15 \times 4,5 mm e 12 \times 3,0 mm, VWR International (West Chester, PA, USA)
- Barras de agitação comerciais revestidas com PDMS (Twister; Gerstel, Müllheim a/d Ruhr, Alemanha): 20 mm de comprimento, revestidas com filme de 1 mm em PDMS (126 μL) e 10 mm de comprimento, revestidas com filme de 0,5 mm em PDMS (24 μL).
- Forno, Raypa (Terrassa, Espanha)
- Balança analítica, Mettler Toledo AG135; 0,001 mg (Greifensee, Suíça)
- Medidor de pH, Metrohm 744 pH meter (Herisan, Suíça)
- Ultra-sons equipado com termóstato, Branson 3510 E-DTH (Danbury, CT, USA)
- Placa de agitação com 15 posições, Variomag Multipoint (Oberschleibheim, Alemanha)

5.2 Reagentes gerais

- Metanol (CH_3OH), MeOH para HPLC, 99,9 %, Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha)
- Acetonitrilo (CH_3CN), ACN para HPLC, 99,9 %, Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha)
- *n*-hexano (C_6H_{14}), > 95 %, Fluka Chemie AG (Buchs, Suíça)
- *n*-pentano (C_5H_{12}), 99 %, Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha)
- Diclorometano (CH_2Cl_2), DCM, José M. Vaz Pereira (Odivelas, Portugal)
- Acetato de etilo ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), Panreac (Barcelona, Espanha)
- Acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), Fluka Chemie AG (Buchs, Suíça)
- Isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$), Fisher (Leicestershire, Inglaterra)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), 96 %, Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha)

- Ácido fosfórico (H₃PO₄), 85 % m/v, Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha)
- Ácido fórmico (HCOOH), 98-100 % m/v, Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha)
- Ácido acético (CH₃COOH), 100 %, Merck (Darmstadt, Alemanha)
- Ácido clorídrico (HCl), 37 %, Panreac (Barcelona, Espanha)
- Ácido nítrico (HNO₃), 65 %, Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha)
- Cloreto de sódio (NaCl), 99,9 %, AnalaR (BDH Chemicals, Poole, Inglaterra)
- Hidróxido de sódio (NaOH), 98 %, AnalaR (BDH Chemicals, Poole, Inglaterra)
- Água ultra-pura, Milli-Q Gradient (Millipore, Bedford, MA , USA)

5.3 Padrões e preparação de soluções

5.3.1 “Musks”

Galaxolide (HHCB, 50 %) e musk cetona (MK, 98 %) foram obtidos de SAFC (St. Louis, MO, USA). Tonalide (AHTN) e celestolide (ADBI) foram adquiridos de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg – Alemanha), em solução (10 mg/L), cujo solvente era ciclohexano. Soluções mãe de HHCB e MK foram preparadas em *n*-hexano (100 mg/L) e armazenadas à temperatura de - 20 °C. Duas soluções intermédias, contendo todos os analitos, foram preparadas em MeOH e *n*-hexano, respectivamente, com concentrações de 1 mg/L e armazenadas a - 20 °C. Para a análise instrumental as soluções de trabalho foram preparadas em *n*-hexano por diluição adequada da solução intermédia preparada em *n*-hexano. Para a optimização e validação do método, as soluções aquosas foram preparadas diariamente por adição de alíquotas (200 µL) de soluções metanólicas de trabalho (preparadas a partir da solução intermédia, cujo solvente era MeOH) com diferentes níveis de concentração.

5.3.2 Anti-sépticos

Triclosan (TCS, 97 %) foi obtido da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). A solução mãe (136 mg/L) foi preparada em MeOH e armazenada à temperatura de - 20 °C. Soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução mãe por diluição adequada com MeOH. Para a optimização e validação do método, as soluções aquosas foram preparadas diariamente por adição de alíquotas (200 µL) de soluções com diferentes níveis de concentração.

5.3.3 NSAIDs e reguladores lipídicos

Ibuprofeno (IBU) foi oferecido por “Shasun Chemical and Drugs” (Generis Farmacêutica, Portugal). Diclofenac de sódio (DIC), ácido mefenâmico (MEF) e gemfibrozil foram adquiridos de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). Naproxeno (NAP, 98 %) e ácido acetilsalicílico (ACA, ≥ 99 %) foram obtidos da Fluka (Buchs, Suíça). Foram preparadas soluções mãe (200 mg/L) em MeOH para cada analito. A partir das soluções mãe foi preparada uma solução intermédia conjunta em MeOH com uma concentração de 10 mg/L. As soluções foram armazenadas à temperatura de - 20 °C. Soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução intermédia conjunta por diluição adequada com MeOH. Para a otimização e validação do método, as soluções aquosas foram preparadas diariamente por adição de alíquotas (200 μ L) de soluções conjuntas com diferentes níveis de concentração.

Acetaminofeno (ACF, 98 %) e cafeína (CAF) foram adquiridos de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). Foram preparadas soluções mãe (200 mg/L) em MeOH para cada analito. A partir das soluções mãe foi preparada uma solução intermédia conjunta (10 mg/L) em 25 % MeOH e 75 % água ultra-pura. Soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução intermédia conjunta por diluição adequada com 25 % MeOH e 75 % água ultra-pura. Para a otimização e validação do método, as soluções aquosas foram preparadas diariamente por adição de alíquotas (200 μ L) de soluções conjuntas com diferentes níveis de concentração.

5.3.4 Antibióticos

Trimetoprim (TMP, 98 %), sulfametoxazol (SMX) e sulfatiazol (STZ, 98 %) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). Sulfadimetoxina (SDM) e enrofloxacina (ENR, ≥ 98 %) foram obtidos da Fluka (Buchs, Suíça). Foram preparadas soluções mãe (200 mg/L) em MeOH, para cada analito e armazenadas à temperatura de - 20 °C. A partir das soluções mãe foi preparada uma solução intermédia conjunta (10 mg/L) em água ultra-pura com 0,1 % ácido fórmico. Soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução intermédia conjunta por diluição adequada em água ultra-pura com 0,1 % ácido fórmico. Para a otimização e validação do método, as soluções aquosas foram preparadas diariamente por adição de alíquotas (200 μ L) de soluções conjuntas com diferentes níveis de concentração.

5.3.5 Hormonas esteróides sexuais

Dietilstilbestrol (DES, 99,5 %) e 19-noretisterona (19-NOR, 98,5 %) foram fornecidos por Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha). D-(-)-Norgestrel (NORG, 99,0 %), estriol (E3, 97 %), progesterona (PROG, 98,0 %), estrona (E1, 99,0 %), 17 β -estradiol (17 β -E2) e mestranol (MES) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). Foram preparadas soluções mãe (200 mg/L) em MeOH, para cada analito. A partir das soluções mãe foi preparada uma solução intermédia conjunta (10 mg/L) em MeOH com 0,1 % ácido fórmico. As soluções foram armazenadas à temperatura de - 20 °C. Soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução intermédia conjunta por diluição adequada em MeOH com 0,1 % ácido fórmico. Para a optimização e validação do método, as soluções aquosas foram preparadas diariamente por adição de alíquotas (200 μ L) de soluções conjuntas com diferentes níveis de concentração.

5.4 Preparação de materiais e micro-dispositivos para extracção

5.4.1 Espumas de poliuretano (PU)

Para síntese das espumas de PU utilizou-se o óleo de silicone proveniente da Dow Corning (Midland, MI, USA) como estabilizador de espuma; dilaurato de dibutilestanho (DBTL, > 97 %; Merck, Darmstadt, Alemanha) como catalisador e 4,4' – difenilmetanodiiisocianato (MDI) da BASF (Lupanat, Alemanha). O polipropileno glicol (PPG, Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, USA) e trimetilpropanol etoxilato (TMPE, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) foram utilizados como polióis. Para a síntese do polímero utilizado neste estudo o PPG, TMPE, óleo de silicone, água e o catalisador foram misturados num copo de polietileno e agitados vigorosamente por intermédio de um agitador mecânico durante 1 min. O isocianato foi adicionado ao mesmo copo, tendo-se aplicado forte agitação durante 15 s. Posteriormente, deixou-se a mistura em repouso durante 1 min e colocou-se no forno a 60 \pm 1 °C durante 24 h, por forma a permitir a formação e crescimento da espuma. Posteriormente, o polímero foi cortado em pequenos cilindros (15 mm comprimento e 10 mm em largura) (figura 5.1), tendo-se procedido à limpeza com ACN e MeOH em duplicado e sob tratamento ultra-sónico (20 min). Uma lavagem adicional com ACN (20 min) foi realizada, tendo seguidamente o polímero sido seco. Os cilindros em PU foram pesados e usados para revestir uma barra de agitação convencional em teflon (15 \times 4,5 mm). Cada cilindro de PU tinha uma massa média de aproximadamente 0,1 g, o equivalente a 83 μ L, de acordo com a densidade previamente estimada¹. A síntese e caracterização das espumas de PU foram efectuadas de acordo com estudos prévios¹.

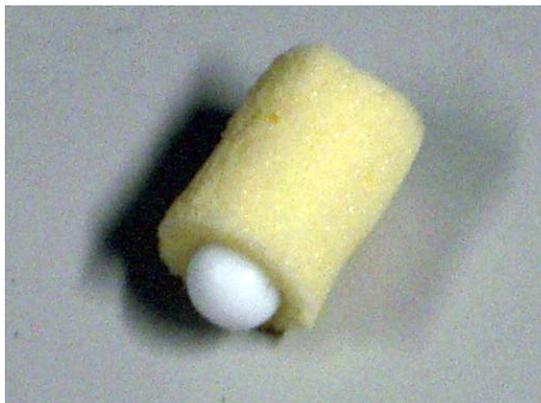


Figura 5.1 – Fotografia ilustrativa da barra de “teflon” revestida com o PU sintetizado.

5.4.2 Micro-extracção adsortiva em barra (BAμE)

Para preparação do micro-dispositivo BAμE foram utilizadas as seguintes fases extractivas: AC Ridel Lote 01930 (Riedel-de Haën, Seelze, Alemanha), Norit Sae Super (NSAES) Lote 94039-5 (Salmon & Cia, AC Amersfoort, Holanda), AC obtido por tratamento de NSAES com solução de HNO₃ (20 %) a fim de se oxidar a sua superfície (NSAESox) e PS-DVB (LiChrolut EN, Merck, Darmstadt, Alemanha). A preparação das barras de micro-extracção adsortiva envolve o desenvolvimento de um micro-dispositivo para a extracção vestigial de substâncias polares e apolares que se encontra sob pedido provisório de patente nacional². O micro-dispositivo consiste num suporte cilíndrico em polipropileno com comprimento inferior ou igual a 15 mm e 3 mm em diâmetro, revestido externamente com fita adesiva. O dispositivo previamente revestido foi então colocado dentro de um frasco contendo o material sólido finamente dividido, para que o mesmo aderisse à superfície do adesivo, ficando o sólido suportado por colagem. No final o micro-dispositivo (figura 5.2) foi tratado no sentido de retirar o excesso de material sólido e limpo com solvente apropriado.

5.4.3 Micro-extracção adsortiva em multi-esferas (MSAμE)

A MSAμE compreende o desenvolvimento de um micro-dispositivo para a extracção vestigial de substâncias polares e apolares que se encontra sob pedido provisório de patente nacional³. Numa forma de realização da invenção, o micro-dispositivo consiste num suporte constituído por diversas esferas de poliestireno (PS) com 2 mm de diâmetro médio, unidas por um fio que poderá, por exemplo, ser de algodão. O fio e as esferas foram colocados dentro de um frasco contendo já algum material sólido finamente dividido, enchendo-se o frasco posteriormente, com o material sólido para que todas as esferas ficassem cobertas. O frasco contendo o fio com as esferas em PS e o material sólido foi

então colocado num forno sob temperatura adequada e durante um período de tempo consoante o tipo de material utilizado. O material ou fase extractiva aderiu à superfície das esferas de PS, ficando suportado por acção térmica. Posteriormente, retirou-se do frasco o fio contendo as esferas de PS já cobertas pela fase extractiva (figura 5.2). No final, o microdispositivo foi tratado no sentido de retirar o excesso de material e limpo com recurso a um solvente apropriado. Os materiais testados neste microdispositivo foram os mesmos que os testados nas barras de micro-extracção.

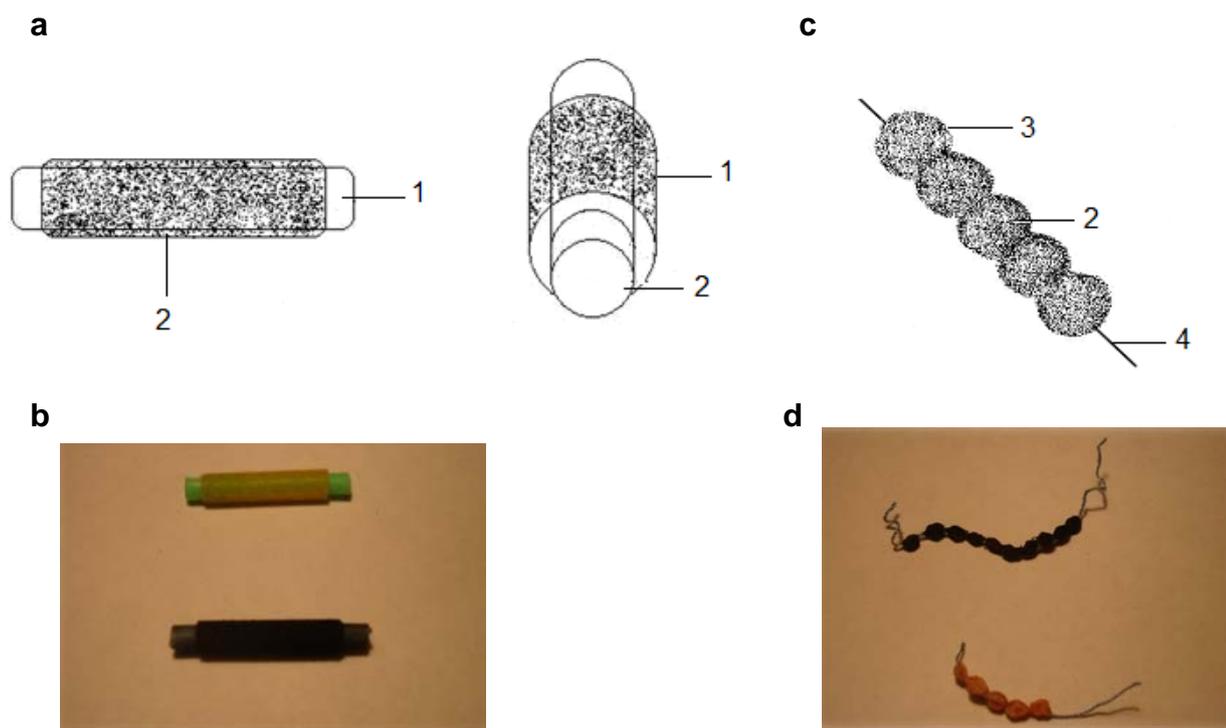


Figura 5.2 – Representação esquemática e fotografia da barra de micro-extracção (a e b) e das multi-esferas de micro-extracção (c e d). 1 – barra de polipropileno; 2 – fase extractiva; 3 – esferas de poliestireno; 4 – linha.

5.5 Preparação das amostras

As amostras analisadas ao longo do trabalho foram pasta de dentes comercial (pesou-se 48,1 mg de pasta de dentes e diluiu-se para 100 mL, seguindo-se uma rediluição (1:125) com água ultra-pura); saliva, recolhida de uma mulher saudável que escovou os dentes com uma pasta comercial contendo TCS, tendo sido recolhidas amostras de saliva, imediatamente após a escovagem dos dentes e 12 h mais tarde (1 mL de saliva foi diluído para 25 mL com água ultra-pura); água residual (influyente e efluente) recolhida em duas ETARs do concelho do Cartaxo (amostra pontual); água superficial – rio Tejo: Valada,

Oriente, Santa Apolónia e Docas; água para consumo humano, recolhida do abastecimento no município de Lisboa; água do mar – praia de Quarteira, Algarve; água de aquacultura, recolhida num tanque do laboratório de aquacultura da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (Peniche). As amostras ambientais foram filtradas e armazenadas à temperatura de 4 °C até serem analisadas (máximo dois dias). O método de adição padrão (SAM) foi utilizado para quantificar e suprimir eventuais efeitos de matriz, tendo cada ensaio sido realizado em triplicado.

5.6 Processo de extracção / retro-extracção

Num ensaio típico de um processo de micro-extracção foram medidos 25 ou 30 mL de amostra ou água ultra-pura para um “vial” adequado, colocando-se de seguida o micro-dispositivo de extracção, a barra de agitação, sendo de seguida o “vial” selado com o encapsulador apropriado. Posteriormente, a solução foi fortificada com 200 µL da solução conjunta com uma determinada concentração, por intermédio do septo. Seguidamente, promoveu-se a extracção através de agitação magnética durante um determinado período de tempo à temperatura ambiente (20 °C). Após a extracção, o “vial” foi aberto, retirou-se o micro-dispositivo colocando-o num “vial” contendo solvente orgânico apropriado para se proceder à retro-extracção ou LD, auxiliada por tratamento ultrasónico à temperatura de 25 °C. Posteriormente, o micro-dispositivo foi retirado do “vial”, evaporou-se o solvente até à secura sob suave corrente de azoto. Os analitos foram posteriormente redissolvidos em 200 µL de solvente adequado. A injeção para análise instrumental tomou lugar depois de todo o processo de extracção e retro-extracção concluído. A figura 5.3 ilustra esquematicamente o processo de execução experimental relativamente ao passo de pré-concentração dos analitos.

Durante o processo de optimização avaliaram-se os seguintes parâmetros susceptíveis de afectar ou influenciar a eficiência da extracção em meio aquoso, de acordo com diversos autores ⁴⁻⁸: tempo de extracção (0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 16 h), velocidade de agitação magnética (750, 1000 e 1250 rpm), pH, características de polaridade (MeOH: 5, 10 e 15 %, v/v), força iónica (NaCl: 5, 10 e 15 %, m/v), tempo de retro-extracção (15, 30, 45 e 60 min) e solvente para retro-extracção. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Para o ajuste do pH das amostras foi utilizada uma solução diluída de HCl e/ou de NaOH. Durante todos os estudos efectuados foram ainda realizados ensaios em branco. Após toda a metodologia ter sido optimizada procedeu-se à respectiva validação, utilizando soluções padrão de trabalho com diferentes concentrações.

As barras comerciais à base de PDMS, após utilização, foram lavadas com ACN ou MeOH sob agitação magnética e/ou ultrasónica. As multi-esferas de micro-extracção, após utilização, foram lavadas com água e MeOH, sob tratamento ultrasónico.

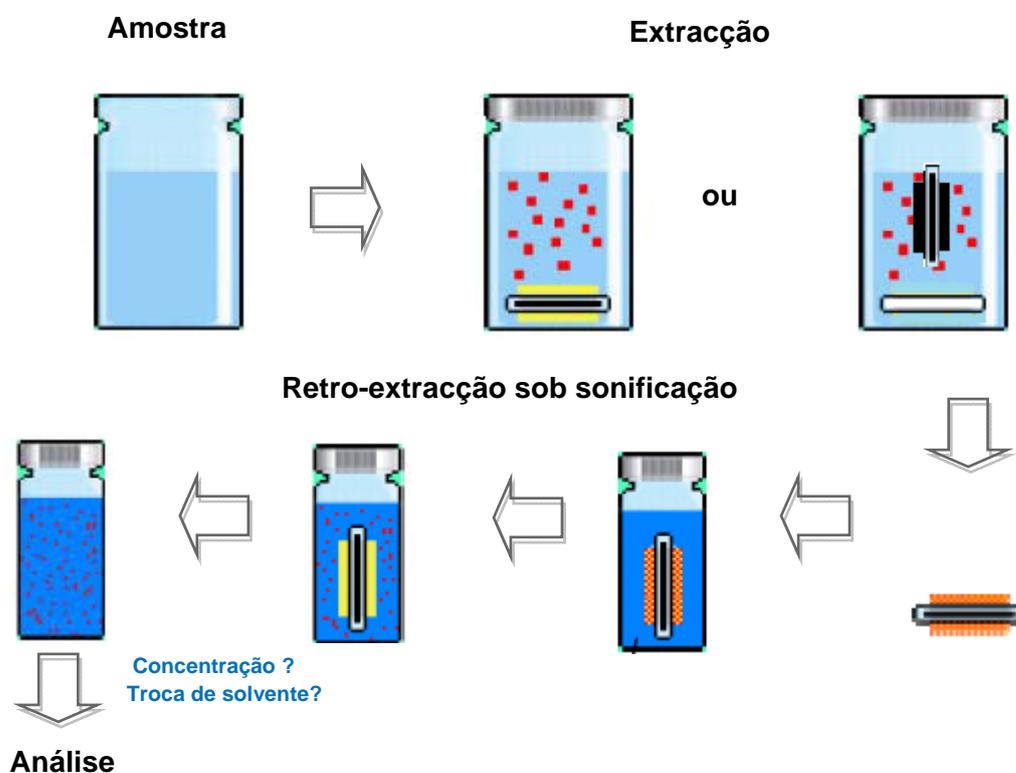


Figura 5.3 – Ilustração genérica do processo de pré-concentração dos analitos.

5.7 Análise por GC-MS

5.7.1 Equipamento

As análises por GC-MS foram realizadas com o equipamento Agilent Technologies (Little Falls, DE, USA), constituído por um cromatógrafo gasoso (Agilent 6890 Series) equipado com amostrador automático (Agilent 7683) e injetor PTV, acoplado ao detector selectivo de massa (Agilent 5973 N) (figura 5.4). Todo o controlo instrumental e o registo de dados foram efectuados a partir do “software” MSD ChemStation (G1701; versão C.00.00; Agilent Technologies).



Figura 5.4 – Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrómetro de massa, Agilent Technologies. Legenda: 1 – cromatógrafo gasoso; 2 – amostrador automático; 3 – torre de injeção; 4 – detector selectivo de massa; 5 – computador com “software”.

5.7.2 Condições instrumentais

O injector PTV foi arrefecido com azoto líquido e seleccionado no modo “solvent vent” (tempo de “vent”: 0,30 min; fluxo: 10 e 50 mL/min; pressão: 0,0 psi; purga: fluxo 60,0 mL/min, tempo 2 min), tendo a temperatura sido programada para 0, 10, 20, 30 ou 40 °C (0,35 min) até 320 °C (600 °C/min, 3 min isotérmica) e subsequentemente para 200 °C (50 °C/min até ao final da análise). O volume e a velocidade de injeção foram 20 µL e 100 µL/min, respectivamente. O gás de arraste usado foi o hélio (He), mantido no modo de pressão constante (19,58 psi). Utilizou-se uma coluna capilar TRB-5MS, 30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm espessura (5 % difenil e 95 % polidimetilsiloxano); (Teknokroma, Espanha). A temperatura do forno foi programada desde 60 °C (2 min) até 250 °C (10 °C/min), posteriormente até 300 °C (20 °C/min, durante 5 min), obtendo-se assim um tempo de análise de 28,50 min. A temperatura da linha de transferência, fonte de ionização e o quadrupolo foram mantidos a 280 °C, 230 °C e 150 °C, respectivamente, tendo sido seleccionado um “solvent delay” de 4 min. No modo varrimento contínuo, foi usada a EI (70 eV) numa gama de massa compreendida entre 35 e 350 Da, uma corrente de ionização de 34,6 µA. No modo de monitorização seleccionada de iões (SIM), diversos grupos de iões foram monitorizados em diferentes janelas, definidas pelo correspondente t_R . Dois ou três iões para cada analito foram seleccionados, de acordo com o espectro de massa característico, obtido no modo de varrimento contínuo e por comparação com a biblioteca de espectros “Wiley’s” (G1035B; Rev D.02.00; Agilent Technologies).

5.8 Análise por HPLC-DAD

5.8.1 Equipamento

As análises por HPLC-DAD foram efectuadas com o cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Little Falls, DE, USA), equipado com desgaseificador de vácuo G1322A, bomba quaternária G1311A, injektor automático G 1313A, compartimento termostaticado para a coluna G1316A, detector por rede de díodos (DAD) G1315A (figura 5.5). Todo o controlo instrumental e registo de dados foram efectuados a partir do “software” LC3D ChemStation (versão Ver.A.08.03 [847]).



Figura 5.5 – Cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series (Agilent Technologies). Legenda: 1 – desgaseificador; 2 – bomba quaternária; 3 – amostrador automático; 4 – coluna e termostato; 5 – detector de rede de díodos; 6 – computador com “software.”

5.8.2 Condições instrumentais

Os padrões e as amostras foram injectadas utilizando um volume de 20 μL , tendo a separação sido efectuada à temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Para análise de antibióticos e hormonas utilizou-se uma coluna Teknokroma Mediterranean Sea 18, 150 \times 2,1 mm \times 5 μm . Para a análise dos restantes analitos utilizou-se uma coluna Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A: C18 - 150 \times 4,0 mm \times 5 μm . As condições de análise seleccionadas para cada classe de analitos estudados estão descritas na tabela 5.1.

Tabela 5.1. – Condições experimentais usadas para a análise de cada classe de analitos estudados por HPLC-DAD.

Classe PPCPs	Fluxo (mL/min)	Composição fase móvel	^c λ (nm)
Anti-séptico	1,0	Eluente A (80 %): ACN Eluente B (20 %): água com 0,1 % H ₃ PO ₄	230
NSAIDs / regulador lipídico	1,0	^a Eluente A (45 %): ACN Eluente B (55 %): água com 0,1 % H ₃ PO ₄ ^b Eluente A (25 %): MeOH Eluente B (75 %): água com 0,1 % H ₃ PO ₄	205, 220 e 230
Antibióticos	0,25	Eluente A : MeOH Eluente B: água com 0,1 % HCOOH 0 -14 min – 10-50 % A (gradiente linear); 14-15 min – 50-95 % A; 15-25 min – 95% A; 26-36 min: 10 % A.	225 e 260
Hormonas	0,30	Eluente A: MeOH Eluente B: água com 0,1 % HCOOH 0 -30 min – 40-100% A (gradiente linear); 30-45 min – 100% A; 46-56 min: 40% A.	205 e 240

^a ACA, NAP, DIC, IBU, MEF e GEM ^b CAF e ACF ^c λ – comprimento de onda

5.9 Análise por LC-MS

5.9.1 Equipamento

As análises por LC-MS foram efectuadas com o cromatógrafo líquido Waters (Milford, MA, USA) equipado com bomba quaternária, injetor automático, compartimento termostaticado para a coluna e detector UV (Waters, Dual 2487), acoplado ao espectrómetro de massa Esquire 3000 Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha), equipado com uma seringa 74900 Series da Cole-Parmer Instrument Company, um analisador ITD e com fonte de ionização ESI (figura 5.6). A aquisição de dados e o controlo do equipamento foram obtidos usando os “softwares” HyStar 2.3, Esquire Control 5.1 e Data Analysis 3.1, todos da Bruker Daltonics.



Figura 5.6 – Cromatógrafo líquido (Waters) e espectrómetro de massa (Esquire 3000 Bruker).

5.9.2 Condições instrumentais

Os padrões e as amostras foram injectadas utilizando um volume de 40 μL . A separação foi efectuada à temperatura de 28 $^{\circ}\text{C}$, utilizando uma coluna Teknokroma Mediterranean Sea 18, 150 mm \times 2,1 mm \times 5 μm . As condições de análise referentes à composição, fluxo da fase móvel e comprimento de onda são iguais às apresentadas na tabela 5.1.

A análise por ESI-MS foi efectuada no modo de ionização positivo e fragmentação auto MS^n . Na tabela 5.2 apresentam-se as condições do espectrómetro de massa usadas para identificação e quantificação dos antibióticos.

As voltagens e a amplitude de fragmentação foram optimizadas para cada composto estudado (injecção directa), utilizando-se posteriormente o valor médio.

Tabela 5.2 – Condições de análise por LC-MS para os antibióticos.

Voltagens	Capilar (V)	4000
	Fonte (V)	72,6
	Skim 1 (V)	33,5
Gás de nebulização e secagem (azoto)	Pressão (psi)	30
	Fluxo (L/min)	10
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	300
Gás colisão		He
Massa alvo (m/z)		311
Massas adquiridas (m/z)		50-400
Amplitude média de fragmentação (V)		0,73

5.10 Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

A caracterização morfológica dos micro-dispositivos preparados usados na técnica MSA μ E foi efectuada por microscopia electrónica de varrimento (SEM) (JEOL, modelo JSM-7001F, Tóquio, Japão). As amostras foram previamente cobertas com ouro.

5.11 Análise textural – Adsorção de azoto a -196 °C

Os ensaios de adsorção com azoto foram realizados pelo grupo de Adsorção e Materiais Adsorventes (Centro de Química e Bioquímica, CQB), num equipamento automático (ASAP 2010, Micromeritics, Norcross, GA, USA), tendo-se procedido à desgasificação prévia das amostras de modo a remover os gases ou vapores que se encontrassem adsorvidos à superfície dos ACs. Esta limpeza foi realizada por tratamento térmico durante 2 h a 120 °C, de modo a assegurar que o azoto era a única substância adsorvida à superfície dos ACs e a única que contribuía para a pressão. Durante a realização da isotérmica, as amostras foram imersas num banho de azoto líquido garantindo assim que se encontravam à temperatura de -196 °C.

5.12 Análise termogravimétrica

As análises termogravimétricas foram realizadas no “Instituto Nacional del Carbón” (INCAR), utilizando o equipamento Setaram Labsys (Caluire, França), recorrendo a uma velocidade de fluxo de azoto igual a 50 mL/min e rampa de aquecimento de 15 °C/min, até à temperatura final de 900 °C.

5.13 Bibliografia

- [1] F.C.M. Portugal, M.L. Pinto, J.M.F. Nogueira, "Optimization of polyurethane foams for enhanced stir bar sorptive extraction of triazinic herbicides in water matrices", *Talanta* **77** (2008) 765.
- [2] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, INPI, Portugal, PPP20091000096389 (2009).
- [3] A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, INPI, Portugal, PPP20091000114179 (2009).
- [4] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, "Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous sample: theory and principles", *J. Microcolumn. Sep.* **11** (1999) 737.
- [5] F. David, P. Sandra, "Stir bar sorptive extraction for trace analysis", *J. Chromatogr. A* **1152** (2007) 54.
- [6] P. Serôdio, J.M.F. Nogueira, "Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection", *Anal. Chim. Acta* **517** (2004) 21.
- [7] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, "Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection", *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 1303.
- [8] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, "Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions", *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 2642.

Capítulo 6

Resultados e Discussão

6.1 Introdução

No presente capítulo proceder-se-á à apresentação e discussão dos resultados obtidos aquando do desenvolvimento, optimização e validação de novos métodos analíticos para a identificação e quantificação vestigial de analitos pertencentes a diversas classes de PPCPs em amostras ambientais. As classes de PPCPs estudadas foram os “musks”, anti-sépticos, analgésicos, anti-inflamatórios, reguladores lipídicos, antibióticos e hormonas esteróides sexuais.

O desenvolvimento de cada método analítico está dividido em três fases. Numa primeira fase procedeu-se à selecção dos analitos prioritários dentro da classe de PPCPs pretendida, à escolha do equipamento adequado, análise de espectros de massa e UV-vis (anexo A e B), optimização e validação do método instrumental. A segunda fase contemplou os processos para enriquecimento dos analitos, procedendo-se à optimização dos parâmetros que influenciam o processo de extracção e de retro-extracção, por forma a aumentar a sensibilidade da metodologia. Por último validaram-se as metodologias analíticas desenvolvidas tomando em conta diversos parâmetros, nomeadamente a gama linear dinâmica, limiares analíticos (anexo C) e precisão (anexo D), bem como aplicação a matrizes reais.

6.2 Parâmetros que influenciam o processo de extracção/retro-extracção

Na optimização do processo de extracção dos analitos optou-se por usar o método mais comum, no qual à excepção de uma, todas as variáveis do sistema se encontram fixas (OVAT – “One Variable At Time”)¹. Focando o passo de extracção, as variáveis mais estudadas são o tempo de extracção, ajuste de pH, controlo da força iónica, adição de modificador ao meio, velocidade de agitação e quantidade de fase extractiva²⁻⁵. Algumas variáveis como o pH ou o controlo da força iónica, podem modificar o analito ou as propriedades do meio aquoso afectando o equilíbrio. Outro grupo de variáveis, como por exemplo a velocidade de agitação, acelera o processo de difusão do analito, afectando a cinética de extracção. Seguidamente, algumas das variáveis que afectam o passo de extracção irão ser apresentadas detalhadamente.

O pH da matriz aquosa é uma variável importante para os analitos que apresentam propriedades básicas ou acídicas, sendo nestes casos ajustado por forma a obter o soluto parcial ou totalmente na forma não iónica, podendo originar assim um máximo de eficiência de extracção¹.

Por outro lado, um sal inerte, como o NaCl, pode ser adicionado durante o processo de extracção para modificar a força iónica da matriz aquosa. Em geral, para analitos mais hidrofóbicos ($\log K_{OW} > 3,0$), a adição de sal não melhora a recuperação, podendo até reduzir a eficiência de extracção devido ao aumento da viscosidade da solução aquosa (“oil effect”). Pelo contrário, para analitos polares pode verificar-se um aumento da eficiência da extracção com a adição de sal, provocada pela diminuição de solubilidade dos analitos na fase aquosa (“salting out”). No entanto, discrepâncias destas regras têm sido observadas o que leva a inferir que a adição de sal deve ser cuidadosamente otimizada para cada caso.

A adição de um modificador orgânico, como é o caso do MeOH, deve igualmente ser testado durante a optimização do processo de extracção por forma a minimizar a adsorção dos analitos nas paredes do frasco de amostragem, nomeadamente os mais hidrofóbicos (“wall effect”). No entanto, a adição de modificador orgânico pode também aumentar a solubilidade dos analitos na fase aquosa e portanto, minimizar a eficiência de extracção.

A velocidade de agitação é um parâmetro muitas vezes estudado uma vez que acelera a difusão, e portanto, a velocidade de transferência dos analitos da fase aquosa para a fase extractiva, aumentando assim a eficiência do processo para um determinado tempo de extracção. Este facto é explicado pelo decréscimo da espessura da camada fronteira entre o material de extracção e o seio da solução. No entanto, para velocidades de agitação mais elevadas o material pode ser danificado devido ao contacto directo com as paredes ou fundo do frasco de amostragem. Vários autores têm verificado um aumento de resposta para velocidades de agitação compreendidas entre 500 e 750 rpm, embora para valores mais elevados tenham verificado somente um ligeiro aumento ou mesmo um efeito negligenciável¹.

Conforme já referido no capítulo 3 (equação 3.5) a quantidade total de analito extraída depende da razão de fases envolvida. Deste modo, o volume de amostra e a quantidade de material usado para a extracção podem influenciar significativamente a eficiência de extracção.

Finalmente, uma das variáveis mais estudadas, o tempo de extracção, determina o período necessário para que cada analito seja quantitativamente transferido da matriz da amostra para a fase de extracção. Uma vez estar-se em presença de um sistema estático, operar sob condições de equilíbrio garante sensibilidade e precisão maximizados.

Para o processo de retro-extracção ou LD, a natureza, o tempo e o volume do solvente envolvido são as variáveis mais estudadas. O tipo de solvente utilizado tem uma importância fundamental para o processo de LD, uma vez que é o responsável pela remoção dos

analitos da fase polimérica ou material adsorvente utilizado durante o processo de extracção. A utilização de um solvente inadequado pode originar o designado efeito de memória ou “carry-over” no material de extracção. Os solventes mais utilizados são genericamente o ACN, MeOH e mistura de ambos^{4,5}. Solventes mais apolares, como é o caso do *n*-hexano, podem igualmente ser usados, embora alguns possam diminuir o tempo de vida ou promover a degradação da fase polimérica, principalmente em SBSE(PDMS).

Para acelerar o processo de LD, é prática vulgar recorrer ao uso de agitação mecânica, tratamento ultra-sónico ou aumento de temperatura¹. O tempo de LD é igualmente importante para garantir que a transferência dos analitos do material de extracção para o solvente seja completa, evitando assim também a ocorrência de efeitos de memória.

O volume de solvente deverá garantir a completa imersão do material utilizado para a extracção dos analitos. De modo a minimizar o volume de solvente, diversos autores propõem a utilização de LD em “vials” com “inserts”, por forma a diminuir a quantidade de solvente utilizada, podendo ainda recorrer-se à eliminação por evaporação.

6.3 “Musks”

6.3.1 Considerações gerais

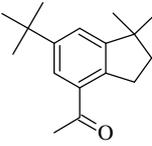
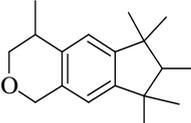
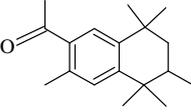
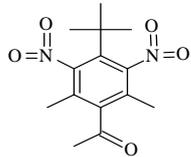
Devido à elevada capacidade de biocumulação de “musks” no ambiente, assim como ao seu potencial efeito tóxico em diversos organismos, esta classe de compostos tem despertado o interesse da comunidade científica nos últimos anos. A sua presença no meio ambiente e em diversos organismos pode ser explicado com base na natureza lipofílica que evidencia, pela lenta degradação biológica e bioquímica, assim como pelo elevado consumo de produtos de higiene e cuidado pessoal⁶.

Os “musks” policíclicos são o tipo de “musks” que têm sido referidos como principais poluentes nos últimos anos, sendo de salientar o HHCB e o AHTN que surgem mais frequentemente e em concentrações mais elevadas, seguindo-se o ADBI e o AHMI (fantolide)⁷. As elevadas concentrações de HHCB e AHTN presentes no ambiente devem-se ao facto de estes compostos serem os “musks” que apresentam uma maior percentagem de consumo no mercado⁸. O aparecimento de nitro “musks” no ambiente tem vindo a atenuar-se, uma vez que estes têm sido gradualmente substituídos pelos policíclicos, devido à toxicidade que apresentam quer para o ser humano quer para o ambiente⁹.

No presente trabalho, procedeu-se ao desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para a detecção e quantificação de três “musks” policíclicos – HHCB, AHTN e

ADBI. Embora os nitro “musks” se encontrem em desuso, decidiu-se também incluir o MK neste estudo, no sentido do método desenvolvido também permitir, posteriormente, avaliar a evolução do uso deste “musk”, assim como os níveis de concentração em amostras ambientais. Na tabela 6.1 é possível encontrar o valor de $\log K_{OW}$ e a fórmula estrutural para cada “musk” estudado.

Tabela 6.1 – Estruturas químicas e $\log K_{OW}$ para os “musks” estudados.

“Musks”	Estrutura química	$\log K_{OW}$ ^a
ADBI		6,6
HHCB		5,9
AHTN		5,7
MK		4,3

^aValores de $\log K_{OW}$ obtidos de [10]

6.3.2 Optimização e validação instrumental

Devido às propriedades físico-químicas dos “musks”, a técnica mais apropriada para proceder à sua análise é geralmente a GC-MS, utilizando a EI. Começou por se analisar uma solução padrão conjunta (1,0 mg/L) no modo de varrimento contínuo, o que permitiu a monitorização de todos os iões produzidos na gama de massas seleccionada (50 - 350 Da). A identificação de cada um dos analitos, assim como a determinação da retenção foi efectuada com base na comparação dos espectros obtidos para cada um com os espectros existentes na biblioteca de espectros disponível. Após a confirmação da ordem de eluição de cada um dos analitos, procedeu-se à análise dos espectros de massa obtidos (anexo A1), com o objectivo de seleccionar os iões característicos correspondentes a determinada m/z , com maior contribuição para a área total do pico. A tabela 6.2 resume os valores de m/z característicos de cada um dos analitos em estudo, sendo o ião que está a negrito o de

maior abundância, tendo sido conseqüentemente usado para quantificação. Por outro lado, os valores de m/z obtidos para cada composto estão de acordo com os apresentados por outros autores^{11,12}.

Tabela 6.2 – Tempos de retenção (t_R) e valores de m/z característicos para cada “musk”, nas condições instrumentais otimizadas¹³.

“Musks”	t_R (min)	iões característicos (m/z)
ADBI	14,2	173, 229 , 244
HHCB	15,7	213, 243 , 258
AHTN	15,8	243 , 258
MK	17,0	279 , 294

Posteriormente, as análises foram realizadas no modo SIM, sendo assim apenas monitorizados os iões com interesse, o que origina maior selectividade e sensibilidade.

Por forma a melhorar a sensibilidade, optou-se pela injeção de grandes volumes (LVI), tendo-se seleccionado 20 μ L uma vez maiores volumes originarem uma menor razão sinal/ruído (S/N) durante a análise de ultra-traços.

Dado que a velocidade de fluxo do gás de arrastamento (He) e a temperatura inicial do injecto influenciam a eficiência da injeção por LVI, optimizaram-se estes dois parâmetros instrumentais. Neste sentido, testaram-se duas velocidades de fluxo, 10 e 50 mL/min, tendo-se verificado que uma menor velocidade de fluxo permitia obter um ligeiro aumento no sinal de todos os compostos estudados (figura 6.1a). A temperatura inicial do injecto é igualmente um parâmetro importante que deverá ser optimizado, uma vez garantir uma melhor criofoagem. Do ponto de vista prático, baixas temperaturas minimizam perdas dos analitos aumentando o seu sinal, principalmente para os analitos mais voláteis. Para as cinco temperaturas testadas (0, 10, 20, 30 e 40 °C), o sinal obtido para os analitos alvo aumenta quando a temperatura decresce de 40 para 20 °C, tendo temperaturas inferiores originado diferenças negligenciáveis (figura 6.1b). Neste sentido, 20 °C e uma velocidade de fluxo de 10 mL/min foram as condições instrumentais seleccionadas.

Monitorizando os iões seleccionados nas condições instrumentais seleccionadas obteve-se uma boa selectividade e sensibilidade, assim como picos simétricos, em tempo analítico aceitável.

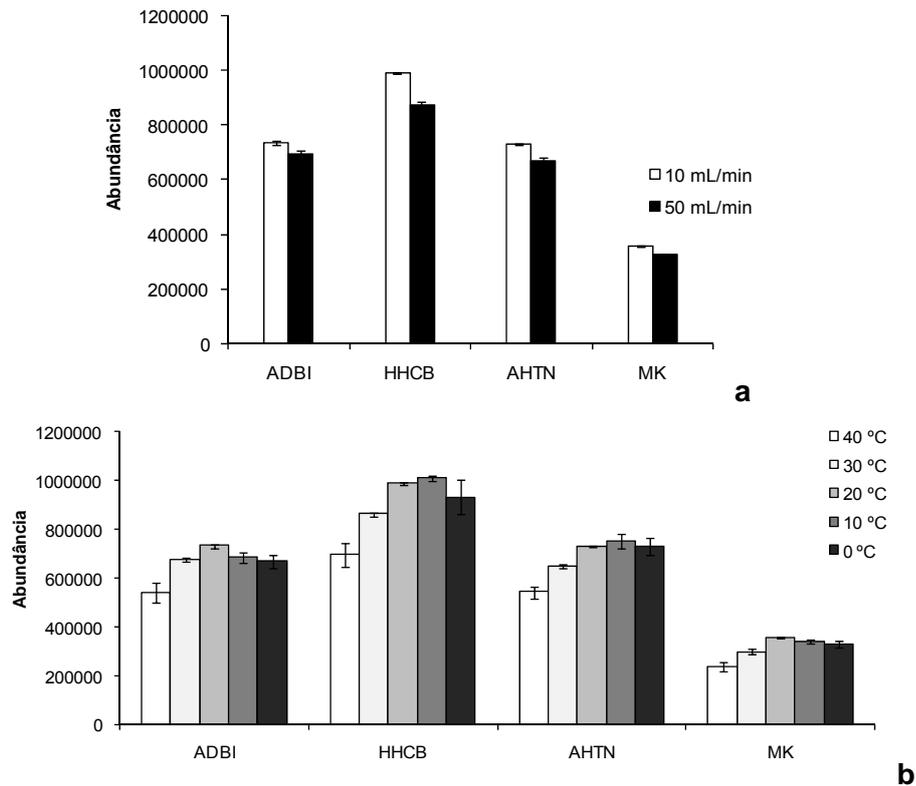


Figura 6.1 – Influência da velocidade de fluxo (a) e da temperatura inicial do injector (b) na abundância dos quatro “musks” estudados por LVI-GC-MS(SIM)¹³.

O principal problema para análise de “musks” é o elevado risco de contaminação que pode ocorrer durante o procedimento analítico, uma vez estes compostos se encontram em muitos produtos usados no dia-a-dia, nomeadamente, perfumes, detergentes, cremes, sabonetes, entre outros⁶. Neste contexto, foram realizados diversos ensaios em branco para avaliar eventuais ocorrências provenientes do ambiente laboratorial, não tendo sido observadas contaminações durante a realização destes ensaios.

Posteriormente, avaliou-se a gama linear dinâmica instrumental utilizando soluções conjuntas contendo diferentes concentrações. A partir dos resultados obtidos verificou-se boa linearidade na gama de concentrações compreendidas entre 10 e 100 µg/L, com coeficientes de correlação (*r*) superiores a 0,9972 para os quatro “musks” estudados. Os limites de detecção (LODs) e de quantificação (LOQs) foram determinados em condições de repetibilidade, com recurso à análise de seis ensaios do padrão de concentração mais baixa da gama linear dinâmica. Os LODs e LOQs são expressos como a concentração analítica correspondente a três e dez vezes o desvio padrão da concentração obtida dos seis ensaios, respectivamente. Os valores de LODs e LOQs determinados estão situados entre

0,9 - 1,8 µg/L e 3,0 - 6,1 µg/L, respectivamente. A precisão instrumental foi igualmente avaliada através de injeções consecutivas dos padrões com concentração 10, 60 e 100 µg/L, tendo-se obtido desvios padrão relativos (RSD) inferiores a 12 %. A tabela 6.3 resume os dados referentes à calibração obtidos por LVI-GC-MS(SIM) para cada “musk” estudado, nas condições instrumentais utilizadas.

Tabela 6.3 – Gama linear dinâmica, coeficiente de correlação (r), LODs, LOQs e precisão instrumental obtidos por LVI-GC-MS(SIM) para os “musks” estudados, sob condições instrumentais optimizadas.

“Musks”	Gama linear dinâmica (µg/L)	r	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Precisão (% RSD, n=6)		
					10 µg/L	60 µg/L	100 µg/L
ADBI	10-100	0,9992	0,9	3,0	12,0	3,9	2,9
HHCB	10-100	0,9986	0,9	3,0	11,1	9,8	10,7
AHTN	10-100	0,9987	0,9	3,0	8,8	7,3	5,4
MK	10-100	0,9972	1,8	6,1	4,9	2,6	7,6

6.3.3 Optimização da SBSE(PDMS)-LD

Pelos valores de $\log K_{O/W}$ (tabela 6.1) verifica-se que os “musks” estudados são compostos apolares e conseqüentemente espera-se que as barras comerciais revestidas com PDMS dêem boa resposta na respectiva extracção. Assim, procedeu-se à optimização do método SBSE(PDMS)-LD, por forma a aumentar a sensibilidade da metodologia e diminuir os LODs. Para tal, foram realizados ensaios para um nível de 200 ng/L.

6.3.3.1 Dessorção líquida (LD)

Começou por se avaliar quais as melhores condições experimentais que permitiam uma completa retro-extracção dos analitos das barras de PDMS. De modo a avaliar possíveis perdas de analito durante o passo de evaporação, testou-se uma solução padrão conjunta de 50 µg/L, preparada em *n*-hexano. A solução foi evaporada sob uma suave corrente de azoto, tendo sido os resíduos redissolvidos no mesmo solvente e injectados no sistema LVI-GC-MS(SIM). Comparando os resultados obtidos com uma solução de igual concentração, mas não sujeita ao passo de evaporação, verificou-se que as recuperações obtidas se encontravam compreendidas entre 31,8 e 82,7 %, com RSD situado entre 4,6 e 8,5 %. Desta forma, verifica-se que ocorrem perdas significativas dos analitos durante o passo de

evaporação, sendo por isso necessário eliminá-lo. Assim, decidiu usar-se barras com menor volume em PDMS (24 μ L), uma vez estas requererem quantidade mínima de solvente (< 200 μ L), não sendo necessário o processo de evaporação do solvente, minimizando eventuais perdas de analito.

Tal como já referido anteriormente, os solventes mais frequentemente utilizados para LD são o MeOH e o ACN. Contudo, nesta nova abordagem analítica, ao utilizar um destes solventes teria de ser efectuada uma troca do mesmo, no sentido do uso de um solvente mais compatível com a análise por LVI-GC-MS(SIM), através de um passo de evaporação^{4,14,15}. Alternativamente, solventes apolares³ podem ser usados no passo de LD, nomeadamente *n*-alcanos¹⁶, em particular para compostos que apresentam uma elevada afinidade para este tipo de solventes, como é o caso dos compostos alvo em estudo. Assim, optou-se por utilizar o *n*-hexano, que demonstrou um bom desempenho na análise por LVI-GC-MS e que revelou uma excelente capacidade de remoção dos analitos do PDMS.

Após estabelecido o solvente utilizado na LD, testou-se qual o tempo que permitia uma completa remoção dos analitos do PDMS sob tratamento ultrasónico. Neste sentido, usou-se um “insert” de 250 μ L num “vial” (2 mL), ao qual foi adicionado 200 μ L de *n*-hexano. Por análise dos resultados obtidos para cada tempo testado (15, 30, 45 e 60 min) verificou-se que 30 min eram suficientes para a remoção completa dos analitos do PDMS, como é apresentado na figura 6.2.

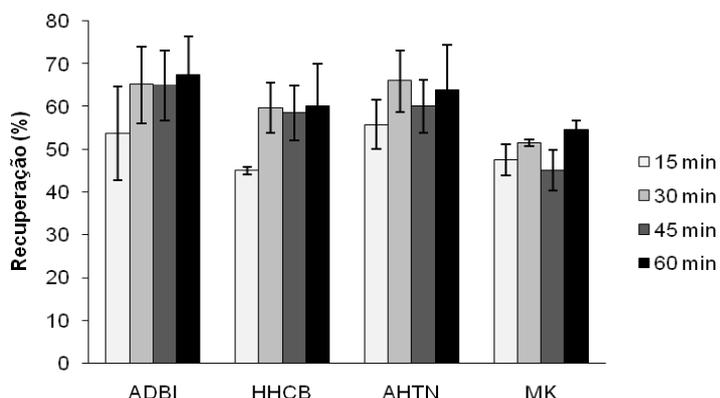


Figura 6.2 – Efeito do tempo de LD na recuperação dos “musks” estudados por SBSE-LD/LVI-GC-MS(SIM) (extração - 1 h (1000 rpm); retro-extração sob tratamento ultrasónico em *n*-hexano).

