

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS



Ciências
ULisboa

Metodologias Analíticas Inovadoras Baseadas em Microextração Adsorptiva em Barra (BA μ E) para a Monitorização de Contaminantes e Substâncias de Abuso Emergentes em Matrizes Ambientais e Biológicas

“ Documento Definitivo ”

Doutoramento em Química
Especialidade de Química Analítica

Samir Marcos Esmail Ahmad

Tese orientada por:
Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira

Documento especialmente elaborado para a obtenção do grau de doutor

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS



**Ciências
ULisboa**

Metodologias Analíticas Inovadoras Baseadas em Microextração Adsorptiva em Barra (BAμE) para a Monitorização de Contaminantes e Substâncias de Abuso Emergentes em Matrizes Ambientais e Biológicas

Doutoramento em Química

Especialidade de Química Analítica

Samir Marcos Esmail Ahmad

Tese orientada por:

Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira

Júri:

Presidente:

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

Vogais:

- Doutora Cristina Maria Fernandes Delerue Alvim de Matos, Professora Coordenadora Principal do Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto
- Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro
- Doutor José de Sousa Câmara, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências Exatas e de Engenharia da Universidade da Madeira
- Doutora Margaria Maria Portela Correia dos Santos Romão, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa
- Doutor José Manuel Florêncio Nogueira, Professor Associado com Agregação da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Orientador
- Doutor Nuno da Rosa Neng, Investigador Doutorado da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

A presente tese foi elaborada em colaboração com investigadores do Centro de Química e Bioquímica da FCUL.

A presente dissertação teve o financiamento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (UID/MULTI/00612/2013, UID/MULTI/00612/2019 e SFRH/BD/107892/2015).

Documento especialmente elaborado para a obtenção do grau de doutor

Prefácio

A água é um dos bens mais preciosos da humanidade. A disponibilidade de água livre de contaminantes é indispensável para o desenvolvimento sustentável de qualquer nação, sendo essencial legislação e mecanismos que forcem esta necessidade. Por outro lado, tem havido crescente preocupação com o consumo tanto de substâncias de abuso lícitas como de ilícitas, tendo um tremendo impacto económico e social nas sociedades contemporâneas. No entanto, tanto para o primeiro como para o segundo caso, os compostos estão normalmente presentes a nível vestigial, sendo necessárias metodologias analíticas inovadoras que permitam a sua monitorização em matrizes ambientais e biológicas, sem descuidar os princípios da Química Analítica Verde. Neste sentido, os métodos analíticos deverão contemplar abordagens mais simples e amigas do utilizador, que empreguem menor uso de solventes orgânicos e que apresentem boa relação custo-benefício, sem nunca comprometer o desempenho analítico.

A presente dissertação, intitulada “Metodologias Analíticas Inovadoras Baseadas em Microextração Adsorptiva em Barra (BA μ E) para a Monitorização de Contaminantes e Substâncias de Abuso Emergentes em Matrizes Ambientais e Biológicas”, resulta do desenvolvimento, otimização, validação e aplicação de abordagens analíticas baseadas em microextração adsorptiva em barra (BA μ E) para a monitorização de contaminantes emergentes (principalmente fármacos) em matrizes ambientais, como águas estuarinas, fluviais, de mar, entre outras. Foram igualmente desenvolvidas metodologias para a determinação de substâncias de abuso em amostras de urina, soro, plasma e fluido oral. Para a presente dissertação foi igualmente introduzida uma nova abordagem analítica baseada em BA μ E, a microextração adsorptiva em barra de alto rendimento (HT-BA μ E). Este novo *apparatus* e ciclo analítico permitem realizar, de uma forma simples e eficaz, o enriquecimento de até 100 amostras em simultâneo. Todas as metodologias desenvolvidas pautaram-se pelo excelente custo-benefício e bom desempenho analítico.