Para o estudo dos efeitos de memória, foram ainda executados ensaios com dois passos consecutivos de LD, nos quais após 30 min de LD, a barra era transferida para um outro “insert” contendo *n*-hexano, tendo-se procedido a tratamento ultrasónico durante mais 15 min. Por análise dos ensaios referentes a este estudo, conclui-se que não existem efeitos

de memória, uma vez os sinais detectados pela análise do solvente utilizado na segunda LD terem sido inferiores ao LOD instrumental encontrado.

6.3.3.2 SBSE(PDMS)

Após a optimização das melhores condições para LD, prosseguiu-se com a optimização dos parâmetros que afectam a extracção dos analitos das matrizes aquosas.

Neste contexto, começou por se optimizar o pH, tendo-se testado três níveis, nomeadamente, ácido (2,0), neutro (7,0) e básico (12,0), cujos resultados obtidos estão reproduzidos na figura 6.3a. Verificou-se que para pH ácido se obtém uma menor percentagem de recuperação, enquanto para pH neutro e básico os resultados são semelhantes, o que está de acordo com os resultados obtidos por outros autores¹¹. Para estudos posteriores seleccionou-se o valor de pH neutro, uma vez que valores extremos de pH provocam degradação do PDMS, diminuindo neste sentido o tempo de vida das barras¹.

Posteriormente, foram testados três níveis de velocidade de agitação: 750, 1000 e 1250 rpm. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 6.3b, que conforme pode ser observado, a velocidade de 1250 rpm origina um ligeiro aumento na recuperação dos analitos estudados. Assim, para os próximos ensaios seleccionou-se uma velocidade de agitação de 1250 rpm. Diferentes tempos de extracção (0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 16,0 h) foram seguidamente testados de modo a avaliar qual o período que permitiria alcançar o equilíbrio. A figura 6.3c ilustra o perfil cinético obtido, no qual pode ser observado que após 2,0 h de extracção o equilíbrio foi alcançado para o HHCB e AHTN, embora somente após 4,0 h para o ADBI e MK. Como consequência, optou-se por fixar as 4,0 h como tempo mínimo necessário para atingir o equilíbrio de todos os “musks” estudados.

De modo a avaliar o efeito da adição de um modificador da polaridade da matriz na recuperação dos analitos, foram realizados ensaios contendo 5, 10 e 15 % de MeOH (v/v) em amostras de água ultra-pura fortificada. Na figura 6.3d é possível observar a ilustração gráfica dos resultados obtidos, donde se verifica que para o HHCB e AHTN a adição de MeOH não influencia a sua recuperação, ao passo que para o ADBI e MK se verifica uma diminuição da recuperação quando a matriz contém 15 % daquele álcool.

Por forma a analisar o efeito da força iónica na eficiência de recuperação adicionou-se NaCl ao meio aquoso em diferentes quantidades (5, 10 e 15 % (m/v)). É de salientar que a adição de sal acima dos 15 % foi evitada, uma vez que elevadas concentrações decompõem a camada polimérica, diminuindo a eficiência de extracção ou mesmo danificando o PDMS¹⁴. Os resultados obtidos revelaram que a adição de NaCl não

influenciava a recuperação dos analitos estudados, o que está de acordo com resultados avançados por outros autores.¹⁷ Assim, em estudos posteriores não houve necessidade de modificar a polaridade ou a força iónica do meio.

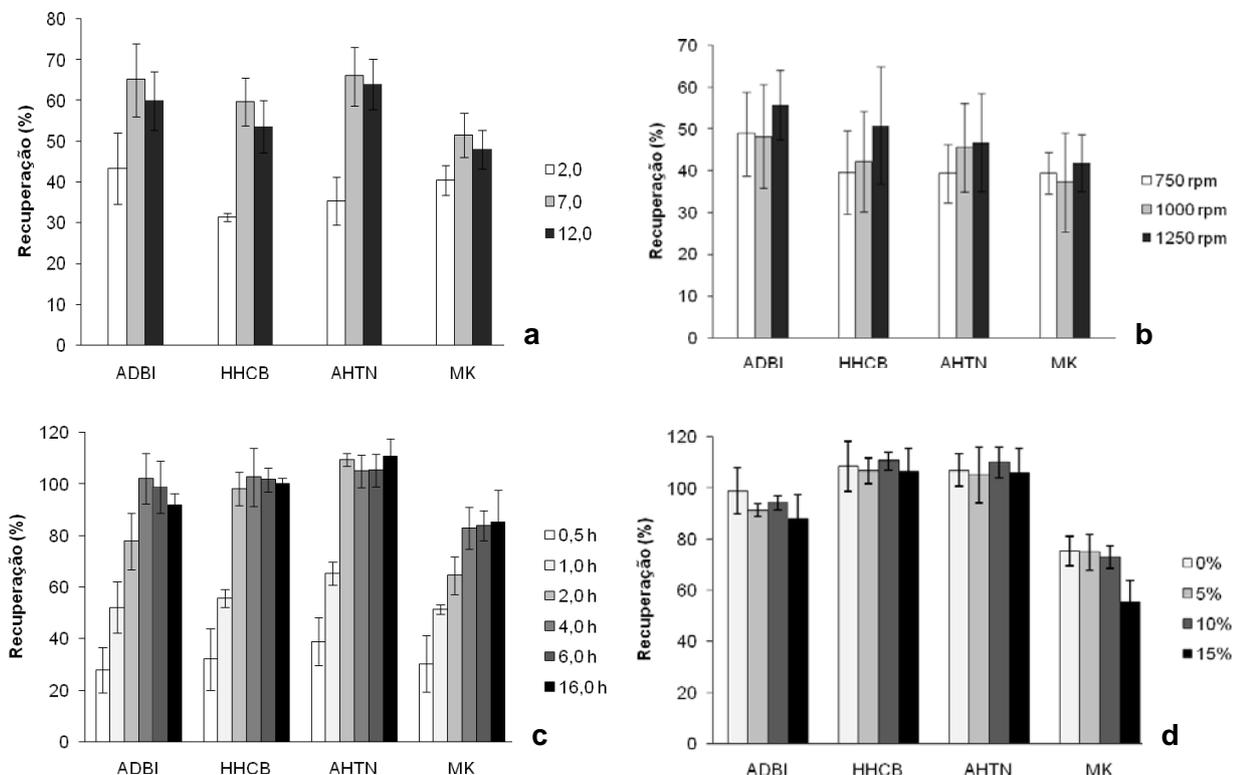


Figura 6.3 – Efeito do pH (a), velocidade de agitação (b), tempo de extracção (c) e % de MeOH (d) na recuperação dos “musks” estudados por SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS(SIM) (retro-extracção em *n*-hexano (30 min) sob tratamento ultrasónico)¹³.

Tal como já foi referido no capítulo 3, o coeficiente de partição dos analitos entre o PDMS e a matriz aquosa ($K_{PDMS/W}$) é proporcional ao coeficiente de partição octanol-água ($K_{O/W}$). Assim, a recuperação teórica para os “musks” pode ser estimada com base no valor de β e no valor de $K_{O/W}$, de acordo com a equação 3.5. A título exemplificativo, para o ADBI que apresenta um $\log K_{O/W}$ de 6,6 e com base no valor de β (1250; $V_W = 30$ mL e $V_{PDMS} = 24$ μ L) estima-se uma recuperação de 100 %. Para determinar as recuperações obtidas experimentalmente realizaram-se ensaios sob as condições optimizadas (SBSE: 4 h (1250 rpm, pH 7,0); LD: *n*-hexano (30 min)) em água ultra-pura fortificada com uma solução padrão conjunta de 200 ng/L. As recuperações obtidas estão compreendidas entre $83,7 \pm 8,1$ % (MK) e $107,6 \pm 10,8$ % (HHCB). Comparando as recuperações teóricas com as experimentais (figura 6.4 e tabela 6.4), verifica-se a ocorrência de boa aproximação entre ambas, o que pode confirmar as considerações teóricas avançadas ($K_{PDMS/W} \approx K_{O/W}$).

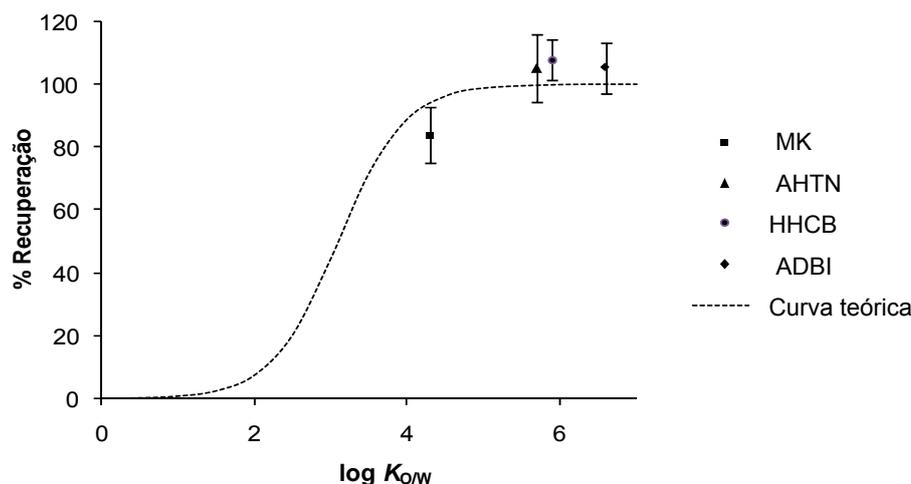


Figura 6.4 – Recuperação experimental e curva teórica para os quatro “musks” estudados por SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS(SIM), em condições experimentais otimizadas¹³.

6.3.4 Validação do método SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS(SIM)

Durante o processo de validação do método analítico determinou-se a gama linear dinâmica, LODs e LOQs, tendo-se ainda avaliado a precisão.

A gama linear dinâmica foi testada recorrendo ao método dos mínimos quadrados com análise de resíduos, verificando-se linearidade para uma gama de concentrações compreendidas entre 66 e 500 ng/L, para cinco níveis de concentração em condições experimentais otimizadas. Os resultados obtidos evidenciaram linearidades com coeficientes de correlação (r) compreendidos entre 0,9980 e 0,9990 (tabela 6.4 e anexo E1), tendo os resíduos apresentado sempre um desvio inferior a 9,3 % (anexo F1). Pode ainda constatar-se que os sinais obtidos pelo método SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS(SIM) são proporcionais às concentrações dos analitos presentes na matriz aquosa, naquela gama de concentrações. Na determinação dos LODs e LOQs para cada composto, procedeu-se de forma semelhante à descrita para determinação destes mesmos limites aquando a validação instrumental, tendo-se verificado que estavam compreendidos entre 12 - 19 ng/L e 41 - 62 ng/L, respectivamente (tabela 6.4). É de salientar que concentrações máximas permitidas para estes analitos em águas destinadas ao consumo humano ainda não estão estabelecidas pelas organizações regulamentares internacionais, principalmente devido ao incompleto conhecimento dos seus efeitos quer ao nível toxicológico quer de distribuição no ambiente.

Tabela 6.4 – Recuperação teórica e experimental, LOD, LOQ, gama linear dinâmica e coeficiente de correlação (*r*) obtidos para os “musks” estudados por SBSE(PDMS)-LD/GC-MS(SIM) sob condições experimentais optimizadas¹³.

“Musks”	Recuperação teórica (%) ^a	Recuperação experimental (% ±RSD ; n= 6) ^b	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Gama linear dinâmica (ng/L)	<i>r</i>
ADBI	100,0	105,2 ± 8,9	19	62	66-500	0,9987
HHCB	99,8	107,6 ± 10,8	14	48	68-510	0,9981
AHTN	99,8	105,1 ± 6,3	17	58	66-500	0,9980
MK	94,1	83,7 ± 8,1	12	41	70-520	0,9990

^a Volume de amostra: 30 mL; $\beta=1250$; ^b Nível de fortificação: 200 ng/L

A precisão do método foi avaliada através de seis ensaios realizados no mesmo dia (repetibilidade) e em dias diferentes (precisão intermédia), para três níveis de concentração (70, 200 e 400 ng/L). Na tabela 6.5 é possível consultar os valores de RSD (%) obtidos para cada ensaio.

Tabela 6.5 – Estudo de precisão do método SBSE(PDMS)-LD/GC-MS(SIM), para três níveis de concentração (n = 6).

“Musks”	Repetibilidade (RSD %)			Precisão Intermédia (RSD %)		
	70 ng/L	200 ng/L	400 ng/L	70 ng/L	200 ng/L	400 ng/L
ADBI	10,9	8,9	6,3	19,0	10,9	11,3
HHCB	10,8	7,5	5,2	12,4	16,7	13,5
AHTN	7,3	6,3	7,4	20,0	15,8	12,8
MK	13,2	8,1	6,0	19,5	14,8	9,9

Avaliando a dispersão dos resultados nos três níveis de concentração estudados, verifica-se que existe uma tendência para esta dispersão ser menor à medida que o nível de concentração aumenta. Verifica-se, tal como era expectável, uma maior dispersão de resultados para a precisão intermédia, uma vez que estas determinações foram efectuadas em seis dias distintos. Os valores de RSD são inferiores a 13,2 % quando se avalia a repetibilidade e inferiores a 20 % para a precisão intermédia. De acordo com a directiva 98/83/CE¹⁸, são aceites valores de precisão inferiores a 25 % para métodos indicados de análise vestigial de compostos orgânicos em matrizes aquosas. Neste sentido, os valores de precisão obtidos estão de acordo com esta conformidade.

Refira-se por último que ensaios em branco regularmente efectuados pela metodologia proposta revelaram ausência de quaisquer contaminações.

6.3.5 Aplicação do método a amostras reais

Por forma a demonstrar a capacidade analítica da metodologia desenvolvida avaliou-se a sua aplicabilidade a amostras reais ambientais.

Tal como noutros métodos de preparação de amostra para análise vestigial, a eficiência da extracção da SBSE(PDMS)-LD pode ser afectada pela complexidade da matriz. Por exemplo, matéria inorgânica ou orgânica dissolvida ou suspensa em matrizes aquosas pode interferir com a extracção dos analitos alvo pela fase polimérica de PDMS e portanto, a eficiência da extracção poder variar de amostra para amostra¹⁹. No presente estudo, o SAM foi seleccionado com o intuito de minimizar eventuais efeitos de matriz que pudessem ocorrer. Neste sentido, as amostras foram avaliadas pelo método desenvolvido através de quatro níveis de fortificação (66 - 500 ng/L), assim como o respectivo ensaio em branco (ponto zero) sem fortificação. A figura 6.5 ilustra fragmentogramas obtidos para os ensaios realizados em água ultra-pura fortificada para um nível de concentração de 200 ng/L (a), e para as amostras estudadas sem fortificação, nomeadamente, água residual (b), mar (c), água de abastecimento (d) e superficial (e) por SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais optimizadas, onde é possível verificar boa sensibilidade e selectividade.

Na figura 6.6, é possível observar as recuperações obtidas para os quartos “musks” nas cinco matrizes aquosas estudadas, fortificadas com 200 ng/L. A aplicação da ANOVA unifactorial permitiu avaliar a influência da matriz na percentagem de recuperação. O valor de p (anexo G1) é a probabilidade para a qual a hipótese nula H_0 é verdadeira, em que H_0 assume que os valores médios são iguais. Como os valores p são sempre inferiores a 0,05 significa que existem diferenças estatisticamente significativas entre as recuperações obtidas para as diferentes matrizes, para um nível de confiança de 95 %. Afim de verificar quais as matrizes responsáveis por essas diferenças realizou-se um teste de comparações múltiplas – teste de “Tuckey” (anexo G1). Por análise dos resultados verifica-se que quando se compara a percentagem de recuperação obtida para cada matriz apenas com a referência (água ultra-pura), o valor $p > 0,05$, à excepção do MK em água residual. Neste sentido, concluí-se que não existem diferenças estatisticamente significativas nas recuperações para os vários compostos quando se compara apenas a matriz com a água ultra-pura. Por análise dos resultados foi ainda possível observar que ocorrem diferenças

estatisticamente significativas para os seguintes casos – ADBI: mar/superficial; HHCB: mar/superficial, rede de abastecimento/superficial e residual/superficial; AHTN: mar/rede de abastecimento; MK: mar/superficial, rede de abastecimento/superficial, residual/superficial e residual/ultra-pura.

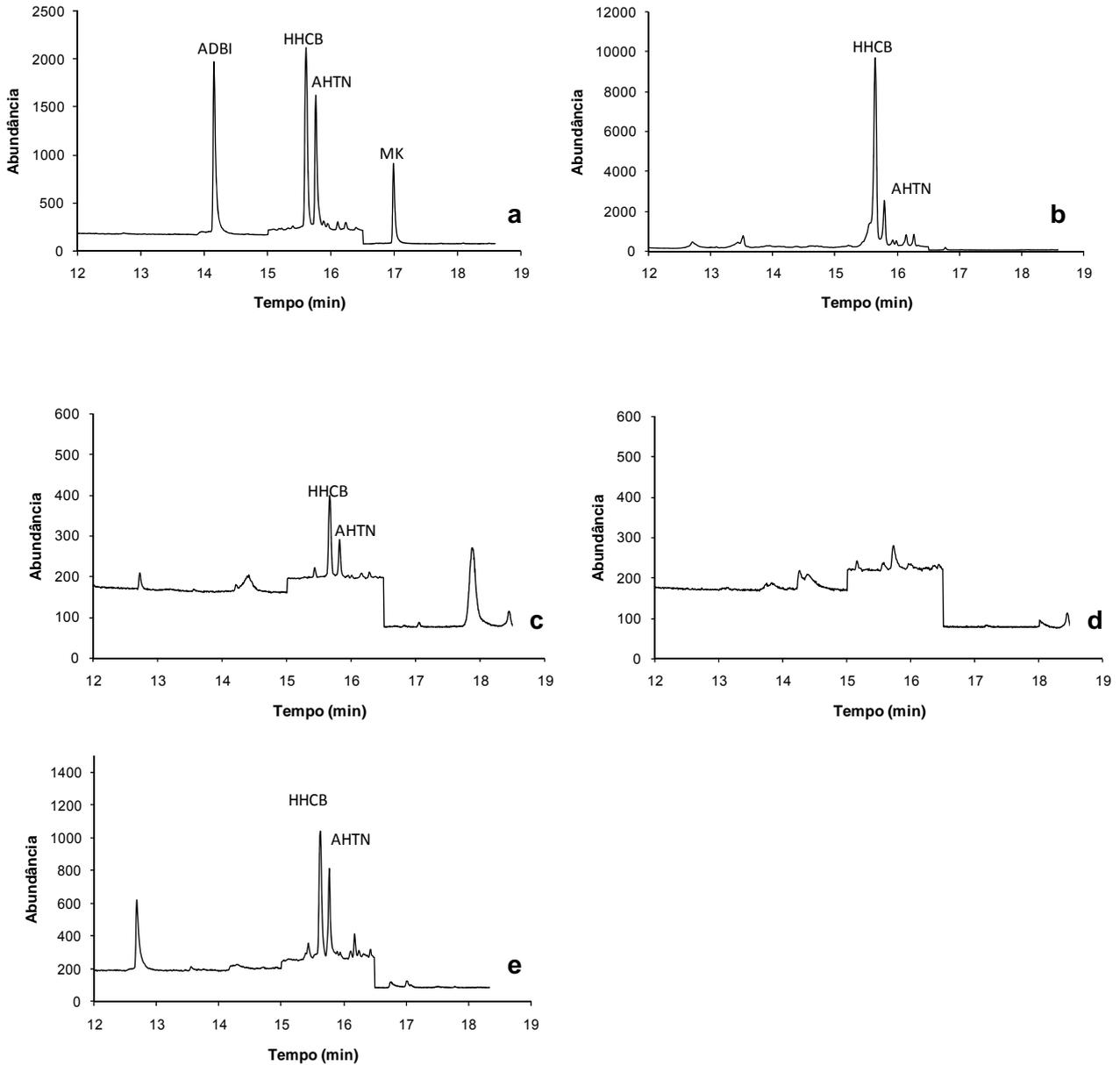


Figura 6.5 – Fragmentogramas obtidos para os ensaios realizados em água ultra-pura fortificada a 200 ng/L (a), residual (b), mar (c), água de abastecimento (d) e superficial (e), por SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas¹³.

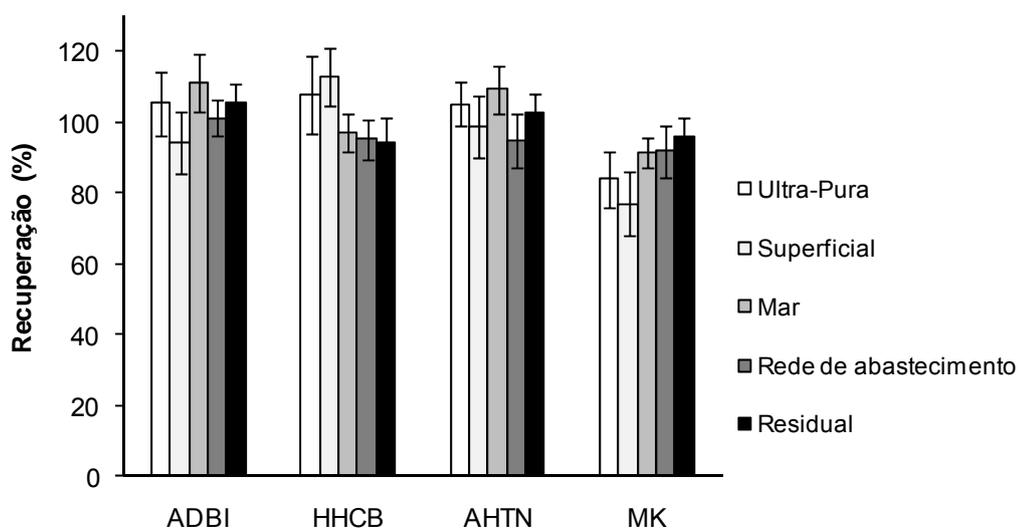


Figura 6.6 – Comparação das recuperações obtidas em água ultra-pura, superficial, mar, abastecimento e residual para um nível de fortificação de 200 ng/L por SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais optimizadas¹³.

Na tabela 6.6 é possível consultar os coeficientes de correlação (r), assim como as concentrações determinadas para cada “musk” nas diferentes amostras estudadas por SAM, sob condições experimentais optimizadas. É possível verificar que se obteve boa linearidade, que conduz a uma excelente selectividade e notável sensibilidade. As concentrações de ADBI e MK são sempre inferiores aos LODs para todas as amostras analisadas, assim como para o HHCb e AHTN na água de abastecimento. Contudo, nas amostras de águas residuais, HHCb e AHTN estavam presentes em concentrações mais elevadas, 1270, 4670 e 259, 1290 ng/L, dependendo se a água provinha do efluente ou influente, respectivamente. Já seria de esperar que a concentração de “musks” policíclicos diminuísse depois do tratamento efectuado na ETAR. A ordem de grandeza das concentrações encontradas neste tipo de amostras está de acordo com valores mencionados por outros autores^{8,20}.

Como consequência das elevadas concentrações de HHCb e AHTN presentes na água residual já tratada, será de esperar a presença destes compostos nas águas que irão receber estes efluentes. HHCb e AHTN foram detectados em todas as águas superficiais analisadas, o primeiro presente em concentrações compreendidas entre 77 e 236 ng/L, tendo a concentração máxima detectada de AHTN sido de 143 ng/L. Comparando as concentrações encontradas em diferentes pontos do rio Tejo, Valada foi o local no qual estes poluentes estavam presentes em maior quantidade, o que pode ser explicado pela existência de uma praia fluvial neste ponto de recolha.

Tabela 6.6 – Concentração (C_0 , ng/L) e coeficiente de correlação (r) obtidos pelo SAM para os quatro “musk” estudados em água superficial, mar, residual e rede de abastecimento pelo método SBSE(PDMS-LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais optimizadas¹³.

	r					C_0 (ng/L)											
	Água Superficial		Água Mar	Água Residual	Rede	Água Superficial		Água Mar	Água Residual	Rede							
	Valada	Oriente	Santa Apol.	Docas	Algarve	Influyente	Efluente	Lisboa	Valada	Oriente	Santa Apol.	Docas	Algarve	Influyente	Efluente	Lisboa	
“Musks”																	
ADBI	0,9974	0,9987	0,9990	0,9990	0,9968	0,9968	0,9985	0,9982	0,9982	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
HHCB	0,9999	0,9970	0,9994	0,9991	0,9969	0,9982	0,9977	0,9988	0,9988	236	77	132	154	64	4670	1270	< LOD
AHTN	0,9993	0,9988	0,9995	0,9997	0,9960	0,9994	0,9974	0,9988	0,9988	143	< LOD	100	< LOD	< LOQ	1290	259	< LOD
MK	0,9988	0,9994	0,9998	0,9999	0,9976	0,9986	0,9981	0,9972	0,9972	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

A presença de ambos os “musks” policíclicos nas águas superficiais reflecte o impacto de descarga do efluente das águas residuais para o rio e no caso da praia fluvial a utilização de produtos de higiene e cuidado pessoal pelos banhistas. As concentrações de HHCB e AHTN encontradas nas águas superficiais analisadas são semelhantes às recentemente referidas por autores de outros países²¹.

A concentração de HHCB encontrada nas amostras analisadas foi sempre superior à concentração de AHTN, reflectindo que o HHCB é produzido e usado em maior quantidade. Roosens *et al* (2007)²² ao analisar o conteúdo de “musks” policíclicos em produtos de higiene e cuidado pessoal, nomeadamente, perfumes, loções corporais e champô, demonstraram que a quantidade de HHCB presente é superior à de AHTN. Contudo, as concentrações encontradas em cada amostra podem ser diariamente alteradas devido à variação da composição dos efluentes domésticos e industriais, bem como provenientes de fontes de contaminação locais, como é o caso dos banhistas.

6.4 Anti-Sépticos

6.4.1 Considerações gerais

Dentro da classe dos anti-sépticos, o TCS (figura 6.7), é um anti-microbiano utilizado há mais de quarenta anos em todo o mundo e conseqüentemente, tem-se igualmente tornado um contaminante ambiental. A sua presença no ambiente tem sérias implicações devido à elevada toxicidade que evidencia para os organismos aquáticos²³ e à capacidade de desenvolver mecanismos resistentes a bactérias²⁴. A fotodegradação do TCS para dioxinas, tem suscitado igualmente preocupação por parte da comunidade científica. Este composto está incluído no grupo de poluentes orgânicos emergentes, sendo candidato a potencial EDC²⁵. Neste sentido, é importante desenvolver metodologias analíticas, integradas na designada “química verde”, para a monitorização de TCS em diversas matrizes ambientais e biológicas.

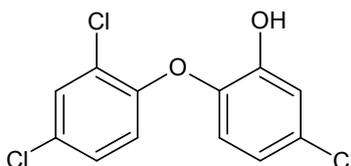


Figura 6.7 – Estrutura química do TCS.

6.4.2 Otimização e validação instrumental

Os métodos cromatográficos têm genericamente demonstrado serem eficazes e versáteis na monitorização do TCS. Uma vez a determinação de TCS por GC requerer a derivatização do analito, a LC torna-se uma técnica mais vantajosa para a respectiva análise, já que este composto é cromóforo.

Inicialmente começou por se seleccionar os parâmetros instrumentais que permitiam obter condições adequadas para a análise do TCS por HPLC-DAD. Utilizando uma coluna convencional de fase reversa, uma fase móvel constituída por ACN e solução aquosa de ácido fosfórico (0,1 %) na proporção de 80/20 % e uma velocidade de fluxo de 1,0 mL/min, obteve-se uma boa resposta analítica, com um tempo de retenção aceitável (3,1 min). De acordo com a literatura²⁶, seleccionou-se o comprimento de onda de 230 nm para a monitorização do TCS (espectro UV-vis em anexo B).

Posteriormente, testou-se a gama linear dinâmica instrumental com recurso a treze soluções padrão, contendo concentrações compreendidas entre 0,2 e 136 mg/L, tendo-se verificado excelente resposta linear, com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9997. Neste sentido, testou-se a sensibilidade instrumental, por determinação do LOD e LOQ em condições de repetibilidade, com recurso à análise de seis ensaios do padrão de concentração mais baixa da gama linear dinâmica. Os valores de LOD e LOQ obtidos para o TCS foram 18 e 60 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Avaliou-se ainda a precisão através de repetibilidade de injeções (0,2 e 10 mg/L; seis ensaios para cada concentração), resultando num RSD inferior a 3,2 %. Por análise de brancos testou-se a ausência de contaminação ou efeitos de memória.

6.4.3 Otimização da SBSE(PDMS)-LD

Uma vez o TCS estar presente em amostras ambientais com concentrações vestigiais, é necessário um passo de concentração do analito prévio à análise instrumental. Neste sentido, aplicou-se pela primeira vez a técnica SBSE para a extracção e concentração do TCS em diversas matrizes reais, tendo-se procedido à optimização do método SBSE(PDMS)-LD, por forma a aumentar a sensibilidade da metodologia e diminuir o LOD. Foram efectuados ensaios para uma concentração de 10 $\mu\text{g/L}$, utilizando barras de agitação cobertas com 126 μL de PDMS, por forma a alcançar uma maior capacidade de sorção do analito.

6.4.3.1 Dessorção líquida (LD)

Os primeiros ensaios realizados durante o processo de optimização da LD foram efectuados no sentido de se verificar a possibilidade de perda de analito durante o passo de evaporação do solvente, ainda que o TCS seja considerado uma substância não volátil. Deste modo, soluções padrão de TCS com várias concentrações foram evaporadas sob suave corrente de azoto, tendo os resíduos sido posteriormente redissolvidos em MeOH e injectados no sistema HPLC-DAD. Comparando os dados obtidos com controlos apropriados, verificou-se que se obtinha uma reconstituição superior a 94,8 %, com RSD inferior a 2,0 %, confirmando assim a não ocorrência de perdas significativas durante o passo de evaporação.

Posteriormente, avaliou-se quais as melhores condições para LD, por forma a assegurar completa retro-extracção do TCS da fase de PDMS. Testaram-se solventes polares, como o MeOH e ACN, tendo-se verificado que a capacidade de retro-extracção do segundo é ligeiramente superior à do primeiro (figura 6.8a). O volume de solvente utilizado foi de 1,5 mL de modo a garantir que a barra ficasse completamente imersa. A LD foi efectuada sob tratamento ultrasónico por forma a acelerar o processo, tendo sido avaliado qual o tempo adequado para a retro-extracção. Por análise do gráfico da figura 6.8b, verifica-se que somente após 60 min é que é alcançada maior percentagem de recuperação. Realizando uma segunda retro-extracção, verificou-se que a primeira retro-extracção era suficiente para a remoção de todo o TCS do PDMS. Consequentemente um período de 60 min foi estabelecido para a LD.

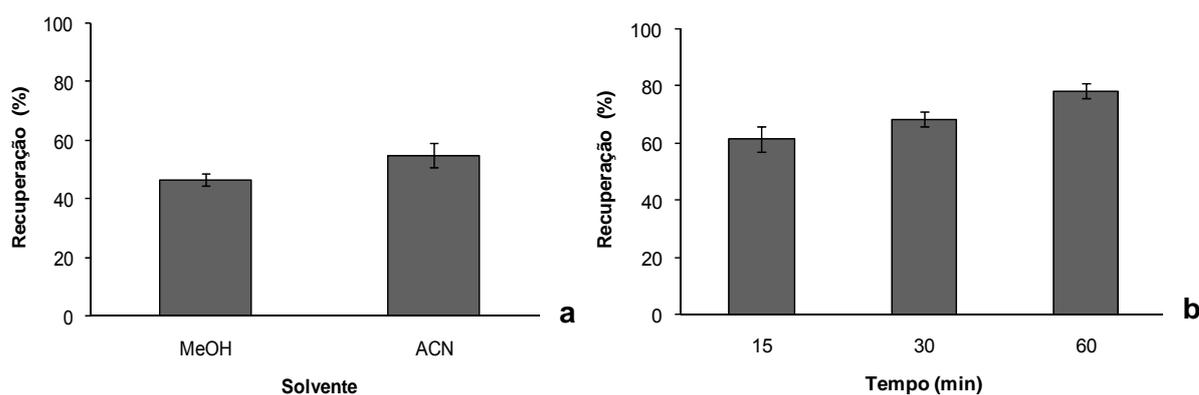


Figura 6.8 – Efeito do solvente (a) e do tempo (b) de LD na recuperação do TCS por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD (extracção – 1 h (750 rpm)).

6.4.3.2 SBSE(PDMS)

A SBSE é uma técnica de equilíbrio e conseqüentemente o processo de extracção é significativamente influenciado pelo tempo de extracção e pela velocidade de agitação². Para a optimização da velocidade de agitação foram testados os valores 750, 1000 e 1250 rpm, não se tendo verificado grandes diferenças nas recuperações obtidas (figura 6.9a). Neste sentido, seleccionou-se uma velocidade de agitação de 1000 rpm, uma vez que para velocidades superiores se tornar difícil manter a barra (126 µL em PDMS) com um movimento circular constante e conseqüentemente, não se conseguir garantir uma velocidade de agitação uniforme durante todo o processo de extracção.

Para o estudo do tempo de extracção foram testados diferentes períodos (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 17 h), tendo-se obtido o perfil cinético que está representado na figura 6.9b. Verifica-se que o equilíbrio é alcançado após uma hora de extracção e que a eficiência do processo de extracção começa a diminuir ligeiramente para períodos de extracção superiores a 2 h. Este facto parece ser explicado pela ocorrência de fenómenos de adsorção do analito nas paredes do frasco de vidro (“wall effect”), o que claramente influencia a eficiência do processo.

A alteração da polaridade da matriz, por adição de MeOH, não influenciou significativamente a extracção do TCS, para um tempo de extracção de 1,0 h (figura 6.9c). Alterando a força iónica do meio verifica-se um ligeiro aumento da extracção por adição de 5 % em NaCl (figura 6.9d), no entanto como a diferença observada não é muito significativa, optou-se por não adicionar este sal ao meio aquoso por forma a prolongar o tempo de vida das barras de agitação.

Aquando dos ensaios, o pH da matriz foi sempre inferior ao valor do pKa do TCS (7,9)²⁷, de modo a que este composto se encontrasse na forma não ionizada, originando assim um máximo de eficiência de extracção.

Com base no valor do log $K_{O/W}$ (4,8)²⁷ para o TCS, no valor de β (198,4; $V_w = 25$ mL e $V_{PDMS} = 126$ µL) e com recurso à equação 3.5, estimou-se uma recuperação teórica de 99,7 % para este anti-séptico. Usando as condições experimentais definidas após a optimização do processo (SBSE: 1 h (1000 rpm); LD: ACN (60 min) com evaporação sob corrente de azoto até à secura e redissolução em MeOH), a recuperação experimental média obtida foi de $78,5 \pm 2,2$ %, para um nível de concentração de 10 µg/L. Comparando a recuperação teórica com a experimental foi possível observar que existe um desvio entre os dois valores ($K_{PDMS/W} < K_{O/W}$), constatando-se assim que nem sempre a aproximação teoricamente

considerada ($K_{PDMS/W} \approx K_{O/W}$) é verificada, estando esta constatação de acordo com observações mencionadas por outros autores.^{2,4,5}

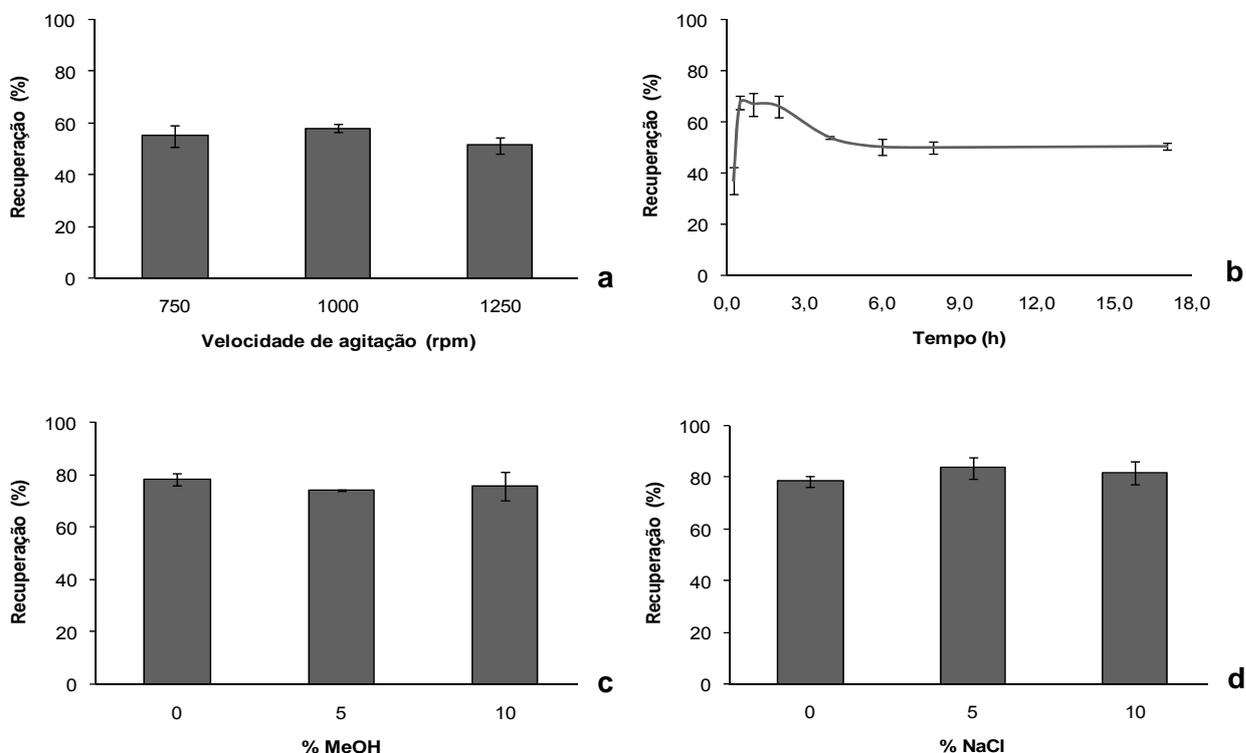


Figura 6.9 – Efeito da velocidade de agitação (a), tempo de extração (b), adição de MeOH (c) e NaCl (d) na recuperação do TCS por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD (retro-extração em ACN sob tratamento ultrasónico (15 min))²⁸.

6.4.4 Validação do método SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD

Durante o processo de validação do método analítico determinou-se a gama linear dinâmica, os LODs e os LOQs, tendo-se ainda avaliado a precisão.

A gama linear dinâmica foi testada pelo método dos mínimos quadrados com análise de resíduos, verificando-se linearidade para concentrações compreendidas entre 0,4 e 108 µg/L, utilizando oito níveis de concentração sob condições experimentais optimizadas. Os resultados obtidos evidenciaram boa linearidade com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9996 (anexo E2), tendo os resíduos apresentado desvios inferiores a 14,0 % (anexo F2). Assim, pode constatar-se que os sinais obtidos pelo método SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD são proporcionais às concentrações do analito presentes na matriz aquosa, naquela gama de concentrações. Para a determinação do LOD e LOQ procedeu-se de forma semelhante às anteriormente descritas, tendo-se encontrado valores de 0,1 e 0,4 µg/L, respectivamente.

A precisão do método foi avaliada com recurso a seis ensaios realizados no mesmo dia (repetibilidade) e em dias diferentes (precisão intermédia), para três níveis de concentração (1,0, 54 e 108 µg/L). Na tabela 6.7 é possível consultar quais os valores de RSD (%) obtidos para cada ensaio, onde é possível verificar que são inferiores a 4 %. Ensaios em branco foram ainda frequentemente efectuados de modo a controlar eventuais contaminações.

Tabela 6.7 – Estudo de precisão do método SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, para três níveis de concentração (n = 6) em TCS.

	Repetibilidade (RSD %)			Precisão Intermédia (RSD %)		
	1,0 µg/L	54 µg/L	108 µg/L	1,0 µg/L	54 µg/L	108 µg/L
TCS	3,6	1,2	2,4	3,6	3,1	2,9

6.4.5 Aplicação do método a amostras reais

Por forma a avaliar a aplicação da nova metodologia desenvolvida a matrizes reais, realizaram-se ensaios em pasta de dentes comercial, saliva e água residual. Durante este estudo, o SAM foi seleccionado para minimizar eventuais efeitos de matriz que podem ocorrer. Assim, as amostras foram analisadas pelo método desenvolvido através de quatro níveis de fortificação, bem como o respectivo ensaio em branco (ponto zero) sem fortificação. Na tabela 6.8 é possível consultar os coeficientes de correlação (*r*) obtidos, assim como as concentrações determinadas para o TCS nas diferentes amostras estudadas por SAM, sob condições experimentais optimizadas.

Tabela 6.8 – Coeficientes de correlação (*r*) e concentrações (*C*₀) obtidos pelo SAM para o TCS em diferentes matrizes com recurso a SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas²⁸.

	<i>r</i>	<i>C</i> ₀ (µg/L)	Observações
Solução pasta de dentes comercial	0,9998	1284	0,27 % ^a
Saliva	0,9983	1570	0h ^b
	0,9994	26,5	12h ^c
Água Residual – ETAR 1	0,9992	< LOD	Influente
	0,9994	< LOD	Efluente
Água Residual – ETAR 2	0,9994	< LOD	Influente
	0,9995	< LOD	Efluente

^a m/m; ^b Imediatamente após a lavagem dos dentes; ^c 12h após a lavagem dos dentes

A figura 6.10 ilustra os perfis cromatográficos obtidos para os ensaios realizados na solução de pasta de dentes (a), saliva (b e c) e água residual (d) sem fortificação, após a aplicação da presente metodologia.

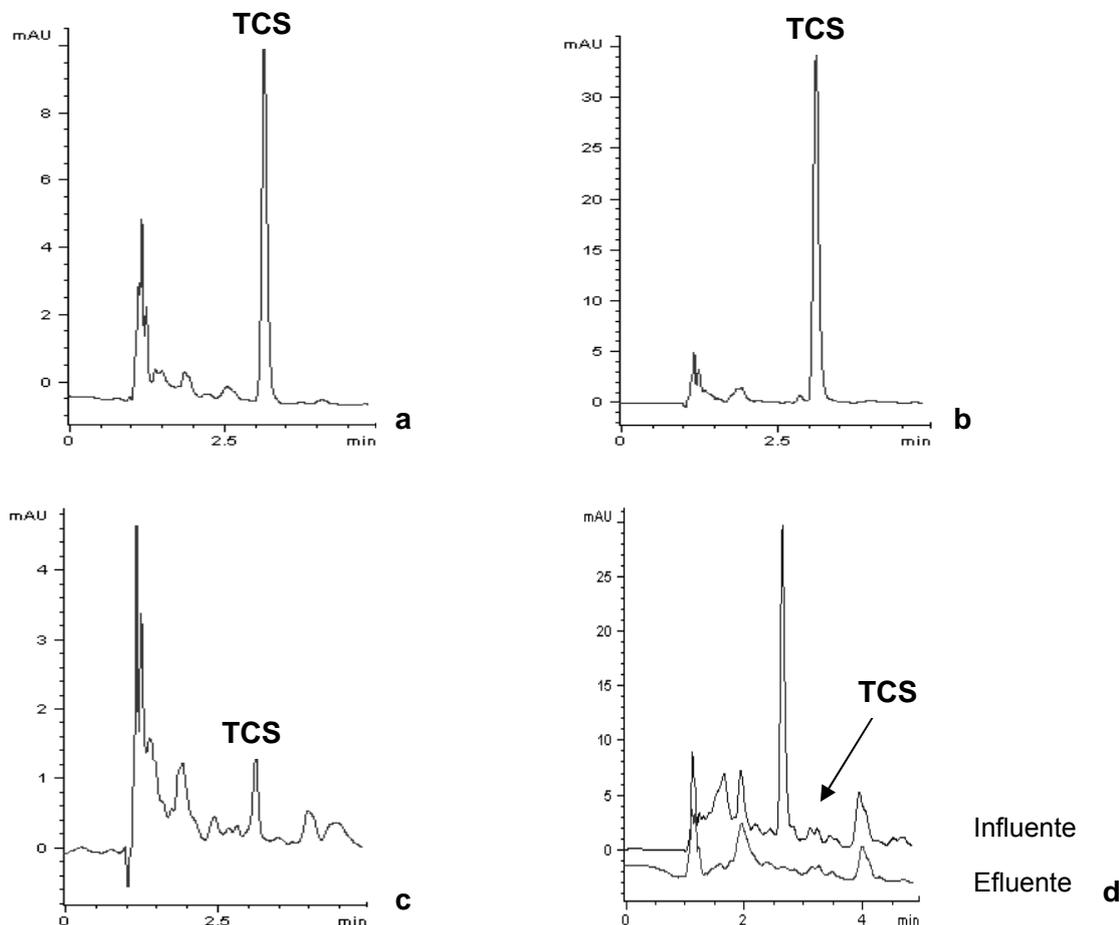


Figura 6.10 – Perfis cromatográficos obtidos para o TCS em ensaios realizados em solução de pasta de dentes comercial (a), saliva após a lavagem dos dentes com pasta de dentes comercial (b), saliva 12 h após a lavagem dos dentes (c) e água residual (ETAR 1) (d), por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas²⁸.

Por análise dos cromatogramas apresentados na figura 6.10, é possível verificar que o pico correspondente ao TCS (3,1 min) se encontra resolvido de eventuais interferentes que possam estar presentes nas matrizes estudadas, sob as condições optimizadas, mostrando assim que a metodologia desenvolvida apresenta boa selectividade. Os ensaios realizados a uma solução de pasta de dentes, revelaram um conteúdo médio em TCS de 0,27 % (m/m), o que está de acordo com o valor aceite pela directiva 76/768/CEE (< 0,30 %). Por outro lado, deve ser referido a fácil manipulação e sensibilidade obtida pela presente metodologia para a quantificação de TCS em pasta de dentes comercial, mostrando ser uma alternativa a

outros métodos convencionais usados para a análise de produtos de higiene e cuidado pessoal, que utilizam maior quantidade de solventes²⁶.

A presente metodologia demonstrou igualmente capacidade para detectar e quantificar o TCS em fluidos biológicos, nomeadamente saliva. O conteúdo de TCS foi determinado em dois momentos distintos, ou seja, imediatamente após a lavagem dos dentes (figura 6.10b) e 12 horas mais tarde (figura 6.10c), detectando-se concentrações médias de 1,6 mg/L e 26,5 µg/L, respectivamente. Como seria de esperar, a concentração de TCS no corpo humano decresce ao longo do tempo, embora ao fim de 12 h ainda se encontre presente na saliva ao nível de traços. Estes resultados, sugerem que o uso regular de pasta de dentes comercial contendo TCS pode originar a presença contínua deste composto no corpo humano e consequentemente, influenciar negativamente o desenvolvimento humano, caso se venha a provar que este composto é um potencial EDC. Bagley e Lin²⁹ mostraram igualmente que o uso de pasta de dentes comercial durante 12 semanas originava um conteúdo de TCS no sangue compreendido entre 14 e 21 µg/L.

Por último, ensaios realizados em águas residuais provenientes de ETARs urbanas, foram igualmente efectuados. Como exemplifica o cromatograma da figura 6.10d, apesar da grande complexidade geralmente observada para este tipo de matrizes, é possível concluir que o TCS não foi detectado nas amostras estudadas.

Na figura 6.11 é ainda possível observar as recuperações obtidas para o TCS em matrizes fortificadas com 10 µg/L. A aplicação da ANOVA unifactorial permitiu avaliar a influência da matriz na percentagem de recuperação. O valor de p é a probabilidade para a qual a hipótese nula H_0 é verdadeira, em que H_0 assume que os valores médios são iguais. Como os valores p são sempre inferiores a 0,05 significa que existem diferenças estatisticamente significativas entre as recuperações obtidas para as diferentes matrizes estudadas, para um nível de confiança de 95 % (anexo G2). Afim de verificar quais as matrizes responsáveis por essas diferenças realizou-se um teste de comparações múltiplas – teste de “Tuckey” (anexo G2). Pela análise dos resultados verifica-se que não existem efeitos de matriz apenas para a água residual.

Tendo em conta a elevada complexidade geralmente associada às matrizes estudadas no presente trabalho, verificou-se que a nova metodologia demonstrou muito boa selectividade, suficiente sensibilidade e boa linearidade para monitorizar o TCS ao nível de traços. Neste sentido, a metodologia proposta é uma alternativa apropriada aos métodos dedicados para monitorizar TCS em diferentes tipos de matrizes.

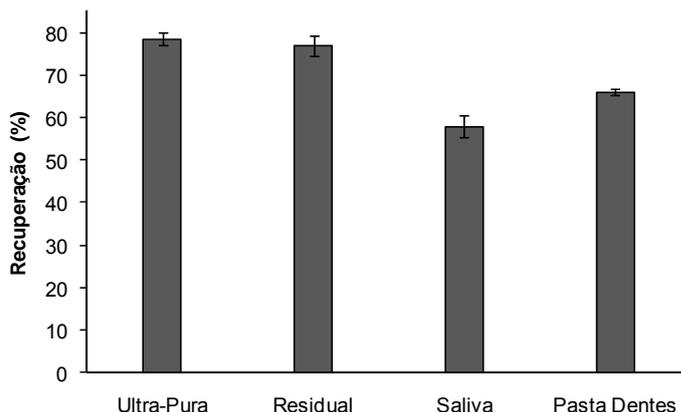


Figura 6.11 – Comparação das recuperações médias de TCS obtidas em água ultra-pura, residual, saliva e solução de pasta de dentes comercial para um nível de fortificação de 10 µg/L por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

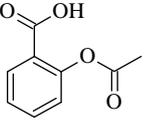
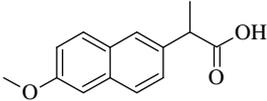
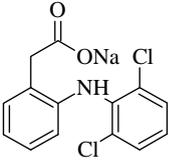
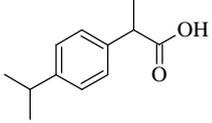
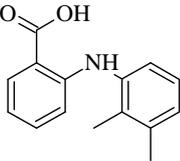
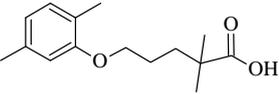
6.5 NSAIDs e reguladores lipídicos

6.5.1 Considerações gerais

Na última década, diversos estudos efectuados na Europa, Canadá e USA demonstraram que os NSAIDs e reguladores lipídicos são os produtos farmacêuticos mais detectados em águas residuais, superficiais e mesmo em água destinada ao consumo humano. A ocorrência destes compostos no ambiente deve-se ao elevado consumo, uma vez que são os fármacos mais vulgarmente usados no tratamento de diversas dores estando muitos deles disponíveis sem a exigência de qualquer prescrição médica. Por outro lado, as suas propriedades físico-químicas, elevada solubilidade em água, pKa ácido e baixa degradabilidade (tabela 6.9), permite que não sejam removidos durante o tratamento convencional efectuado a águas residuais e contaminem águas superficiais, subterrâneas e por conseguinte as destinadas ao consumo humano^{30,31}.

O presente estudo propõe uma nova metodologia para a determinação de cinco NSAIDs, nomeadamente, ACA, IBU, DIC, NAP, MEF e de um regulador lipídico, GEM, em amostras ambientais. A selecção destes fármacos ácidos foi efectuada com base na sua percentagem de prescrição, presença no ambiente e efeitos toxicológicos. Na tabela 6.9 é possível encontrar a fórmula estrutural, o valor de $\log K_{OW}$ e o pKa para cada composto estudado.

Tabela 6.9 – Estrutura química, log K_{OW} e pKa para cada NSAIDs e regulador lipídico estudado.

Fármacos	Fórmula Estrutural	log K_{OW} ^a	pKa ^a
ACA		1,19	3,49
NAP		3,18	4,15
DIC		4,51	4,15
IBU		3,97	4,91
MEF		5,12	4,20
GEM		4,77	n.d.

^a Valores de log K_{OW} e pKa obtidos de [32]; n.d. – não determinado

6.5.2 Optimização e validação instrumental

Devido à polaridade e à natureza acídica dos analitos alvo, a HPLC foi a técnica instrumental seleccionada, por forma a evitar o passo de derivatização requerido pela GC.

Os parâmetros de HPLC-DAD foram seleccionados de modo a se obterem condições instrumentais convenientes para a análise simultânea de ACA, NAP, DIC, IBU, MEF e GEM. Utilizando uma coluna convencional de fase reversa, uma fase móvel constituída por ACN e solução aquosa em ácido fosfórico (0,1 %) na proporção de 45/55 % e um fluxo de 1,0 mL/min, obteve-se resposta analítica adequada, com boa resolução para todos os compostos em tempo analítico aceitável (< 32 min). Por análise dos espectros UV-vis, verificou-se que o comprimento de onda que fornecia uma sensibilidade adequada era de 230 nm para o NAP, 220 nm para o MEF e 205 nm para os restantes compostos (anexo B).

Posteriormente, testou-se a gama linear dinâmica instrumental usando seis soluções padrão, com concentrações compreendidas entre 0,1 e 10,0 mg/L para o ACA e NAP, e 0,3 a 10,0 mg/L para os restantes compostos. Verificou-se excelente resposta linear, com um coeficiente de correlação (r) superior a 0,9997. A sensibilidade instrumental foi igualmente testada, através da determinação dos LODs e LOQs em condições de repetibilidade, com recurso à análise de seis ensaios do padrão de concentração mais baixa da gama linear dinâmica. Os valores de LODs e LOQs determinados estão compreendidos entre 3,6 - 55,3 $\mu\text{g/L}$ e 11,9 - 184,5 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. A precisão instrumental foi ainda avaliada com recurso a injeções consecutivas dos padrões com concentração 0,3, 2,0 e 10,0 mg/L, tendo-se obtido um RSD inferior a 10 %. Por análise de brancos testou-se a ausência de contaminação e eventuais efeitos de memória. Na tabela 6.10 é possível consultar os dados da calibração instrumental obtidos por HPLC-DAD para cada fármaco ácido estudado, nas condições experimentais utilizadas.

Tabela 6.10 – Gama linear dinâmica, coeficiente de correlação (r), LODs, LOQs e precisão instrumental obtidos por HPLC-DAD para os fármacos ácidos estudados, sob condições instrumentais optimizadas.

Fármacos	Gama linear dinâmica (mg/L)	r	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	Precisão (%RSD, n=6)		
					0,3 mg/L	2,0 mg/L	10 mg/L
ACA	0,1-10	0,9999	9,5	31,5	3,1	0,8	0,9
NAP	0,1-10	1,0000	3,6	11,9	3,7	0,4	0,1
DIC	0,3-10	0,9999	21,3	71,0	8,8	1,1	0,8
IBU	0,3-10	0,9997	55,3	184,5	10,0	4,0	0,1
MEF	0,3-10	0,9998	33,2	110,7	3,8	1,5	1,7
GEM	0,3-10	0,9998	37,8	125,9	9,8	3,2	1,9

6.5.3 Optimização da SBSE(PDMS)-LD e SBSE(PU)-LD

Devido às diferenças de polaridade apresentadas pelos fármacos ácidos estudados (tabela 6.9) optimizou-se o método de extracção (SBSE-LD) utilizando duas fases diferentes, nomeadamente, as barras convencionais em PDMS e barras em PU. O PU foi testado afim de verificar se apresentava melhor resposta analítica para os fármacos ácidos mais polares, relativamente ao PDMS. Neste sentido, durante a optimização realizaram-se ensaios para concentrações de 10 $\mu\text{g/L}$, utilizando barras de agitação cobertas com 126 μL em PDMS e 83 μL em PU³³.

6.5.3.1 Dessorção líquida (LD)

Avaliaram-se quais as melhores condições para a LD, por forma a assegurar uma completa retro-extracção dos analitos quer do PDMS quer do PU. Neste sentido, testaram-se solventes polares, nomeadamente, MeOH, ACN e mistura equimolar de ambos, tendo-se verificando que o ACN é o mais adequado quando se utiliza PU, não sendo observadas diferenças significativas para o PDMS (figura 6.12a).

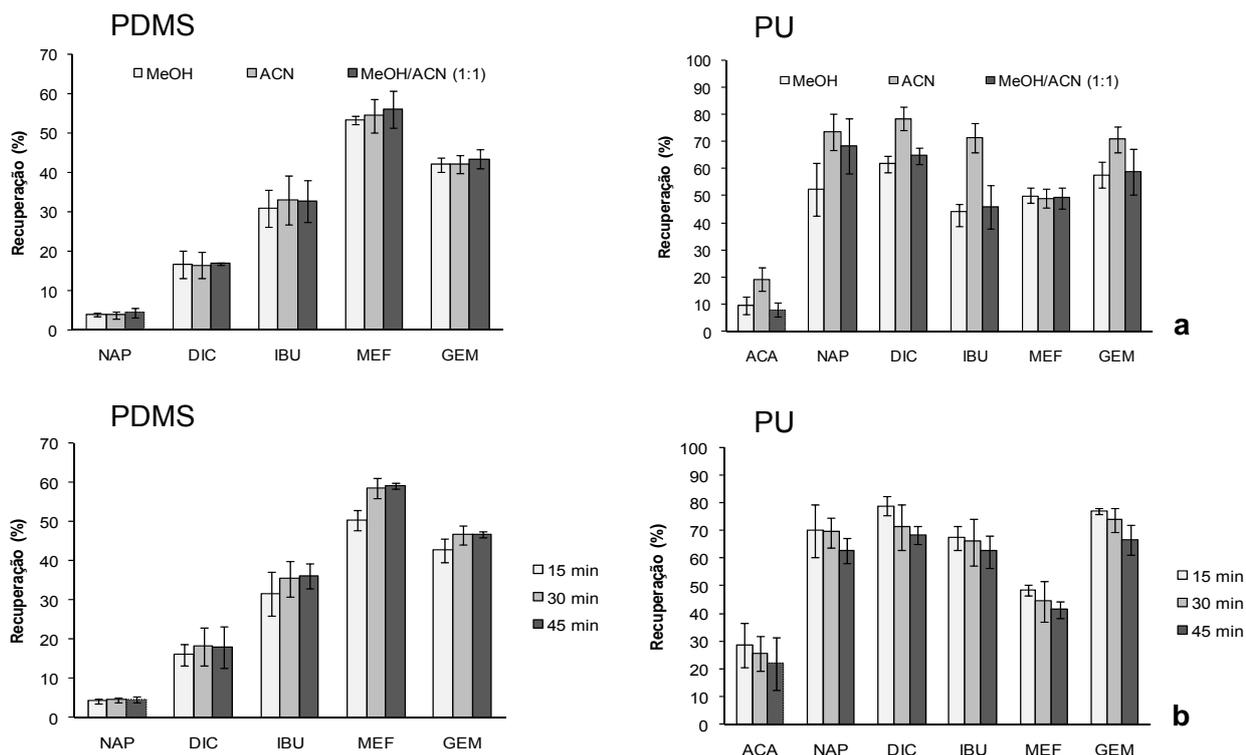


Figura 6.12 – Efeito do solvente (a) e do tempo (b) de LD na recuperação dos fármacos ácidos estudados por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido por LD/HPLC-DAD (extracção - 1 h (750 rpm); pH - 2,0).

O volume de solvente utilizado foi de 1,5 e 5,0 mL quando se utilizaram as barras à base de PDMS e PU, respectivamente. O critério seguido para a selecção do volume de solvente foi apenas o de garantir que a barra ficasse completamente imersa no solvente. A LD foi efectuada sob tratamento ultrasónico, por forma a acelerar o processo de retro-extracção, tendo sido testados vários tempos (15, 30 e 45 min). Analisando o gráfico da figura 6.12b, verifica-se que 15 e 30 min para o PU e PDMS são os tempos óptimos para a LD, respectivamente. É de salientar que o PDMS não extrai o fármaco ACA. Por outro lado, realizando uma segunda retro-extracção verificou-se que não ocorriam efeitos de memória.

Foram também efectuados ensaios, no sentido de se verificar a possibilidade de perda de analito durante o passo de evaporação do solvente, ainda que os fármacos ácidos sejam consideradas substâncias não voláteis. Assim, soluções padrão conjuntas de 0,8, 4,0 e 10,0 mg/L foram evaporadas sob suave corrente de azoto, tendo os resíduos sido seguidamente redissolvidos em MeOH e injectados no sistema HPLC-DAD. Comparando os dados obtidos com controlos apropriados, verificou-se que se obtinha uma reconstituição superior a 96,5 %, com um RSD inferior a 2,9 %, confirmando assim, a não ocorrência de perdas significativas durante o passo de evaporação.

6.5.3.2 SBSE(PDMS) e SBSE(PU)

Após a optimização das melhores condições para LD, prosseguiu-se com a optimização dos parâmetros que afectam a extracção dos fármacos ácidos por SBSE.

A forma iónica e molecular dos compostos alvo influencia a afinidade dos mesmos para a fase polimérica, uma vez os analitos na sua forma neutra serem mais eficientemente extraídos pelas fases poliméricas³⁴. Como consequência, foi necessário controlar o pH do meio de modo a melhorar a recuperação dos analitos quer pelo PDMS quer pelo PU. Os compostos alvo neste estudo são compostos ácidos (tabela 6.9), o que significa que a forma não dissociada predomina em meio ácido. Deste modo, para optimização do pH do meio aquoso testaram-se valores de 2,0, 4,0 e 6,0 (figura 6.13), verificando-se que o pH 2,0 permitiu alcançar uma maior percentagem de recuperação, como seria espectável³⁵. Confirma-se ainda que para $\text{pH} > \text{pKa}$, a forma iónica traduz-se em baixas recuperações³.

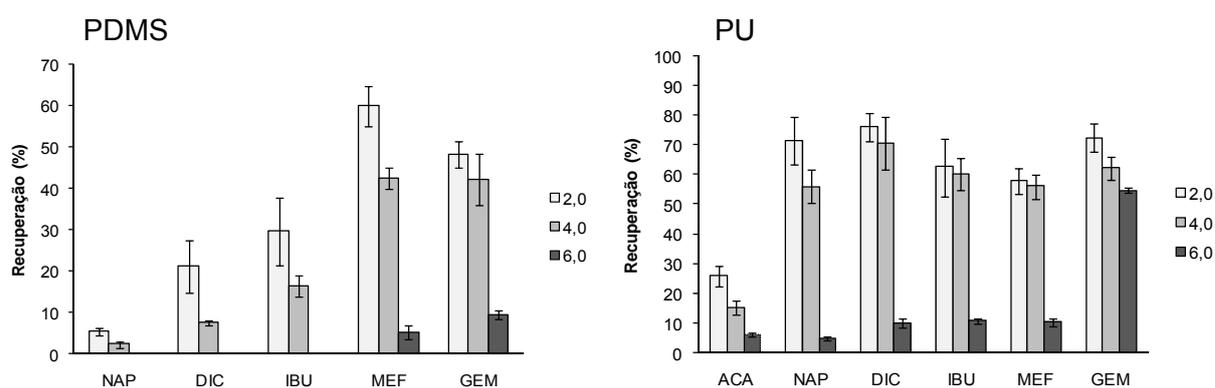


Figura 6.13 – Efeito do pH na recuperação dos fármacos ácidos estudados por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido de LD/HPLC-DAD (extracção - 1 h (750 rpm); retro-extracção sob tratamento ultrasónico durante 30 min para o PDMS e 15 min para o PU, em ACN).

Por forma a acelerar o processo de extracção, os ensaios foram efectuados sob agitação, tendo-se testado várias velocidades, nomeadamente, 750, 1000 e 1250 rpm. Os resultados obtidos revelaram que as diferenças encontradas entre as diferentes velocidades testadas não eram significativas para o PDMS. No entanto, para o PU obteve-se um ligeiro aumento na recuperação utilizando uma velocidade de 1250 rpm. Neste sentido, seleccionou-se 1250 rpm quando se utilizou o PU e 1000 rpm para o PDMS. A velocidade de agitação seleccionada foi menor para as barras de PDMS, uma vez que para velocidades mais elevadas, tornar-se difícil manter a estabilidade das mesmas (126 μ L em PDMS), com um movimento circular constante, conforme foi referido anteriormente, afectando assim a precisão dos resultados.

O tempo de exposição da fase polimérica aos analitos é igualmente um parâmetro muito importante, uma vez que influencia a partição dos analitos entre a matriz e o polímero. Neste sentido, seis tempos de extracção (0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 16,0 h) foram testados, de modo a determinar qual o tempo que permitia obter uma maior recuperação dos fármacos acídicos estudados. A figura 6.14a ilustra os resultados obtidos, sendo possível verificar que usando PDMS, o equilíbrio é alcançado após 4,0 h de extracção, contrariamente ao PU que requer um período mínimo de extracção de 6,0 h. Genericamente, verifica-se que a eficiência é superior quando se utiliza o PU.

O efeito da adição de MeOH à matriz aquosa foi também testado pela adição de 5, 10 e 15 % (v/v) deste modificador. Por análise da figura 6.14b é possível verificar que a adição de MeOH reduz significativamente a recuperação de todos os fármacos acídicos, usando ambas as fases poliméricas. Estes resultados podem ser explicados pelo facto do MeOH tornar a matriz menos polar, aumentando a solubilidade dos analitos, reduzindo assim a afinidades destes para as fases poliméricas. Consequentemente, os ensaios posteriores foram realizados na ausência deste modificador.

O efeito da força iónica foi igualmente testado por adição de NaCl (5, 10 e 15 % (m/v)) à matriz aquosa. Analisando os resultados obtidos (figura 6.14c) verifica-se que aumentando a força iónica a recuperação do MEF diminui significativamente quando se utiliza o PDMS, o que pode ser devido ao facto de este ser de todos os fármacos acídicos estudados o mais hidrofóbico. O decréscimo da recuperação dos analitos mais hidrofóbicos após o aumento da força iónica é muitas vezes explicado pelo aumento da viscosidade, tornando mais lenta a cinética de extracção destes compstos, necessitando assim de períodos mais longos. O aumento da força iónica originou um aumento na recuperação do NAP e DIC e não se verificam diferenças significativas na recuperação do IBU e do GEM. Para o ACA, apesar de ser o analito mais polar, a adição de sal reduziu a respectiva recuperação. Deste modo, uma

vez a adição de sal aumentar a recuperação para uns analitos e diminuir para outros, optou-se pela realização dos ensaios sem a adição de NaCl, por forma a aumentar o tempo de vida das fases poliméricas.

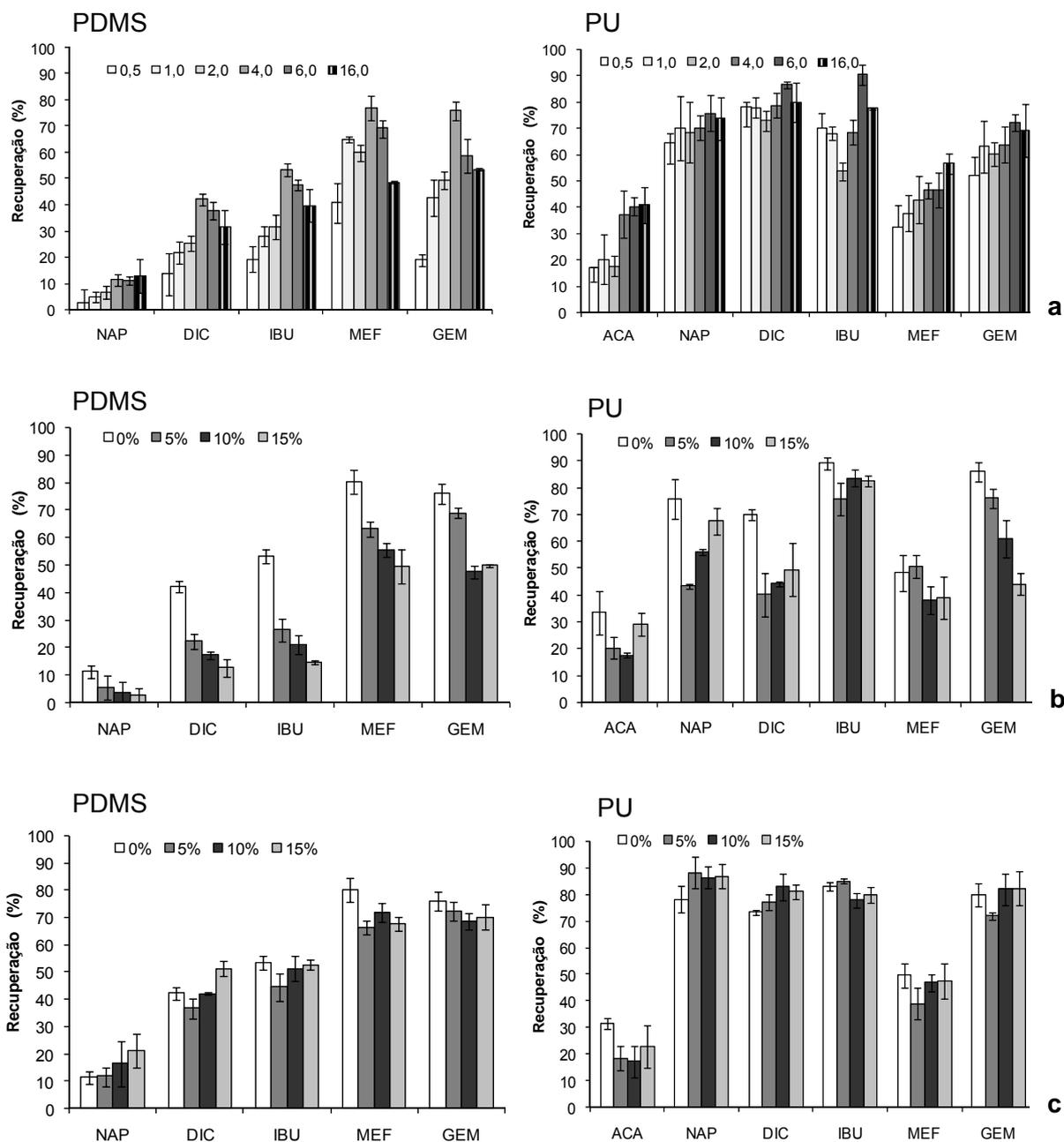


Figura 6.14 – Efeito do tempo de extracção (a), modificador orgânico (b) e força iónica (c) na recuperação dos fármacos ácidos estudados por SBSE(PDMS) (extracção - 4 h (1000 rpm); pH - 2,0; retro-extracção (30 min) sob tratamento ultrasónico com ACN) e SBSE(PU) (extracção - 6 h (1250 rpm); pH - 2,0; retro-extracção (15 min) sob tratamento ultrasónico com ACN) seguido por LD/HPLC-DAD³⁶.

À semelhança do que se tem efectuado para os métodos descritos anteriormente, estimou-se a recuperação teórica para os fármacos acídicos extraídos com o PDMS. Para as condições experimentais definidas ($V_W = 25$ mL e $V_{PDMS} = 126$ μ L), obtém-se um valor de β igual a 198,4. A título de exemplo, para o ACA que apresenta um $\log K_{O/W}$ de 1,19, estima-se uma recuperação de 7,2 %. Neste sentido, para determinar as recuperações obtidas experimentalmente realizaram-se ensaios sob condições optimizadas (SBSE(PDMS): 4 h (1000 rpm e pH 2,0), LD: ACN (30 min)) em água ultra-pura fortificada com uma solução padrão conjunta de 10 μ g/L. Comparando as recuperações teóricas com as experimentais (figura 6.15) verifica-se que existe um desvio entre os dois valores ($K_{PDMS/W} < K_{O/W}$), constatando-se uma vez mais que nem sempre a aproximação considerada teoricamente ($K_{PDMS/W} \approx K_{O/W}$) é verificada, estando de acordo com observações mencionadas por outros autores.^{2,4,5}

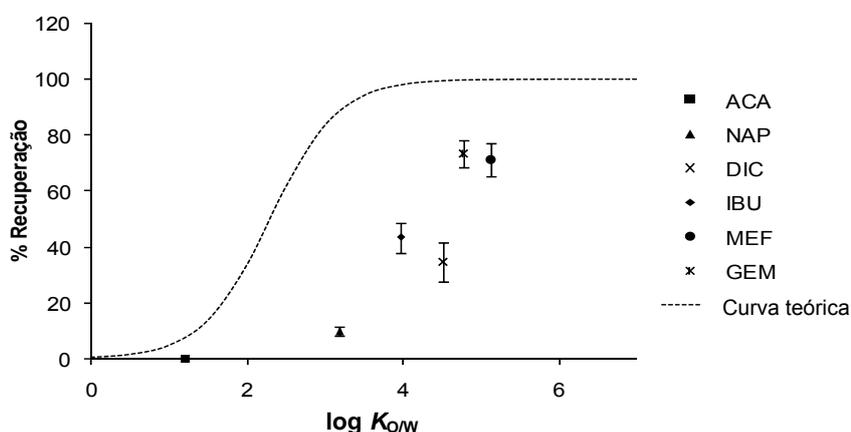


Figura 6.15 – Recuperação experimental e curva teórica para os fármacos acídicos estudados por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas.

Apesar de nem sempre ser verificada a aproximação teórica entre $K_{PDMS/W}$ e $K_{O/W}$, esta consideração é em regra geral aceitável. No entanto, a aproximação $K_{PU/W}$ ao $K_{O/W}$ não parece ser, uma vez que esta fase polimérica permite a extração de analitos mais polares. Neste sentido, não será possível estimar uma recuperação teórica quando se utiliza PU.

De modo a comparar a capacidade extractiva de cada fase polimérica utilizada, estimaram-se os valores K para os fármacos acídicos estudados, a partir das recuperações experimentais obtidas, sob condições optimizadas.

O coeficiente K_{PDMS} ou $K_{PU/W}^*$ é, por definição, a razão entre a C_{PDMS} ou C_{PU} e C_W , após o equilíbrio ser alcançado. Este parâmetro pode ser calculado através da razão entre m_{PDMS} ou m_{PU} e m_W , multiplicada por β :

* Por questão de simplificação

$$K_{\text{PDMS ou PU/W}} = \frac{C_{\text{PDMS ou PU}}}{C_W} = \frac{m_{\text{PDMS ou PU}}}{m_W} \times \frac{V_W}{V_{\text{PDMS ou PU}}} = \frac{m_{\text{PDMS ou PU}}}{m_W} \times \beta \quad \text{equação 6.1}$$

Podendo o valor de K ser estimado tendo em conta que a recuperação pode ser expressa como a razão entre $m_{\text{PDMS ou PU}}$ e m_0 ($m_0 = m_{\text{PDMS ou PU}} + m_W$), pela equação 6.2:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{m_{\text{PDMS ou PU}}}{m_0} \times 100 = \frac{\frac{K_{(\text{PDMS ou PU})/W}}{\beta}}{1 + \frac{K_{(\text{PDMS ou PU})/W}}{\beta}} \times 100 \quad \text{equação 6.2}$$

Então, para o presente estudo, os valores de K foram calculados tendo em conta que se utilizou um volume de fase aquosa igual a 25 mL (V_W), um volume em PDMS igual a 126 μL e em PU de 83 μL , obtendo-se valores de β de 198,4 e 301,2, respectivamente. A tabela 6.11 resume as recuperações e os valores de K médios obtidos para cada fármaco ácido estudado, utilizando PDMS e PU como fase polimérica, sob condições experimentais optimizadas (SBSE(PU): 6 h (1250 rpm e pH 2,0), LD: ACN (15 min); SBSE(PDMS): 4 h (1000 rpm e pH 2,0), LD: ACN (30 min)). Dos dados obtidos, os valores de K calculados mostram que o PU apresenta uma maior capacidade de extracção para os compostos alvo, relativamente ao PDMS. A afinidade aumenta em muitos casos mais de cinquenta vezes, em particular para os analitos com características mais polares (NAP e ACA) (tabela 6.9). Contudo, para o analito mais apolar (MEF) os valores de K são inferiores para o PU.

Tabela 6.11 – Recuperação e coeficiente de partição (K) médio estimado para os seis fármacos ácidos estudados por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido de LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas³⁶.

Fármacos	Recuperação \pm RSD (%; n= 6) ^a		K	
	PDMS	PU	$K_{\text{PDMS/W}}$	$K_{\text{PU/W}}$
ACA	< 1,0	45,3 \pm 9,0	< 2,0	249
NAP	9,8 \pm 1,6	78,3 \pm 3,4	21,6	1087
DIC	34,6 \pm 6,9	77,7 \pm 2,7	105	1050
IBU	43,4 \pm 5,4	90,6 \pm 7,2	152	2904
MEF	71,3 \pm 5,8	48,4 \pm 8,4	493	283
GEM	73,4 \pm 5,0	84 \pm 9,0	547	1581

^a nível de fortificação 10 $\mu\text{g/L}$

6.5.4 Validação dos métodos SBSE(PDMS ou PU)-LD/HPLC-DAD

Durante o processo de validação do método analítico determinou-se a gama linear dinâmica, LODs e LOQs, tendo-se ainda avaliado a precisão.

A gama linear dinâmica foi testada pelo método dos mínimos quadrados com análise de resíduos, verificando-se linearidade para uma gama de concentrações compreendidas entre 2,4 e 64 µg/L, tendo-se utilizando cinco níveis de concentração, sob condições experimentais optimizadas. Os resultados obtidos evidenciaram linearidades com coeficientes de correlação (*r*) superiores a 0,9988 (tabela 6.12 e anexo E3) e os resíduos apresentaram sempre um desvio inferior a 14,5 % (anexo F3). Assim, pode-se constatar que os sinais obtidos pelo método SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido de LD/HPLC-DAD são proporcionais às concentrações dos analitos presentes na matriz aquosa, nas gamas de concentrações estudadas. Para a determinação dos LODs e LOQs de cada composto, procedeu-se de forma semelhante à descrita para a determinação dos limiares instrumentais. Verificou-se que os LODs estão compreendidos entre 0,4 e 1,7 µg/L e os LOQs entre 1,5 e 5,8 µg/L (tabela 6.12). Os limites obtidos por SBSE(PU) são inferiores aos obtidos por SBSE(PDMS), como consequência da maior percentagem de recuperação alcançada com aquela fase polimérica. É de salientar que concentrações máximas permitidas para estes analitos em águas destinadas ao consumo humano ainda não estão estabelecidas pelas organizações regulamentares internacionais, principalmente devido ao incompleto conhecimento dos efeitos toxicológicos, assim como da respectiva distribuição no ambiente.

Tabela 6.12 – LODs, LOQs, gama linear dinâmica e coeficiente de correlação (*r*) obtidos para os seis fármacos ácidos estudados por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido de LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas³⁶.

Fármacos	LOD (µg/L)		LOQ (µg/L)		Gama linear dinâmica (µg/L)		<i>r</i>	
	PDMS	PU	PDMS	PU	PDMS	PU	PDMS	PU
ACA	-	0,8	-	2,7	-	4,6-63,0	-	0,9989
NAP	1,0	0,4	3,2	1,5	3,2-47,0	2,4-63,0	0,9997	0,9997
DIC	1,6	0,7	5,4	2,4	6,3-63,0	2,4-63,0	0,9995	0,9998
IBU	1,7	1,1	5,5	3,6	6,4-64,0	4,5-64,0	0,9998	0,9994
MEF	1,5	1,3	5,1	4,2	6,0-60,0	4,2-60,0	0,9996	0,9994
GEM	1,7	0,7	5,8	2,5	6,4-64,0	2,5-64,0	0,9988	0,9999

A precisão dos métodos foi avaliada através de seis ensaios realizados no mesmo dia (repetibilidade) e em dias diferentes (precisão intermédia), para três níveis de concentração (6,0, 10,0 e 60,0 µg/L). Na tabela 6.13 é possível consultar os valores de RSD (%) obtidos para cada ensaio.

Tabela 6.13 – Estudo de precisão do método SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido de LD/HPLC-DAD, para três níveis de concentração (n = 6).

Fármacos	Repetibilidade (RSD %)			Precisão Intermédia (RSD %)		
	6,0 µg/L	10,0 µg/L	60,0 µg/L	6,0 µg/L	10,0 µg/L	60,0 µg/L
	PDMS/PU	PDMS/PU	PDMS/PU	PDMS/PU	PDMS/PU	PDMS/PU
ACA	-10,2	-9,0	-5,6	-14,8	-14,9	-16,1
NAP	2,0/9,6	1,6/3,4	1,1/6,1	2,2/13,2	1,8/13,3	1,9/12,8
DIC	6,5/10,9	6,9/2,7	4,1/4,7	6,8/12,9	10,8/13,0	7,3/11,5
IBU	7,3/7,9	5,4/7,2	5,4/4,6	9,6/11,9	8,0/12,6	10,1/13,6
MEF	8,3/11,9	5,8/8,4	3,5/7,6	8,3/13,4	9,5/13,6	7,3/9,9
GEM	9,2/13,9	5,0/9,0	3,9/5,8	8,7/12,8	5,7/14,5	9,6/15,6

Avaliando os dados para os três níveis de concentração estudados, verifica-se que existe uma maior dispersão dos resultados quando se utiliza PU. Como seria expectável, ocorre uma maior dispersão de resultados para a precisão intermédia, uma vez estas determinações terem sido efectuadas em seis dias distintos. Os valores de RSD são inferiores a 13,9 % quando se avalia a repetibilidade e inferiores a 14,9 % para a precisão intermédia. De acordo com a directiva 98/83/CE¹⁸, é aceite um valor de precisão inferior a 25 % para análise vestigial de compostos orgânicos em matrizes aquosas. Neste sentido, os valores obtidos estão claramente abaixo desta exigência, diferindo notoriamente dos apresentados por outras metodologias já propostas, como por exemplo a micro-extracção em fase líquida, uma vez que os autores mencionam valores de dispersão mais elevados (15 - 32 %)³⁷. Ensaio em branco foram frequentemente efectuados de modo a controlar eventuais contaminações, tendo-se mostrado negligenciáveis.

6.5.5 Aplicação dos métodos a amostras reais

De modo a avaliar a aplicação das novas metodologias desenvolvidas a amostras reais, realizaram-se ensaios em diversos tipos de matrizes, nomeadamente água residual, superficial e do mar.

À semelhança de outros métodos de preparação de amostra vulgarmente usados para análise de traços, a eficiência da extracção da SBSE-LD pode ser afectada pela complexidade da amostra, pelo que foi aplicado o SAM no presente estudo, por forma a minimizar eventuais efeitos de matriz. As amostras foram avaliadas pelos métodos desenvolvidos com quatro níveis de fortificação (10 - 60 µg/L), bem como o respectivo ensaio em branco (ponto zero) sem fortificação. A figura 6.17 ilustra os perfis cromatográficos obtidos de uma mistura padrão (10 µg/L) contendo os seis fármacos acídicos após ensaios realizados por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido de LD-HPLC-DAD em água ultra-pura, bem como o respectivo controlo (a) e água superficial fortificada para um nível de concentração 24,0 µg/L (b), sob condições experimentais optimizadas. É possível verificar um bom desempenho analítico quer no processo de extracção quer na aplicação da presente metodologia a amostras reais, bem como excelente selectividade para os analitos alvo.

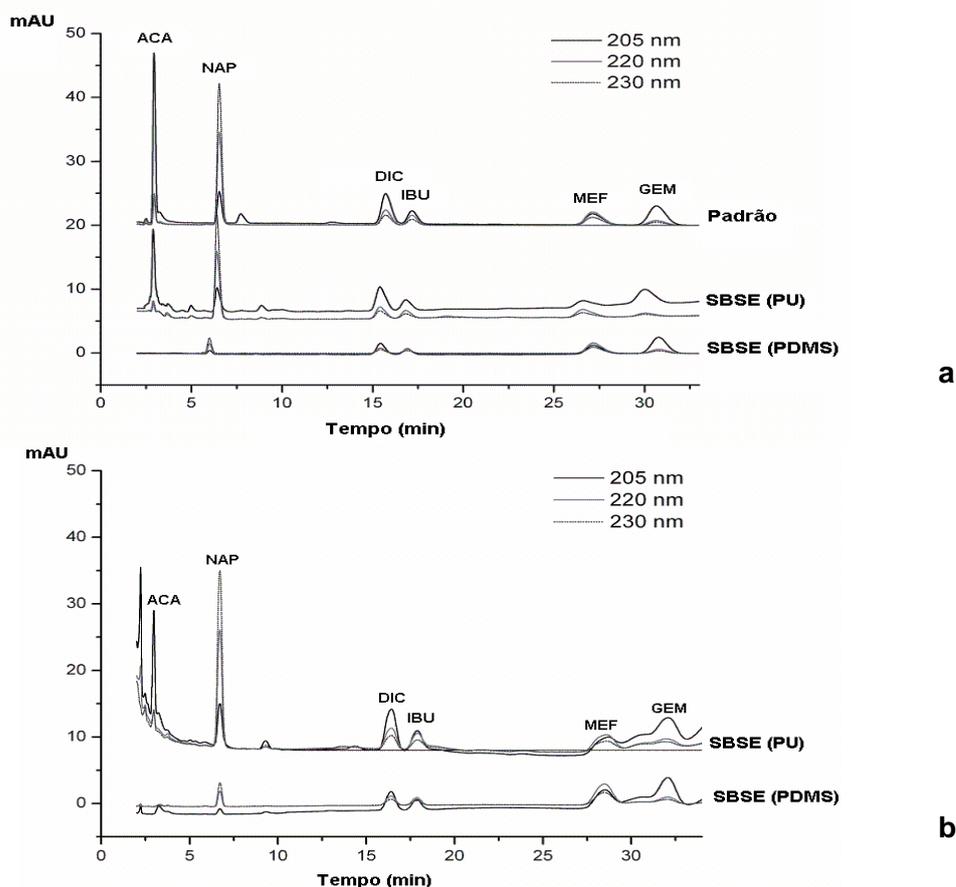


Figura 6.16 – Perfis cromatográficos obtidos de uma mistura padrão (10 µg/L) contendo os seis fármacos acídicos após ensaios realizados por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguido de LD/HPLC-DAD em água ultra-pura, bem como o respectivo controlo (a) e água superficial fortificada para um nível de concentração 24,0 µg/L (b), sob condições experimentais optimizadas³⁶.

A tabela 6.14 resume os resultados obtidos por SAM para cada amostra, nomeadamente os coeficientes de correlação (r) e as recuperações médias obtidas para um nível de fortificação igual a 10 µg/L. Por análise de amostras sem fortificação constatou-se que a concentração de cada fármaco ácido estudado era menor que o LOD da presente metodologia. Apesar da nova metodologia ter provado ser apropriada para análise de fármacos ácidos ao nível de traços, o seu desempenho pode ser melhorado com recurso ao sistema de LC-MS, permitindo desta forma alcançar maior selectividade e sensibilidade, com diminuição dos limites de detecção.

Tabela 6.14 – Coeficiente de correlação (r) e % de recuperação obtida para os seis fármacos ácidos estudados em água residual, superficial e do mar pelo SAM, por SBSE(PDMS) e SBSE(PU) seguida de LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas.

Matrizes	r			% Recuperação ^a		
	Residual	Superficial	Mar	Residual	Superficial	Mar
PDMS						
NAP	0,9953	0,9962	0,9992	5,0±2,6	7,4±4,5	9,1±0,8
DIC	0,9955	0,9978	0,9999	28,7±10,3	32,4±13,3	34,1±8,6
IBU	0,9952	0,9981	1,0000	31,3±5,7	34,1±6,0	39,5±7,6
MEF	0,9956	0,9977	0,9984	82,4±6,1	65,1±6,0	77,7±7,3
GEM	0,9958	0,9980	0,9988	60,6±11,6	57,9±4,7	64,1±7,3
PU						
ACA	0,9962	0,9899	0,9995	41,1±4,9	25,0±2,8	11,2±3,6
NAP	0,9964	0,9964	0,9964	70,4±10,5	45,7±3,6	63,9±5,4
DIC	0,9999	0,9966	0,9974	74,0±10,5	55,2±7,4	69,3±2,8
IBU	0,9956	0,9993	0,9964	83,6±3,7	80,4±1,1	61,6±4,3
MEF	0,9966	0,9982	0,9952	75,1±5,5	54,6±6,7	67,3±8,5
GEM	0,9980	0,9978	0,9986	69,8±4,7	35,8±7,8	68,8±4,2

^a para um nível de fortificação de 10 µg/L

A aplicação da ANOVA unifactorial permitiu avaliar a influência da matriz na percentagem de recuperação. Uma vez os valores p serem sempre inferiores a 0,05 (anexo G3) significa que existem diferenças estatisticamente significativas entre as recuperações obtidas para as diferentes matrizes, para um nível de confiança de 95 %. Afim de verificar

quais as matrizes responsáveis por essas diferenças realizou-se um teste de comparações múltiplas – teste de “Tuckey” (anexo G3).

Comparando as percentagens de recuperação obtidas em água ultra-pura relativamente às obtidas para as amostras estudadas, verifica-se que os efeitos de matriz são mais evidentes quando se utiliza o PU. Neste sentido, a ocorrência de efeitos matriz justifica o uso do SAM por estas metodologias desenvolvidas. Esta constatação pode ser suportada com a observação de diversos autores na aplicação de outras técnicas de extracção para análise de fármacos acídicos em matrizes ambientais.^{35,38}

6.6 Acetaminofeno (ACF) e cafeína (CAF)

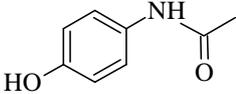
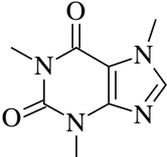
6.6.1 Considerações gerais

O ACF ou paracetamol é o analgésico e antipirético mais consumido em todo o mundo. Segundo o documento “Estatística do medicamento 2008” elaborado pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED), o ACF é a substância activa com maior número de embalagens no sistema nacional de saúde. Dado o seu elevado consumo, este fármaco também tem surgido como poluente ambiental, podendo ser uma ameaça para diversos organismos terrestres e aquáticos³⁹.

Por outro lado, a CAF é um estimulante presente em alguns medicamentos e em muitos produtos alimentares. É considerada um marcador químico em estudos da qualidade da água, sendo utilizada para a detecção de fontes de poluição de águas residuais domésticas. Esta aplicação, no entanto, ainda é limitada devido à falta de uniformização e validação de métodos analíticos para a respectiva identificação e quantificação neste tipo de matrizes. A CAF tem sido detectada em águas residuais, superficiais e até subterrâneas. As concentrações de CAF em águas residuais não tratadas reflectem não só o seu consumo e excreção, mas também a quantidade proveniente de bebidas e alimentos, nomeadamente, chás e cafés eliminados directamente nos esgotos.

O ACF e a CAF pertencem à lista de compostos analisados pela USEPA em matrizes aquosas, sendo a sua análise contínua ainda um desafio para os químicos analíticos dado a elevada polaridade que apresentam (tabela 6.15).

Tabela 6.15 – Estrutura química, $\log K_{OW}$ e pK_a para o ACF e CAF.

	Estrutura química	$\log K_{OW}^a$	pK_a^a
ACF		0,46	9,38
CAF		-0,07	10,4

^a Valores de $\log K_{OW}$ obtidos de [32]

6.6.2 Optimização e validação instrumental

Devido à polaridade e baixa volatilidade dos analitos alvo, a HPLC-DAD foi a técnica instrumental seleccionada, por forma a evitar o passo de derivatização requerido pela GC.

Os parâmetros de HPLC-DAD foram seleccionados de modo a se obterem condições instrumentais apropriadas para a análise simultânea de ACF e CAF. Utilizando uma coluna convencional de fase reversa, uma fase móvel constituída por MeOH e solução aquosa de ácido fosfórico 0,1 % (25/75 %) com fluxo de 1,0 mL/min, obteve-se excelente resposta analítica, com boa resolução para ambos os compostos em tempo analítico aceitável (< 7,0 min). Por análise do espectro UV-vis verificou-se que o comprimento de onda 205 nm fornecia uma resposta adequada para ambos os compostos em estudo (anexo B).

Posteriormente, testou-se a gama linear dinâmica instrumental usando seis soluções padrão, com concentrações compreendidas entre 0,6 e 10,0 mg/L para o ACF e 0,3 a 10,0 mg/L para a CAF. Verificou-se, desta forma, excelente resposta linear, com coeficientes de correlação (r) iguais a 0,9999 para ambos os compostos. A sensibilidade instrumental foi igualmente testada por determinação dos LODs e LOQs em condições de repetibilidade, com recurso à análise de seis ensaios do padrão de concentração mais baixa da gama linear dinâmica. Para o ACF os valores de LODs e LOQs obtidos foram iguais a 120 e 400 $\mu\text{g/L}$ e para a CAF a 89 e 297 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. A precisão instrumental foi ainda avaliada com recurso a injeções consecutivas dos padrões com concentração 1,0, 6,0 e 10,0 mg/L, obtendo-se um RSD inferior a 3,8 %. Por análise de brancos verificou-se a ausência de contaminação, assim como de efeitos de memória.

6.6.3 Desenvolvimento do método micro-extracção adsortiva em multi-esferas (MSA μ E)

A eficiência do passo de preparação de amostra é, de todo o procedimento analítico, o parâmetro mais crítico, uma vez que condiciona a sensibilidade do método, sendo ainda o principal responsável pelos erros ocorridos e discrepância de valores vulgarmente encontrados entre laboratórios. A SPE tem sido o método de preparação de amostra mais utilizado para extrair e concentrar ACF e CAF. Contudo, tal como já foi referido no capítulo 3, esta técnica de preparação de amostra apresenta diversas desvantagens, nomeadamente, tempo de análise prolongado, bem como elevadas quantidades de amostra e solventes associados. As técnicas de micro-extracção têm sido vastamente aplicadas na última década apresentando, no entanto, diversas limitações; a SPME permite analisar compostos polares e apolares contudo o material onde ocorre o enriquecimento do analito satura muito rapidamente, o que pode contribuir para quantificações por defeito. Por outro lado, a SBSE evidencia excelente capacidade na extracção de compostos essencialmente apolares, apresentando limitações na extracção de compostos polares, como ACF e CAF devido às características apolares do material onde ocorre o enriquecimento. Deste modo, o desenvolvimento de novas técnicas de preparação de amostras adequadas a pequenas quantidades de amostra, que sejam simples e “amigas do ambiente”, diminuindo as quantidades de solventes que utilizam e indicadas para compostos polares, são bem vindas do ponto de vista analítico.

Uma vez os PUs terem revelado bom desempenho analítico na extracção de NSAIDs e reguladores lipídicos, começou por se aplicar este material na extracção do ACF e da CAF. Pelos resultados obtidos verificou-se que não se obteve sucesso no processo de extracção para estes dois compostos, verificando-se que este material não apresentava qualquer afinidade para os mesmos.

Neste contexto, houve necessidade de repensar o material e a metodologia adequada para a extracção de compostos mais polares. Assim, decidiu-se testar outros materiais que já são utilizadas na SPE e SPME, como são o caso dos ACs e dos copolímeros PS-DVB, embora numa nova abordagem, por forma a colmatar as desvantagens apresentadas pelas técnicas mencionadas.

Nesta perspectiva, desenvolveu-se um novo micro-dispositivo com geometria esférica (esferas de PS) revestida externamente com a fase extractiva. O micro-dispositivo pode ter um número variável de esferas, que se encontram unidas. Ao contrário das barras revestidas com PDMS, o micro-dispositivo proposto não apresenta na sua constituição nenhum material magnético, para se alcançar o equilíbrio, sendo a agitação efectuada com

recurso a uma barra magnética convencional em “teflon”, ficando o micro-dispositivo suspenso na matriz a analisar, tal como ilustra a figura 6.17.

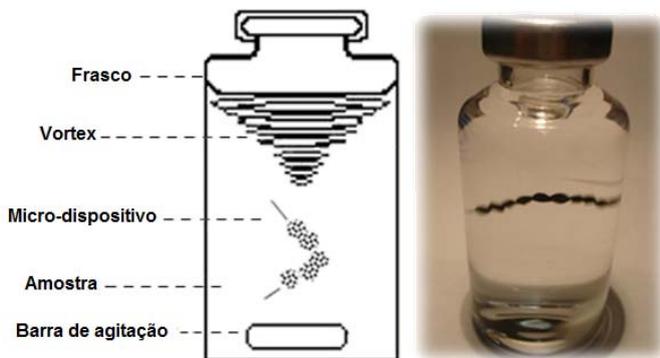


Figura 6.17 – Representação esquemática e imagem do processo MSAμE^{40,41}.

A nova técnica desenvolvida foi designada por micro-extracção adsortiva em multi-esferas (MSAμE), cuja invenção se encontra sob pedido provisório de patente nacional (PPP20091000114179, 2009)^{40,41}.

6.6.3.1 Preparação dos micro-dispositivos

Uma vez o AC e o PS-DVB se apresentarem sob a forma de pós muito finos (< 30 μm) a sua utilização directa no processo de extracção torna-se inviável. Neste sentido, essa limitação foi contornada no desenvolvimento de dispositivos onde estes materiais são suportados com recurso a tecnologias de fixação, como por exemplo, com tratamento térmico. Nos primeiros estudos efectuados procedeu-se à optimização do tempo e temperatura de fixação do material em esferas de PS.

Os melhores resultados de fixação do AC à superfície do PS foram obtidos para a temperatura de 160 °C, durante 2,0 h. Para temperaturas inferiores a fixação do AC mostrou-se insatisfatória, e para temperaturas superiores verificou-se que as esferas de PS cobertas com AC apresentavam alguma fragilidade. Realizando um estudo da estabilidade térmica das esferas de PS por termogravimetria, infere-se que a fragilidade observada para temperaturas superiores a 160 °C possa ser devida à degradação térmica do PS (figura 6.18), que começa a ocorrer ligeiramente por volta desta temperatura. Testando diferentes tempos e mantendo a temperatura de 160 °C, verificou-se que somente após 2,0 h é que ocorria uma fixação conveniente.

A fixação do copolímero PS-DVB à superfície do PS ocorre idealmente a 160 °C durante 1,0 h. À semelhança do que aconteceu para o AC, para temperaturas inferiores a 160 °C a fixação mostrou-se insatisfatória, enquanto para temperaturas superiores as esferas cobertas com PS-DVB apresentavam grande fragilidade.

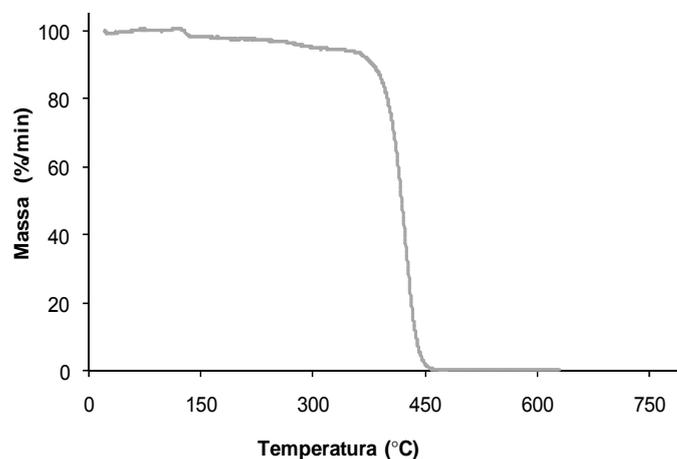


Figura 6.18 – Curva termogravimétrica das esferas de PS.

Por forma a remover o material não fixado à superfície do PS foi necessário proceder a um passo de limpeza dos micro-dispositivos preparados, com recurso a água ultra-pura sob agitação. Cada esfera de PS coberta com fase extractiva apresenta uma massa média de $0,21 \pm 0,07$ g e $0,52 \pm 0,07$ g para AC e PS-DVB, respectivamente.

6.6.3.2 Avaliação da robustez e estabilidade dos micro-dispositivos

Os micro-dispositivos foram avaliados em termos de robustez e estabilidade através de testes físico-químicos adequados. Nesse sentido, foram submetidos a diversos solventes orgânicos e vários valores de pH sob tratamento ultrasónico ou sob agitação. O teste de estabilidade e robustez dos micro-dispositivos em diversos solventes é um dos parâmetros mais importantes a ser considerado, uma vez o processo de remoção dos analitos da fase extractiva ocorrer por LD.

Assim, mergulharam-se os micro-dispositivos em diversos solventes com diferentes características polares (MeOH, ACN, etanol, isopropanol, acetona, acetato de etilo, *n*-pentano, *n*-hexano, DCM, ácido fórmico e acético) sob tratamento ultrasónico durante 1,0 h. A robustez/estabilidade dos micro-dispositivos nos solventes testados variou com o tipo de fase extractiva utilizada. Para os micro-dispositivos cobertos com AC ocorreu degradação apenas quando colocado em contacto com acetona, acetato de etilo, ACN e DCM, enquanto

que para o PS-DVB o número de solventes no qual os micro-dispositivos apresentaram estabilidade foi mais reduzido – MeOH, etanol, isopropanol, ácido acético e fórmico. Na maioria dos casos, a degradação ocorreu devido à dissolução das esferas de PS quando em contacto com o solvente, destruindo assim a fixação do material sólido.

Para o estudo de robustez/estabilidade a diferentes valores de pH os micro-dispositivos foram colocados em água ultra-pura com valores de pH compreendidos entre 1,0 e 14,0 seguido de agitação. Após 3,0 h de agitação, foram transferidos para um vial contendo também água ultra-pura, sendo posteriormente sujeitos a tratamento ultrasónico durante 1,0 h. Os micro-dispositivos mantiveram-se inalterados para todos os valores de pH testados.

6.6.3.3 Caracterização textural

A caracterização textural dos materiais sólidos consiste na determinação da superfície específica e do volume específico de poros. Um dos métodos mais adequados para a caracterização da estrutura porosa deste tipo de materiais é a adsorção de gases e vapores uma vez que permite uma caracterização geral da sua micro e mesoporosidade⁴².

O modelo de Brunauer, Emmet e Teller (BET), proposto em 1938, tem sido o mais utilizado na análise de isotérmicas de adsorção, nomeadamente, na estimativa da área superficial específica, designada por A_{BET} . Este modelo foi desenvolvido para a adsorção em multicamada, em sólidos não porosos baseando-se no fenómeno de adsorção física considerando as forças de atracção de van der Waals⁴².

A caracterização textural de sólidos também pode ser obtida através da análise das isotérmicas recorrendo a métodos empíricos. Estes métodos baseiam-se na comparação da isotérmica de adsorção para um dado adsorvato com a isotérmica padrão do mesmo adsorvato num material de referência não poroso, com uma composição similar à do material em estudo. O método t recorre a este tipo de comparação e permite determinar o volume microporoso a partir da comparação gráfica das isotérmicas das amostras em estudo com uma curva de referência⁴².

Por forma a comparar a estrutura porosa do AC e do PS-DVB suportado nas esferas de PS com o respectivo material sólido em pó realizaram-se estudos de adsorção para os micro-dispositivos preparados, cujos resultados se encontram na tabela 6.16. Uma vez que os resultados obtidos referem-se à massa total dos micro-dispositivos (material sólido e PS), procedeu-se ao cálculo da porosidade apenas do material tendo em conta a percentagem deste, presente nos micro-dispositivos.

Por análise dos resultados apresentados na tabela 6.16 verifica-se que a porosidade dos materiais sólidos diminui consideravelmente quando estes estão suportados no PS. A A_{BET} para o AC em pó é igual a 937 enquanto que no micro-dispositivo já é só 211 m^2 / g . Relativamente ao PS-DVB ocorre uma redução de A_{BET} de 653 m^2 / g . Este facto pode ser devido ao entupimento dos poros durante o processo térmico de preparação dos micro-dispositivos.

Apesar da redução da porosidade dos materiais sólidos, a utilização destes micro-dispositivos para a extracção de poluentes orgânicos de amostras aquosas permitiu alcançar boas recuperações, muito provavelmente devido às baixas concentrações de analito utilizadas neste tipo de análises, como se demonstrará mais à frente.

Tabela 6.16 – Caracterização textural do material sólido suportado nos micro-dispositivos e em pó.

	% Material sólido	A_{BET} (m^2/g)	V_{total}^a (cm^3/g)	V_{meso}^b (cm^3/g)	V_{micro}^c (cm^3/g)
Micro-dispositivo (AC-Ridel)	6,16	211	0,13	0,05	0,08
AC-Ridel	---	937	0,65	0,33	0,32
Micro-dispositivo (PS-DVB)	14,9	859	0,40	0,02	0,38
PS-DVB^d	---	1512	0,83	0,44	0,39

^avolume adsorvido a $p/p^0=0,95$; ^bdiferença entre V_{total} e V_{micro} ; ^cMétodo t; ^dvalores obtidos de [43]

p – pressão de equilíbrio p^0 – pressão de saturação à temperatura a que o ensaio é realizado

6.6.3.4 Análise estrutural dos micro-dispositivos

As características dos micro-dispositivos preparados, nomeadamente, a topografia da superfície e a estrutura cristalográfica, foram avaliadas com recurso à técnica de SEM. Na figura 6.19 são apresentadas as imagens de uma esfera de PS sem fase extractiva e coberta com AC ou PS-DVB, onde é possível observar que a superfície da esfera está completamente coberta com o material sólido. Verifica-se ainda que o PS-DVB apresenta partículas de maiores dimensões relativamente ao AC.

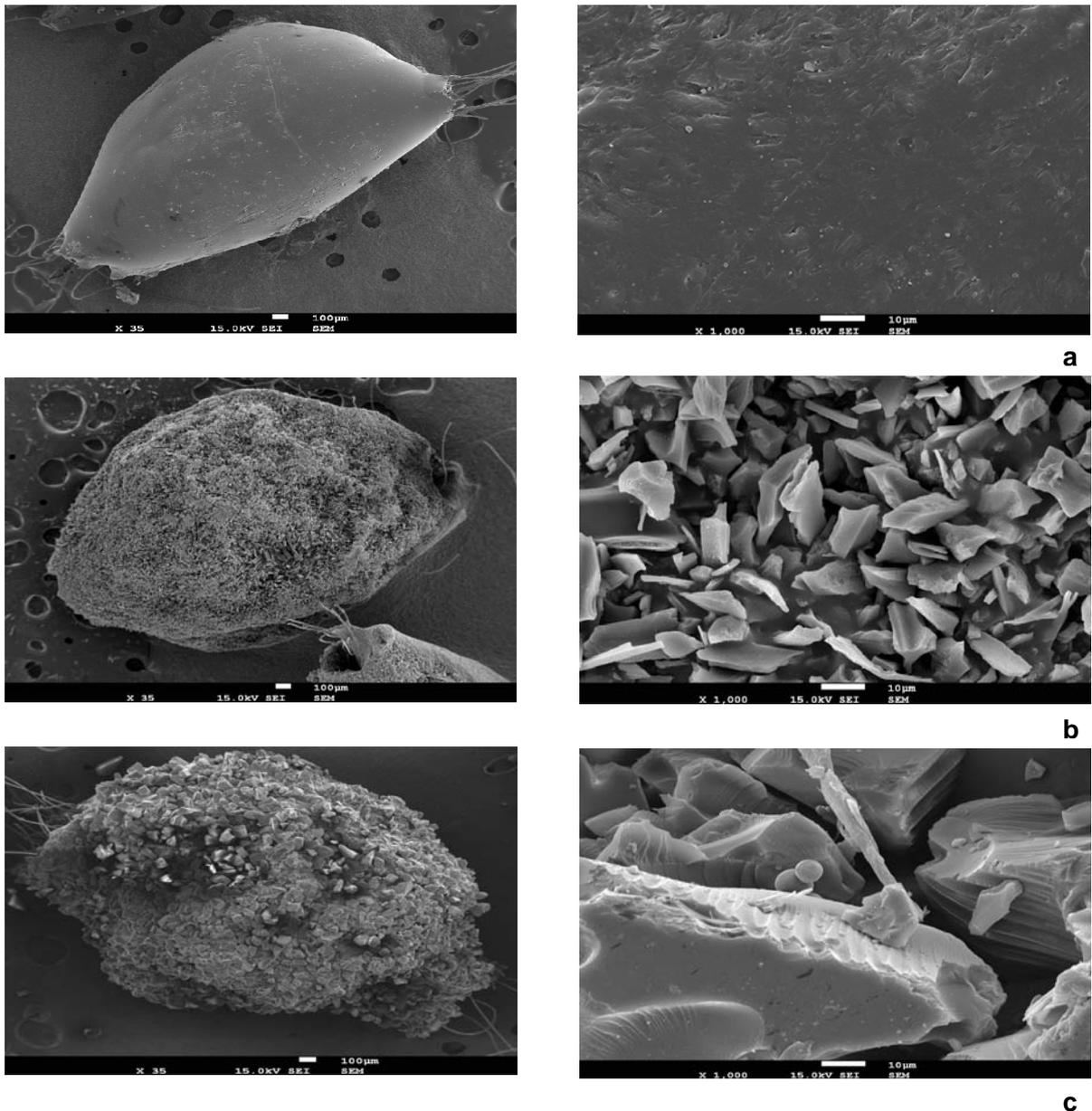


Figura 6.19 – Imagens SEM da esfera de PS com uma ampliação de 35 × e 1000 ×, sem fase extractiva (a), coberta com AC (b) ou PS-DVB (c).

6.6.4 Optimização da MSA μ E(AC)-LD

Por forma a aumentar a recuperação do ACF e da CAF em matrizes aquosas, foram testados três ACs (Ridel, NSAES e NSAESox) e PS-DVB. Após a selecção da fase extractiva foram optimizados os principais parâmetros que afectam os processos de extracção e retro-extracção, realizando ensaios para concentrações de 10 μ g/L.

6.6.4.1 Dessorção líquida (LD)

Os primeiros ensaios realizados durante o processo de optimização da LD, foram efectuados no sentido de se verificar a possibilidade de perda de analitos durante o passo de evaporação do solvente, ainda que os analitos alvo sejam considerados substâncias não voláteis. Neste sentido, soluções padrão conjuntas de várias concentrações foram evaporadas sob uma suave corrente de azoto tendo os resíduos sido seguidamente redissolvidos em MeOH (25 %) e água ultra-pura (75 %) e injectados no sistema HPLC-DAD. Por comparação dos dados obtidos com controlos apropriados, verificou-se que se obtinha uma reconstituição entre 97,6 e 104 % com um RSD inferior a 2,7 %, confirmando assim a não ocorrência de perdas significativas durante o passo de evaporação.

Inicialmente, o estudo incidiu sobre o AC Ridel, utilizando MeOH como solvente para a remoção dos analitos adsorvidos no carvão. Por análise dos resultados obtidos (figura 6.20) verifica-se que a percentagem de recuperação obtida é muito baixa para o ACF e nula para a CAF. A fim de avaliar se o problema estava associado ao passo de extracção ou de retro-extracção, avaliou-se a água ultra-pura fortificada após o processo de extracção de 3 h, tendo-se constatado que o material adsorvente utilizado permitia a extracção da CAF e do ACF numa percentagem superior à encontrada após o passo de LD. Assim sendo, o problema centrava-se na remoção dos analitos do material adsorvente, o que é comum quando se utilizam materiais adsorventes para a extracção de compostos polares⁴⁴.

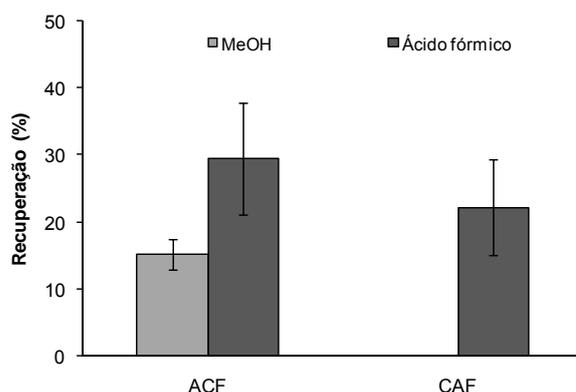


Figura 6.20 – Efeito do solvente de LD na recuperação do ACF e CAF por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD (extracção - 3 h (1000 rpm); retro-extracção (45 min) sob tratamento ultrasónico).

Neste sentido, testou-se outro solvente, com base nos estudos de robustez/estabilidade dos micro-dispositivos efectuado para vários solventes. De todas as possibilidades disponíveis, optou-se por seleccionar o ácido fórmico pelo facto de o etanol e o isopropanol pertencerem à classe dos álcoois, logo muito provavelmente os resultados iriam ser

semelhantes aos obtidos para o MeOH; os *n*-alcanos, serem solventes apolares, logo a afinidade para os analitos alvo será baixa; o ácido fórmico ser um ácido mais volátil relativamente ao acético, permitindo que o passo de evaporação fosse mais rápido.

Por análise da figura 6.20, observa-se que o ácido fórmico permite a remoção da CAF do AC e que também aumenta a percentagem de remoção do ACF. No entanto, as percentagens de recuperação obtidas são muito baixas, verificando-se que são inferiores à quantidade extraída após 3 h. Deste modo, a remoção dos analitos alvo do AC suportado no micro-dispositivo continua ainda a ser insatisfatória.

Perante este facto, decidiu-se despende mais algum tempo de modo a tentar melhorar os resultados obtidos utilizando a técnica MSA μ E, começando por se proceder à optimização do processo de lavagem. Após a lavagem dos micro-dispositivos em água ultra-pura sob agitação, para a remoção do excesso de AC que não ficou suportado na fase polimérica, procedeu-se a uma nova lavagem. Durante a optimização do processo da segunda lavagem dos micro-dispositivos testaram-se os seguintes solventes: água, *n*-hexano e MeOH; o processo de lavagem foi efectuado sob agitação e com tratamento ultrasónico (figura 6.21).

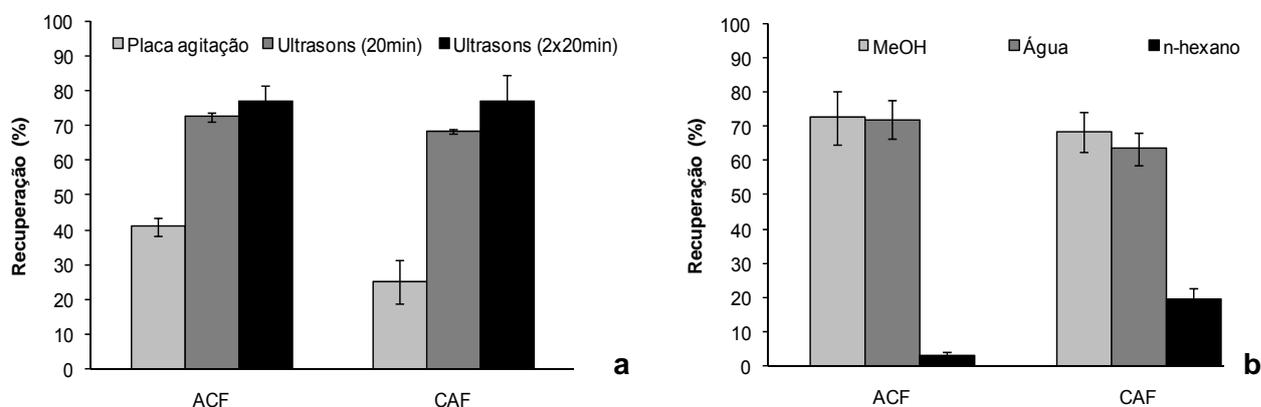


Figura 6.21 – Efeito do processo de lavagem do micro-dispositivo na recuperação do ACF e CAF por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD (extração – 17 h (1000 rpm); retro-extração em ácido fórmico (45 min) sob tratamento ultrasónico; lavagem com MeOH (a); lavagem em ultrasons durante 20 min (b)).

Por análise do gráfico da figura 6.21a, verifica-se que o tratamento ultrasónico efectuado aos micro-dispositivos permite um aumento considerável na recuperação dos analitos. Observando a figura 6.21b, verifica-se que o solvente de lavagem tanto pode ser MeOH ou água. Assim, para novos ensaios os micro-dispositivos foram primeiramente lavados em água sob agitação, seguindo-se duas lavagens durante 20 minutos com MeOH sob tratamento ultrasónico e finalmente uma nova lavagem com água sob agitação.

A topografia da superfície e a estrutura cristalográfica dos micro-dispositivos não lavados, lavados na placa de agitação e lavados no ultrasons foram seguidamente avaliadas com recurso à técnica de SEM. Na figura 6.22 são apresentadas as imagens obtidas, nas quais é possível observar que o tratamento de limpeza é mais eficaz quando efectuado por ultra-sons, justificando o aumento da % de recuperação apresentado na figura 6.21a.

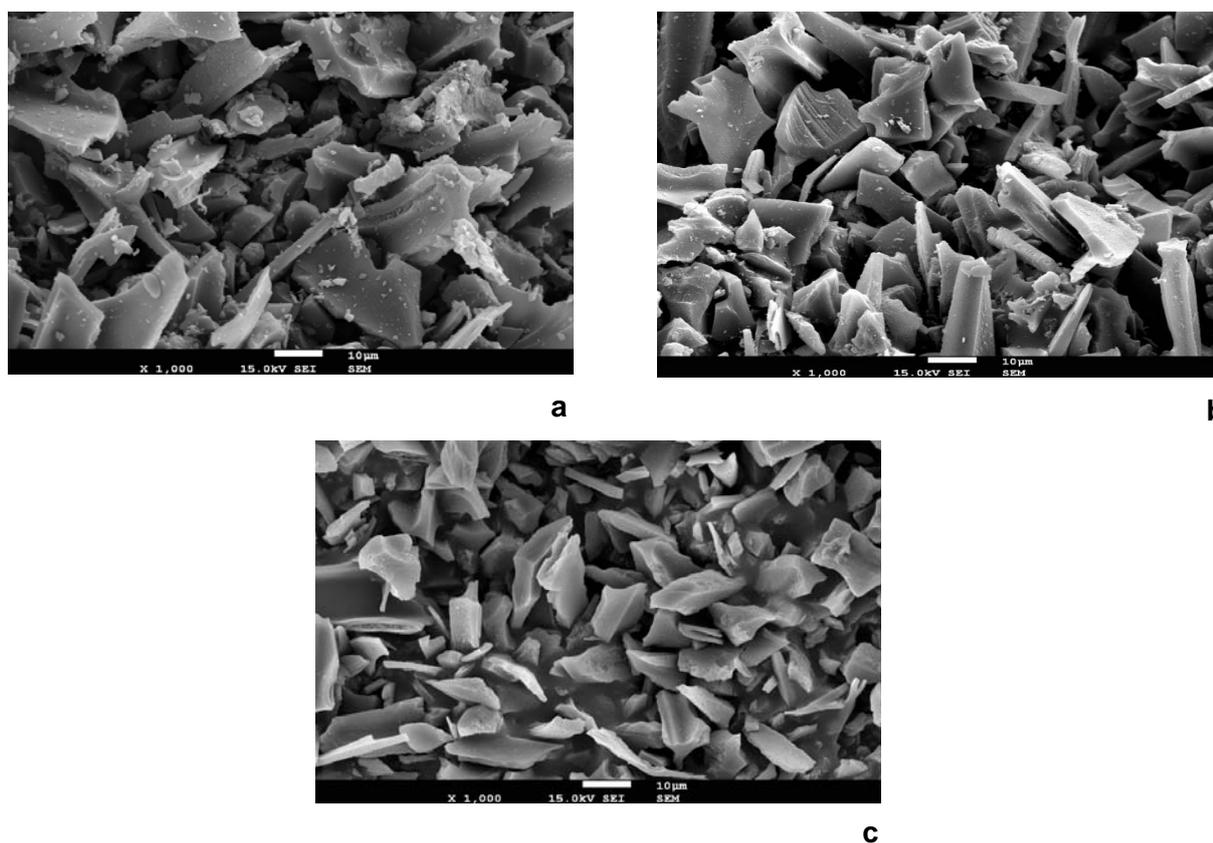


Figura 6.22 – Imagens SEM da esfera de PS cobertas com AC sem lavagem (a), após a lavagem na placa de agitação (b) e após lavagem em ultrasons (c) (ampliação 1000 ×).

Tendo em conta as considerações discutidas, a LD foi efectuada sob tratamento ultrasónico, por forma a acelerar o processo, avaliando-se qual o tempo óptimo deste passo. Analisando o gráfico da figura 6.23a, verifica-se que após 30 min é alcançada uma maior percentagem de recuperação. Realizando uma segunda retro-extracção verificou-se que 30 min são suficientes para a remoção dos analitos do AC. Consequentemente, um período de 30 min foi estabelecido para LD.

De modo a estudar as potencialidades do copolímero PS-DVB como fase extractiva para a MSA μ E do ACF e da CAF, realizaram-se ensaios nos quais foi testada a influência do solvente utilizado na LD. Por análise da figura 6.23b verifica-se para este material sólido que a remoção da CAF também aumenta quando se utiliza ácido fórmico, não havendo

diferenças significativas para o ACF. Comparando as recuperações obtidas com o PS-DVB e com o AC (Ridel) (figura 6.23a), nas mesmas condições experimentais, pode observar-se que o segundo permite uma maior percentagem de recuperação. Verificou-se ainda, que o processo de lavagem dos micro-dispositivos preparados com PS-DVB não influencia a retro-extracção dos analitos.

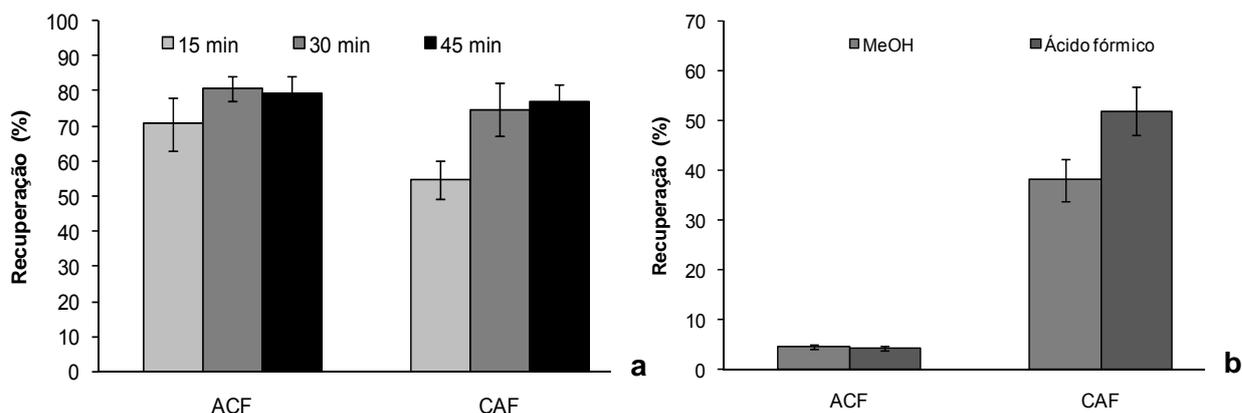


Figura 6.23 – Efeito do tempo (a) e do solvente da LD (b) na recuperação do ACF e CAF por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD e MSA μ E(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD, respectivamente (extracção – 17 h (1000 rpm); retro-extracção sob tratamento ultrasónico).

6.6.4.2 MSA μ E(AC)

Após a optimização das melhores condições para a LD, prosseguiu-se com a optimização dos parâmetros que afectam a extracção, por forma a alcançar o máximo de eficiência no menor tempo analítico.

Podendo a ionização do analito e a carga superficial do AC variar com o pH, a superfície do AC e as espécies de analito podem coexistir num sistema complexo, no qual podem estar presentes cargas iguais ou opostas. Como consequência é necessário controlar o pH do meio de modo a melhorar a recuperação dos analitos pelo AC. Durante a optimização do pH foram testados três ACs, nomeadamente, Ridel, NSAES e NSAESox (figura 6.24).

Os dados da figura 6.24 mostram que para o ACF se deve trabalhar na gama de pH compreendida entre 4,0 e 8,0 uma vez que nesta zona a variação de recuperação que ocorre é pouco significativa, assegurando-se que a molécula não tem carga. O diferente desempenho dos três ACs não deverá estar relacionado com a estrutura porosa, mas sim com a química superficial, uma vez a amostra NSAES ter maior área superficial (tabela 6.17), embora não apresente maior eficiência. Para os dois ACs mais ácidos as recuperações obtidas para o ACF são semelhantes.

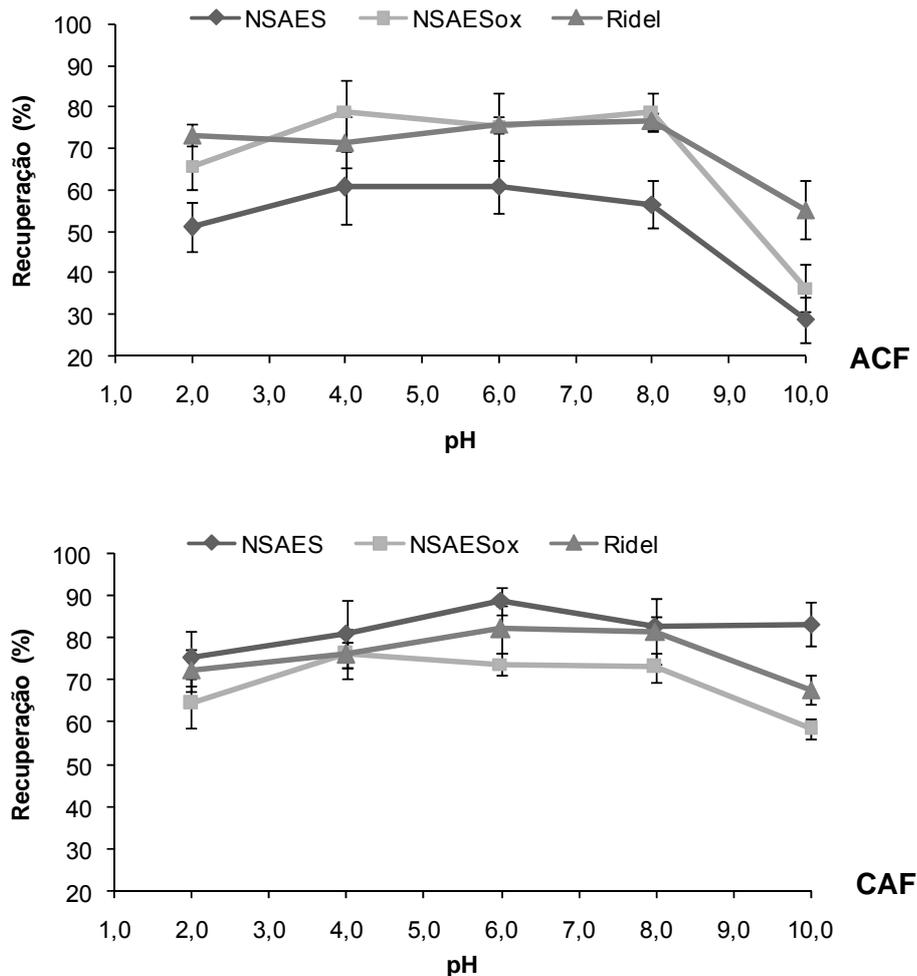


Figura 6.24 – Efeito do pH na recuperação do ACF e CAF por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD, usando ACs da Ridel, NSAES e NSAESox (extração - 17 h (1000 rpm); retro-extração em ácido fórmico (30 min), sob tratamento ultrasónico).

No que se refere à CAF, o AC(NSAESox) é o que apresenta menor recuperação, apresentando o AC(Ridel) o máximo de eficiência para valores de pH compreendidos entre 6,0 e 8,0, enquanto que o AC(NSAES) alcança o máximo de recuperação para pH 6,0. Verifica-se que o decréscimo mais acentuado no valor de recuperação ocorre a pH 10,0, sendo esse efeito mais notório para o ACF, o que pode ser explicado com base no valor do pK_a . Uma vez que o valor de pK_a para o ACF é igual a 9,38 (tabela 6.15), este composto já apresenta carga negativa a pH 10,0 não sendo completamente extraído da fase aquosa pelo AC. Para a CAF esse efeito já não é tão acentuado, uma vez que o valor de pK_a é superior a 10,0 (tabela 6.15). Por outro lado, o AC(NSAES) apresenta um comportamento distinto dos outros ACs para a CAF, uma vez que a recuperação não decresce para pH 10,0 o que pode ser explicado pela natureza mais básica deste carvão (tabela 6.17).

Por fim, foi possível concluir que o AC(Ridel) é a fase sólida que permite alcançar uma maior recuperação para a análise simultânea das duas moléculas testadas, facto pelo qual este AC foi o seleccionado para prosseguir o desenvolvimento do novo método MSA μ E para análise de ACF e CAF em solução aquosa.

Tabela 6.17 – Caracterização textural dos ACs utilizados por MSA μ E.

Carvão	pH _{PZC}	A _{BET} (m ² /g)	V _{total} ^a (cm ³ /g)	V _{meso} ^b (cm ³ /g)	V _{micro} ^c (cm ³ /g)
Ridel	6,5	937	0,65	0,33	0,32
NSAES	8,4	1065	0,70	0,25	0,45
NSAESox	5,5	875	0,51	0,08	0,43

^avolume adsorvido a $p/p^0 = 0,95$; ^bdiferença entre V_{total} e V_{micro}; ^cMétodo t

Uma das vantagens da nova metodologia é a possibilidade de variar facilmente a quantidade de fase extractiva através da adição ou remoção do número de esferas. Deste modo, um dos parâmetros que também foi optimizado foi a quantidade de AC(Ridel) presente nos micro-dispositivos. De acordo com os resultados apresentados na figura 6.25a, verifica-se que uma massa de AC igual a 2,1 mg é suficiente para se alcançar o máximo de recuperação dos analitos alvo, quando ocorrem ao nível dos traços.

Por forma a acelerar o processo de extracção foram testadas diferentes velocidades de agitação (750, 1000 e 1250 rpm) durante 3 h, verificando-se que os valores testados não influenciavam o processo. Neste sentido, optou-se por utilizar a velocidade de 1000 rpm.

O tempo de exposição do AC aos analitos é igualmente um parâmetro muito importante, uma vez que influencia a extracção dos analitos pela fase extractiva. Seis diferentes tempos de extracção (0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 17,0 h) foram testados, por forma a determinar qual o que permitia obter uma maior recuperação do ACF e da CAF. A figura 6.25b ilustra os resultados obtidos, na qual é possível verificar um aumento contínuo na recuperação dos analitos com o aumento do tempo de extracção.

O efeito da adição de MeOH à matriz aquosa foi igualmente testado pela adição de 5, 10 e 15 % (v/v) daquele álcool. Por análise da figura 6.25c é possível verificar que a adição em MeOH reduz ligeiramente a recuperação dos analitos, sendo esse efeito mais notório para o ACF. Consequentemente, os ensaios posteriores foram realizados na ausência deste modificador.

O efeito da força iónica foi igualmente testado por adição de NaCl (5, 10 e 15 % (m/v)) à matriz aquosa. Analisando os resultados obtidos (figura 6.25d), verifica-se em geral um ligeiro decréscimo, embora negligenciável, na recuperação dos analitos, após a adição deste sal, tendo o mesmo sido preterido em ensaios posteriores.

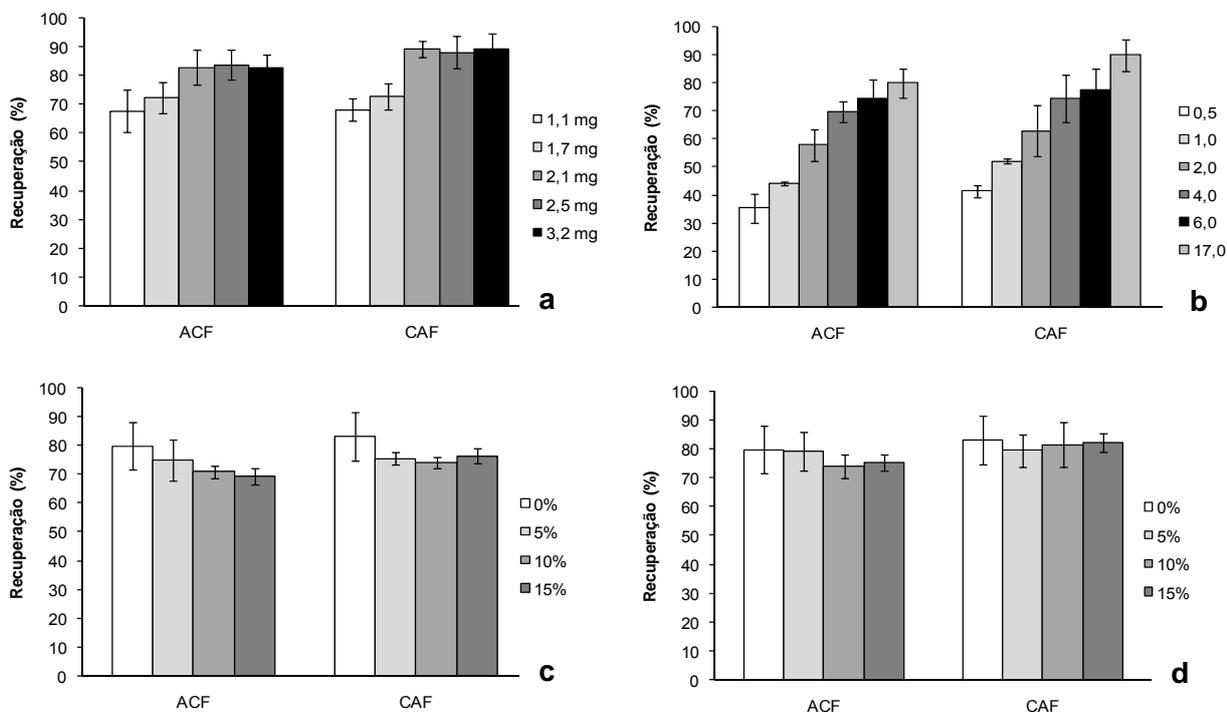


Figura 6.25 – Efeito da massa em AC (a), tempo de extracção (b), modificador orgânico (c) e força iónica (d) na recuperação do ACF e da CAF por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em ácido fórmico (30 min), sob tratamento ultrasónico; 2,1 mg de AC(Ridel)).

O processo de extracção (pH, tempo, velocidade de agitação, adição de modificador orgânico e controlo da força iónica) também foi optimizado utilizando a técnica BA μ E, tendo sido obtidos resultados concordantes com os obtidos por MSA μ E, evidenciando a robustez de ambas as técnicas independentemente da forma dos micro-dispositivos e do tipo de fixação dos materiais sólidos. Após as condições experimentais optimizadas (extracção: 17 h (AC - Ridel (2,1 mg), pH 7,0, 1000 rpm), LD: ácido fórmico (30 min)) em água ultra-pura fortificada com uma solução padrão conjunta de 10 μ g/L, procedeu-se à comparação da recuperação alcançada por cada analito para cada técnica de A μ E (figura 6.26).

A aplicação da ANOVA unifactorial (anexo G4), permitiu verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas na recuperação obtida para ACF e CAF pelas duas técnicas.

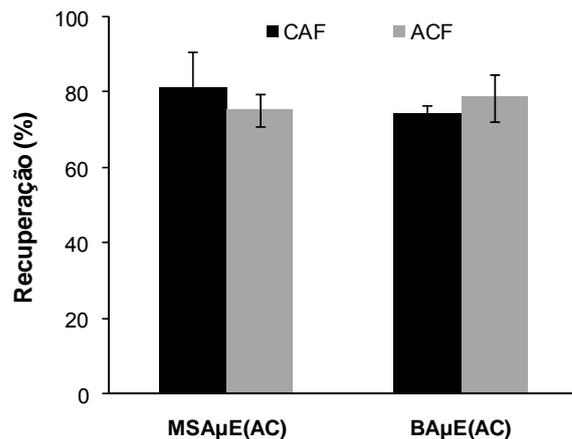


Figura 6.26 – Comparação as recuperações obtidas para o ACF e CAF pelas técnicas MSAμE e BAμE, seguido de LD-HPLC/DAD.

Por forma a avaliar a possibilidade de reutilização dos novos micro-dispositivos contendo AC(Ridel), utilizados na técnica MSAμE, para a extracção dos analitos ACF e CAF, realizaram-se diversos ensaios, em água ultra-pura e em triplicado. Na figura 6.27a é possível observar as recuperações obtidas para cada reutilização. A aplicação da ANOVA (anexo G4), permitiu verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as recuperações para um nível de confiança de 95 %. Assim sendo, após dez utilizações em água ultra-pura os micro-dispositivos mantêm a mesma capacidade extractiva, concluindo-se que podem ser reutilizados.

O tempo que os analitos podem estar adsorvidos no AC, antes de se proceder à LD foi igualmente testado, tendo-se para tal realizado ensaios em triplicado e armazenado os micro-dispositivos a 4 °C com os analitos adsorvidos entre um a oito dias. Após o período de armazenamento procedeu-se à LD, tendo-se obtido as recuperações apresentadas na figura 6.27b. Por aplicação da ANOVA unifactorial (anexo G4), verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as recuperações para um nível de confiança de 95 %. Assim sendo, é possível armazenar os micro-dispositivos com os analitos alvo adsorvidos no AC durante oito dias. Esta informação torna-se importante para o caso de se pretender efectuar uma extracção dos analitos *in situ* e posteriormente enviar os micro-dispositivos para o laboratório.

Avaliou-se ainda a capacidade de extracção do AC(Ridel) suportado no PS, após estar exposto durante 48 horas a solventes básicos, ácidos e orgânicos. Neste sentido, os micro-dispositivos foram imersos em MeOH (polar), *n*-hexano (apolar), HCl (0,1 M) e NaOH (0,1 M). Após as 48 horas os micro-dispositivos foram removidos dos solventes e lavados com água ultra-pura durante 20 min sob tratamento ultrasónico. Posteriormente, realizaram-se

ensaios por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD, por forma a avaliar a recuperação dos analitos, cujos resultados estão apresentados na figura 6.28. A aplicação da ANOVA unifactorial (anexo G4), permitiu verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as recuperações para um nível de confiança de 95 % para a CAF, em relação ao ACF verificando-se que existem diferenças estatisticamente significativas quando os micro-dispositivos são expostos ao *n*-hexano. É de salientar que já quando os micro-dispositivos foram sujeitos a uma lavagem com *n*-hexano, se verificou um decréscimo significativo na recuperação dos analitos (figura 6.21 b).

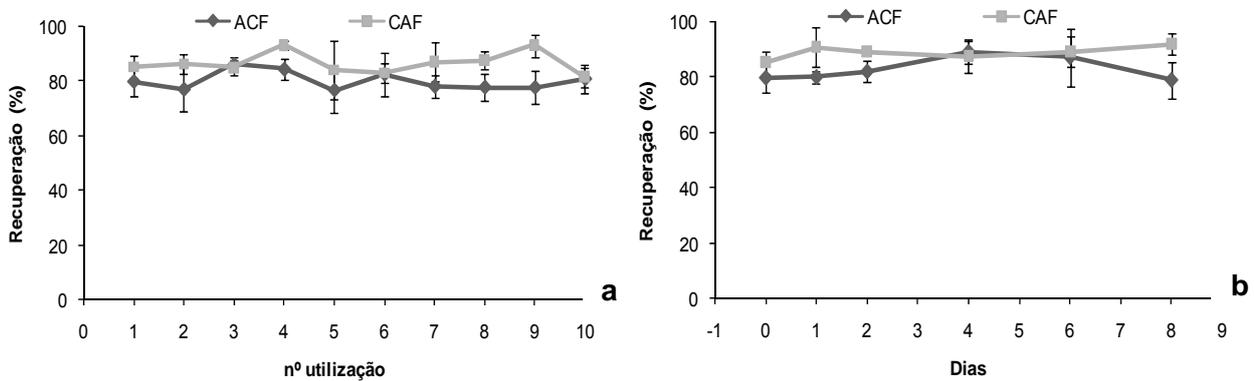


Figura 6.27 – Comparação da recuperação de ACF e CAF obtida após vários ensaios de reutilização do micro-dispositivo (a) e após o armazenamento do micro-dispositivo durante vários dias, com os analitos adsorvidos no AC (b) (extração - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extração em ácido fórmico (30 min), sob tratamento ultrasónico; 2,1 mg de AC(Ridel)).

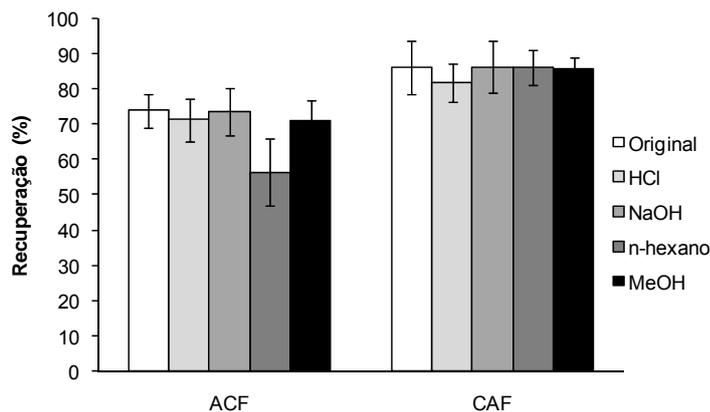


Figura 6.28 – Comparação da recuperação de ACF e CAF obtida antes e após os micro-dispositivos serem mergulhados em diferentes meios durante 48 h (extração - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extração em ácido fórmico (30 min), sob tratamento ultrasónico; 2,1 mg de AC(Ridel)).

6.6.5 Análise termogravimétrica

Foram realizados estudos por análise termogravimétrica com o intuito de se averiguar qual a zona de temperaturas na qual os analitos eram removidos do AC(Ridel) suportado nas esferas de PS, avaliando-se assim a interacção que ocorre entre o analito e o AC.

Inicialmente efectuou-se a análise termogravimétrica dos materiais em pó utilizados na preparação dos micro-dispositivos (AC(Ridel), das esferas de PS antes e após a exposição a 160 °C), assim como dos micro-dispositivos preparados com AC(Ridel), de modo a avaliar qual a zona de perda de massa destes materiais. Por análise das curvas de termogravimetria diferencial (DTG) (figura 6.29), verifica-se que ocorre decomposição do PS entre os 320 e 470 °C.

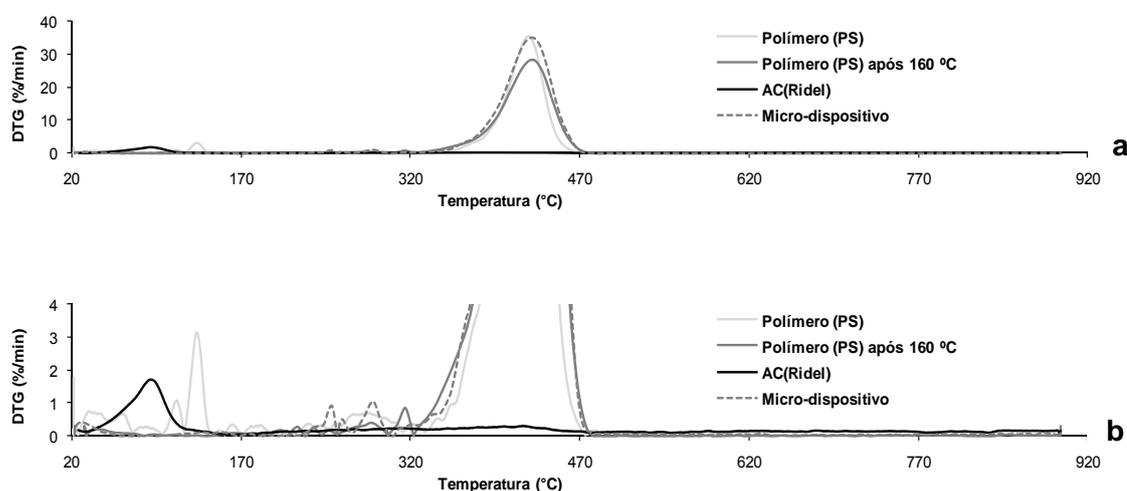


Figura 6.29 – DTG das esferas de PS, das esferas após serem submetidas a uma temperatura de 160 °C, do AC(Ridel) e dos micro-dispositivos preparados com o AC(Ridel) (a e b diferem na escala de DTG (% min)).

Posteriormente, procedeu-se à análise termogravimétrica dos micro-dispositivos preparados com AC(Ridel) com os analitos adsorvidos, à concentração utilizada durante o processo de optimização da metodologia MSA μ E(AC) (10 μ g/L). No entanto, dado a quantidade de analito adsorvida ser muito pequena e devido ao grande pico resultante da decomposição dos micro-dispositivos sem analitos adsorvidos (figura 6.29), não foi possível observar qual a gama de temperaturas que origina a remoção dos poluentes (figura 6.30). Para tentar aumentar a sensibilidade da análise alterou-se a concentração para 50 μ g/L, tendo-se também duplicado o número de micro-dispositivos utilizados numa análise termogravimétrica, embora os resultados obtidos tenham sido semelhantes aos anteriores.

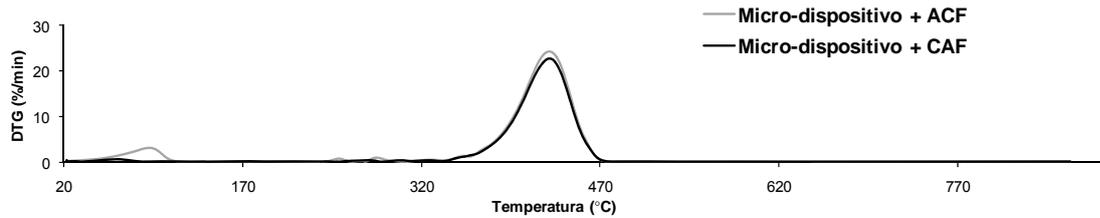


Figura 6.30 – DTG do micro-dispositivo depois da adsorção do ACF e da CAF para uma concentração de 10 µg/L.

Por forma a observar a interacção dos analitos somente com o AC e eliminar a contribuição referente à degradação do PS, procedeu-se à adsorção dos analitos com uma concentração de 120 mg/L no AC em pó, com posterior análise termogravimétrica. Analisando a figura 6.31 é possível verificar que para o AC saturado com as soluções de 120 mg/L, a remoção dos analitos começa à temperatura de 250 °C, alcançando o máximo a 390 °C para o ACF e 430 °C para a CAF. Como se vê estas temperaturas estão incluídas na zona de decomposição do PS, pelo que não foi possível observar a remoção dos analitos dos micro-dispositivos.

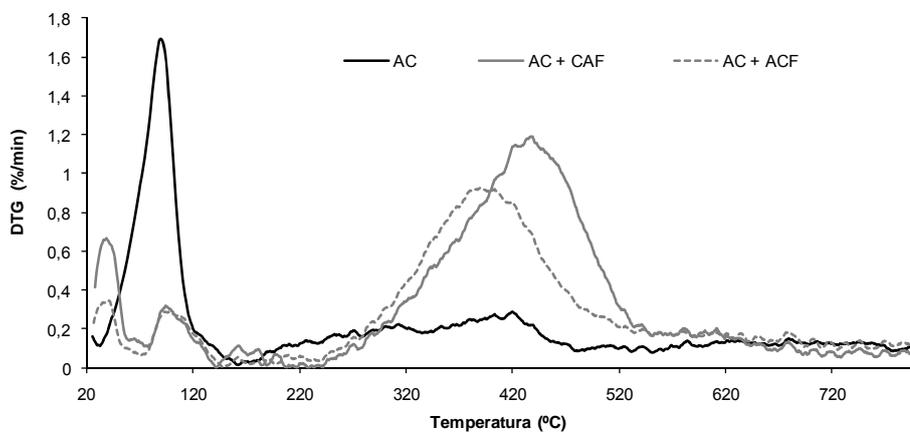


Figura 6.31 – DTG do AC antes e depois da adsorção do ACF e da CAF para uma concentração de 120 mg/L.

Verificando que a desadsorção dos analitos ocorre a temperaturas tão elevadas, devido à forte interacção destes com o carvão, compreende-se a dificuldade que se encontrou durante a optimização do processo de retro-extracção. Ainda é possível concluir que para o caso de se pretender utilizar dessorção térmica com o micro-dispositivo preparado com o AC(Ridel) não será aconselhado a utilização de temperaturas superiores a 320 °C, de modo a não danificar o micro-dispositivo.

6.6.6 Validação do método MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD

Durante o processo de validação do método analítico determinou-se a gama linear dinâmica, LODs e LOQs, tendo-se avaliado ainda a precisão.

A gama linear dinâmica foi testada pelo método dos mínimos quadrados com análise de resíduos, verificando-se linearidade para uma gama de concentrações compreendida entre 4,0 e 40 μ g/L, utilizando cinco níveis de concentração sob as condições experimentais optimizadas. Os resultados obtidos evidenciaram linearidades com coeficientes de correlação (r) superiores a 0,9988 (anexo E4) e os resíduos apresentaram sempre desvios inferiores a 9,1% (anexo F4). Assim, pode-se constatar que os sinais obtidos pelo método MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD são proporcionais às concentrações dos analitos presentes na matriz aquosa, nas gamas de concentrações definidas. Para a determinação dos LODs e LOQs para cada composto, procedeu-se de forma semelhante à descrita para a determinação destes mesmos limites na parte de validação instrumental. Os LODs e os LOQs obtidos foram, respectivamente, 1,2 e 4,0 μ g/L para o ACF, 0,8 e 2,8 μ g/L para a CAF. Uma vez mais, é de salientar que concentrações máximas permitidas para estes analitos em águas destinadas ao consumo humano ainda não estão estabelecidas pelas organizações regulamentares internacionais.

Por último, a precisão do método foi avaliada com recurso a seis ensaios realizados no mesmo dia (repetibilidade) e em dias diferentes (precisão intermédia), para três níveis de concentração (4,0, 20,0 e 40,0 μ g/L). Na tabela 6.18 é possível consultar quais os valores de RSD (%) obtidos para cada ensaio.

Tabela 6.18 – Estudo de precisão do método MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD, para três níveis de concentração ($n = 6$), sob condições experimentais optimizadas.

	Repetibilidade (RSD %)			Precisão Intermédia (RSD %)		
	4,0 μ g/L	20 μ g/L	40 μ g/L	4,0 μ g/L	20 μ g/L	40 μ g/L
ACF	10,8	2,2	3,2	13,0	8,4	10,9
CAF	11,8	7,3	4,2	13,8	13,3	7,8

Como seria expectável, ocorre maior dispersão de resultados para a precisão intermédia, uma vez estas determinações terem sido efectuadas em seis dias distintos. No entanto, os valores de RSD são sempre inferiores a 13,8 %, estando de acordo com a directiva 98/83/CE¹⁸. Ensaio em branco frequentemente efectuados demonstraram contaminações ou “efeito memória” negligenciáveis.

6.6.7 Aplicação do método a amostras reais

De modo a avaliar a aplicação da nova metodologia desenvolvida a amostras reais, realizaram-se ensaios em diversas matrizes aquosas, nomeadamente, águas residuais, superficiais e mar.

Com recurso ao SAM, por forma a minimizar os efeitos de matriz, as amostras foram analisadas pelo método desenvolvido com quatro níveis de fortificação (4,0 – 40 µg/L), bem como o respectivo ensaio em branco (ponto zero) sem fortificação. A tabela 6.19 resume os resultados obtidos para cada matriz estudada, nomeadamente os coeficientes de correlação (*r*) e as recuperações obtidas para um nível de fortificação igual a 10 µg/L. Por análise de amostras sem fortificação constatou-se que a concentração de cada analito estudado era inferior ao LOD encontrado para a presente metodologia.

Tabela 6.19 – Coeficiente de correlação (*r*) e % de recuperação para o ACF e CAF em água residual, superficial e do mar obtida pelo SAM, por MSAµE(AC)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais optimizadas.

Fármacos	<i>r</i>			% Recuperação ^a		
	Residual	Superficial	Mar	Residual	Superficial	Mar
ACF	0,9976	0,9980	0,9985	50,1±2,2	64,8±8,3	73,1±2,9
CAF	0,9994	0,9967	0,9987	54,7±5,6	83,5±1,1	74,6±2,7

^a para um nível de fortificação de 10 µg/L

A aplicação ANOVA unifactorial permitiu avaliar a influência da matriz na percentagem de recuperação. Como os valores *p* são sempre inferiores a 0,05 (anexo G4) significa que existem diferenças estatisticamente significativas entre as recuperações obtidas para as diferentes matrizes, para um nível de confiança de 95%. Afim de verificar quais as matrizes responsáveis por essas diferenças realizou-se um teste de comparações múltiplas – teste de “Tuckey” (anexo G4). Comparando a percentagem de recuperação obtida em água ultra-pura com a obtida nas amostras estudadas verifica-se que o efeito de matriz para o ACF ocorre em água superficial e residual, enquanto para a CAF esse efeito é apenas observado em água residual. A ocorrência de efeitos matriz justifica o uso SAM para a quantificação destes analitos pelas novas metodologias desenvolvidas.

A figura 6.32 ilustra os perfis cromatográficos obtidos para o controlo e para os ensaios realizados em água ultra-pura e matrizes estudadas por MSAµE(AC)-LD/HPLC-DAD, para um nível de concentração de 10 µg/L (a), sob condições experimentais optimizadas, nos

quais é possível verificar um bom desempenho analítico quer no processo de extracção quer na aplicação da presente metodologia a amostras reais.

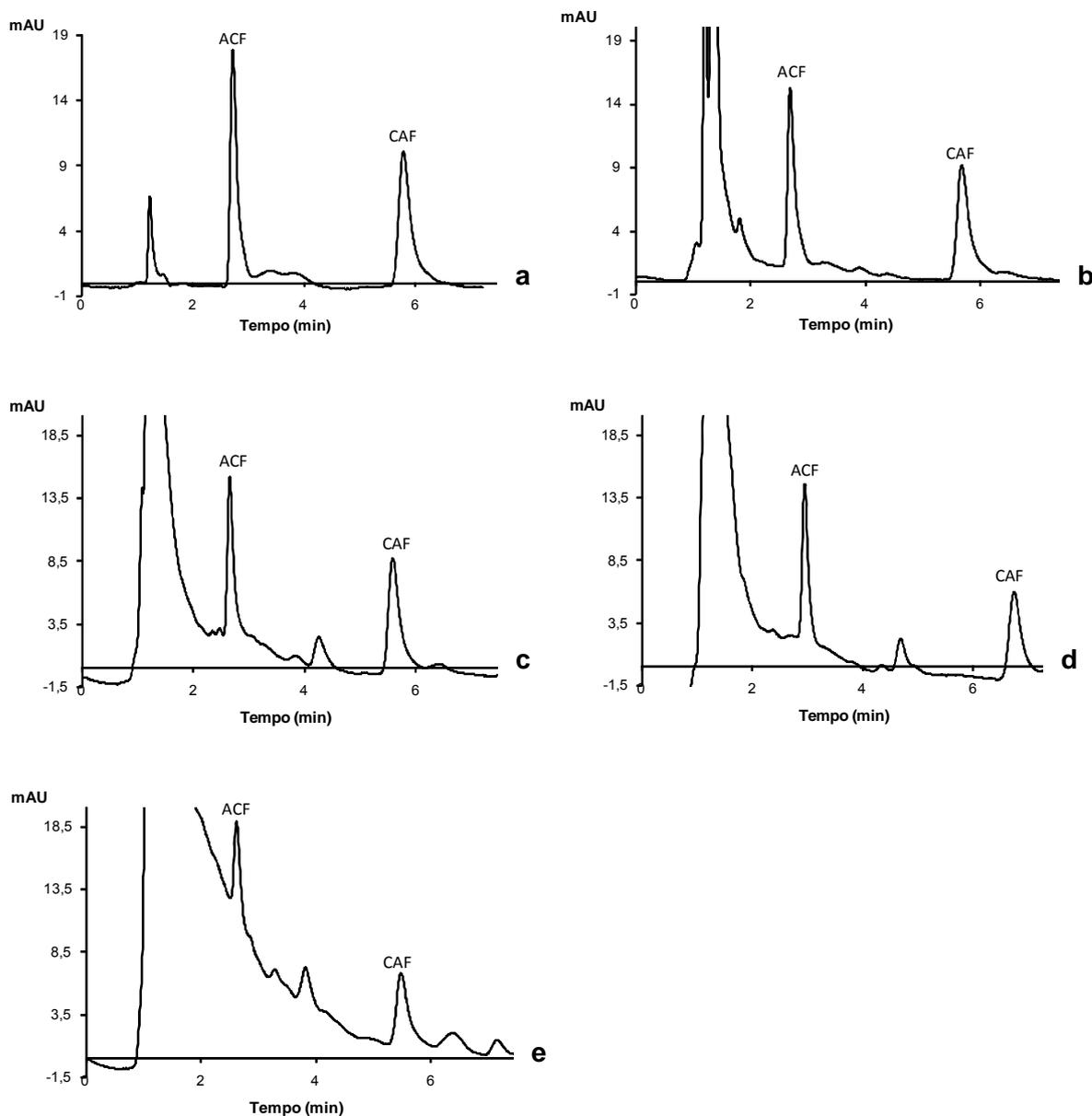


Figura 6.32 – Perfis cromatográficos obtidos para o controlo (a) e ensaios realizados em água ultra-pura (b), superficial (c), mar (d) e residual (e), por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD, para um nível de fortificação de 10 μ g/L sob condições experimentais optimizadas.

A metodologia desenvolvida demonstrou boa selectividade, requerendo volume reduzido de solvente orgânico e de amostra, apresentando assim vantagens em relação a outras técnicas de preparação de amostra, nomeadamente SPE, propostas por outros autores⁴⁵ para a monitorização de ACF e CAF.

6.7 Antibióticos

6.7.1 Considerações gerais

De acordo com Kemper⁴⁶ as classes de antibióticos que apresentam maior probabilidade de ocorrer no ambiente são os aminoglicósidos, β -lactamas (penicilinas), fluoroquinolonas, macrólidos, sulfonamidas, trimetoprim e tetraciclinas, uma vez os pertencentes a estas classes serem os que são maioritariamente administrados na medicina humana e veterinária.

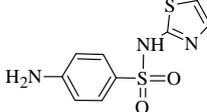
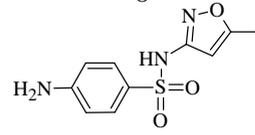
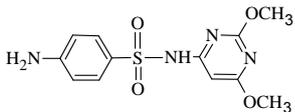
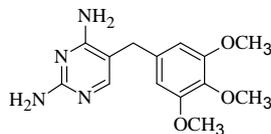
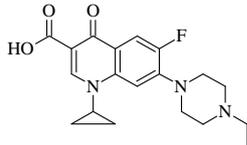
As tetraciclinas não ocorrem frequentemente no meio aquático, mas sim em matrizes sólidas, devido à elevada capacidade de sorção em solos e partículas sólidas presentes no meio aquático⁴⁶. As penicilinas hidrolisam-se facilmente, a estrutura β -lactama que consiste num anel β -lactama contribui para a fraca estabilidade deste grupo no ambiente, uma vez o anel poder ser aberto pela β -lactamase (uma enzima muito frequente em bactérias) ou por hidrólise química⁴⁶. Segundo Michel Haller⁴⁷, os aminoglicósidos e macrólidos podem igualmente sofrer degradação quando presentes no meio ambiente. Assim, estas classes de antibióticos não são normalmente encontradas no ambiente, mas sim metabolitos da sua degradação.

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 aquático⁴⁷. Apesar de serem fracamente adsorvidas pelo solo, a sua presença neste tipo de matrizes pode ocorrer por repetida adição de estrume nos solos (efeito cumulativo). As sulfonamidas são a segunda classe de compostos mais utilizada em medicina veterinária na EU⁴⁸.

Para o presente estudo, os antibióticos estudados foram SMX, STZ e SDM pertencentes à classe das sulfonamidas e TMP, antibiótico frequentemente administrado com uma sulfonamida. Optou-se ainda por seleccionar um antibiótico pertencente à classe das fluoroquinolonas, a ENR, já referenciada como presente no meio ambiente⁴⁹. A presença de fluoroquinolonas no ambiente é preocupante, uma vez que geralmente a resistência a um dos antibióticos desta família, confere simultaneamente resistência a toda esta classe de antibióticos⁵⁰. Na tabela 6.20 é possível consultar a estrutura química, o valor de $\log K_{OW}$ e o pK_a para cada antibiótico estudado.

Conforme referido no capítulo 1, o maior efeito da presença de antibióticos no ambiente está associado ao desenvolvimento de mecanismos resistentes a bactérias, os quais podem comprometer a saúde pública.

Tabela 6.20 – Estrutura química, log K_{OW} e pKa para cada antibiótico estudado.

Antibióticos	Estrutura química	log K_{OW} ^a	pKa
STZ		0,05	2,0; 7,1 ^b
SMX		0,89	1,8; 5,6 ^b
SDM		1,63	2,1; 6,1 ^b
TMP		0,91	3,2; 6,8 ^c
ENR		0,70	6,0; 8,8 ^d

^aValores de log K_{OW} obtidos de [32]; Valores de pKa obtidos de ^b [51] ^c [52] ^d [53]

6.7.2 Optimização e validação instrumental

Tendo em conta as propriedades físico-químicas dos antibióticos, a HPLC-DAD será a técnica analítica mais adequada para a respectiva análise. No entanto, o acoplamento LC-MS permite, geralmente, um aumento na sensibilidade e selectividade.

Para a optimização das condições cromatográficas, no sentido da separação dos antibióticos seleccionados, efectuou-se a escolha do sistema de eluentes mais adequado, gradiente e fluxo, tendo o processo de optimização sido efectuado num sistema HPLC-DAD.

O sistema de eluentes que se revelou mais eficaz foi a mistura água / MeOH. No entanto, ao adicionar 0,1 % de ácido fórmico à fase aquosa verificou-se a presença de picos cromatográficos mais simétricos e com menor largura de base, aumentando assim a eficiência do processo cromatográfico. A adição de ácidos orgânicos em baixas percentagens à fase móvel apresenta ainda a vantagem para análises efectuadas por LC-MS, uma vez que ajuda na formação de espécies carregadas na fase móvel.

Neste sentido, foram testadas diversas composições de fase móvel, tendo-se usado a composição apresentada na tabela 5.1 (capítulo 5), o que permitiu boa resolução entre todos os analitos estudados em tempo analítico aceitável (< 22 min). Foram ainda testados

três fluxos de fase móvel (0,20, 0,25 e 0,30 mL/min), verificando-se melhor resolução num tempo analítico aceitável para o fluxo de 0,25 mL/min. A detecção foi efectuada com comprimentos de onda de 225 nm para o TMP e 260 nm para os restantes antibióticos (anexo B).

Após a optimização do método cromatográfico, procedeu-se à optimização da análise por MS. Dada a polaridade dos compostos em estudo (tabela 6.20) e ao facto de serem pouco voláteis e termicamente instáveis, utilizou-se a ionização por ESI.

Começou por se analisar soluções individuais de cada antibiótico por injeção directa no espectrómetro de massa no modo varrimento contínuo, o que permitiu a monitorização dos iões precursores numa gama de m/z compreendida entre 50 e 400 Da. Os espectros de massa foram obtidos no modo positivo, com base em análises já efectuadas por outros autores^{49,52,54,55}, foram ainda traçados os espectros de massa “tandem” (MS^n) (anexo A2). Durante a optimização das condições experimentais, verificou-se que a adição de 0,1 % ácido fórmico às soluções diminuía a formação do aducto de sódio ($[M+Na]^+$), aumentando assim a intensidade do ião precursor $[M+H]^+$. O ião precursor apresentou melhor fragmentação do que o aducto de sódio para todos os antibióticos estudados.

Para as sulfonamidas (figura 6.33) os fragmentos observados estão de acordo com os mencionados por outros autores⁵⁵, sendo os mais característicos com m/z 156, 108 e 92 correspondendo aos iões $[M-RNH_2]^+$, $[M-RNH_2-SO]^+$ e $[M-RNH_2-SO_2]^+$. O pico correspondente ao ião precursor é o mais intenso para todas as sulfonamidas estudadas.

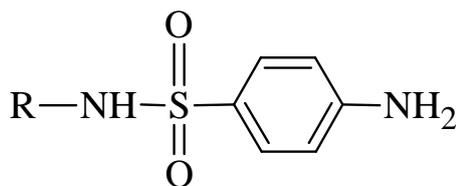


Figura 6.33 – Estrutura química geral das sulfonamidas.

Analisando o espectro de massa obtido para o TMP verifica-se que o pico base a m/z 291 corresponde à molécula protonada ($[M+H]^+$). A formação dos iões fragmentos deste antibiótico pode facilmente ser explicada pela perda de pequenos neutros, nomeadamente moléculas de água, grupos metilo, amino e metoxi. Para o fragmento com m/z 230, uma possível perda pode ser devida ao ião $[M+H-CH_3-CH_3-OCH_3]^+$ e para o fragmento m/z 123 poderá ser atribuído ao ião $[M+H-C_9H_{12}O_3]^+$.

Para a ENR também se verifica que o fragmento mais abundante corresponde ao ião $[M+H]^+$, ou seja, após a fragmentação da molécula ocorre a perda de uma molécula de CO_2 (m/z 316) e a perda de fragmentos relacionados com a quebra do anel piperazínico, dando origem por exemplo ao ião com m/z 245, de acordo com a literatura⁵⁶.

Posteriormente, as análises foram realizadas apenas com os iões mais abundantes, utilizando-se o ião precursor para quantificação e os iões fragmento para confirmação, no sentido de aumentar a sensibilidade do método. Na tabela 6.21 é possível consultar os iões seleccionados.

Tabela 6.21 – Ião precursor e iões produto seleccionados para a monitorização dos antibióticos estudados.

Antibióticos	Ião precursor (m/z)	Iões produto (m/z)
STZ	256	156, 108
SMX	254	156, 108
SDM	311	156, 108
TMP	291	230, 123
ENR	360	316, 245

Seguidamente, determinou-se a gama linear dinâmica usando seis soluções padrão, com concentrações compreendidas entre 10 e 200 $\mu\text{g/L}$ para o TMP e ENR e 50 a 500 $\mu\text{g/L}$ para as sulfonamidas. A figura 6.34 apresenta o traçado de corrente iónica, com extracção dos iões precursores atribuídos aos antibióticos estudados e obtidos após a análise da solução padrão conjunta por LC-ESI/MS

Dos dados obtidos, verificou-se excelente resposta linear, com coeficientes de correlação (r) superiores a 0,9976. A sensibilidade instrumental foi igualmente testada, com recurso à determinação de LODs e LOQs em condições de repetibilidade, por análise de seis ensaios do padrão de concentração mais baixa da gama linear dinâmica. Os valores de LODs e LOQs determinados encontram-se compreendidos entre 1,8 - 12,2 $\mu\text{g/L}$ e 5,9 - 40,5 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. A precisão instrumental foi igualmente avaliada através de injecções consecutivas dos padrões com três níveis de fortificação, obtendo-se RSD inferiores a 10 %. Por análise de brancos testou-se a ausência de contaminação, bem como de efeitos memória. Na tabela 6.22 é possível consultar os dados da calibração instrumental obtidos por LC-ESI/MS para cada antibiótico estudado, nas condições experimentais optimizadas.

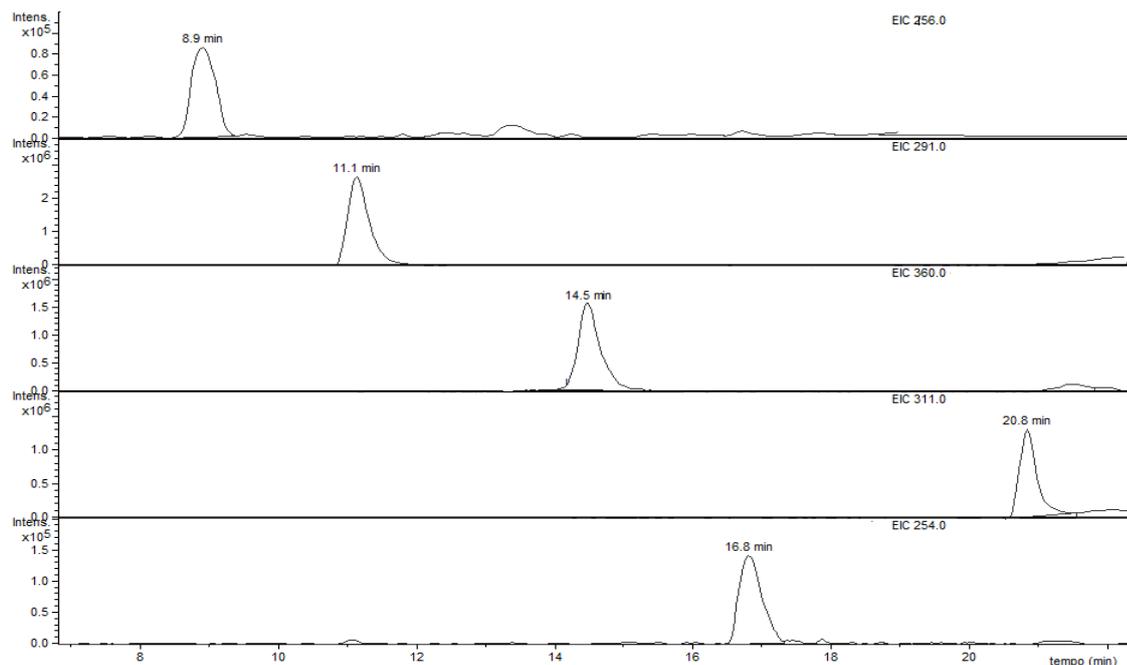


Figura 6.34 – Traçado de corrente iónica com extracção dos iões precusores, de uma solução padrão conjunta em antibióticos (100 µg/L) obtido por LC-ESI/MS.

Tabela 6.22 – Gama linear dinâmica, coeficiente de correlação (*r*), LODs e LOQs obtidos por LC-ESI/MS, sob condições optimizadas para os antibióticos estudados.

Antibióticos	Gama linear dinâmica (µg/L)	<i>r</i>	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
STZ	50-500	0,9979	8,4	28,0
SMX	50-500	0,9983	8,8	29,3
SDM	50-500	0,9982	12,2	40,5
TMP	10-200	0,9977	2,0	6,6
ENR	10-200	0,9976	1,8	5,9

6.7.3 Optimização da MSAµE(PS-DVB)-LD

O que torna difícil o processo de extracção dos antibióticos é o facto destes compostos possuírem grupos polares, com capacidade de se protonarem ou desprotonarem consoante o pH do meio (tabela 6.20)⁴⁶.

Para a extracção dos antibióticos alvo foram testadas as técnicas SBSE(PDMS), SBSE(PU), MSAµE(AC) e MSAµE(PS-DVB). Como seria de esperar as barras convencionais à base de PDMS não são adequadas, uma vez que estes antibióticos

apresentam elevada polaridade. Embora o PU tenha revelado, em estudos anteriores, uma maior eficiência na recuperação dos analitos mais polares relativamente ao PDMS, na extracção dos antibióticos não demonstrou qualquer afinidade para com estes analitos. A extracção dos analitos da matriz aquosa foi possível com recurso a MSA μ E, pelo que foram optimizados os parâmetros que afectam a sua eficiência. Os ensaios de optimização foram efectuadas para um nível de fortificação de 10 μ g/L, recorrendo ao sistema HPLC-DAD.

6.7.3.1 Dessorção líquida (LD)

Começou por se iniciar a optimização efectuando ensaios com AC(Ridel) e PS-DVB, tendo-se testado dois solventes (MeOH e ácido fórmico) para a remoção dos analitos destes materiais. A escolha dos solventes foi efectuada com base na discussão apresentada na secção 6.6.4.1.

Por análise dos resultados obtidos (figura 6.35), verifica-se que o material mais adequado para a extracção dos analitos em estudo é o PS-DVB, uma vez que permite obter maiores percentagens de recuperação em relação ao AC testado. Quanto ao solvente utilizado para a LD dos antibióticos pode verificar-se que o MeOH é o solvente mais adequado, no sentido da remoção das sulfonamidas da fase extractiva. No entanto, para o TMP o ácido fórmico permitiu alcançar maiores recuperações.

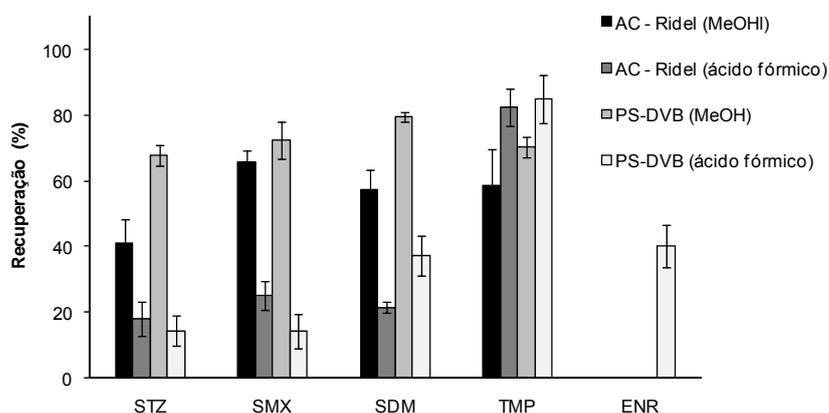


Figura 6.35 – Efeito do solvente e da fase extractiva na recuperação dos cinco antibióticos estudados por MSA μ E-LD/HPLC-DAD (extracção - 15 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção (30 min) sob tratamento ultrasónico).

A ENR apresentou sinal apenas quando a extracção foi efectuada com o PS-DVB, utilizando o ácido fórmico como solvente de retro-extracção. Neste sentido, procedeu-se a mais estudos com o fim de verificar se ao utilizar o AC comercial o problema residia na

extracção ou retro-extracção deste analito. Estes estudos implicaram a análise por HPLC-DAD de água ultra-pura fortificada com a solução, antes e após o processo de extracção. Com esta análise verificou-se que os micro-dispositivos preparados com AC(Ridel) apresentam boa capacidade de enriquecimento para este composto ($85,2 \pm 7,5 \%$) após 15 h. Assim, constata-se que a interacção analito/AC é forte, tornando-se difícil a subsequente remoção.

Posteriormente, foram testados mais dois ACs – NSAES e NSAESox. A figura 6.36, ilustra as recuperações obtidas para todos os ACs testados, usando MeOH como solvente de retro-extracção.

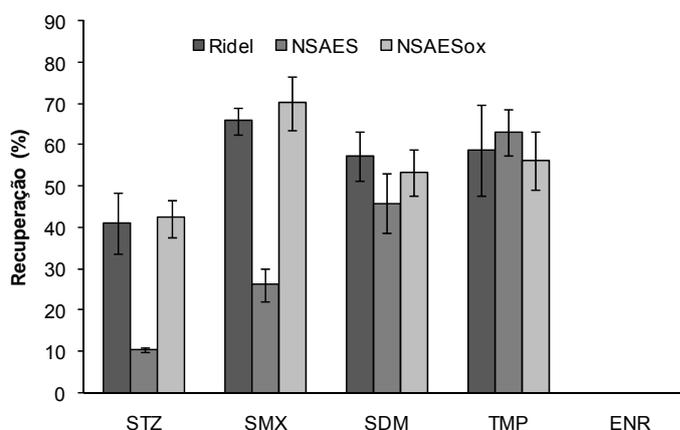


Figura 6.36 – Influência de vários ACs na recuperação dos antibióticos estudados por MSA μ E-LD/HPLC-DAD (extracção - 15 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH (30 min) sob tratamento ultrasónico).

O AC(Ridel) e o AC(NSAESox) originam recuperações muito semelhantes, o que talvez possa ser explicado pelo facto de ambos serem ACs ácidos, enquanto com o AC(NSAES) se obtém menor recuperação para os antibióticos estudados, à excepção do TMP. Uma vez o pH do processo de extracção desempenhar um papel fundamental no processo global, procedeu-se a novos estudos com os ACs para diferentes valores de pH por forma a avaliar a possibilidade de se obterem melhores recuperações. Após os ensaios efectuados, verificou-se que as recuperações óptimas se encontravam na zona do pH neutro, não se conseguindo obter melhores recuperações do que as apresentadas anteriormente.

Face aos dados obtidos, o copolímero PS-DVB permitiu alcançar maiores percentagens de recuperação, prosseguindo-se os estudos de optimização com este material. Para o grupo das sulfonamidas utilizou-se MeOH como solvente de retro-extracção, para o TMP e ENR recorreu-se a ácido fórmico.

Posteriormente, testaram-se diversos tempos para LD sob tratamento ultra-sónico, afim de verificar qual o período necessário para a remoção da maior quantidade de analito da fase extractiva. Por análise da figura 6.37a, verifica-se que para as sulfonamidas se obtêm recuperações máximas após 45 min de retro-extracção, sendo para o TMP necessários 30 min e para a ENR 15 min. Deste modo, seleccionaram-se os tempos de LD de 45 min para as sulfonamidas e de 30 min para TMP e ENR.

Com o objectivo de diminuir a quantidade de solvente usado durante a LD, testaram-se três volumes de solvente, nomeadamente, 0,5, 1,0 e 1,5 mL. Qualquer um destes volumes assegura a completa imersão no solvente dos micro-dispositivos cobertos com PS-DVB. Pode observar-se na figura 6.37b que para as sulfonamidas as diferenças encontradas são desprezáveis, podendo-se usar um volume de 0,5 mL em MeOH. Para o TMP e ENR obtém-se uma maior eficiência utilizando um maior volume em ácido fórmico (1,5 mL).

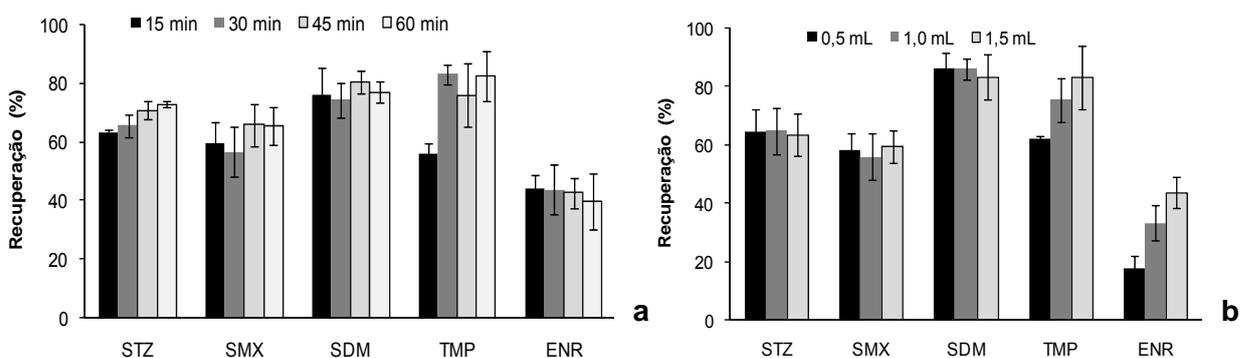


Figura 6.37 – Efeito do tempo de LD (a) e do volume de solvente (b) na recuperação dos antibióticos estudados por MSA μ E (PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH para as sulfonamidas e ácido fórmico para o TMP e ENR, sob tratamento ultrasónico).

Conforme já mencionado anteriormente, durante o passo de evaporação do solvente utilizado para LD sob corrente de azoto podem ocorrer perdas de analito. Desta forma, soluções padrão conjuntas de várias concentrações foram evaporadas sob suave corrente de azoto, sendo os resíduos conseqüentemente redissolvidos numa solução aquosa de ácido fórmico (0,1 %) e injectados no sistema HPLC-DAD. Comparando os dados obtidos com controlos apropriados, verificou-se que se obtinha reconstituições compreendidas entre 96,6 e 103 %, com RSD inferiores a 2,4 %, confirmando assim a não ocorrência de perdas significativas durante o passo de evaporação.

Os efeitos de memória podem igualmente ocorrer devido a uma transferência ineficaz dos analitos da fase extractiva para o solvente de LD, como consequência de um tempo de retro-extracção insuficiente. Por forma a avaliar eventuais efeitos de memória, realizaram-se

segundas retro-extracções, tendo-se verificado que os valores encontrados estavam abaixo dos LODs, pelo que a primeira retro-extracção terá sido completa. Assim, os parâmetros fixados anteriormente terão sido adequados aos antibióticos em estudo.

6.7.3.2 MSA μ E(PS-DVB)

Após a optimização das condições para LD, prosseguiu-se com a optimização dos parâmetros que afectam a extracção, de modo a alcançar o máximo de recuperação no menor tempo analítico.

O material para extrair os analitos deve estar presente em quantidade suficiente para garantir uma extracção completa, sem contudo alcançar a capacidade máxima. Os micro-dispositivos desenvolvidos têm a vantagem de oferecer a possibilidade de se poder seleccionar a quantidade de fase extractiva utilizada durante o processo de extracção. Assim, testaram-se diversas massas de PS-DVB, tendo os resultados obtidos (figura 6.38a) demonstrado que uma massa média de 2,6 mg é suficiente para se alcançar o máximo de recuperação dos analitos alvo, quando ocorrem ao nível de traços.

Como discutido anteriormente, o pH da matriz aquosa pode ter um efeito significativo na recuperação dos analitos, principalmente em compostos ionizáveis, como são o caso dos antibióticos. Por forma a estudar o efeito do pH na matriz aquosa seis níveis de pH foram estudados (2,0, 4,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 10,0), cujos resultados são apresentados na figura 6.38b.

Por análise dos dados obtidos, verifica-se que são alcançadas maiores recuperações para as sulfonamidas quando o pH da matriz aquosa é 7,0. Pelos valores do pKa apresentados na tabela 6.20 e pela geometria molecular das sulfonamidas (figura 6.33), verifica-se que estes compostos estão carregados positivamente sob condições ácidas, devido à protonação do azoto que se encontra ligado ao anel aromático, ficando carregados negativamente sob condições básicas, face à desprotonação do outro azoto. Adicionalmente, grupos ácidos ou básicos muito fracos podem também estar presentes na cadeia R, que varia de sulfonamida para sulfonamida⁵⁵. Assim, o decréscimo da recuperação para pHs mais ácidos ou mais básicos deve-se à presença de espécies iónicas, cuja extracção se torna menos eficiente, uma vez ficarem mais solubilizadas na matriz aquosa.

Para o TMP verifica-se que a pH 2,0 se obtêm menores recuperações, provavelmente devido ao facto de ocorrer a protonação do azoto originando uma espécie carregada positivamente. Para os restantes valores de pH as recuperações aumentaram, sendo ligeiramente superiores a pH 4,0.

A ENR apresenta maiores recuperações quando o pH da matriz é 4,0, sendo obtidos menores valores para pHs mais básicos, o que pode ser explicado pela presença de um grupo ácido carboxílico na sua estrutura. Deste modo e por análise de sulfonamidas sob estudo, seleccionou-se o valor de pH 7,0, enquanto para o TMP e ENR optou-se pelo valor de pH 4,0.

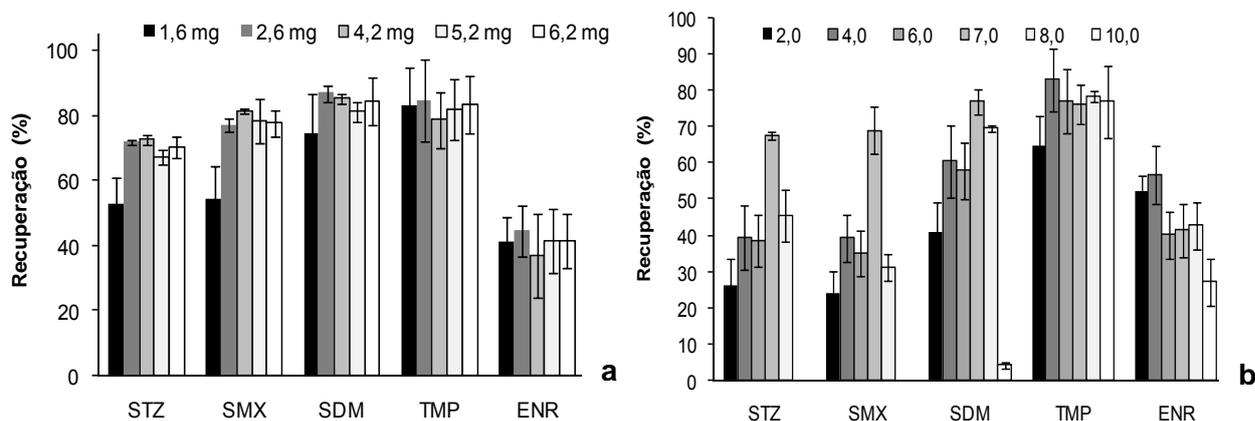


Figura 6.38 – Optimização da quantidade de PS-DVB necessária para a extracção (a) e efeito do pH (b) na recuperação dos antibióticos estudados por MSA μ E(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm); retro-extracção em MeOH (45 min) para as sulfonamidas e ácido fórmico (30 min) para o TMP e ENR, sob tratamento ultrasónico).

Por forma a acelerar o processo de extracção foram testadas diferentes velocidades de agitação (750, 1000 e 1250 rpm) durante 3 h, verificando-se que nenhuma era crítica durante o processo de extracção. Neste sentido, seleccionou-se agitação com 1000 rpm.

O tempo de exposição do PS-DVB aos analitos também é um parâmetro muito importante, uma vez que influencia a partição dos mesmos entre a matriz e a fase extractiva. Neste sentido foram estudados seis períodos de extracção (0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 17,0 h), por forma a determinar qual o que permitia obter uma maior recuperação para os antibióticos estudados. A figura 6.39 ilustra os resultados obtidos, na qual é possível verificar um aumento contínuo na recuperação das sulfonamidas com o aumento do tempo de extracção, enquanto para o TMP e ENR o equilíbrio é alcançado ao fim de 6 h.

Subsequentemente, foram realizados ensaios contendo 5, 10 e 15 % em MeOH (v/v) na matriz aquosa. Na figura 6.40a é possível verificar que na generalidade a adição deste modificador diminui a recuperação dos antibióticos. Assim, ao adicionar-se MeOH à amostra a apetência dos antibióticos para a camada de PS-DVB é reduzida, resultando na diminuição do coeficiente de partição ($K_{PS-DVB/água}$). Neste sentido o uso de MeOH foi preterido em estudos posteriores.

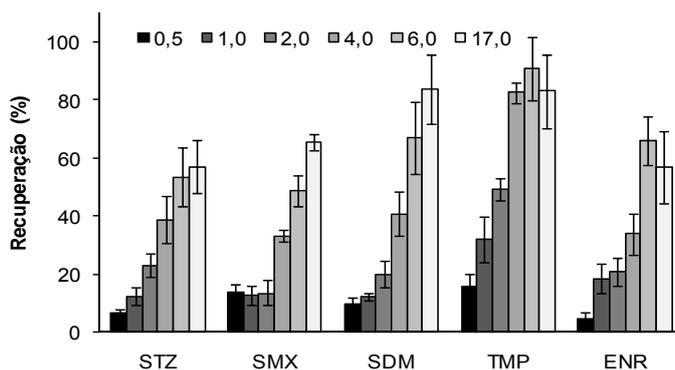


Figura 6.39 – Efeito do tempo de extracção na recuperação dos antibióticos estudados por MSA μ E(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (sulfonamidas: (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH (45 min); TMP e ENR: (1000 rpm, pH 4,0); retro-extracção em ácido fórmico (30 min), 2,6 mg PS-DVB).

No sentido de aumentar a força iónica da matriz aquosa adicionou-se NaCl em diferentes percentagens (5, 10 e 15% (m/v)). Por análise da figura 6.40b, verifica-se que para os antibióticos estudados a presença deste sal em solução diminui a sua recuperação, à excepção da ENR cujas diferenças observadas são consideradas negligenciáveis. Deste modo, optou-se igualmente por não se adicionar electrólito à matriz aquosa.

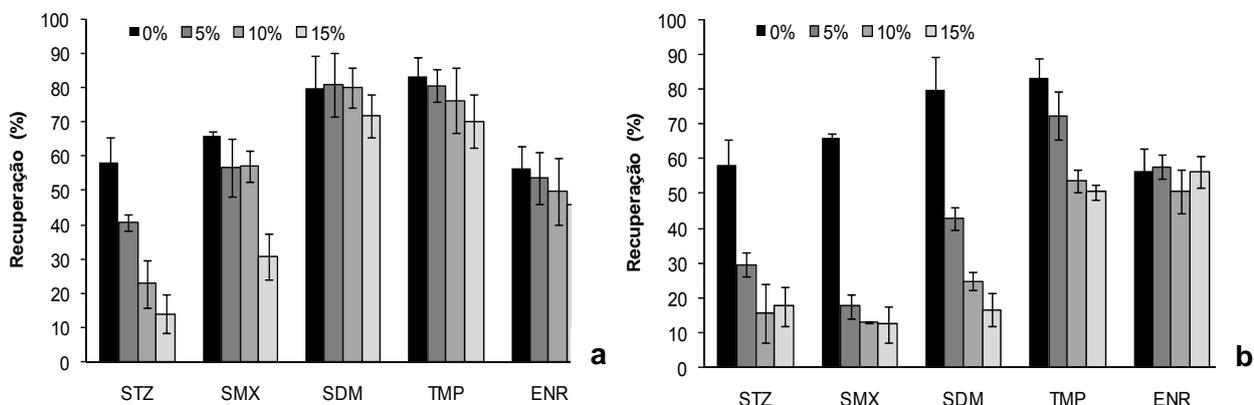


Figura 6.40 – Efeito de MeOH (a) e NaCl (b) na recuperação dos antibióticos estudados por MSA μ E(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (sulfonamidas: extracção – 17,0 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH (45 min); TMP e ENR: extracção – 6,0 h (1000 rpm, pH 4,0); retro-extracção em ácido fórmico (30 min), 2,6 mg PS-DVB).

À semelhança do que aconteceu para os micro-dispositivos preparados com AC, foram efectuados do mesmo modo alguns ensaios com os micro-dispositivos à base de PS-DVB por forma a testar a possibilidade de reutilização, bem como a capacidade de extracção após a exposição a diferentes solventes. Estes ensaios foram realizados para as sulfonamidas em água ultra-pura, para um nível de fortificação de 10 μ g/L sob condições

experimentais optimizadas ((extração: 17 h (1000 rpm, pH 7,0) PS-DVB (2,6 mg); retro-extração: 0,5 mL de MeOH (45 min)).

No sentido de avaliar a possibilidade de reutilização dos micro-dispositivos preparados com PS-DVB, para a extração das sulfonamidas, realizaram-se vários ensaios em água ultra-pura e em triplicado. Na figura 6.41a é possível observar as recuperações obtidas para cada reutilização. A aplicação da ANOVA unifactorial (anexo G5), permitiu verificar que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as recuperações para um nível de confiança de 95 %. No entanto, verificou-se que após quatro reutilizações as esferas cobertas com o PS-DVB começam a quebrar-se, não podendo assim os micro-dispositivos serem novamente usados. Deste modo, conclui-se que os micro-dispositivos preparados com AC são muito mais robustos, permitindo um maior número de reutilizações relativamente aos micro-dispositivos preparados com PS-DVB.

A figura 6.41b traduz os resultados obtidos após a análise de sulfonamidas por MSA μ E(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD, utilizando micro-dispositivos expostos durante 48 horas a solventes básicos, ácidos e orgânicos. O teste das comparações múltiplas (teste de “Tuckey”) indica que não existem diferenças estatisticamente significativas quando se comparam as recuperações obtidas após a exposição dos micro-dispositivos a cada solvente com as obtidas pelos micro-dispositivos não expostos ao solvente durante 48 h. No entanto, por análise da figura 6.41b, verifica-se um ligeiro decréscimo da recuperação para o solvente *n*-hexano e MeOH. Nos testes de avaliação de robustez/estabilidade já se tinha verificado que os micro-dispositivos preparados com PS-DVB apresentavam alguma fragilidade quando expostos ao *n*-hexano, daí a reduzida recuperação obtida. Relativamente ao MeOH, verifica-se que ao efectuar a lavagem dos micro-dispositivos com este solvente não ocorre alteração na recuperação. No entanto, quando expostos durante longos períodos verifica-se uma ligeira diminuição na recuperação dos analitos.

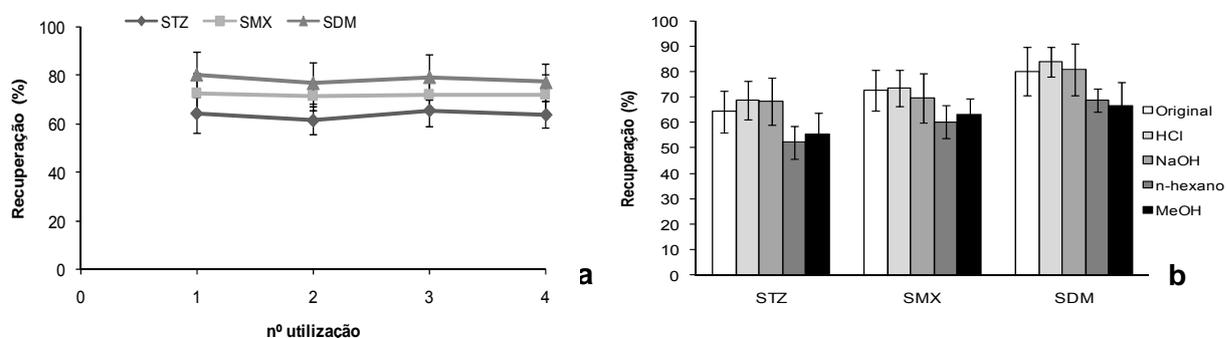


Figura 6.41 – Comparação da recuperação das sulfonamidas obtida após vários ensaios de reutilização do micro-dispositivo (a) antes e após os micro-dispositivos serem imersos em quatro solventes diferentes durante 48h (b).

6.7.4 Validação do método MSA μ E(PS-DVB)-LD/LC-ESI/MS

O processo de validação do método foi efectuado por MSA μ E(PS-DVB)-LD/ LC-ESI/MS, sob condições experimentais optimizadas, tendo-se determinado a gama linear dinâmica, os LODs, os LOQs e a precisão. A ESI/MS foi utilizada com o intuito de melhorar a sensibilidade e selectividade, permitindo uma identificação dos composto em amostras reais ao nível vestigial.

A gama linear dinâmica foi testada com recurso ao método dos mínimos quadrados com análise de resíduos, utilizando cinco níveis de concentração sob as condições experimentais optimizadas. Os resultados obtidos evidenciaram linearidades com coeficientes de correlação (*r*) superiores a 0,9972 (tabela 6.23 e anexo E5), tendo os resíduos apresentado sempre desvios inferiores a 14,3 % (anexo F5). Neste contexto, pode constatar-se que os sinais obtidos pelo método MSA μ E(PS-DVB)-LD/LC-ESI/MS são proporcionais às concentrações dos analitos presentes na matriz aquosa, nas gamas de concentrações estudadas. No sentido da determinação dos LODs e LOQs para cada composto, procedeu-se de forma semelhante à descrita aquando da validação instrumental, tendo-se verificado LODs compreendidos entre 0,02 e 0,12 μ g/L e LOQs entre 0,06 e 0,40 μ g/L (tabela 6.23), de acordo com os valores determinados por outros autores⁵⁷. É de salientar que concentrações máximas permitidas para estes analitos em águas destinadas ao consumo humano ainda não estão estabelecidas pelas organizações regulamentares internacionais, principalmente devido ao incompleto conhecimento dos efeitos toxicológicos e distribuição no ambiente.

Tabela 6.23 – LOD, LOQ, gama linear dinâmica e coeficiente de correlação (*r*) obtidos para os antibióticos estudados por MSA μ E(PS-DVB)-LD/LC-ESI/MS sob condições experimentais optimizadas.

Antibióticos	LOD (μ g/L)	LOQ (μ g/L)	Gama linear dinâmica (μ g/L)	<i>r</i>
STZ	0,12	0,40	0,40-4,0	0,9977
SMX	0,12	0,40	0,40-4,0	0,9991
SDM	0,12	0,40	0,40-4,0	0,9972
TMP	0,02	0,06	0,08-1,6	0,9999
ENR	0,05	0,16	0,16-1,6	0,9993

A precisão do método foi avaliada com recurso a seis ensaios realizados no mesmo dia (repetibilidade) para três níveis de concentração (0,4, 2,2 e 4,0 μ g/L para as sulfonamidas;

0,2, 0,8 e 1,6 µg/L para o TMP e ENR). Na tabela 6.24 é possível consultar quais os RSD (%) obtidos para cada ensaio.

Avaliando a dispersão dos resultados para os três níveis de concentração estudados, verifica-se que existe uma maior dispersão para valores inferiores de concentração, sendo os valores obtidos aceitáveis. Ensaio em branco foram frequentemente efectuados de modo a verificar ausência de contaminações ou efeitos de memória.

Tabela 6.24 – Estudo de precisão do método MSAµE(PS-DVB)-LD/LC-ESI/MS, para três níveis de concentração (n = 6).

Sulfonamidas	Concentração (µg/L)		
	0,4	2,2	4,0
TMP e ENR	0,2	0,80	1,6
STZ	10,5	8,8	7,9
SMX	12,3	10,4	9,8
SDM	11,9	8,9	7,4
TMP	3,7	11,4	6,5
ENR	11,4	8,9	7,9

6.7.5 Aplicação do método a amostras reais

De modo a avaliar a aplicação da nova metodologia desenvolvida a matrizes reais, realizaram-se ensaios a amostras de água superficial e de aquacultura.

Usou-se igualmente o SAM no presente estudo, por modo a minimizar os efeitos de matriz. Neste sentido, as amostras foram analisadas pelo método desenvolvido com cinco níveis de fortificação, bem como o respectivo ensaio em branco (ponto zero) sem fortificação.

A tabela 6.25 resume os resultados obtidos para cada amostra, nomeadamente os coeficientes de correlação (r) e as recuperações obtidas. Por forma a verificar a existência de efeitos matriz, são ainda apresentadas as recuperações obtidas em água ultra-pura. Por análise de amostras sem fortificação constatou-se que a concentração de cada antibiótico estudado era inferior ao LOD da presente metodologia.

Comparando a percentagem de recuperação obtida em água ultra-pura com a obtida nas amostras estudadas verifica-se que ocorre uma diminuição no seu valor, não sendo necessário aplicar a análise ANOVA para confirmar as diferenças observadas. Os efeitos de

matriz são o principal problema encontrado numa análise efectuada por LC-ESI/MS e geralmente ocorrem porque a ionização por ESI é fortemente influenciada por matéria orgânica, sais e outros compostos que não são objectivo de estudo presentes nas matrizes analisadas⁵¹. C. Guignard⁵¹, verificou igualmente elevada supressão de sinal quando procedeu à análise de sulfonamidas em água superficial por SPE/LC-ESI/MS. A ocorrência de efeitos matriz justifica o uso do SAM para a quantificação destes analitos pela nova metodologia desenvolvida, melhorando assim a robustez do método, no sentido da supressão de sinal.

Tabela 6.25 – Coeficientes de correlação (*r*) e % de recuperação obtida para os antibióticos estudados em água superficial e de aquacultura por SAM, por MSA μ E(PS-DVB)-LD/LC-ESI/MS, sob condições experimentais optimizadas.

Antibióticos	<i>r</i>			% Recuperação ^a	
	Superficial	Aquacultura	Ultra-pura	Superficial	Aquacultura
STZ	0,9989	0,9985	64,5 \pm 10,5	42,8 \pm 6,2	29,6 \pm 5,6
SMX	0,9964	0,9987	72,3 \pm 9,8	30,3 \pm 6,9	29,2 \pm 6,5
SDM	0,9988	0,9981	80,6 \pm 8,9	32,9 \pm 5,6	42,8 \pm 4,4
TMP	0,9973	0,9991	78,2 \pm 8,6	39,8 \pm 8,1	34,8 \pm 7,2
ENR	0,9989	0,9984	66,0 \pm 8,4	22,1 \pm 6,9	32,7 \pm 6,1

^a Nível de fortificação de 2,2 μ g/L para as sulfonamidas e 0,80 μ g/L para o TMP e ENR

6.8 Hormonas esteróides sexuais

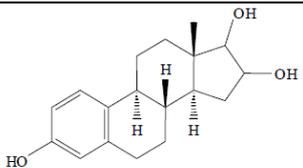
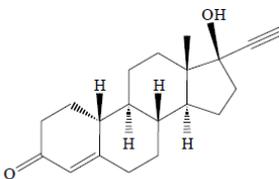
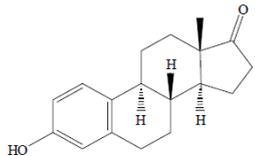
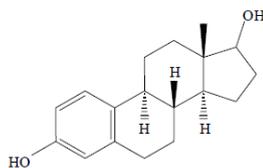
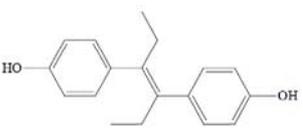
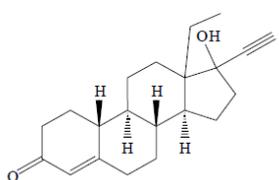
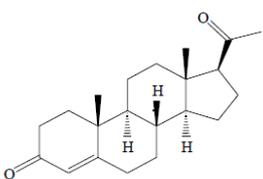
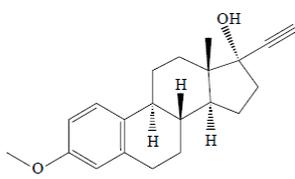
6.8.1 Considerações gerais

As hormonas esteróides sexuais são uma classe de compostos pertencentes aos PPCPs, cujos estudos de toxicidade já confirmaram que actuam como EDCs. Esta classe de compostos é das que tem suscitado maior preocupação por parte da comunidade científica e das entidades oficiais, sendo já possível encontrar na literatura vários métodos analíticos para a respectiva monitorização em diversas matrizes⁵⁸. Esta classe de PPCPs apresenta moderada a elevada hidrofobicidade, possuindo log K_{OW} compreendidos entre 2,5 e 5,0 (tabela 6.26), sendo desta forma ideais como compostos modelos para aferir a capacidade de extracção da nova técnica desenvolvida (MSA μ E) e comparar os resultados obtidos com estudos já efectuados recorrendo às técnicas SBSE(PDMS)⁵⁹ e SBSE(PU)⁶⁰.

A técnica instrumental seleccionada para a análise destes compostos foi a HPLC-DAD, cujas condições experimentais estão descritas no capítulo 5. No anexo B é possível

observar os espectros UV-vis característicos da cada uma das hormonas seleccionadas, sendo este parâmetro uma “ferramenta” analítica adicional no auxílio da respectiva identificação.

Tabela 6.26 – Estrutura química e $\log K_{OW}$ para cada hormona esteróide sexual estudada.

Composto	Estrutura química	$\log K_{OW}$ ^a
E3		2,45
19-NOR		2,97
E1		3,13
17β-E2		4,01
DES		5,07
NORG		3,48
PROG		3,87
MES		4,68

^aValores de $\log K_{OW}$ obtidos de [32]

6.8.2 Optimização da MSA μ E(PS-DVB)-LD

Durante a optimização do processo de MSA μ E todos os ensaios foram realizados em triplicado, para um nível de fortificação igual a 10 μ g/L.

6.8.2.1 Dessorção líquida (LD)

Em ensaios iniciais começou por se seleccionar o solvente adequado à retro-extracção dos analitos da fase extractiva, tendo-se para tal efectuado ensaios utilizando AC(Ridel) e PS-DVB e testado dois solventes - MeOH e ácido fórmico. Analisando os resultados obtidos (figura 6.42) verifica-se que o MeOH é o solvente mais adequado para a remoção das hormonas esteróides de ambos os materiais sólidos.

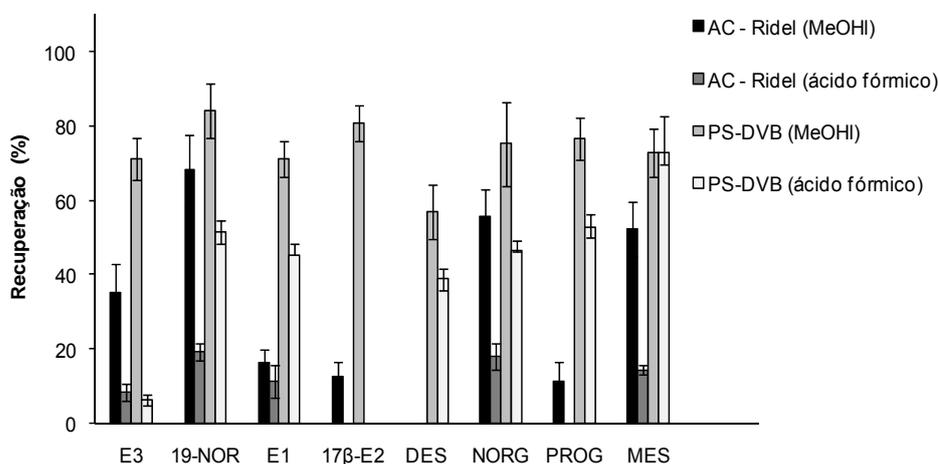


Figura 6.42 – Efeito do solvente e do material de extracção na recuperação das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção (30 min) sob tratamento ultrasónico).

Após a selecção do solvente mais adequado para a remoção dos analitos, foram testados outros dois ACs – NSAES e NSAESox. Os resultados da comparação das recuperações obtidas por cada fase extractiva testada encontram-se apresentados na figura 6.43. Por análise do gráfico, o PS-DVB permite alcançar uma maior recuperação para as hormonas esteróides estudadas, sendo a diferença observada bastante significativa para a E3, E1, 17 β -E2, DES e PROG. Em relação ao NORG verifica-se que os valores obtidos para o NSAES, NSAESox e PS-DVB são muito semelhantes. Por análise de água ultra-pura fortificada com solução conjunta de hormonas esteróides, antes e após o processo de extracção, constatou-se que o DES é extraído por todos os materiais. Contudo, analisando o

gráfico da figura 6.43 verifica-se que a correspondente retro-extracção apenas é verificada na fase PS-DVB.

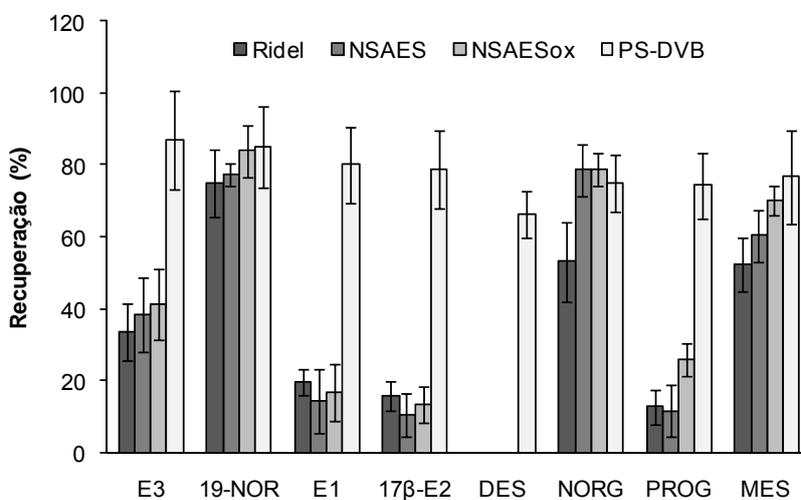


Figura 6.43 – Efeito da fase extractiva na recuperação das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH (30 min) sob tratamento ultrasónico).

Uma vez o pH do processo de extracção desempenhar um papel importante no processo global, continuaram-se a fazer estudos com o AC para diferentes valores de pH por forma a avaliar a possibilidade em se obterem melhores recuperações para este tipo de adsorvente. No entanto, verificou-se que a alteração do pH da matriz aquosa não influenciava a recuperação dos analitos. Deste modo seleccionou-se o PS-DVB como fase extractiva para estudos posteriores.

Posteriormente, testaram-se diversos períodos para LD sob tratamento ultra-sónico, afim de verificar qual o tempo necessário para a remoção da maior quantidade de analito retido no PS-DVB. Por análise da figura 6.44a, verifica-se que 15 min são suficientes. Esta informação foi reforçada pela realização de uma segunda retro-extracção, dado que não se obteve sinal para a solução injectada após este ensaio.

Com o objectivo de diminuir a quantidade de solvente usado durante a LD, testaram-se três volumes de solvente (0,5, 1,0 e 1,5 mL), assegurando qualquer um destes volumes a completa imersão no solvente dos micro-dispositivos revestidos com PS-DVB. Conforme pode ser observado na figura 6.44b, as diferenças encontradas não são significativas, podendo-se usar um volume de 0,5 mL em MeOH.

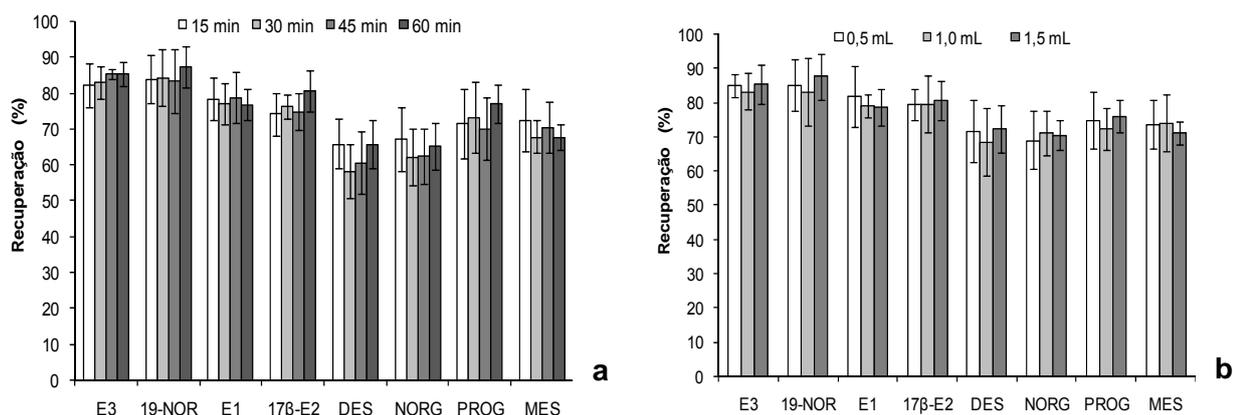


Figura 6.44 – Efeito do tempo de LD (a) e do volume de solvente (b) na recuperação das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E (PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extração - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extração em MeOH, sob tratamento ultrasónico).

A possibilidade de perdas de analito durante o passo de evaporação do solvente e subsequente redissolução no solvente adequado à análise cromatográfica foi igualmente testada. Neste sentido, soluções padrão conjuntas foram evaporadas sob suave corrente de azoto tendo os resíduos sido posteriormente redissolvidos em MeOH com 0,1 % de ácido fórmico e injectados no sistema HPLC-DAD. Comparando os dados obtidos com controlos apropriados, verificou-se que se obtinha uma reconstituição compreendida entre 95,6 e 101 %, com RSD inferior a 2,7 %, confirmando assim a não ocorrência de perdas significativas durante o passo de evaporação

6.8.2.2 MSA μ E(PS-DVB)

Após a optimização das melhores condições para LD, prosseguiu-se com a optimização dos parâmetros que afectam a extração, de modo a alcançar o máximo de recuperação no menor tempo analítico.

O material para extrair os analitos deve estar presente em quantidade suficiente para garantir maior capacidade de extração, sem saturar. Neste sentido, testaram-se diversas quantidades de PS-DVB, verificando-se uma massa média de 2,6 mg ser suficiente para se alcançar o máximo de recuperação das hormonas estudadas, quando ocorrem ao nível de traços (figura 6.45).

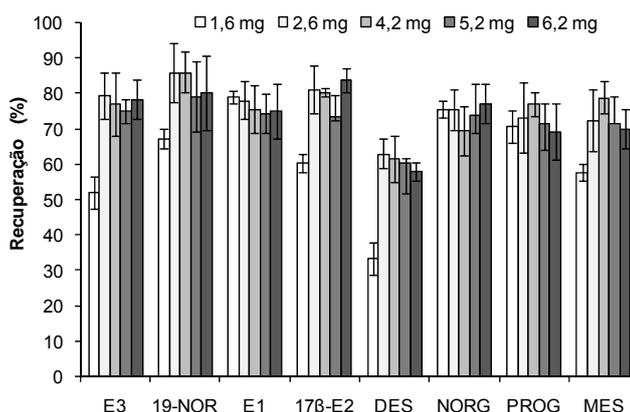


Figura 6.45 – Optimização da quantidade de PS-DVB necessária para a extracção das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E (PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, pH 7,0); retro-extracção em MeOH (15 min), sob tratamento ultrasónico).

Por forma a estudar o efeito do pH na matriz aquosa, cinco níveis de pH foram testados (2,0; 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0), cujos resultados são apresentados na figura 6.46.

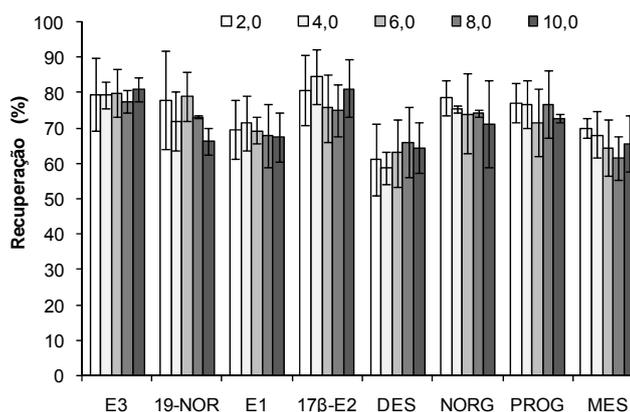


Figura 6.46 – Efeito do pH na recuperação das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção - 17 h (1000 rpm, 2,6 mg PS-DVB); retro-extracção em MeOH (15 min), sob tratamento ultrasónico).

Por análise dos resultados obtidos, verifica-se que o pH da matriz aquosa não produz alterações significativas na recuperação das hormonas esteróides, o que pode ser explicado pelo facto da ionização ocorrer para pHs geralmente superiores a 10,0 e somente em algumas hormonas.

No sentido de acelerar o processo de extracção foram testadas diferentes velocidades de agitação (750, 1000 e 1250 rpm) durante 3 h, verificando-se que os valores testados não influenciavam a recuperação. Como consequência, optou-se por utilizar uma velocidade de 1000 rpm.

O estudo do tempo de extracção foi igualmente analisado, uma vez que permite determinar o tempo de equilíbrio necessário para que cada uma das hormonas seja extraída até serem obtidas recuperações constantes. Neste estudo foram testados seis tempos de extracção (0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 17,0 h) por forma a determinar qual o que permitia obter uma maior recuperação para as hormonas esteróides estudadas. A figura 6.47 ilustra os resultados obtidos, na qual é possível verificar que o equilíbrio é alcançado após 6 h de extracção.

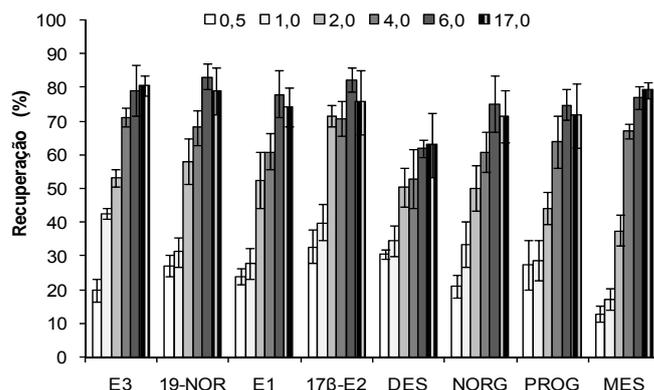


Figura 6.47 – Efeito do tempo de extracção na recuperação das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E (PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção - 1000 rpm, 2,6 mg PS-DVB, pH 7,0; retro-extracção em MeOH (15 min), sob tratamento ultrasónico).

Seguidamente, foram ainda realizados ensaios por modificação da matriz com 5, 10 e 15 % de MeOH (v/v). Na figura 6.48a é possível verificar que na generalidade a adição de MeOH diminui a recuperação das hormonas. Assim, ao adicionar-se este modificador à matriz aquosa a apetência das hormonas esteróides para a camada de PS-DVB é reduzida, resultando numa diminuição do coeficiente de partição, $K_{PS-DVB/W}$. Neste sentido o uso de MeOH foi preterido em estudos posteriores.

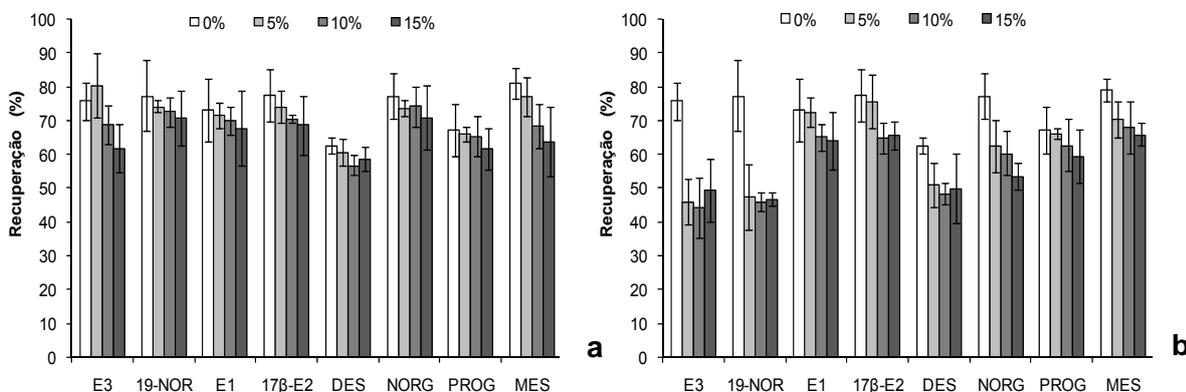


Figura 6.48 – Efeito do modificador orgânico (a) e força iónica (b) na recuperação das hormonas esteróides estudadas por MSA μ E(PS-DVB)-LD/HPLC-DAD (extracção – 17 h (1000 rpm, pH 7,0, 2,6 mg PS-DVB); retro-extracção em MeOH (15 min), sob tratamento ultrasónico).

No sentido de aumentar a força iónica da matriz aquosa utilizou-se NaCl em diferentes percentagens (5, 10 e 15 % (m/v)). Observando a figura 6.48b verifica-se que para as hormonas estudadas a presença na solução deste sal diminui a recuperação, tendo-se igualmente preterido o seu uso.

6.8.3 Comparação das técnicas SBSE(PDMS), SBSE(PU) e MSA μ E(PS-DVB)

Após a optimização do processo por MSA μ E(PS-DVB), pretendeu-se seguidamente comparar as condições experimentais, bem como as recuperações com recurso a outras metodologias desenvolvidas, nomeadamente SBSE(PDMS) e SBSE(PU). A tabela 6.27 apresenta as condições experimentais óptimas para cada técnica de preparação de amostra e a figura 6.49 representa graficamente as recuperações obtidas.

Tabela 6.27 – Comparação das condições experimentais obtidas para as técnicas SBSE(PDMS), SBSE(PU) e MSA μ E(PS-DVB), na análise de hormonas esteróides sexuais.

Condições		SBSE(PDMS) ⁵⁹	SBSE(PU) ⁶⁰	MSA μ E(PS-DVB)
Extracção	Tempo de extracção (h)	2	2	6
	Velocidade de agitação		Não é relevante	
	pH		Não é relevante	
	MeOH (%)	---	---	---
	NaCl (%)	20	5	---
Solvente		ACN	MeOH	MeOH
Retro-extracção	Tempo (min)	15	45	15
	Volume solvente (mL)	1,5	3,0	0,5

A análise das condições experimentais óptimas obtidas para cada técnica, permite concluir que a velocidade de agitação e o pH não são parâmetros experimentais relevantes para a recuperação dos analitos alvo. Em relação ao tempo de extracção verifica-se que a técnica MSA μ E(PS-DVB) requer mais tempo para atingir o equilíbrio permitindo, no entanto, maior percentagem de recuperação para as hormonas esteróides, à excepção do DES e MES. Considerando o tempo de extracção requerido pelo PDMS e pelo PU (2 h) é possível verificar por análise do gráfico da figura 6.47 que a recuperação alcançada pelo PS-DVB após este mesmo período é semelhante ou superior à alcançada por aquelas fases poliméricas.

Em todas as técnicas testadas verifica-se que a adição de MeOH à matriz aquosa representa um efeito negativo para a recuperação dos analitos. A adição de NaCl apenas aumenta a recuperação dos analitos quando se utilizam as técnicas SBSE(PDMS) e SBSE(PU).

A MSA μ E(PS-DVB) utiliza menor volume de solvente orgânico para a retro-extracção dos analitos, sendo uma grande vantagem quer em termos ambientais, quer no tempo dispendido relativamente ao passo de evaporação. O facto de a SBSE(PU) utilizar 3,0 mL de MeOH e necessitar de 45 min de retro-extracção, implica um aumento significativo do tempo de análise.

Uma vez mais, verifica-se que a SBSE(PDMS) é uma técnica adequada somente para a extracção dos analitos mais apolares, embora limitada para os polares ou mediantemente polares, verificando-se que apresenta elevada recuperação para o MES, não apresentando qualquer afinidade para o E3. Neste sentido, as novas técnicas de enriquecimento propostas parecem dar boa resposta para esta limitação analítica, embora a MSA μ E(PS-DVB) evidencie maior propensão para a micro-extracção deste tipo de compostos.

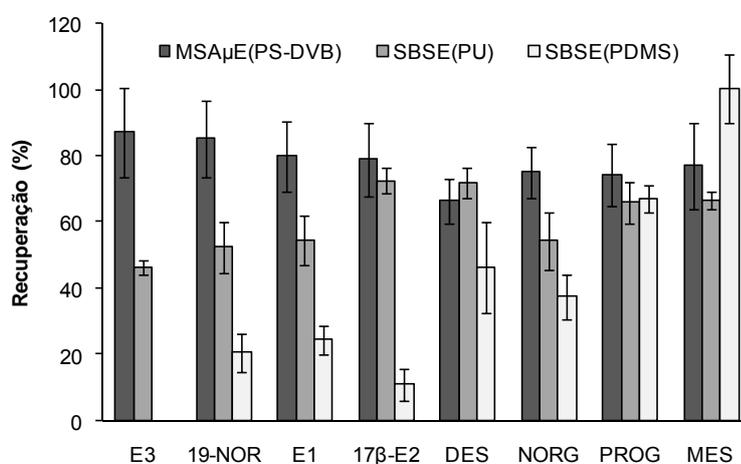


Figura 6.49 – Recuperações experimentais obtidas para cada hormona esteróide estudada pelas técnicas SBSE(PDMS), SBSE(PU) e MSA μ E(PS-DVB), sob condições experimentais apresentadas na tabela 6.27.

6.9 Bibliografia

- [1] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, “Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions”, *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 2642.
- [2] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, “Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Sample: theory and principles”, *J. Microcolumn. Sep.* **11** (1999) 737.
- [3] F. David, P. Sandra, “Stir Bar Sorptive Extraction for Trace Analysis”, *J. Chromatogr. A* **1152** (2007) 54.
- [4] P. Serôdio, J.M.F. Nogueira, “Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography–mass spectrometry detection”, *Anal. Chim. Acta* **517** (2004) 21.
- [5] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, “Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 1303.
- [6] K. Bester, “Analysis of musk fragrances in environmental samples”, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 470.
- [7] W. Shek, M. Murphy, J. Lam, P. Lam, “Synthetic polycyclic musks in Hong Kong sewage sludge”, *Chemosphere* **71** (2008) 1241.
- [8] Y. Horii, J.Reiner, B. Loganathan, K. Kumar, K. Sajwan, K. Kannan, “Occurrence and fate of polycyclic musks in wastewater treatment plants in Kentucky and Georgia, USA”, *Chemosphere* **68** (2007) 2011.
- [9] L. Duedahl-Olesen, T. Cederberg, K. Pedersen, Arne Højgård, “Synthetic musk fragrances in trout from Danish fish farms and human milk”, *Chemosphere* **61** (2005) 422.
- [10] A. Peck, K. Hornbuckle, “Synthetic musk fragrances in lake Michigan”, *Environ Sci Technol* **38** (2004) 367.
- [11] M. Llompарт, C. Garcia-Jares, C. Salgado, M. Polo, R. Cela, “ Determination of musk compounds in sewage treatment plant sludge samples by solid-phase microextraction”, *J. Chromatogr. A* **999** (2003) 185.
- [12] X. Zeng, G. Sheng, Y. Xiong, J. Fu, “Determination of polycyclic musks in sewage sludge from Guangdong, China using GC-EI-MS”, *Chemosphere* **60** (2005) 817.

- [13] A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, “Stir bar sorptive extraction and liquid desorption combined with large volume injection - gas chromatography – mass spectrometry for ultra-trace analyses of musk compounds in environmental samples”, *Anal. Bioanal. Chem.*, **396** (2010) 1853.
- [14] P. Serôdio, J.M.F. Nogueira, “Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water”, *Water Res.* **40** (2006) 2572.
- [15] P. Serôdio, M. Salomé Cabral, J.M.F. Nogueira, “Use of experimental design in the optimization of stir bar sorptive extraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers in environmental matrices”, *J. Chromatogr. A* **1141** (2007) 259.
- [16] E. Coelho, R. Perestrelo, N R. Neng, J.S. Câmara, M.A. Coimbra, J.M.F. Nogueira, S.M. Rocha, “Optimisation of stir bar sorptive extraction and liquid desorption combined with large volume injection-gas chromatography–quadrupole mass spectrometry for the determination of volatile compounds in wines”, *Anal Chim Acta* **624** (2008) 79.
- [17] C. García-Jares, M. Llompart, M. Polo, C. Salgado, S. Macías, R. Cela “Optimisation of a solid-phase microextraction method for synthetic musk compounds in water”, *J. Chromatogr. A* **963** (2002) 277.
- [18] European Commission, Council Directive 98/83/EC, *Off J Eur Commun* **L330** (1998) 32.
- [19] J. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada Rodríguez, “Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction–liquid desorption–gas chromatography–mass spectrometry”, *J Chromatogr A* **1174** (2007) 27.
- [20] X. Zeng, G. Sheng, H. Gui, D. Chen, W. Shao, J. Fu, “Preliminary study on the occurrence and distribution of polycyclic musks in a wastewater treatment plant in Guandong, China”, *Chemosphere* **69** (2007) 1305.
- [21] X. Zhang, Y. Yao, X. Zeng, G. Qian, Y. Guo, M. Wu, G. Sheng, J. Fu, “Synthetic musks in the aquatic environment and personal care products in Shanghai, China”, *Chemosphere* **72** (2008) 1553.
- [22] L. Roosens, A. Covaci, H. Neels, “Concentrations of synthetic musk compounds in personal care and sanitation products and human exposure profiles through dermal application”, *Chemosphere* **69** (2007) 1540.
- [23] H. Ishibashi, N. Matsumura, M. Hirano, M. Matsuoka, H. Shiratsuchi, Y. Ishibashi, Y. Takao, K. Arizono, “Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin”, *Aquatic Toxicology* **67** (2004) 167.

- [24] A.D. Russell, "Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria", *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement* **92** (2002) 121S.
- [25] N. Lozano, C. Rice, M. Ramirez, A. Torrents, "Fate of triclosan in agricultural soils after biosolid applications", *Chemosphere*, **78** (2010) 760.
- [26] A. Piccoli, J. Fiori, V. Andrisano, M. Orioli, "Determination of triclosan in personal health care products by liquid chromatography (HPLC)", *Il Farmaco* **57** (2002) 369.
- [27] M. Allmyr, M. Adolfsson-Erici, M. McLachlan and G. Sandborgh-Englund, "Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products", *Sci. Tot. Environ.* **372** (2006) 87.
- [28] A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, "New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices", *Talanta*, **74** (2008) 1498.
- [29] D.M. Bagley and Y.J. Lin, "Clinical evidence for the lack of triclosan accumulation from daily use in dentifrices", *Am J Dent* **13** (2000) 148.
- [30] M. Farré, M. Petrovic, M. Gros, T. Kosjek, E. Martinez, E. Heath, P. Osvald, R. Loos, K. Le Menach, H. Budzinski, F. De Alencastro, J. Müller, T. Knepper, G. Fink, T.A. Ternes, E. Zuccato, P. Kormali, O. Gans, R. Rodil, J.B. Quintana, F. Pastori, A. Gentili, D. Barceló, "First interlaboratory exercise on non-steroidal anti-inflammatory drugs analysis in environmental samples", *Talanta* **76** (2008) 580.
- [31] E. Heath, T. Kosjek, M. Farre, J.B. Quintana, L.F. de Alencastro, S. Castiglioni, O. Gans, K. Langford, R. Loos, J. Radjenović, L. Mainero Rocca, H. Budzinski, D. Tsiipi, M. Petrovic, D. Barcelo, "Second interlaboratory exercise on non-steroidal anti-inflammatory drug analysis in environmental aqueous samples", *Talanta* **81** (2010) 1189.
- [32] <http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm> (consultado em 8 de Abril de 2010).
- [33] F.C.M. Portugal, M.L. Pinto, J.M.F. Nogueira, "Optimization of polyurethane foams for enhanced stir bar sorptive extraction of triazinic herbicides in water matrices", *Talanta* **77** (2008) 765.
- [34] A. Aresta, F. Palmisano, C.G. Zambonin, "Determination of naproxen in human urine by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography", *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39** (2005) 643.

- [35] J.B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahía, D. Prada-Rodríguez, “Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction–liquid desorption–gas chromatography–mass spectrometry” *J. Chromatogr. A* **1174** (2007) 27.
- [36] A.R.M.Silva, Fátima C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, “Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water matrices: comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases”, *J. of Chromatogr. A*, 1209 (2008) 10.
- [37] J.B. Quintana, R. Rodil, T. Reemtsma, “Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects”, *J. Chromatogr. A* **1061** (2004) 19.
- [38] N. Lindqvist, T. Tuhkanen, L. Kronberg, “Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters”, *Water Res.* **39** (2005) 2219.
- [39] L. H.M.L.M. Santos, A.N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro, “Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment”, *J. Hazard. Mater.* **175** (2010) 45.
- [40] A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, INPI, Portugal, PPP20091000114179 (2009).
- [41] N.R. Neng, A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, “Adsorptive micro-extraction (A μ E) techniques: Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media”, *J. of Chromatogr. A*, 1217 (2010) 7303.
- [42] A.S. Mestre, “Carvões activados a partir da cortiça – avaliação das potencialidades para o tratamento e análise de águas contaminadas”, Tese de Doutoramento em Química Tecnológica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (2009).
- [43] V.M. Gun’ko, V.V. Turov, V.I. Zarko, Y.M. Nychiporuk, E.V. Goncharuk, E.M Pakhlov, G.R. Yurchenko, T.V. Kulik, B.B. Palyanytsya, T.V. Borodavka, T.V. Krupskaya, R. Leboda, J. Skubiszewska-Zięba, V.D. Osovskii, Y.G. Ptushinskii, A.V. Turov, “Structural features of polymer adsorbent LiChrolut EN and interfacial behavior of water and water/organic mixtures”, *J. Colloid Interface Sci.* **323** (2008) 6.
- [44] F. David, B. Tienpont, P. Sandra, “Stir Bar Sorptive Extraction of Trace Organic Compounds from Aqueous Matrices”, *LC-GC Europe* **16**, 410 (2003).
- [45] A. Togola, H. Budzinski, “Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples”, *J. Chromatogr. A* **1177** (2008) 150.

- [46] N. Kemper, "Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment", *Ecological indicators* **8**, (2008) 1.
- [47] M. Haller, S. Müller, C. Mc Ardell, A. Alder, M. Suter, "Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography–mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* **952** (2002) 111.
- [48] M. García-Galán, M. Díaz-Cruz, Damià Barceló, "Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics", *Trends Anal. Chem* **27** (2008) 1008.
- [49] A. Watkinson, E. Murby, D. Kolpin, S. Costanzo, "The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water", *Sci. Tot. Environ.* **407** (2009) 2711.
- [50] J. Martinez, "Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants", *Environ. Pollut.* **157** (2009) 2893.
- [51] J. Pailler, A. Krein, L. Pfister, L. Hoffmann, C. Guignard, "Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg", *Sci. Tot. Environ.* **407** (2009) 4736.
- [52] E. McClure, C. Wong, "Solid phase microextraction of macrolide, trimethoprim, and sulfonamide antibiotics in wastewaters", *J. Chromatogr. A* **1169** (2007) 53.
- [53] J. Riviere, M. Papich, "Veterinary Pharmacology and Therapeutics", Wiley, 9th Ed. (2009).
- [54] M. Díaz-Cruz, M. García-Galán, Damià Barceló, "Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography–quadrupole linear ion trap–mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* **1193** (2008) 50.
- [55] A. Białk-Bielińska, J. Kumirska, R. Palavinskas, P. Stepnowski, "Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC–MS/MS", *Talanta* **80** (2009) 947.
- [56] O. Pozo, C. Guerrero, J. Sancho, M. Ibáñez, E. Pitarch, E. Hogendoorn, Félix Hernández, "Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* **1103** (2006) 83.

[57] A. Batt and D. Aga, “Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination”, *Anal. Chem.* **77** (2005) 2940.

[58] V. Gabet, C. Miége, P. Bados, M. Coquery, “Analysis of estrogens in environmental matrices”, *Trends Anal. Chem* **26** (2007) 1113.

[59] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, “Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 1303.

[60] F.C.M. Portugal, “Desenvolvimento, optimização e aplicação de novas fases poliméricas (poliuretanos) para extracção sortiva em barra de agitação (SBSE)”, Tese de Doutoramento em Química Analítica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (2010).

Capítulo 7

Conclusões e Perspectivas Futuras

7.1 Conclusões

O presente trabalho propõe novas metodologias analíticas para monitorização vestigial de PPCPs em matrizes reais. Neste contexto, desenvolveram-se, validaram-se e aplicaram-se técnicas emergentes de preparação de amostras, como é o caso da SBSE, que requerem menor quantidade de solventes orgânicos e de amostra, prévias à análise cromatográfica.

Numa primeira abordagem, as técnicas cromatográficas (GC e LC) usadas demonstraram ser eficazes e versáteis na monitorização de um alargado grupo de PPCPs, tendo a hifenação a MS incrementado a sensibilidade e selectividade das novas metodologias analíticas. No que respeita ao desenvolvimento analítico, efectuaram-se estudos sistemáticos prévios de optimização de diversos parâmetros que poderiam influenciar a eficiência do processo. Entre os parâmetros avaliados, destacam-se o tempo de extracção, a velocidade de agitação, o pH, a força iónica e a polaridade da matriz, assim como o tipo de solventes e condições para LD.

Os estudos iniciais incidiram nos PPCPs com características mais apolares, tendo sido desenvolvidas com sucesso novas metodologias utilizando a SBSE com PDMS, nomeadamente SBSE(PDMS)-LD/LVI-GC-MS(SIM) para a análise de “musks” (ADBI, HHCB, AHTN e MK) e SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD) para anti-sépticos (TCS), demonstrando excelente selectividade e sensibilidade para os analitos alvo.

Por outro lado, devido ao facto da técnica de SBSE(PDMS) ser ineficaz para compostos mais polares, a extracção de PPCPs com aquela fase polimérica, tornou-se limitada. Neste sentido, o desenvolvimento de novas metodologias para micro-extracção, oferecendo as mesmas vantagens que a SBSE(PDMS), mas que permitisse a análise de compostos alvo com polaridade mais abrangente, como são o caso dos NSAIDs, reguladores lipídicos, antibióticos e hormonas esteróides sexuais, seria a opção mais razoável.

Numa primeira fase, utilizou-se a SBSE com fase polimérica à base de poliuretanos (PU). Para análise de NSAIDs (ACA, NAP, DIC, IBU e MEF) e reguladores lipídicos (GEM), foram testadas as técnicas SBSE(PDMS) e SBSE(PU), tendo a técnica SBSE(PU) evidenciado maior capacidade extractiva, à excepção do composto mais apolar (MEF). A metodologia foi optimizada para ambas as fases, obtendo-se assim dois métodos para a monitorização destes analitos, nomeadamente, SBSE(PU)-LD/HPLC-DAD e SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, ao qual o primeiro permitiu alcançar menores LODs, devido à maior eficiência de recuperação.

Por aplicação de SBSE(PU) e SBSE(PDMS) para análise vestigial de CAF, ACF e antibióticos (STZ, SMX, SDM, TMP e ENR) não se obteve o sucesso pretendido, tendo por isso sido necessário proceder ao desenvolvimento de uma metodologia inovadora, MSA μ E. Esta nova técnica requer a utilização de micro-dispositivos constituídos por geometria esférica revestida externamente com adsorventes, tendo sido testados diversos tipos de ACs e PS-DVB.

A técnica de enriquecimento proposta demonstrou ser económica, robusta, reutilizável, fácil de preparar e de manusear, possibilitando a selecção da fase extractiva mais adequada para cada tipo de aplicação. A robustez/estabilidade dos micro-dispositivos nos solventes testados, assim como o número de reutilizações variou com o tipo de fase extractiva seleccionada, tendo-se concluído que os preparados com ACs são os mais robustos e permitem maior número de reutilizações.

A técnica de MSA μ E permitiu ainda alcançar maior eficiência para a extracção de compostos polares relativamente às técnicas de SBSE(PDMS) e SBSE(PU), revelando ser ainda uma excelente ferramenta analítica para monitorização vestigial de PPCPs em matrizes aquosas. Neste sentido, optimizou-se o método MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD para a análise de ACF e CAF e MSA μ E(PS-DVB)-LD/LC-ESI/MS para análise de antibióticos. Para o primeiro caso em particular, o processo de extracção foi ainda testado pela técnica de BA μ E, tendo os resultados obtidos sido concordantes com os alcançados por MSA μ E, evidenciando a robustez para ambas as técnicas independentemente da geometria dos micro-dispositivos e do tipo de fixação dos adsorventes.

Reunidas as condições de optimização para cada metodologia, procedeu-se à fase de validação, tendo-se para tal estudado a gama linear dinâmica, LODs, LOQs e precisão. Os dados obtidos revelaram excelentes linearidades, limiares analíticos ao nível de traços/ultra-traços e valores de precisão inferiores aos exigidos pela directiva 98/83/EC. Estudos efectuados em matrizes reais, nomeadamente, águas residuais, de mar, superficial, de abastecimento, assim como matrizes biológicas (saliva) e produtos de higiene pessoal (pasta de dentes), permitiram alcançar elevada selectividade e sensibilidade com ausência de efeitos de matriz com recurso ao método da adição padrão (SAM).

Por último, utilizaram-se as hormonas esteróides sexuais (E3, 19-NOR, E1, 17 β -E2, DES, NORG, PROG e MES) como compostos modelos para aferir a capacidade de extracção da MSA μ E, tendo-se comparado os resultados obtidos com métodos propostos, nomeadamente, SBSE(PDMS) e SBSE(PU). Dos dados obtidos, verificou-se uma vez mais, que a técnica desenvolvida demonstrou ser mais adequada para a análise vestigial destes compostos alvos. O PU demonstrou maior eficiência de extracção relativamente ao PDMS, à

excepção do composto mais apolar (MES). Neste sentido, as novas abordagens para preparação de amostra desenvolvidas parecem dar boa resposta às limitações observadas noutras metodologias de sorção indicadas para extracção vestigial de analitos polares. Como nota final, as metodologias aqui desenvolvidas provaram ser alternativas fidedignas, tendo os objectivos propostos sido claramente alcançados.

7.2 Perspectivas futuras

A disponibilidade de uma nova técnica para enriquecimento vestigial (MSA μ E) é, neste contexto, uma mais-valia podendo os primeiros beneficiários ser os laboratórios analíticos e, por último, a qualidade de vida da sociedade em geral. Dado tratar-se de uma técnica muito versátil, com enormes potencialidades, irá seguramente permitir o desenvolvimento de novos métodos alargando a sua utilização para um maior número de aplicações não só para outras classes de PPCPs, assim como para outros compostos considerados prioritários.

Refira-se que a técnica proposta pode ainda ser preparada e otimizada com outros materiais adsorventes, havendo a possibilidade de modificação de propriedades químicas dos ACs, tornando-os mais versáteis para micro-extracção. Neste sentido, podem perspectivar-se outras aplicações baseadas nesta metodologia inovadora para monitorização das mais variadas classes de compostos. Poderá ainda ser testada a utilização de diferentes fases extractivas no mesmo micro-dispositivo de MSA μ E, o que poderá possibilitar a extracção simultânea de compostos de diferentes classes e/ou polaridades.

Relativamente aos PUs, estas fases poderão ainda ser modificadas, inserindo na matriz polimérica diferentes grupos funcionais ou simplesmente fixando materiais adsorventes, de forma a aumentar a capacidade extractiva para analitos mais polares de difícil recuperação. A aplicação dos PUs nos métodos de preparação das amostras prévias à análise cromatográfica irá sem dúvida progredir nos desenvolvimentos das tecnologias de extracção sortiva, fundamentalmente em análise multiresíduo de níveis vestigiais de várias classes de compostos em diversos tipos de matrizes.

Seria ainda importante desenvolver novos métodos analíticos para a monitorização de metabolitos dos PPCPs, que por vezes apresentam maior toxicidade que as moléculas originais e, estender ainda, os estudos a matrizes sólidas.

Dado que em Portugal a monitorização relativa à presença de PPCPs no ambiente ainda ser escassa, seria interessante desenvolver programas para avaliação da presença destes compostos em áreas consideradas prioritárias.

Anexos

Anexo A – Espectros de Massa

A1 – “Musks”

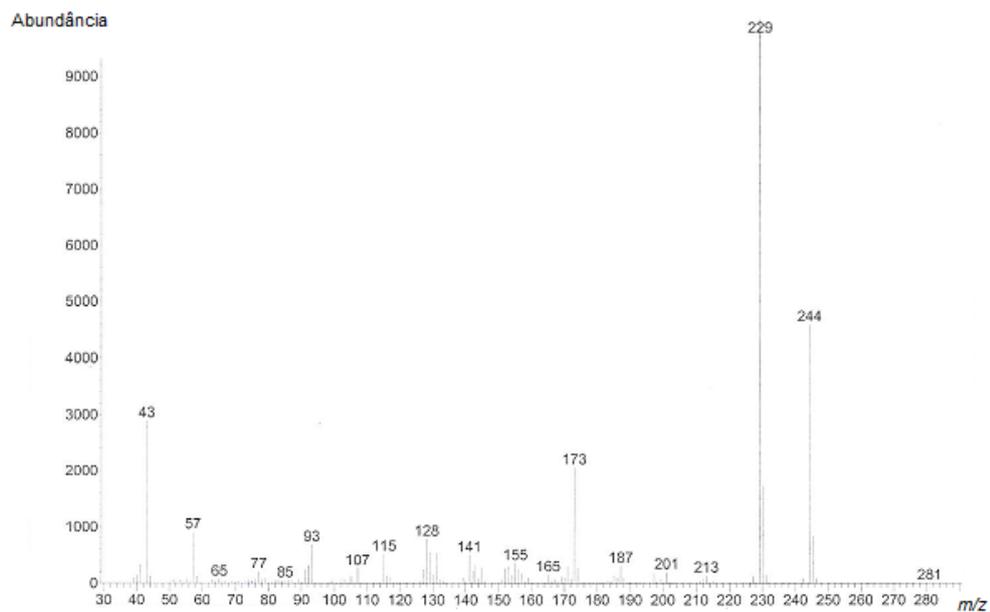


Figura A.1 – Espectro de massa obtido em modo de varrimento contínuo para o ADBI.

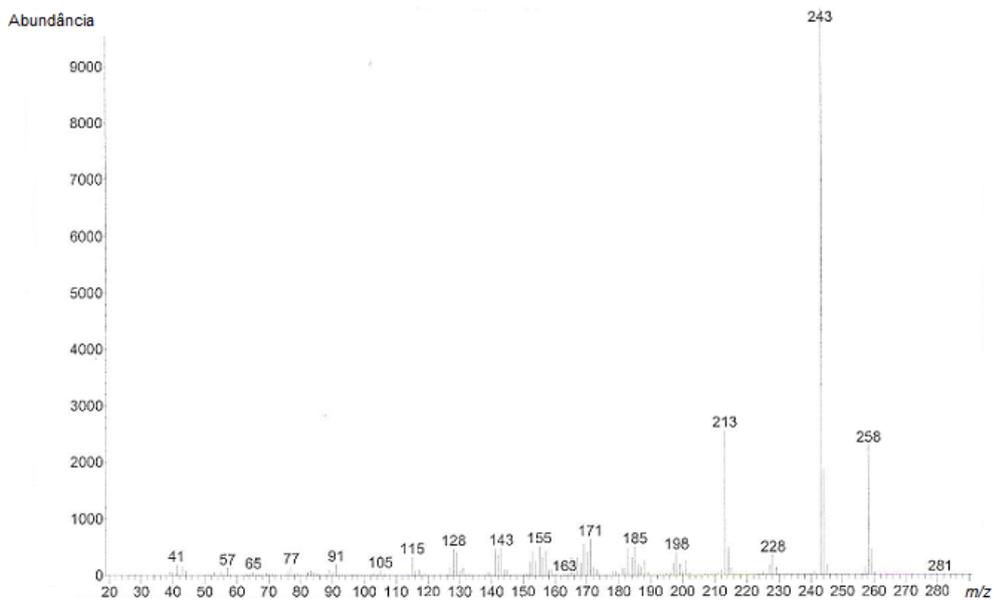


Figura A.2 – Espectro de massa obtido em modo de varrimento contínuo para o HHCB.

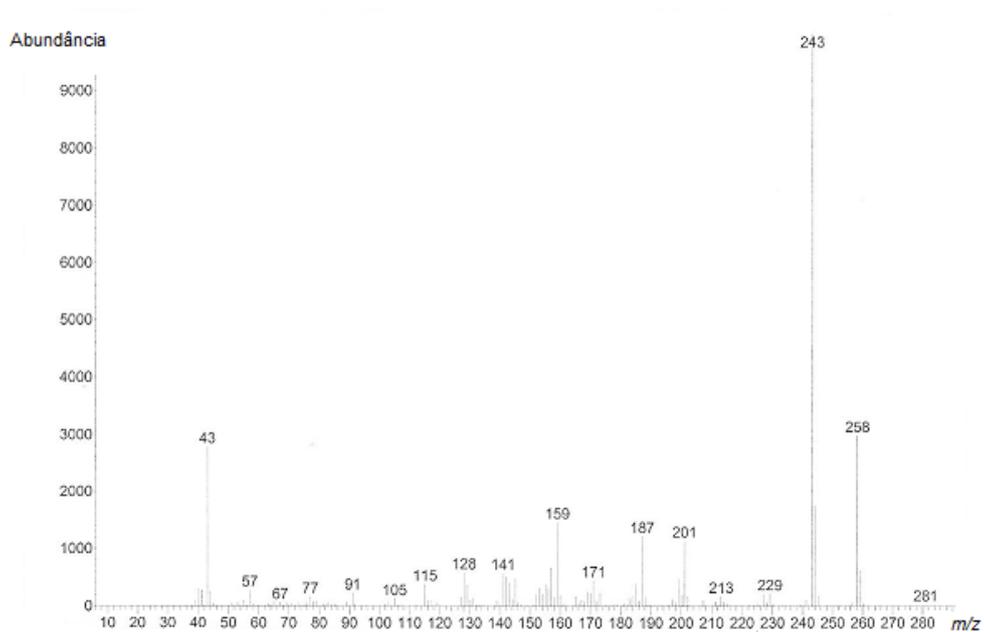


Figura A.3 – Espectro de massa obtido em modo de varrimento contínuo para o AHTN.

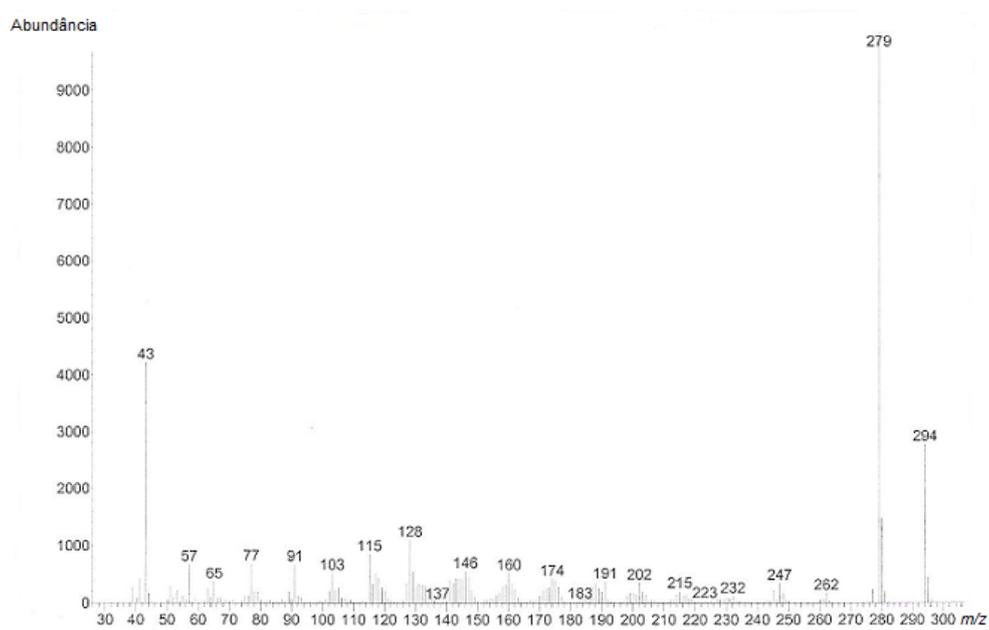


Figura A.4 – Espectro de massa obtido em modo de varrimento contínuo para o MK.

A2 – Antibióticos

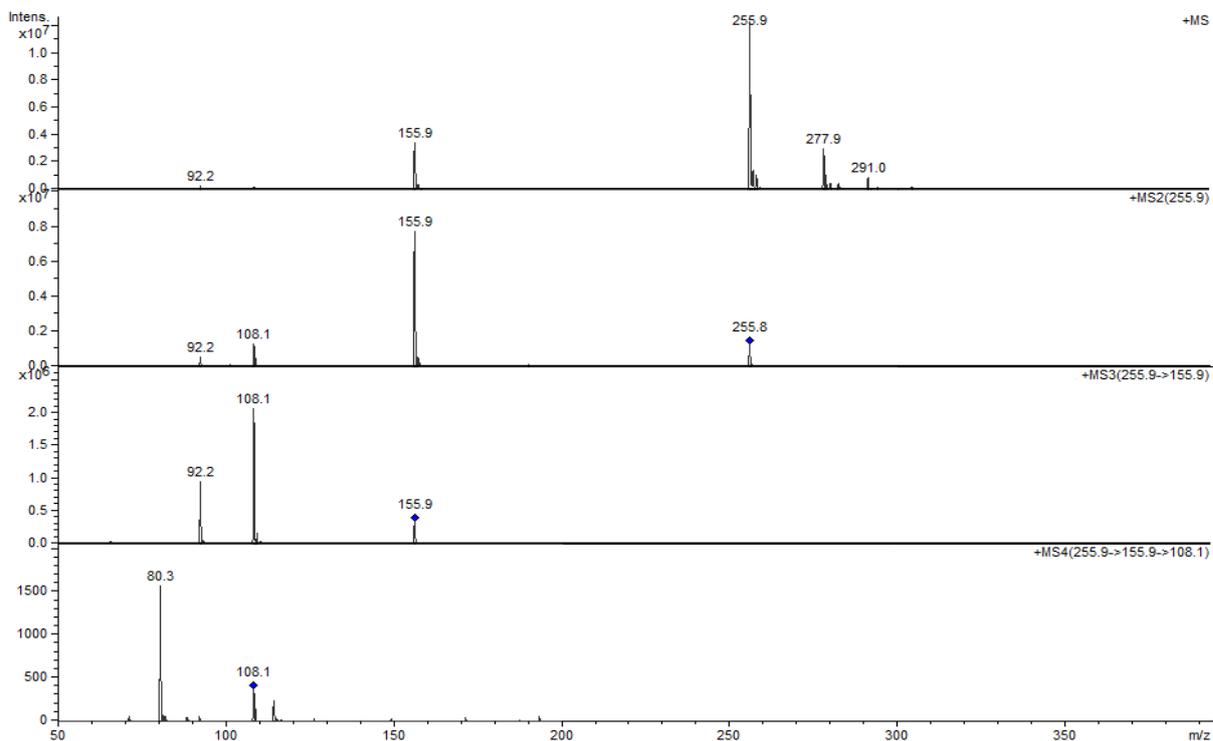


Figura A.5 – Espectro de massa e espectros de massa tandem obtidos em modo de varrimento contínuo para o STZ.

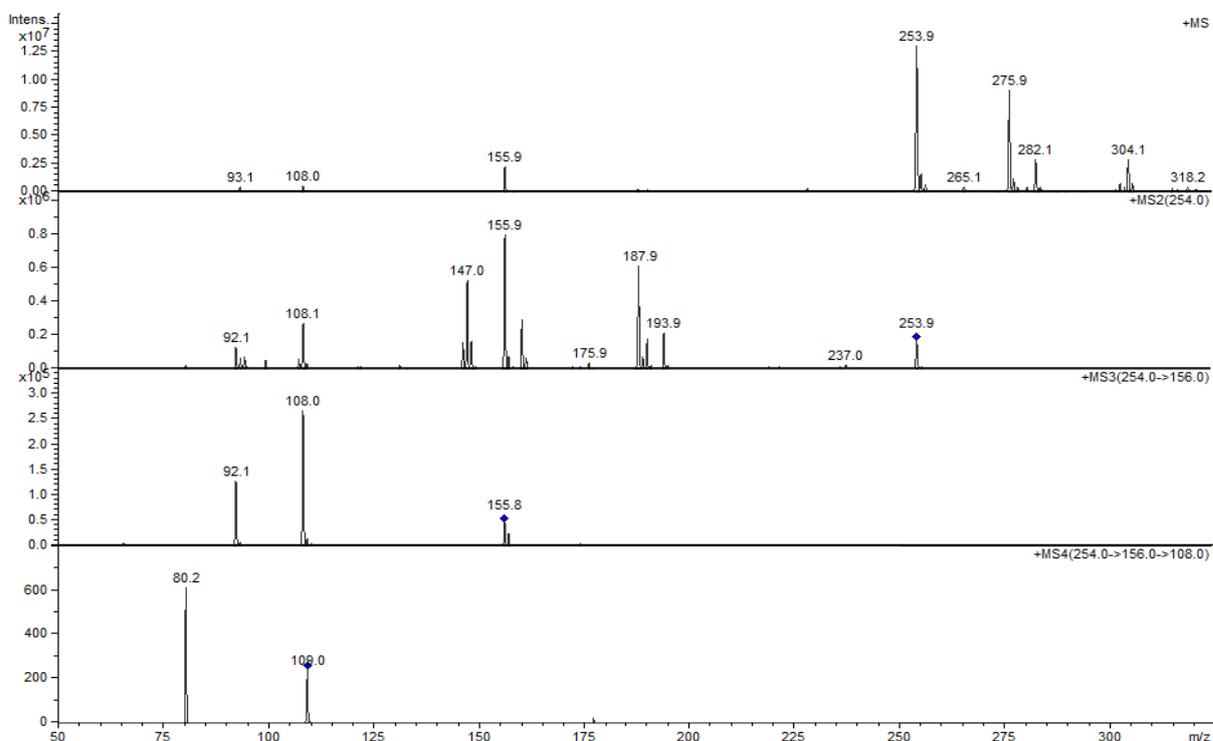


Figura A.6 – Espectro de massa e espectros de massa tandem obtidos em modo de varrimento contínuo para o SMX.

Anexo A | Espectros de Massa

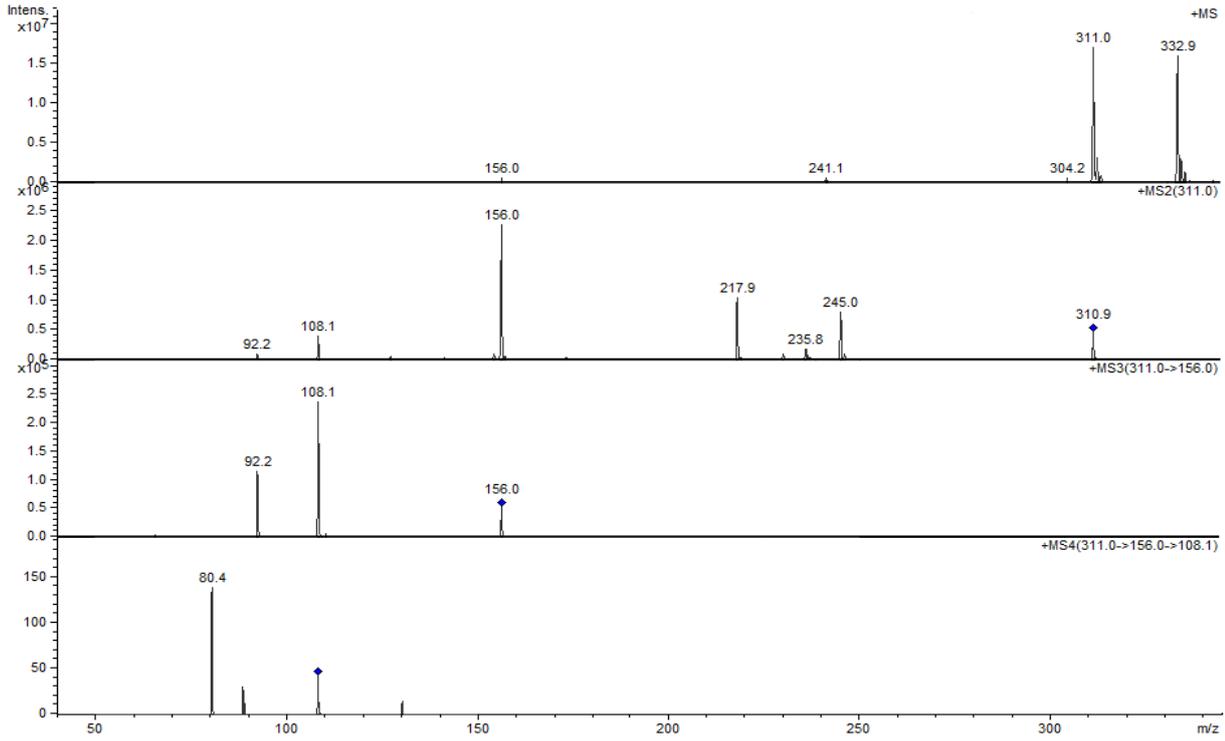


Figura A.7 – Espectro de massa e espectros de massa tandem obtidos em modo de varrimento contínuo para o SDM.

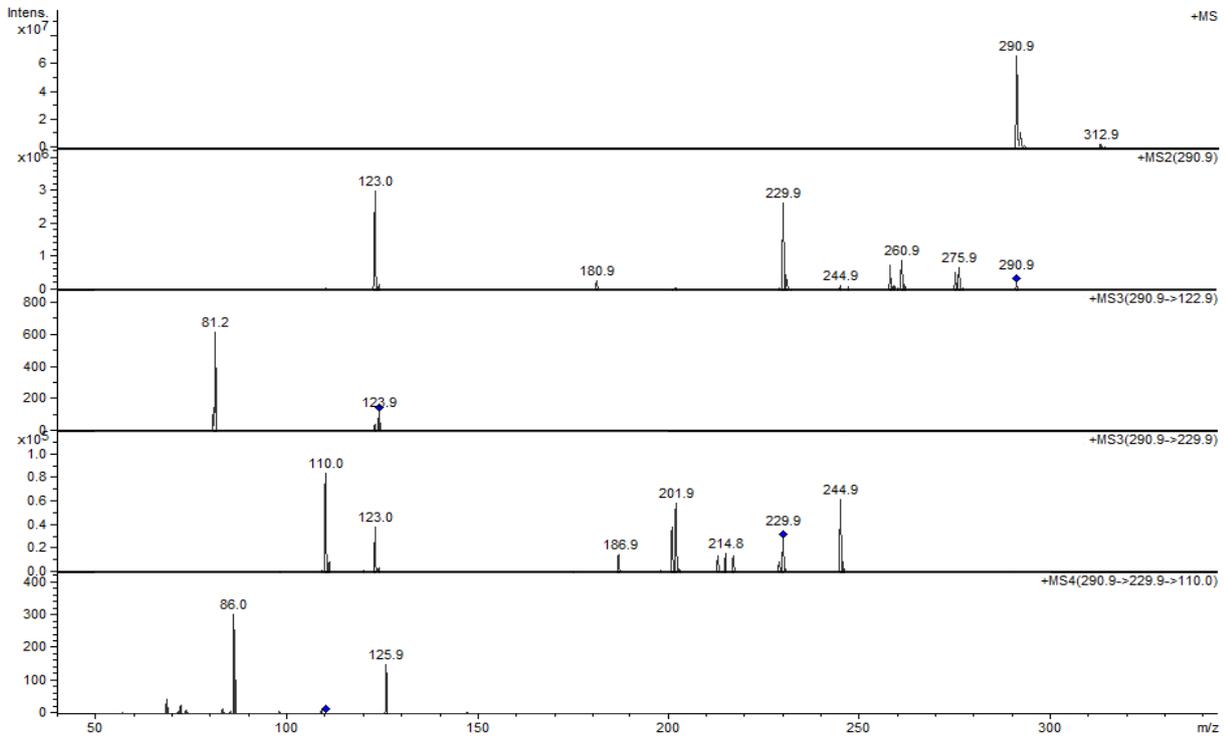


Figura A.8 – Espectro de massa e espectros de massa tandem obtidos em modo de varrimento contínuo para o TMP.

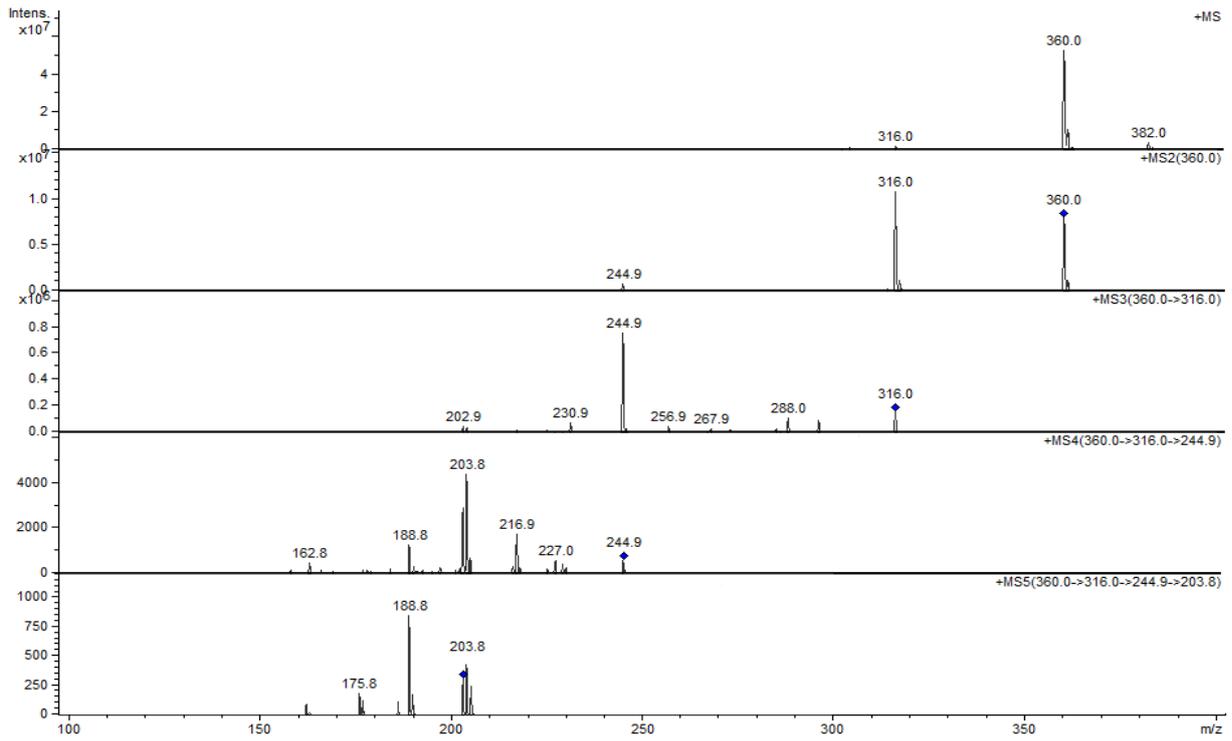
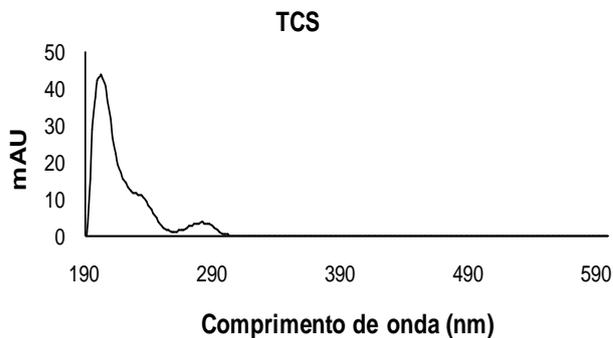
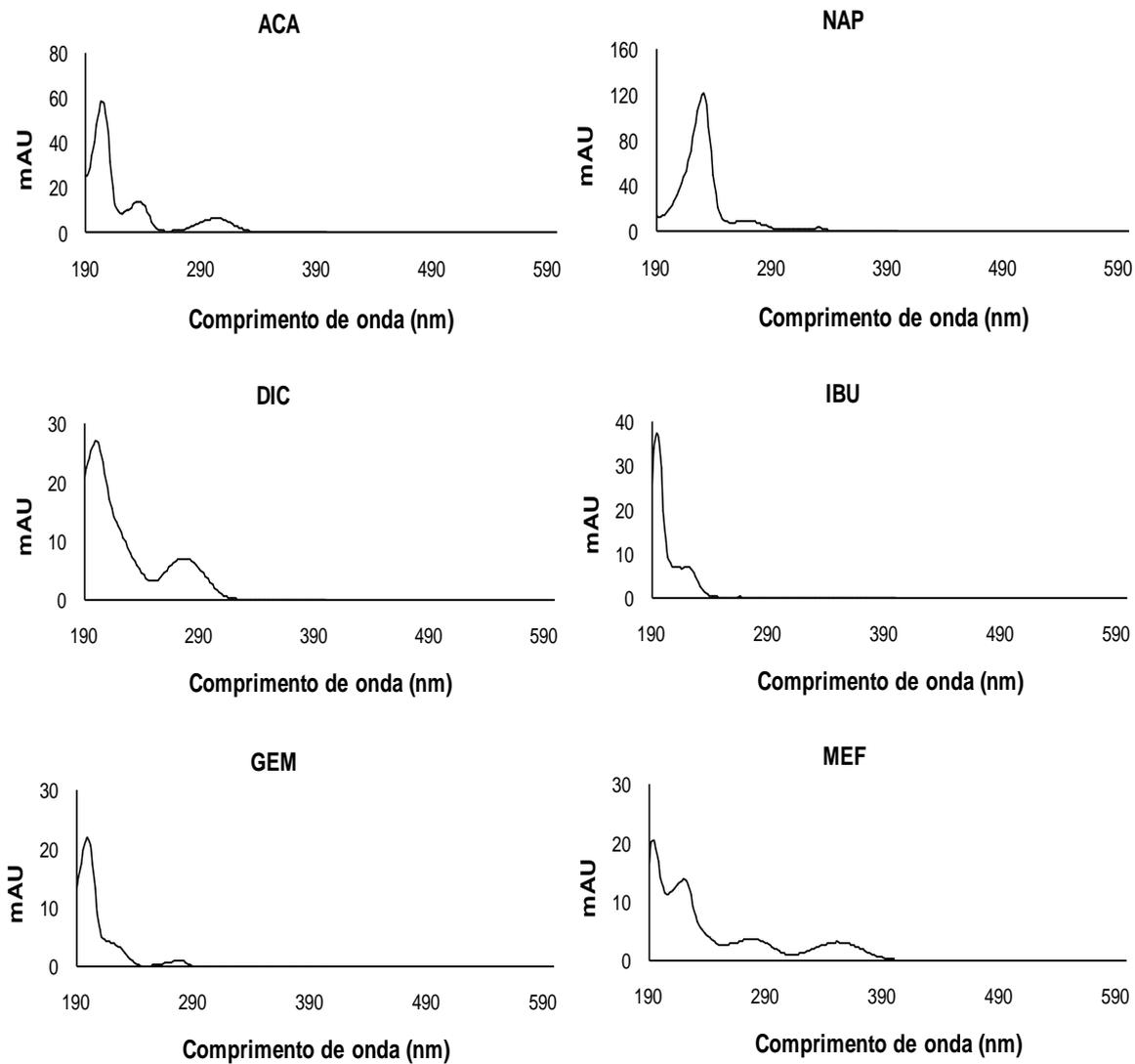


Figura A.9 – Espectro de massa e espectros de massa tandem obtidos em modo de varrimento contínuo para o ENR.

Anexo B – Espectros UV-vis**Figura B.1** – Espectro UV-vis obtido experimentalmente para o TCS.**Figura B.2** – Espectros UV-vis obtidos experimentalmente para os fármacos ácidos.

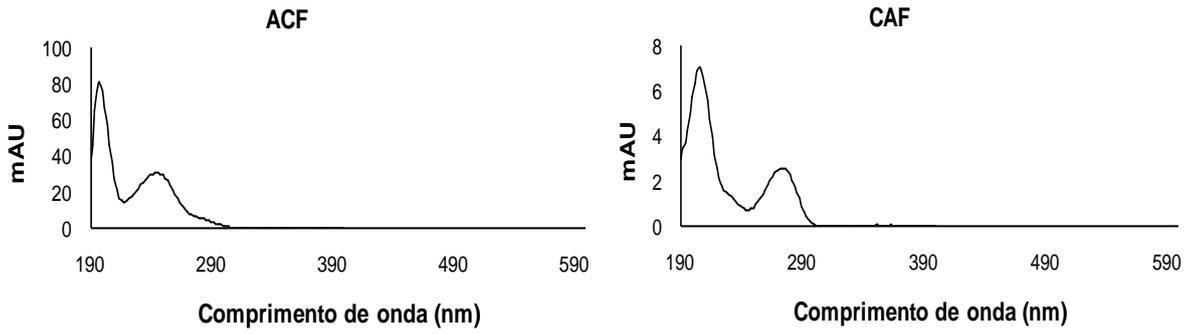


Figura B.3 – Espectros UV-vis obtidos experimentalmente para o ACF e CAF.

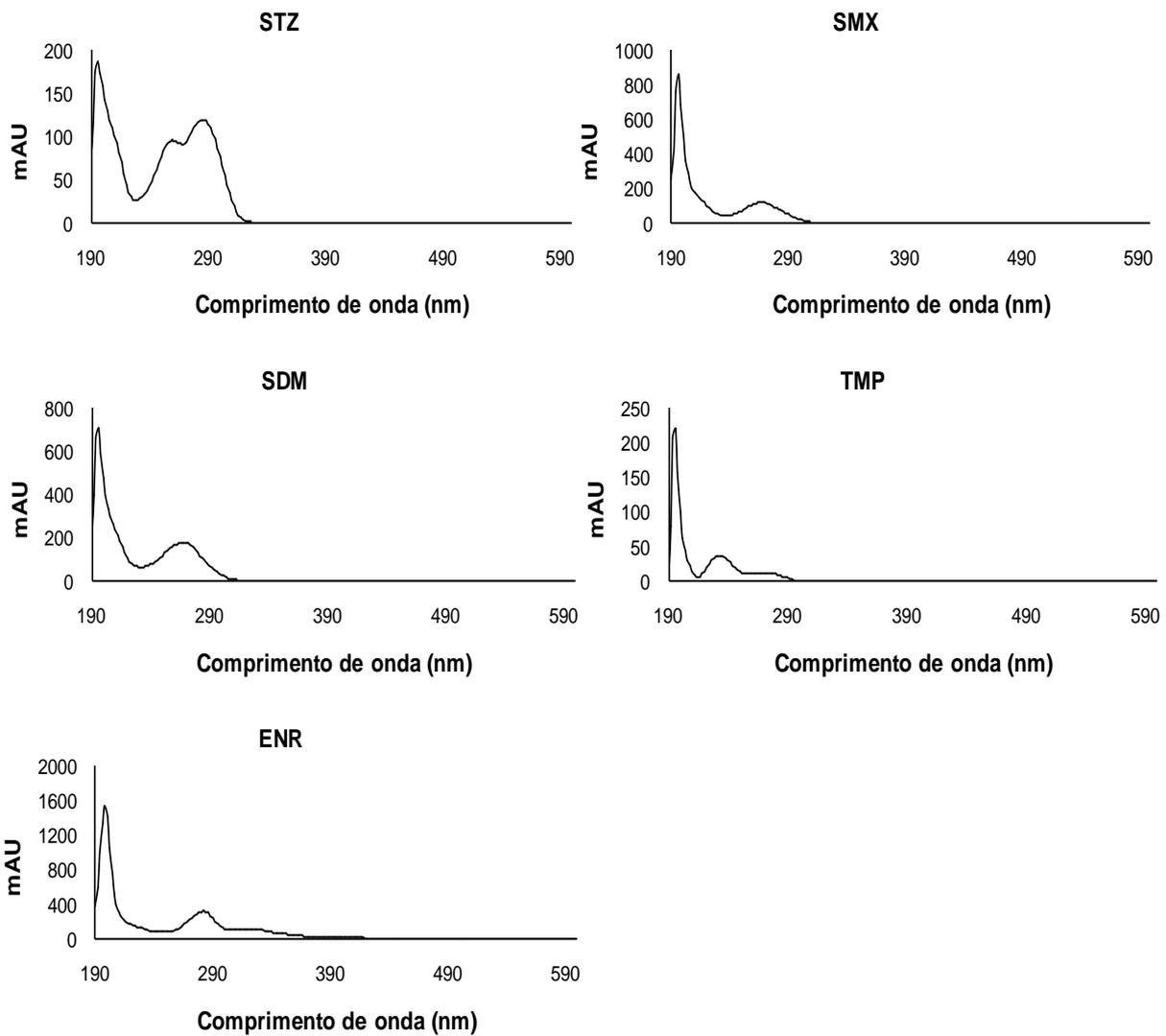


Figura B.4 – Espectros UV-vis obtidos experimentalmente para os antibióticos estudados.

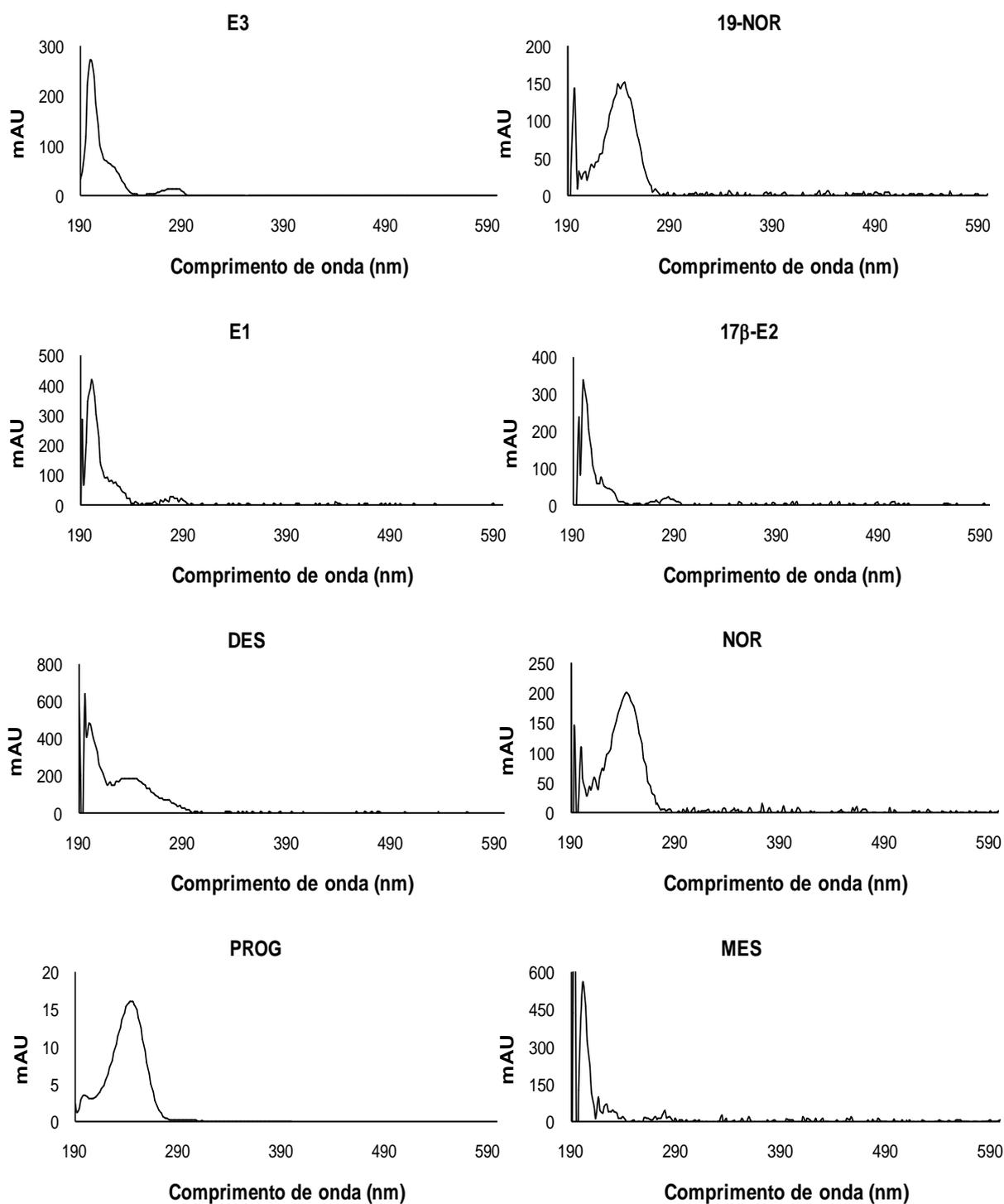


Figura B.5 – Espectros UV-vis obtidos experimentalmente para as hormonas esteróides sexuais estudadas.

Anexo C – Limiares Analíticos

O **limite de detecção** (LOD) é definido como o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito, com razoável certeza estatística. Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detectada numa amostra, mas não necessariamente quantificada com valor exacto.

Uma leitura inferior ao LOD não significa, obviamente, a ausência do analito a medir. Apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do analito em questão é inferior a um determinado valor.

Em termos quantitativos, o conceito de LOD corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, isto é, de uma amostra que contém a mesma matriz mas não contém o analito. O LOD pode ser calculado do seguinte modo:

$$\text{LOD} = 3 \times S_{x_0} \quad \text{equação}$$

C.1

O valor do desvio padrão, S_{x_0} pode ser estimado através da realização de várias leituras do branco ou de uma solução com concentração mais baixa da gama de linearidade.

O **limite de quantificação (LOQ)** corresponde à mais pequena concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exactidão e precisão. O LOQ pode calcular-se também, a partir do valor de S_{x_0} que pode ser estimado através da realização de várias leituras da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade:

$$\text{LOQ} = 10 \times S_{x_0} \quad \text{equação C.2}$$

Anexo D – Precisão

A precisão de um método pretende avaliar a dispersão dos valores dos resultados obtidos entre ensaios, repetidos sobre uma mesma amostra, ou amostras semelhantes, em condições definidas. Existem duas medidas extremas para avaliar esta dispersão: a repetibilidade e a reprodutibilidade. Entre estes dois extremos existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia.

Repetibilidade

É um parâmetro que permite avaliar a precisão obtida quando as análises são realizadas num único laboratório, por um único operador, usando um único equipamento num espaço de tempo relativamente curto.

Reprodutibilidade

É definida como a variação das medidas efectuadas quando as análises são realizadas por operadores de laboratórios diferentes que utilizem o método de ensaio normalizado e o material idêntico.

Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exactamente quais as condições a variar (uma ou mais). Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e por isso a mais aconselhável de usar.

O cálculo da precisão intermédia é efectuado preferencialmente para cada gama de concentração, a partir dos resultados obtidos após eliminação dos resultados aberrantes (ISO 5725-2). Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação de estudo da precisão intermédia, existem vários métodos para a determinação e controlo desses parâmetros de qualidade, nomeadamente através de Cartas de Controlo de Amplitude (ISO 5725-6 e ISO 8258) que poderão ser aplicadas para réplicas, duplicados de amostra e padrões estáveis ao longo do tempo.

A precisão de cada método foi avaliada em termos de desvio padrão relativo (RSD):

$$\text{RSD (\%)} = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{equação D.1}$$

onde

S – desvio padrão dos resultados obtidos; \bar{X} – é a média dos resultados obtidos

Anexo E – Método dos Mínimos Quadrados

A forma algébrica de uma recta é dada por:

$$y = a + bx \quad \text{equação E.1}$$

onde

a – ordenada na origem

b – declive da recta

Esta recta é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes, $(x_1, y_1); \dots; (x_n, y_n)$ onde n deverá corresponder ao número de pontos marcados na recta. A média dos valores de x, (concentração dos padrões utilizados) representa-se por \bar{x} e a média dos valores de y (sinal instrumental) representa-se por \bar{y} , e a posição (\bar{x}, \bar{y}) é designada por centroíde.

O cálculo do coeficiente de correlação, (r) pode ser usado como um dos parâmetros para avaliar uma calibração analítica:

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\left[\left\{ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right\} \left\{ \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right\} \right]}} \quad \text{equação E.2}$$

O valor do coeficiente de correlação pode tomar valores entre -1 e $+1$ ($-1 \leq r \leq +1$). Um valor de $r = +1$ representa uma correlação positiva (recta de declive positivo) e um valor de $r = -1$ representa uma correlação negativa (declive negativo). O cálculo do coeficiente de correlação é fácil de determinar, no entanto um bom coeficiente de correlação não implica necessariamente uma relação linear, pelo que é sempre aconselhável visualizar a recta de calibração. Assume-se, que todos os erros associados aos valores de x são desprezáveis face aos de y.

Por este método demonstra-se que os coeficientes a (ordenada na origem) e b (declive) de recta de regressão de y em x, $y = a + bx$, são dados por:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{equação E.3}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{equação E.4}$$

sendo:

x_i – valores individuais de concentração

y_i – valores individuais de sinal instrumental

\bar{x} – média dos valores de x (concentração dos padrões utilizados)

\bar{y} – média dos valores de y (sinal instrumental)

Os coeficientes a e b dão uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão inevitável do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ($S_{y/x}$) da recta de regressão:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + bx_i)]^2}{N - 2}} \quad \text{equação E.5}$$

Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração. Os desvios padrão de declive b e da ordenada na origem a, são dados por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{equação E.6}$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{equação E.7}$$

e podem ser usados para calcular os limites de confiança de a e b:

$$a \pm t_{\text{stud}} S_a \quad b \pm S_b$$

sendo t_{stud} o valor da variável de Student para o nível de confiança desejado de (N-2) graus de liberdade.

E1 – “Musks”

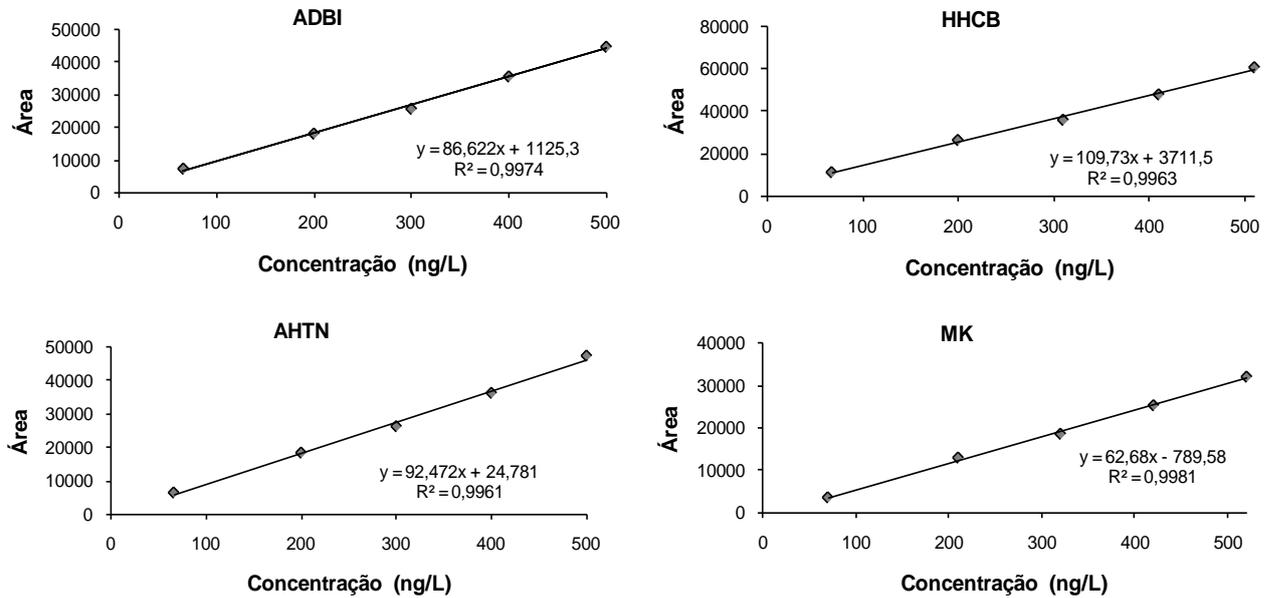


Figura E.1 – Curvas de calibração para os “musks” estudados obtidas por SBSE(PDMS)-LD/GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

E2 – Anti-sépticos

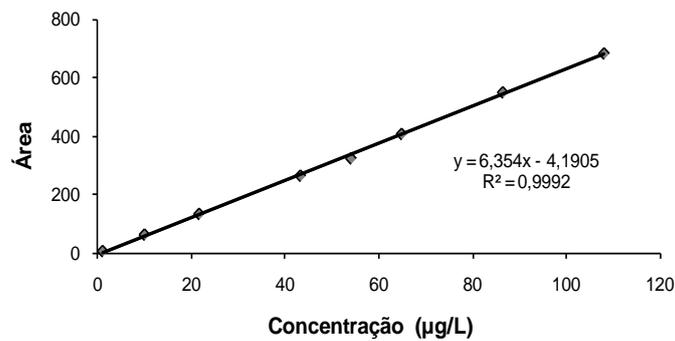


Figura E.2 – Curva de calibração para o TCS obtida por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

E3 – NSAIDs e reguladores lipídicos

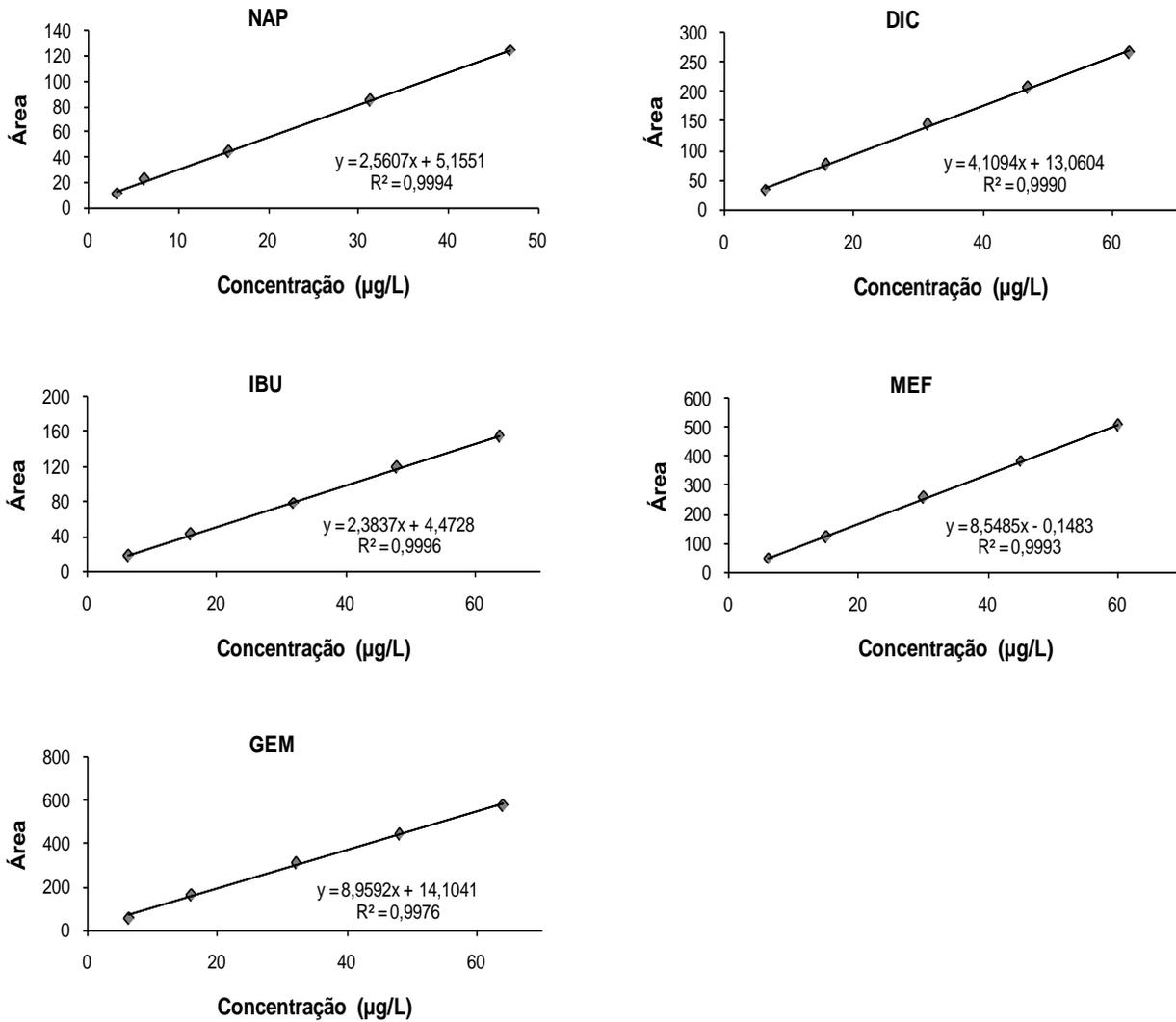


Figura E.3 – Curvas de calibração para os NSAIDs e regulador lipídico obtidas por SBSE(PDMS)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

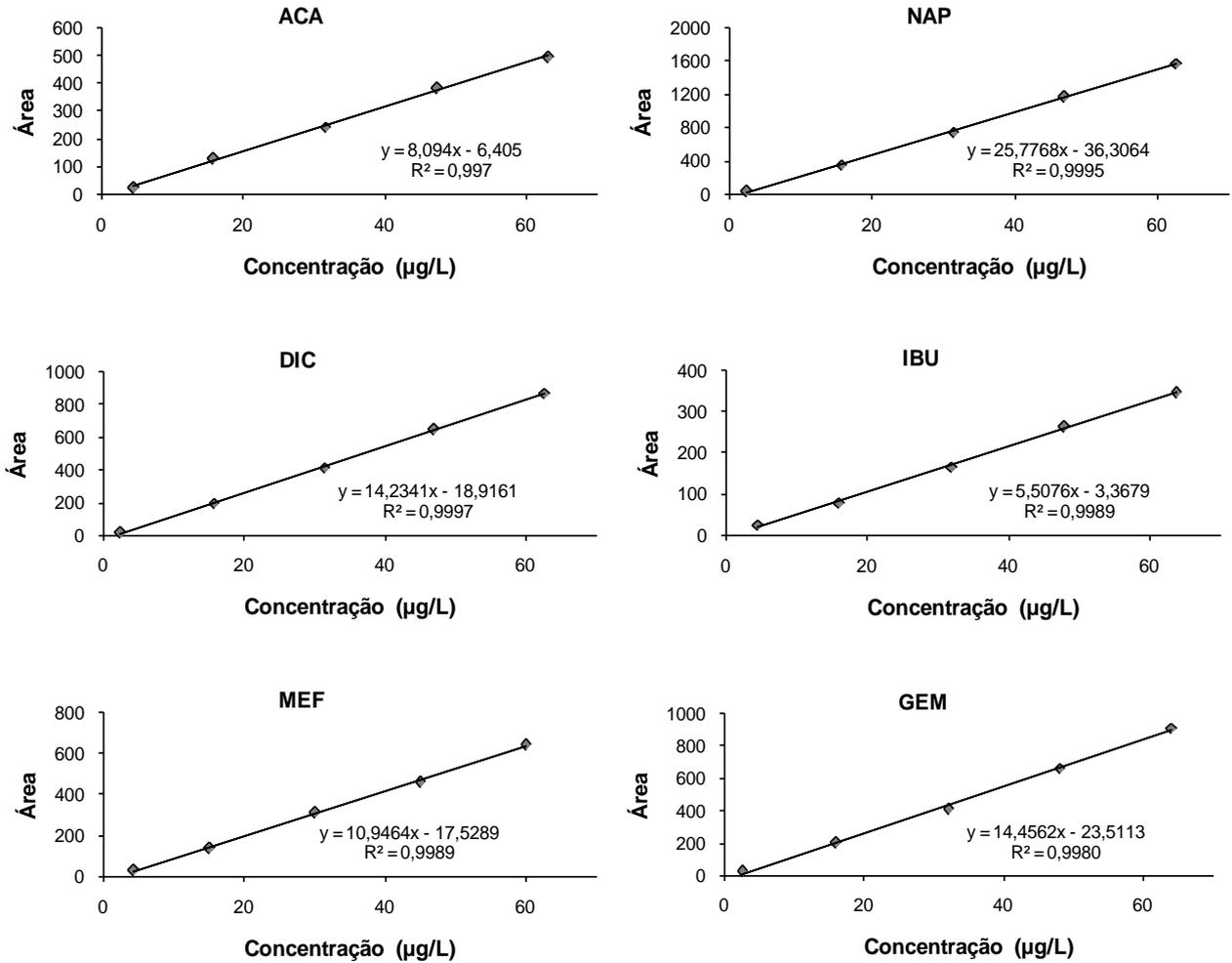


Figura E.4 – Curvas de calibração para os NSAIDs e regulador lipídico obtidas por SBSE(PU)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

E4 – Acetaminofeno e cafeína

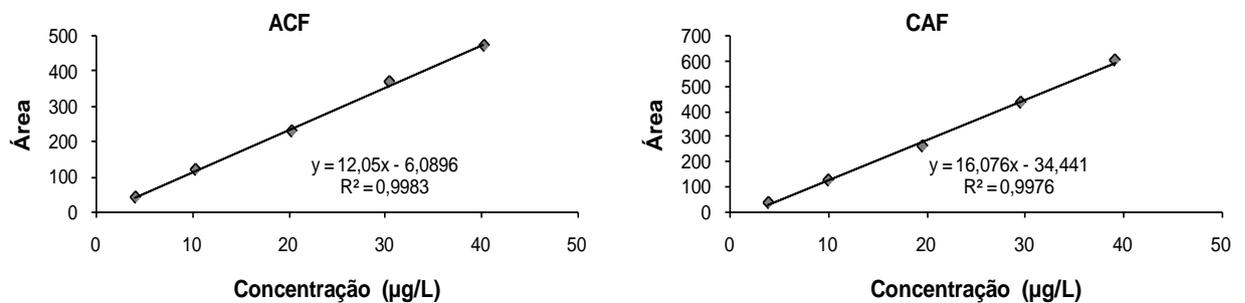


Figura E.5 – Curvas de calibração para o ACF e CAF obtidas por MSA μ E(AC)-LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

E5 – Antibióticos

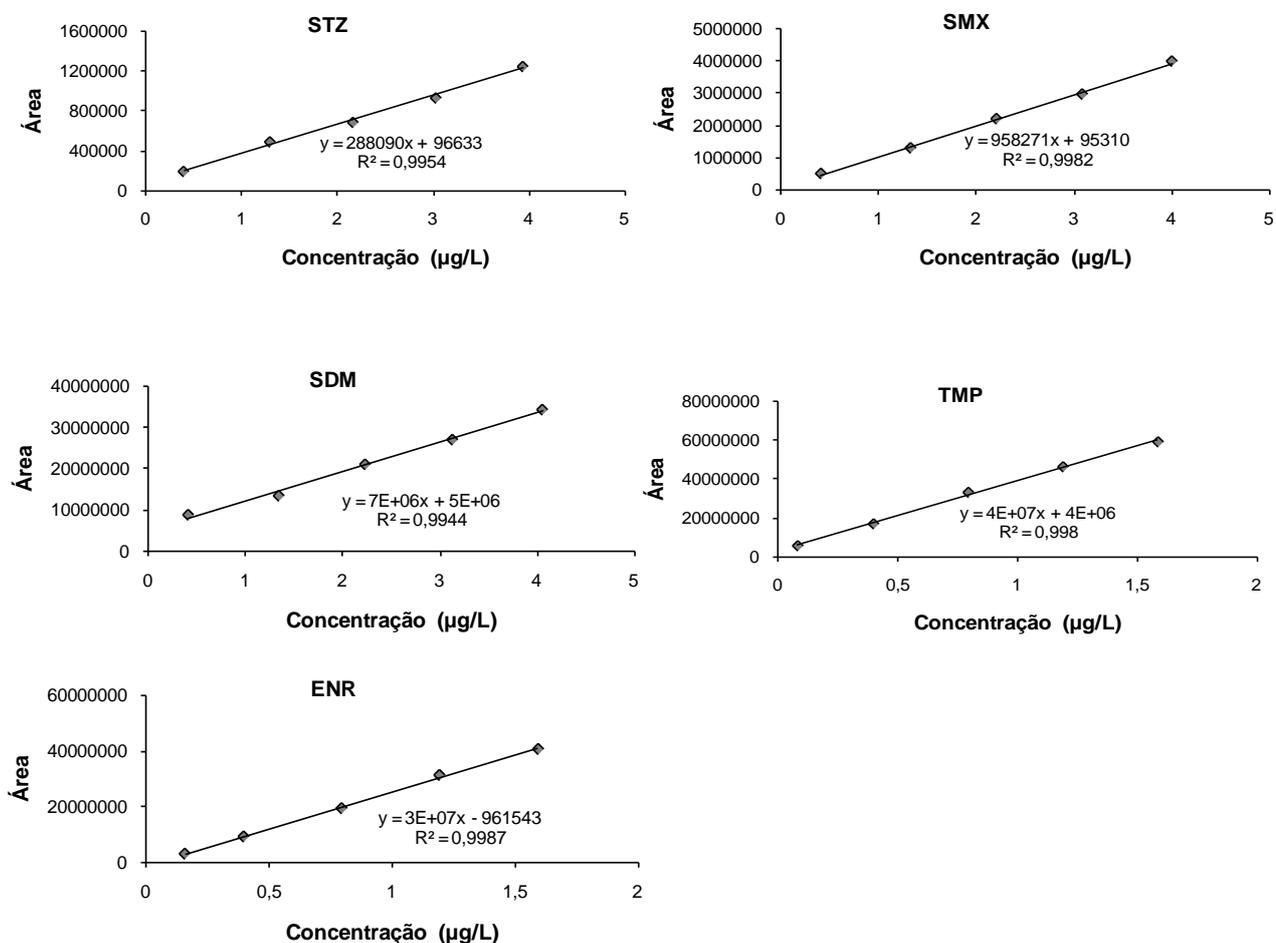


Figura E.6 – Curvas de calibração para os antibióticos estudados obtidas por MSAµE(PS-DVB)-LD/HPLC-MS/MS, sob condições experimentais otimizadas.

Anexo F – Análise de Resíduos

Um bom indicador da linearidade é a determinação dos resíduos, a qual se baseia na avaliação da distância entre os valores de y experimentais e os valores y' ideais da recta de calibração. Uma representação gráfica destes valores em função das concentrações deve dar origem a um conjunto de pontos que se dispõem aleatoriamente em torno do eixo dos x . Caso contrário poderá ser indicativo de que a função que melhor se ajusta ao conjunto de pontos experimentais poderá ser uma curva e não uma recta.

Para admitir a existência de linearidade numa determinada gama de concentração, foi definido que os valores deviam ter um desvio igual ou inferior a 15 %, ou seja, estar compreendidos entre 85 e 115 %. Sempre que existirem resíduos que apresentem um desvio superior a 15 % devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplicando-se novamente o teste até que estes requisitos sejam satisfeitos.

Calcula-se a área estimada (y') com base na equação da recta obtida para o composto em questão:

$$y' = a + bx \qquad \text{equação F.1}$$

onde:

a – ordenada na origem

b – declive da recta

x – valores individuais de concentração conhecida na solução padrão

O resíduo representa o quociente entre os valores experimentais e os valores estimados da área da recta de calibração, em percentagem.

Após o cálculo destes valores, foi traçado um gráfico de resíduos (%) *versus* concentração.

F1 – “Musks”

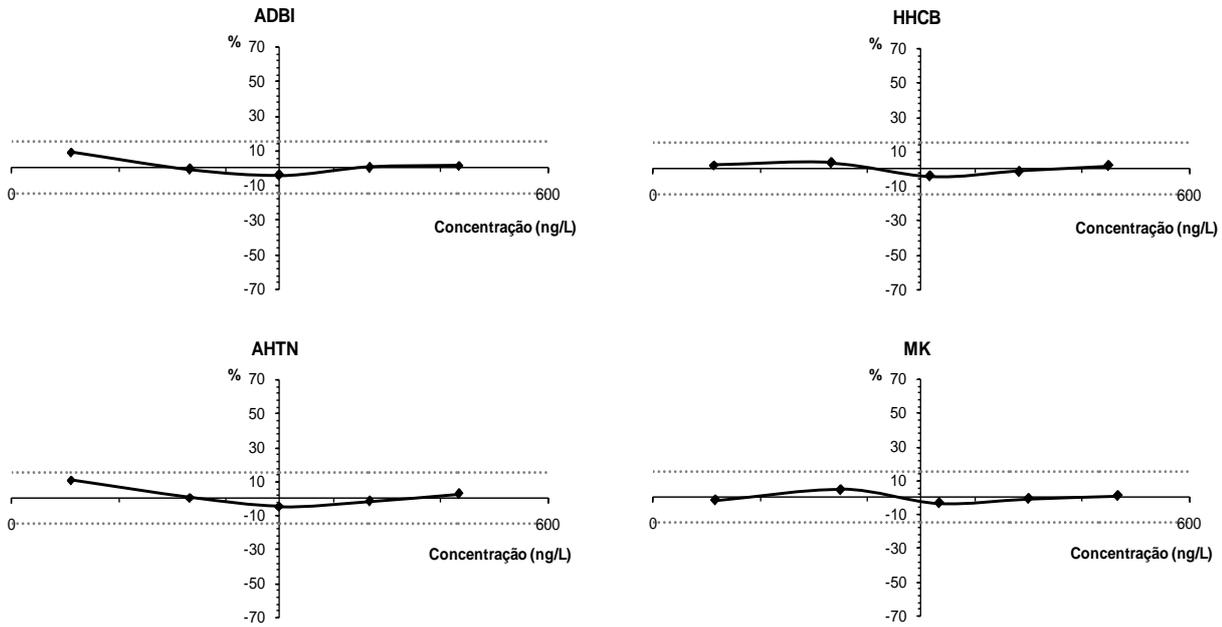


Figura F.1 – Análise de resíduos da gama linear dinâmica estudada para os “musks”, sob condições experimentais otimizadas.

F2 – Anti-sépticos

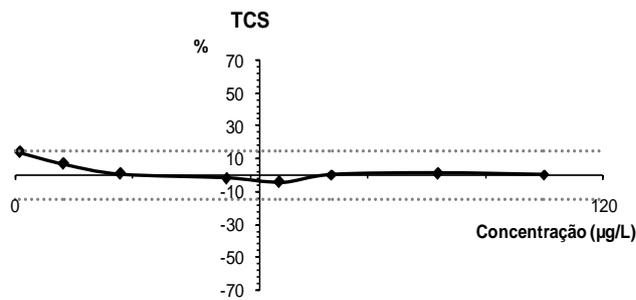


Figura F.2 – Análise de resíduos da gama linear dinâmica estudada para o TCS, sob condições experimentais otimizadas.

F3 – NSAIDs e reguladores lipídicos

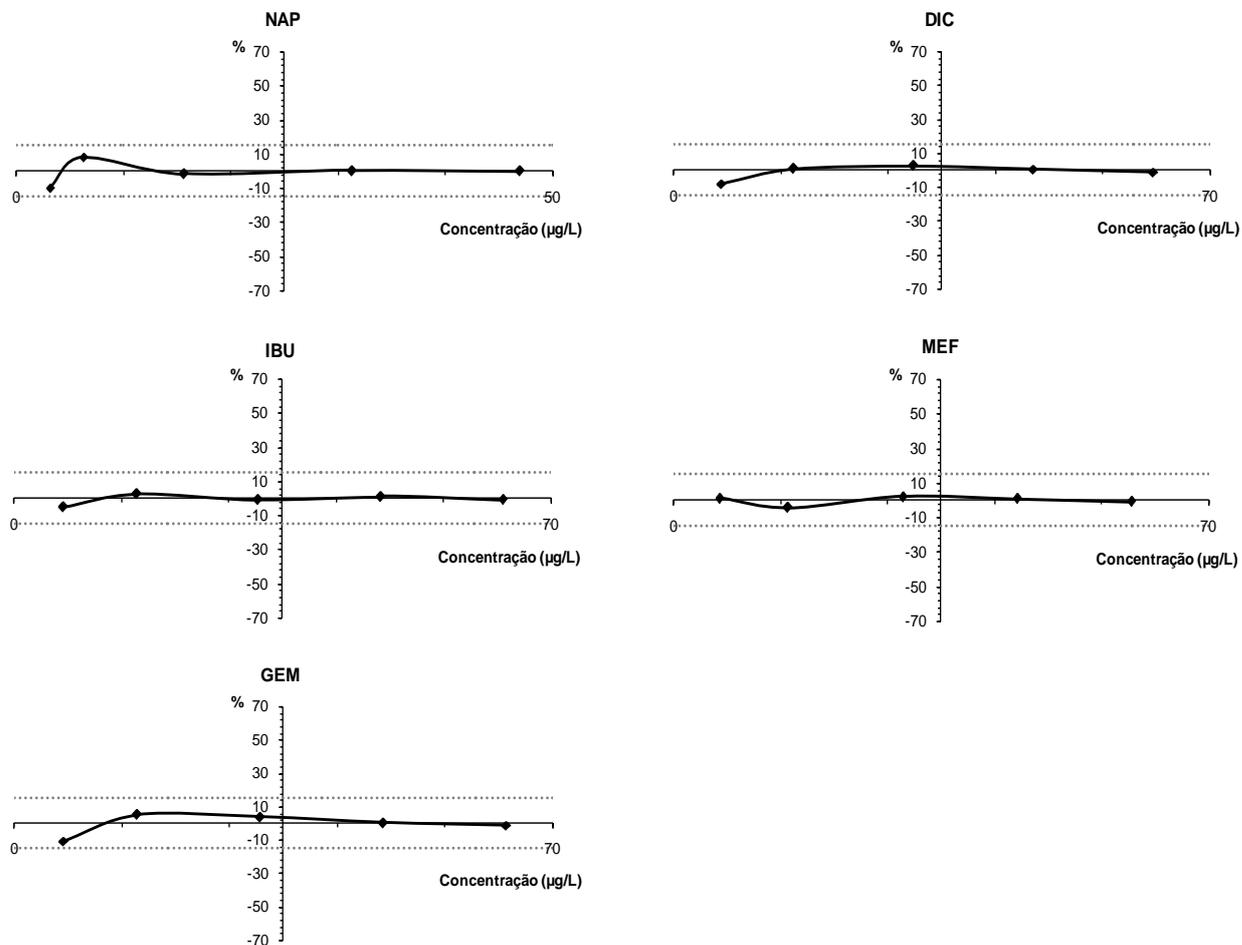


Figura F.3 – Análise de resíduos da gama linear dinâmica estudada para os NSAIDs e regulador lipídico utilizando como fase extractiva o PDMS, sob condições experimentais optimizadas.

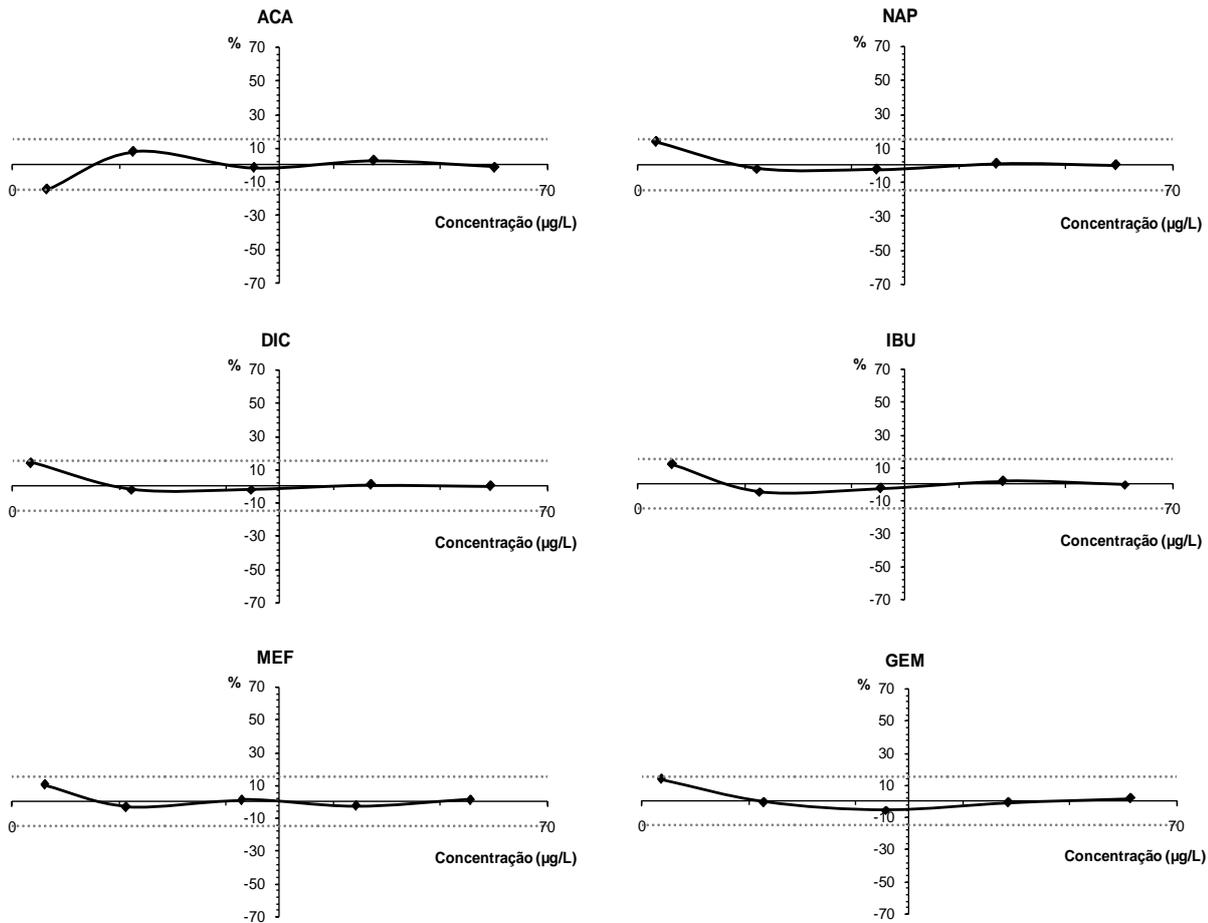


Figura F.4 – Análise de resíduos da gama linear dinâmica estudada para os NSAIDs e regulador lipídico usando como fase extractiva o PU, sob condições experimentais optimizadas.

F4 – Acetaminofeno e cafeína

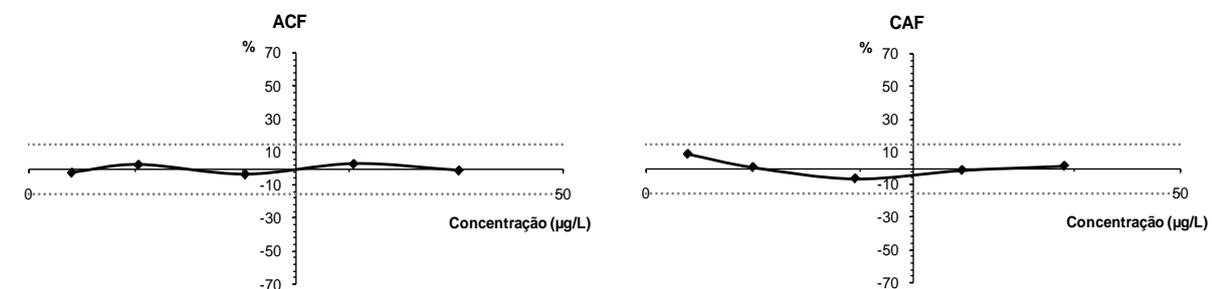


Figura F.5 – Análise de resíduos da gama linear dinâmica estudada para o ACF e CAF, sob condições experimentais optimizadas.

F5 – Antibióticos

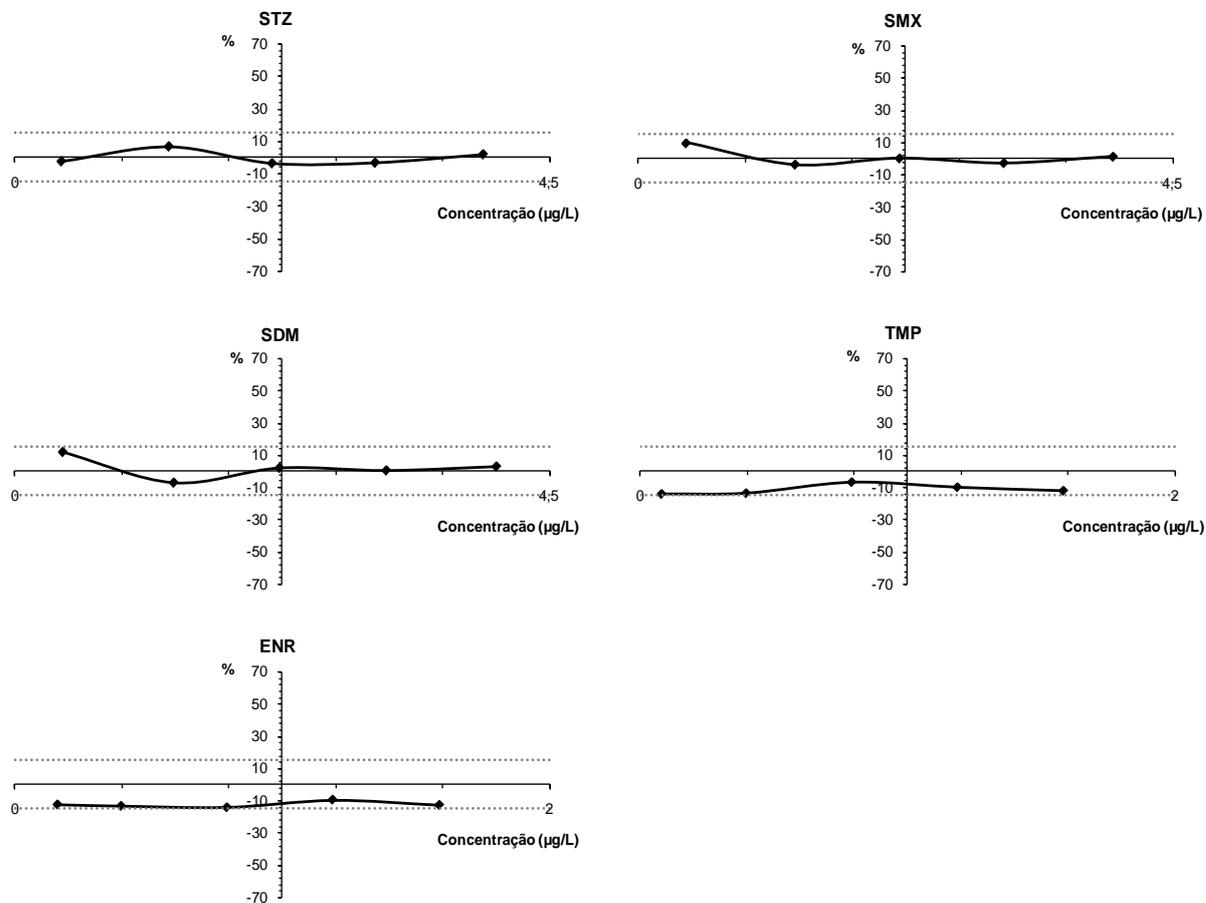


Figura F.6 – Análise de resíduos da gama linear dinâmica estudada para os antibióticos, sob condições experimentais otimizadas.

Anexo G – Análise de variância, ANOVA(“ Analysis Of VAriance”)

Análise de variâncias, ANOVA é uma técnica que permite avaliar se existe diferenças significativas entre os valores médios da variável dependente de diversas amostras. Assim as hipóteses a testar são:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_g \quad \text{vs} \quad H_i: \text{pelo menos uma das médias é diferente das demais}$$

onde

H_0 – hipótese nula

H_i – hipótese alternativa

g – número de amostras

Quando se reporta a conclusão de um teste, tudo se resume a afirmar se a hipótese nula é aceite ou rejeitada. Quando assim se procede não se tem em conta se a amostra observada está muito ou pouco distante da fronteira da região crítica ou se o valor observado do teste estatístico se situa longe ou perto do limiar de rejeição. Contudo, recorrendo ao p-valor, existe uma forma alternativa de reportar o resultado de um teste, forma esta que permite ultrapassar mais satisfatoriamente a mera conclusão de aceitar ou rejeitar a hipótese nula. Neste sentido, o valor-p traduz a probabilidade de uma amostra pertencer a uma dada população assumindo que a hipótese nula é verdadeira, $H_0 : \mu_1 = \mu_2$. Assim, quanto menor for p_{obs} , menor é a consistência dos dados com a hipótese.

Uma vez rejeitado a hipótese nula é necessário identificar quais as amostras que causam a diferença. Esta identificação pode ser efectuada por testes de comparações múltiplas, como por exemplo o de Tukey.

Os testes acima mencionados são vulgarmente utilizados no tratamento estatístico de resultados e podem encontrar-se facilmente descritos em bibliografia específica da área, pelo que uma descrição detalhada destes testes sai do âmbito deste trabalho.

G1 – “Musks”

Tabela G.1 – Tabela ANOVA para o ADBI, no estudo de efeitos de matriz.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	923,040	4	230,760	3,887	,014
Dentro das amostras	1484,292	25	59,372		
Total	2407,333	29			

Tabela G.2 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o ADBI, no estudo de efeitos de matriz .

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Rede	9,88000	4,44866	,205	-3,1851	22,9451
	Residual	5,73000	4,44866	,701	-7,3351	18,7951
	Superficia	16,76667*	4,44866	,007	3,7015	29,8318
	Ultra-pura	5,76667	4,44866	,696	-7,2985	18,8318
Rede	Mar	-9,88000	4,44866	,205	-22,9451	3,1851
	Residual	-4,15000	4,44866	,881	-17,2151	8,9151
	Superficia	6,88667	4,44866	,543	-6,1785	19,9518
	Ultra-pura	-4,11333	4,44866	,885	-17,1785	8,9518
Residual	Mar	-5,73000	4,44866	,701	-18,7951	7,3351
	Rede	4,15000	4,44866	,881	-8,9151	17,2151
	Superficia	11,03667	4,44866	,127	-2,0285	24,1018
	Ultra-pura	,03667	4,44866	1,000	-13,0285	13,1018
Superficia	Mar	-16,76667*	4,44866	,007	-29,8318	-3,7015
	Rede	-6,88667	4,44866	,543	-19,9518	6,1785
	Residual	-11,03667	4,44866	,127	-24,1018	2,0285
	Ultra-pura	-11,00000	4,44866	,129	-24,0651	2,0651
Ultra-pura	Mar	-5,76667	4,44866	,696	-18,8318	7,2985
	Rede	4,11333	4,44866	,885	-8,9518	17,1785
	Residual	-,03667	4,44866	1,000	-13,1018	13,0285
	Superficia	11,00000	4,44866	,129	-2,0651	24,0651

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.3 – Tabela ANOVA para o HHCB, no estudo de efeitos de matriz.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	1655,925	4	413,981	6,558	,001
Dentro das amostras	1578,145	25	63,126		
Total	3234,070	29			

Tabela G.4 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o HHCB, no estudo de efeitos de matriz.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Rede	1,88333	4,58715	,994	-11,5885	15,3552
	Residual	2,66667	4,58715	,977	-10,8052	16,1385
	Superficia	-15,68333*	4,58715	,017	-29,1552	-2,2115
	Ultra-pura	-10,71667	4,58715	,167	-24,1885	2,7552
Rede	Mar	-1,88333	4,58715	,994	-15,3552	11,5885
	Residual	,78333	4,58715	1,000	-12,6885	14,2552
	Superficia	-17,56667*	4,58715	,006	-31,0385	-4,0948
	Ultra-pura	-12,60000	4,58715	,075	-26,0719	,8719
Residual	Mar	-2,66667	4,58715	,977	-16,1385	10,8052
	Rede	-,78333	4,58715	1,000	-14,2552	12,6885
	Superficia	-18,35000*	4,58715	,004	-31,8219	-4,8781
	Ultra-pura	-13,38333	4,58715	,052	-26,8552	,0885
Superficia	Mar	15,68333*	4,58715	,017	2,2115	29,1552
	Rede	17,56667*	4,58715	,006	4,0948	31,0385
	Residual	18,35000*	4,58715	,004	4,8781	31,8219
	Ultra-pura	4,96667	4,58715	,814	-8,5052	18,4385
Ultra-pura	Mar	10,71667	4,58715	,167	-2,7552	24,1885
	Rede	12,60000	4,58715	,075	-,8719	26,0719
	Residual	13,38333	4,58715	,052	-,0885	26,8552
	Superficia	-4,96667	4,58715	,814	-18,4385	8,5052

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.5 – Tabela ANOVA para o AHTN, no estudo de efeitos de matriz.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	761,753	4	190,438	3,746	,016
Dentro das amostras	1270,812	25	50,832		
Total	2032,565	29			

Tabela G.6 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o AHTN, no estudo de efeitos de matriz.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Rede	14,48333*	4,11633	,013	2,3942	26,5725
	Residual	6,78333	4,11633	,482	-5,3058	18,8725
	Superficia	10,65000	4,11633	,103	-1,4391	22,7391
	Ultra-pura	4,03833	4,11633	,861	-8,0508	16,1275
Rede	Mar	-14,48333*	4,11633	,013	-26,5725	-2,3942
	Residual	-7,70000	4,11633	,358	-19,7891	4,3891
	Superficia	-3,83333	4,11633	,882	-15,9225	8,2558
	Ultra-pura	-10,44500	4,11633	,114	-22,5341	1,6441
Residual	Mar	-6,78333	4,11633	,482	-18,8725	5,3058
	Rede	7,70000	4,11633	,358	-4,3891	19,7891
	Superficia	3,86667	4,11633	,879	-8,2225	15,9558
	Ultra-pura	-2,74500	4,11633	,962	-14,8341	9,3441
Superficia	Mar	-10,65000	4,11633	,103	-22,7391	1,4391
	Rede	3,83333	4,11633	,882	-8,2558	15,9225
	Residual	-3,86667	4,11633	,879	-15,9558	8,2225
	Ultra-pura	-6,61167	4,11633	,507	-18,7008	5,4775
Ultra-pura	Mar	-4,03833	4,11633	,861	-16,1275	8,0508
	Rede	10,44500	4,11633	,114	-1,6441	22,5341
	Residual	2,74500	4,11633	,962	-9,3441	14,8341
	Superficia	6,61167	4,11633	,507	-5,4775	18,7008

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.7 – Tabela ANOVA para o MK, no estudo de efeitos de matriz.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Between Groups	1375,513	4	343,878	9,921	,000
Within Groups	866,572	25	34,663		
Total	2242,085	29			

Tabela G.8 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o MK, no estudo de efeitos de matriz.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Mar	Rede	-,43333	3,39916	1,000	-10,4162	9,5496
	Residual	-4,83333	3,39916	,620	-14,8162	5,1496
	Superficia	14,26667 [†]	3,39916	,003	4,2838	24,2496
	Ultra-pura	7,54333	3,39916	,206	-2,4396	17,5262
Rede	Mar	,43333	3,39916	1,000	-9,5496	10,4162
	Residual	-4,40000	3,39916	,697	-14,3829	5,5829
	Superficia	14,70000 [†]	3,39916	,002	4,7171	24,6829
	Ultra-pura	7,97667	3,39916	,164	-2,0062	17,9596
Residual	Mar	4,83333	3,39916	,620	-5,1496	14,8162
	Rede	4,40000	3,39916	,697	-5,5829	14,3829
	Superficia	19,10000 [†]	3,39916	,000	9,1171	29,0829
	Ultra-pura	12,37667 [†]	3,39916	,010	2,3938	22,3596
Superficia	Mar	-14,26667 [†]	3,39916	,003	-24,2496	-4,2838
	Rede	-14,70000 [†]	3,39916	,002	-24,6829	-4,7171
	Residual	-19,10000 [†]	3,39916	,000	-29,0829	-9,1171
	Ultra-pura	-6,72333	3,39916	,305	-16,7062	3,2596
Ultra-pura	Mar	-7,54333	3,39916	,206	-17,5262	2,4396
	Rede	-7,97667	3,39916	,164	-17,9596	2,0062
	Residual	-12,37667 [†]	3,39916	,010	-22,3596	-2,3938
	Superficia	6,72333	3,39916	,305	-3,2596	16,7062

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

G2 – Anti-sépticos

Tabela G.9 – Tabela ANOVA para o TCS, no estudo de efeitos de matriz.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	1646,985	3	548,995	265,836	,000
Dentro das amostras	35,108	17	2,065		
Total	1682,093	20			

Tabela G.10 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o TCS, no estudo de efeitos de matriz.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Past Den	Residual	-10,97013*	1,01616	,000	-13,8586	-8,0816
	Saliva	8,09364*	1,01616	,000	5,2051	10,9821
	Ultra-pura	-12,49692*	1,01616	,000	-15,3854	-9,6084
Residual	Past Den	10,97013*	1,01616	,000	8,0816	13,8586
	Saliva	19,06377*	,82969	,000	16,7053	21,4222
	Ultra-pura	-1,52679	,82969	,290	-3,8852	,8317
Saliva	Past Den	-8,09364*	1,01616	,000	-10,9821	-5,2051
	Residual	-19,06377*	,82969	,000	-21,4222	-16,7053
	Ultra-pura	-20,59056*	,82969	,000	-22,9490	-18,2321
Ultra-pura	Past Den	12,49692*	1,01616	,000	9,6084	15,3854
	Residual	1,52679	,82969	,290	-,8317	3,8852
	Saliva	20,59056*	,82969	,000	18,2321	22,9490

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

G3 – NSAIDs e Reguladores lipídicos

Tabela G.11 – Tabela ANOVA para o ACA, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	2204,616	3	734,872	278,110	,000
Dentro das amostras	21,139	8	2,642		
Total	2225,755	11			

Tabela G.12 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o ACA, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Residual	-29,96584 [*]	1,32725	,000	-34,2161	-25,7155
	Superficial	-13,86667 [*]	1,32725	,000	-18,1170	-9,6164
	Ultra-pura	-34,10667 [*]	1,32725	,000	-38,3570	-29,8564
Residual	Mar	29,96584 [*]	1,32725	,000	25,7155	34,2161
	Superficial	16,09917 [*]	1,32725	,000	11,8489	20,3495
	Ultra-pura	-4,14083	1,32725	,056	-8,3911	,1095
Superficial	Mar	13,86667 [*]	1,32725	,000	9,6164	18,1170
	Residual	-16,09917 [*]	1,32725	,000	-20,3495	-11,8489
	Ultra-pura	-20,24000 [*]	1,32725	,000	-24,4903	-15,9897
Ultra-pura	Mar	34,10667 [*]	1,32725	,000	29,8564	38,3570
	Residual	4,14083	1,32725	,056	-,1095	8,3911
	Superficial	20,24000 [*]	1,32725	,000	15,9897	24,4903

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.13 – Tabela ANOVA para o NAP, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	39,818	3	13,273	387,807	,000
Dentro das amostras	,274	8	,034		
Total	40,092	11			

Tabela G.14 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o NAP, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Residual	4,08667*	,15105	,000	3,6029	4,5704
	Superficial	1,66333*	,15105	,000	1,1796	2,1471
	Ultra-pura	-,62000*	,15105	,014	-1,1037	-,1363
Residual	Mar	-4,08667*	,15105	,000	-4,5704	-3,6029
	Superficial	-2,42333*	,15105	,000	-2,9071	-1,9396
	Ultra-pura	-4,70667*	,15105	,000	-5,1904	-4,2229
Superficial	Mar	-1,66333*	,15105	,000	-2,1471	-1,1796
	Residual	2,42333*	,15105	,000	1,9396	2,9071
	Ultra-pura	-2,28333*	,15105	,000	-2,7671	-1,7996
Ultra-pura	Mar	,62000*	,15105	,014	,1363	1,1037
	Residual	4,70667*	,15105	,000	4,2229	5,1904
	Superficial	2,28333*	,15105	,000	1,7996	2,7671

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.15 – Tabela ANOVA para o NAP, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	1812,898	3	604,299	54,178	,000
Dentro das amostras	89,231	8	11,154		
Total	1902,130	11			

Tabela G.16 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o NAP, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Residual	-6,51324	2,72689	,157	-15,2457	2,2192
	_ Superficial	18,19176 ⁺	2,72689	,001	9,4593	26,9242
	Ultra-pura	-15,30437 ⁺	2,72689	,002	-24,0368	-6,5719
Residual	Mar	6,51324	2,72689	,157	-2,2192	15,2457
	_ Superficial	24,70500 ⁺	2,72689	,000	15,9725	33,4375
	Ultra-pura	-8,79113 ⁺	2,72689	,049	-17,5236	-,0587
_ Superficial	Mar	-18,19176 ⁺	2,72689	,001	-26,9242	-9,4593
	_ Residual	-24,70500 ⁺	2,72689	,000	-33,4375	-15,9725
	Ultra-pura	-33,49613 ⁺	2,72689	,000	-42,2286	-24,7637
Ultra-pura	Mar	15,30437 ⁺	2,72689	,002	6,5719	24,0368
	_ Residual	8,79113 ⁺	2,72689	,049	,0587	17,5236
	Superficial	33,49613 ⁺	2,72689	,000	24,7637	42,2286

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.17 – Tabela ANOVA para o DIC, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	60,721	3	20,240	2,232	,162
Dentro das amostras	72,537	8	9,067		
Total	133,258	11			

Tabela G.18 – Tabela ANOVA para o DIC, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	846,026	3	282,009	13,775	,002
Dentro das amostras	163,785	8	20,473		
Total	1009,811	11			

Tabela G.19 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o DIC, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Residual	-4,74724	3,69443	,596	-16,5781	7,0836
	_ Superficial	14,05152*	3,69443	,022	2,2207	25,8824
	Ultra-pura	-7,90667	3,69443	,220	-19,7375	3,9242
Residual	Mar	4,74724	3,69443	,596	-7,0836	16,5781
	_ Superficial	18,79876*	3,69443	,004	6,9679	30,6296
	Ultra-pura	-3,15943	3,69443	,827	-14,9903	8,6714
Superficial	Mar	-14,05152*	3,69443	,022	-25,8824	-2,2207
	_ Residual	-18,79876*	3,69443	,004	-30,6296	-6,9679
	Ultra-pura	-21,95819*	3,69443	,002	-33,7890	-10,1273
Ultra-pura	Mar	7,90667	3,69443	,220	-3,9242	19,7375
	_ Residual	3,15943	3,69443	,827	-8,6714	14,9903
	Superficial	21,95819*	3,69443	,002	10,1273	33,7890

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.20 – Tabela ANOVA para o IBU, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	247,388	3	82,463	13,027	,002
Dentro das amostras	50,640	8	6,330		
Total	298,029	11			

Tabela G.21 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o IBU, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Residual	7,94667 [*]	2,05427	,020	1,3682	14,5252
	_ Superficial	5,20000	2,05427	,129	-1,3785	11,7785
	Ultra-pura	-3,77333	2,05427	,325	-10,3518	2,8052
Residual	Mar	-7,94667 [*]	2,05427	,020	-14,5252	-1,3682
	_ Superficial	-2,74667	2,05427	,567	-9,3252	3,8318
	Ultra-pura	-11,72000 [*]	2,05427	,002	-18,2985	-5,1415
Superficial	Mar	-5,20000	2,05427	,129	-11,7785	1,3785
	_ Residual	2,74667	2,05427	,567	-3,8318	9,3252
	Ultra-pura	-8,97333 [*]	2,05427	,010	-15,5518	-2,3948
Ultra-pura	Mar	3,77333	2,05427	,325	-2,8052	10,3518
	_ Residual	11,72000 [*]	2,05427	,002	5,1415	18,2985
	Superficial	8,97333 [*]	2,05427	,010	2,3948	15,5518

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.22 – Tabela ANOVA para o IBU, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	1348,763	3	449,588	69,828	,000
Dentro das amostras	51,508	8	6,438		
Total	1400,271	11			

Tabela G.23 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o IBU, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Residual	-22,02923*	2,07179	,000	-28,6638	-15,3946
	_ Superficial	-18,91187*	2,07179	,000	-25,5465	-12,2773
	_ Ultra-pura	-28,49590*	2,07179	,000	-35,1305	-21,8613
Residual	Mar	22,02923*	2,07179	,000	15,3946	28,6638
	_ Superficial	3,11736	2,07179	,478	-3,5172	9,7520
	_ Ultra-pura	-6,46667	2,07179	,056	-13,1013	,1679
_ Superficial	Mar	18,91187*	2,07179	,000	12,2773	25,5465
	_ Residual	-3,11736	2,07179	,478	-9,7520	3,5172
	_ Ultra-pura	-9,58403*	2,07179	,007	-16,2186	-2,9494
_ Ultra-pura	Mar	28,49590*	2,07179	,000	21,8613	35,1305
	_ Residual	6,46667	2,07179	,056	-,1679	13,1013
	_ Superficial	9,58403*	2,07179	,007	2,9494	16,2186

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.24 – Tabela ANOVA para o MEF, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	526,450	3	175,483	12,081	,002
Dentro das amostras	116,208	8	14,526		
Total	642,658	11			

Tabela G.25 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o MEF, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Residual	-4,75333	3,11192	,466	-14,7188	5,2121
	_ Superficial	12,62667 ⁺	3,11192	,015	2,6612	22,5921
	Ultra-pura	6,96333	3,11192	,193	-3,0021	16,9288
Residual	Mar	4,75333	3,11192	,466	-5,2121	14,7188
	_ Superficial	17,38000 ⁺	3,11192	,002	7,4145	27,3455
	Ultra-pura	11,71667 ⁺	3,11192	,023	1,7512	21,6821
Superficial	Mar	-12,62667 ⁺	3,11192	,015	-22,5921	-2,6612
	_ Residual	-17,38000 ⁺	3,11192	,002	-27,3455	-7,4145
	Ultra-pura	-5,66333	3,11192	,332	-15,6288	4,3021
Ultra-pura	Mar	-6,96333	3,11192	,193	-16,9288	3,0021
	_ Residual	-11,71667 ⁺	3,11192	,023	-21,6821	-1,7512
	Superficial	5,66333	3,11192	,332	-4,3021	15,6288

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.26 – Tabela ANOVA para o MEF, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	1297,165	3	432,388	24,637	,000
Dentro das amostras	140,403	8	17,550		
Total	1437,567	11			

Tabela G.27 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o MEF, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Residual	-7,81025	3,42056	,181	-18,7641	3,1436
	_ Superficial	12,75319*	3,42056	,024	1,7994	23,7070
	Ultra-pura	18,65308*	3,42056	,003	7,6993	29,6069
Residual	Mar	7,81025	3,42056	,181	-3,1436	18,7641
	_ Superficial	20,56344*	3,42056	,001	9,6096	31,5173
	Ultra-pura	26,46333*	3,42056	,000	15,5095	37,4172
Superficial	Mar	-12,75319*	3,42056	,024	-23,7070	-1,7994
	_ Residual	-20,56344*	3,42056	,001	-31,5173	-9,6096
	Ultra-pura	5,89989	3,42056	,372	-5,0539	16,8537
Ultra-pura	Mar	-18,65308*	3,42056	,003	-29,6069	-7,6993
	_ Residual	-26,46333*	3,42056	,000	-37,4172	-15,5095
	Superficial	-5,89989	3,42056	,372	-16,8537	5,0539

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.28 – Tabela ANOVA para o GEM, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	421,181	3	140,394	6,554	,015
Dentro das amostras	171,380	8	21,423		
Total	592,561	11			

Tabela G.29 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o GEM, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PDMS.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Residual	3,52000	3,77911	,790	-8,5820	15,6220
	_ Superficial	6,24333	3,77911	,405	-5,8587	18,3454
	Ultra-pura	-9,43667	3,77911	,135	-21,5387	2,6654
Residual	Mar	-3,52000	3,77911	,790	-15,6220	8,5820
	_ Superficial	2,72333	3,77911	,886	-9,3787	14,8254
	Ultra-pura	-12,95667 [*]	3,77911	,036	-25,0587	-,8546
Superficial	Mar	-6,24333	3,77911	,405	-18,3454	5,8587
	_ Residual	-2,72333	3,77911	,886	-14,8254	9,3787
	Ultra-pura	-15,68000 [*]	3,77911	,014	-27,7820	-3,5780
Ultra-pura	Mar	9,43667	3,77911	,135	-2,6654	21,5387
	_ Residual	12,95667 [*]	3,77911	,036	,8546	25,0587
	Superficial	15,68000 [*]	3,77911	,014	3,5780	27,7820

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.30 – Tabela ANOVA para o GEM, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	3795,378	3	1265,126	162,862	,000
Dentro das amostras	62,145	8	7,768		
Total	3857,522	11			

Tabela G.31 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o GEM, no estudo de efeitos de matriz utilizando como fase extractiva o PU.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Residual	-,95052	2,27568	,974	-8,2381	6,3370
	Superficial	33,01615*	2,27568	,000	25,7286	40,3037
	Ultra-pura	-15,56385*	2,27568	,001	-22,8514	-8,2763
Residual	Mar	,95052	2,27568	,974	-6,3370	8,2381
	Superficial	33,96667*	2,27568	,000	26,6791	41,2542
	Ultra-pura	-14,61333*	2,27568	,001	-21,9009	-7,3258
Superficial	Mar	-33,01615*	2,27568	,000	-40,3037	-25,7286
	Residual	-33,96667*	2,27568	,000	-41,2542	-26,6791
	Ultra-pura	-48,58000*	2,27568	,000	-55,8675	-41,2925
Ultra-pura	Mar	15,56385*	2,27568	,001	8,2763	22,8514
	Residual	14,61333*	2,27568	,001	7,3258	21,9009
	Superficial	48,58000*	2,27568	,000	41,2925	55,8675

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

G4 – Acetaminofeno e cafeína**Tabela G.32** – Tabela ANOVA para o ACF, no estudo de reutilização dos micro-dispositivos.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	299,686	9	33,298	1,534	,203
Dentro das amostras	434,031	20	21,702		
Total	733,717	29			

Tabela G.33 – Tabela ANOVA para a CAF, no estudo de reutilização dos micro-dispositivos.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	406,890	9	45,210	2,371	,052
Dentro das amostras	381,349	20	19,067		
Total	788,239	29			

Tabela G.34 – Tabela ANOVA obtida no estudo do tempo de armazenamento do ACF nos micro-dispositivos.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	270,657	5	54,131	2,096	,136
Dentro das amostras	309,913	12	25,826		
Total	580,571	17			

Tabela G.35 – Tabela ANOVA obtida no estudo do tempo de armazenamento da CAF nos micro-dispositivos.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	84,839	5	16,968	,864	,532
Dentro das amostras	235,606	12	19,634		
Total	320,444	17			

Tabela G.36 – Tabela ANOVA obtida no estudo da recuperação do ACF após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	632,531	4	158,133	7,721	,004
Dentro das amostras	204,806	10	20,481		
Total	837,336	14			

Tabela G.37 – Teste de comparações múltiplas Tukey obtida no estudo da recuperação do ACF após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
HCl	<i>n</i> -hexano	14,77259*	3,69509	,017	2,6117	26,9334
	MeOH	,41682	3,69509	1,000	-11,7440	12,5777
	NaOH	-2,43962	3,69509	,961	-14,6005	9,7212
	Original	-2,63577	3,69509	,949	-14,7966	9,5251
<i>n</i> -hexano	HCl	-14,77259*	3,69509	,017	-26,9334	-2,6117
	MeOH	-14,35577*	3,69509	,020	-26,5166	-2,1949
	NaOH	-17,21221*	3,69509	,006	-29,3731	-5,0514
	Original	-17,40836*	3,69509	,006	-29,5692	-5,2475
MeOH	HCl	-,41682	3,69509	1,000	-12,5777	11,7440
	<i>n</i> -hexano	14,35577*	3,69509	,020	2,1949	26,5166
	NaOH	-2,85644	3,69509	,933	-15,0173	9,3044
	Original	-3,05259	3,69509	,916	-15,2134	9,1083
NaOH	HCl	2,43962	3,69509	,961	-9,7212	14,6005
	<i>n</i> -hexano	17,21221*	3,69509	,006	5,0514	29,3731
	MeOH	2,85644	3,69509	,933	-9,3044	15,0173
	Original	-,19615	3,69509	1,000	-12,3570	11,9647
Original	HCl	2,63577	3,69509	,949	-9,5251	14,7966
	<i>n</i> -hexano	17,40836*	3,69509	,006	5,2475	29,5692
	MeOH	3,05259	3,69509	,916	-9,1083	15,2134
	NaOH	,19615	3,69509	1,000	-11,9647	12,3570

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.38 – Tabela ANOVA obtida no estudo da recuperação da CAF após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	42,316	4	10,579	,409	,799
Dentro das amostras	258,945	10	25,895		
Total	301,261	14			

Tabela G.39 – Tabela ANOVA obtida no estudo de comparação da recuperação do ACF pelas técnicas MSA μ E e BA μ E.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	34,003	1	34,003	1,086	,322
Dentro das amostras	313,183	10	31,318		
Total	347,187	11			

Tabela G.40 – Tabela ANOVA obtida no estudo de comparação da recuperação da CAF pelas técnicas MSA μ E e BA μ E.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	20,021	1	20,021	3,294	,100
Dentro das amostras	60,782	10	6,078		
Total	80,802	11			

Tabela G.41 – Tabela ANOVA para o ACF, no estudo de efeitos de matriz.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	1338,854	3	446,285	61,121	,000
Dentro das amostras	58,413	8	7,302		
Total	1397,268	11			

Tabela G.42 – Teste de comparações múltiplas Tukey para o ACF, no estudo de efeitos de matriz.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Residual	22,95667*	2,20631	,000	15,8913	30,0220
	_ Superficial	9,03333*	2,20631	,015	1,9680	16,0987
	Ultra-pura	-4,77667	2,20631	,213	-11,8420	2,2887
Residual	Mar	-22,95667*	2,20631	,000	-30,0220	-15,8913
	_ Superficial	-13,92333*	2,20631	,001	-20,9887	-6,8580
	Ultra-pura	-27,73333*	2,20631	,000	-34,7987	-20,6680
Superficial	Mar	-9,03333*	2,20631	,015	-16,0987	-1,9680
	_ Residual	13,92333*	2,20631	,001	6,8580	20,9887
	Ultra-pura	-13,81000*	2,20631	,001	-20,8754	-6,7446
Ultra-pura	Mar	4,77667	2,20631	,213	-2,2887	11,8420
	_ Residual	27,73333*	2,20631	,000	20,6680	34,7987
	Superficial	13,81000*	2,20631	,001	6,7446	20,8754

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.43 – Tabela ANOVA para a CAF, no estudo de efeitos de matriz.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	1567,491	3	522,497	69,034	,000
Dentro das amostras	60,550	8	7,569		
Total	1628,041	11			

Tabela G.44 – Teste de comparações múltiplas Tukey para a CAF, no estudo de efeitos de matriz.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
Mar	Residual	21,78333*	2,24629	,000	14,5899	28,9767
	Superficial	-5,63667	2,24629	,133	-12,8301	1,5567
	Ultra-pura	-6,34333	2,24629	,085	-13,5367	,8501
Residual	Mar	-21,78333*	2,24629	,000	-28,9767	-14,5899
	Superficial	-27,42000*	2,24629	,000	-34,6134	-20,2266
	Ultra-pura	-28,12667*	2,24629	,000	-35,3201	-20,9333
Superficial	Mar	5,63667	2,24629	,133	-1,5567	12,8301
	Residual	27,42000*	2,24629	,000	20,2266	34,6134
	Ultra-pura	-,70667	2,24629	,988	-7,9001	6,4867
Ultra-pura	Mar	6,34333	2,24629	,085	-,8501	13,5367
	Residual	28,12667*	2,24629	,000	20,9333	35,3201
	Superficial	,70667	2,24629	,988	-6,4867	7,9001

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

G5 – Antibióticos**Tabela G.45** – Tabela ANOVA para o STZ, no estudo de reutilização dos micro-dispositivos.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	27,016	3	9,005	,515	,684
Dentro das amostras	140,013	8	17,502		
Total	167,029	11			

Tabela G.46 – Tabela ANOVA para o SMX, no estudo de reutilização dos micro-dispositivos.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	2,323	3	,774	,029	,993
Dentro das amostras	213,873	8	26,734		
Total	216,197	11			

Tabela G.47 – Tabela ANOVA para o SDM, no estudo de reutilização dos micro-dispositivos.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	24,767	3	8,256	,173	,912
Dentro das amostras	381,513	8	47,689		
Total	406,280	11			

Tabela G.48 – Tabela ANOVA obtida no estudo da recuperação do STZ após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	706,989	4	176,747	6,942	,006
Dentro das amostras	254,587	10	25,459		
Total	961,577	14			

Tabela G.49 – Teste de comparações múltiplas Tukey obtida no estudo da recuperação do STZ após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
HCl	<i>n</i> -hexano	16,78000*	4,11977	,015	3,2215	30,3385
	MeOH	13,62000*	4,11977	,049	,0615	27,1785
	NaOH	,53333	4,11977	1,000	-13,0252	14,0918
	Original	4,66667	4,11977	,787	-8,8918	18,2252
<i>n</i> -hexano	HCl	-16,78000*	4,11977	,015	-30,3385	-3,2215
	MeOH	-3,16000	4,11977	,934	-16,7185	10,3985
	NaOH	-16,24667*	4,11977	,018	-29,8052	-2,6882
	Original	-12,11333	4,11977	,086	-25,6718	1,4452
MeOH	HCl	-13,62000*	4,11977	,049	-27,1785	-,0615
	<i>n</i> -hexano	3,16000	4,11977	,934	-10,3985	16,7185
	NaOH	-13,08667	4,11977	,060	-26,6452	,4718
	Original	-8,95333	4,11977	,264	-22,5118	4,6052
NaOH	HCl	-,53333	4,11977	1,000	-14,0918	13,0252
	<i>n</i> -hexano	16,24667*	4,11977	,018	2,6882	29,8052
	Metanol	13,08667	4,11977	,060	-,4718	26,6452
	Original	4,13333	4,11977	,848	-9,4252	17,6918
Original	HCl	-4,66667	4,11977	,787	-18,2252	8,8918
	<i>n</i> -hexano	12,11333	4,11977	,086	-1,4452	25,6718
	MeOH	8,95333	4,11977	,264	-4,6052	22,5118
	NaOH	-4,13333	4,11977	,848	-17,6918	9,4252

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.50 – Tabela ANOVA obtida no estudo da recuperação do SMX após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	420,537	4	105,134	3,744	,041
Dentro das amostras	280,816	10	28,082		
Total	701,353	14			

Tabela G.51 – Teste de comparações múltiplas Tukey obtida no estudo da recuperação do SMX após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
HCl	<i>n</i> -hexano	13,40667	4,32678	,067	-,8331	27,6465
	MeOH	10,55667	4,32678	,182	-3,6831	24,7965
	NaOH	3,87333	4,32678	,892	-10,3665	18,1131
	Original	1,07333	4,32678	,999	-13,1665	15,3131
<i>n</i> -hexano	HCl	-13,40667	4,32678	,067	-27,6465	,8331
	MeOH	-2,85000	4,32678	,961	-17,0898	11,3898
	NaOH	-9,53333	4,32678	,253	-23,7731	4,7065
	Original	-12,33333	4,32678	,099	-26,5731	1,9065
MeOH	HCl	-10,55667	4,32678	,182	-24,7965	3,6831
	<i>n</i> -hexano	2,85000	4,32678	,961	-11,3898	17,0898
	NaOH	-6,68333	4,32678	,560	-20,9231	7,5565
	Original	-9,48333	4,32678	,257	-23,7231	4,7565
NaOH	HCl	-3,87333	4,32678	,892	-18,1131	10,3665
	<i>n</i> -hexano	9,53333	4,32678	,253	-4,7065	23,7731
	Metanol	6,68333	4,32678	,560	-7,5565	20,9231
	Original	-2,80000	4,32678	,963	-17,0398	11,4398
Original	HCl	-1,07333	4,32678	,999	-15,3131	13,1665
	<i>n</i> -hexano	12,33333	4,32678	,099	-1,9065	26,5731
	MeOH	9,48333	4,32678	,257	-4,7565	23,7231
	NaOH	2,80000	4,32678	,963	-11,4398	17,0398

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

Tabela G.52 – Tabela ANOVA obtida no estudo da recuperação do SDM após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.

	Soma de quadrados	Graus liberdade	Médias quadráticas	F	p-valor
Entre amostras	716,672	4	179,168	4,568	,023
Dentro das amostras	392,201	10	39,220		
Total	1108,874	14			

Tabela G.53 – Teste de comparações múltiplas Tukey obtida no estudo da recuperação do SDM após a exposição dos micro-dispositivos a diferentes meios durante 48 h.

(I) id_matriz	(J) id_matriz	I-J	Erro padrão	p-valor	Intervalo de confiança 95 %	
					Limite inferior	Limite superior
HCl	<i>n</i> -hexano	14,91667	5,11339	,089	-1,9119	31,7453
	MeOH	17,06667*	5,11339	,047	,2381	33,8953
	NaOH	2,90667	5,11339	,977	-13,9219	19,7353
	Original	3,60000	5,11339	,951	-13,2286	20,4286
<i>n</i> -hexano	HCl	-14,91667	5,11339	,089	-31,7453	1,9119
	MeOH	2,15000	5,11339	,992	-14,6786	18,9786
	NaOH	-12,01000	5,11339	,207	-28,8386	4,8186
	Original	-11,31667	5,11339	,250	-28,1453	5,5119
MeOH	HCl	-17,06667*	5,11339	,047	-33,8953	-,2381
	<i>n</i> -hexano	-2,15000	5,11339	,992	-18,9786	14,6786
	NaOH	-14,16000	5,11339	,112	-30,9886	2,6686
	Original	-13,46667	5,11339	,137	-30,2953	3,3619
NaOH	HCl	-2,90667	5,11339	,977	-19,7353	13,9219
	<i>n</i> -hexano	12,01000	5,11339	,207	-4,8186	28,8386
	Metanol	14,16000	5,11339	,112	-2,6686	30,9886
	Original	,69333	5,11339	1,000	-16,1353	17,5219
Original	HCl	-3,60000	5,11339	,951	-20,4286	13,2286
	<i>n</i> -hexano	11,31667	5,11339	,250	-5,5119	28,1453
	MeOH	13,46667	5,11339	,137	-3,3619	30,2953
	NaOH	-,69333	5,11339	1,000	-17,5219	16,1353

*A diferença é significativa para um nível 0,05.