No decorrer da presente dissertação, foram realizadas diversas publicações e submissões em revistas internacionais da especialidade com arbitragem científica, assim como comunicações em painel e orais em encontros

científicos nacionais e internacionais, tendo sido possível rever um manuscrito por convite de uma revista internacional da especialidade com arbitragem científica, como de seguida se indica:

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

- **S.M. Ahmad**, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction (BA μ E) coated with mixed sorbent phases – Enhanced selectivity for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in real matrices in combination with capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography B, 1008 (2016) 115–124;
- A.H. Ide, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Enhancement for trace analysis of sulfonamide antibiotics in water matrices using bar adsorptive microextraction (BA μ E)*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 129 (2016) 593–599;
- B.B. Calado, **S.M. Ahmad**, C. Almeida, N. da R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Determination of trace levels of irgarol in estuarine water matrices by bar adsorptive microextraction*, Journal of Chromatographic Science, 54:8 (2016), 1453–1459;
- **S.M. Ahmad**, A.H. Ide, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Application of bar adsorptive microextraction to determine trace organic micro-pollutants in environmental water matrices*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 97:5 (2017) 484–498;
- C. Almeida, **S.M. Ahmad**, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction technique - application for the determination of pharmaceuticals in real matrices*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 409 (2017) 2093–2106;
- G.P.S. Maciel, E. Lazzari, T. Bjerk, **S.M. Ahmad**, J.M.F. Nogueira, A.P. Carvalho, E.B. Caramão, *Trace analysis of carbazole in commercial diesel by using adsorption on activated biochar from rice husk pyrolysis*, International Journal of Engineering Research & Science, 3 (2017) 46–57;
- F. Abujaber, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, F.J. Guzmán Bernardo, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction coated with multi-walled carbon nanotube phases -*

- Application for trace analysis of pharmaceuticals in environmental waters*, Journal of Chromatography A, 1600 (2019) 17–22;
- **S.M. Ahmad**, J.M.F. Nogueira, *High throughput bar adsorptive microextraction: A novel cost effective tool for monitoring benzodiazepines in large number of biological samples*, Talanta, 199 (2019) 195–202;
 - **S.M. Ahmad**, M.I. Gomes, A.H. Ide, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Monitoring traces of organochlorine pesticides in herbal matrices by bar adsorptive microextraction – Application to black tea and tobacco*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 00 (2019) 1–15;
 - **S. M. Ahmad**, J. M. F. Nogueira, *High Throughput Bar Adsorptive Microextraction: Simple and effective analytical approach for the determination of nicotine and cotinine in urine samples*, Journal of Chromatography A, em revisão, referência CHROMA-S-19-0204;
 - **S. M. Ahmad**, M.N. Oliveira, J. M. F. Nogueira, *Fast High Throughput Bar Adsorptive Microextraction (HT-BA μ E) for the Determination of Ketamine and Norketamine in Urine Samples*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, submetido, referência JPBA_2019_2591;
 - A.M. Segurado, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, H.M. Gaspar, J.M.F. Nogueira, *Development of a cost-effective strategy for rapid decision-making for the presence of three synthetic cathinones (MDPV, α -PVP and α -PVT) in oral fluids*, Forensic Science International, submetido, referência FSI-D-19-00997;
 - **S. M. Ahmad**, N. R. Neng, H.M. Gaspar, J. M. F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction (BA μ E) method for synthetic cannabinoid analysis in oral fluids*, Drug Testing and Analysis, *in preparation*;
 - **S.M. Ahmad**, A.S. Mestre, N.R. Neng, C.O. Ania, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, *Porous hydrochars as novel sorbent coating for the quantification of pharmaceutical compounds by bar adsorptive microextraction*, Applied Materials & Interface, *in preparation*;
 - M.N. Oliveira, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Application of New Generation Bar Adsorptive Microextraction for the determination of tricyclic antidepressants in urine samples*, Talanta, *in preparation*;

- **S.M. Ahmad**, B.B.C. Calado, M.N. Oliveira, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Enhancing the Performance of Bar Adsorptive Microextraction using Mixed Sorbent Phases - Application for monitoring benzotriazoles, benzothiazoles and benzenesulfonamides in environmental matrices*, *Molecules*, in preparation;
- **S.M. Ahmad**, A.H. Ide, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *10 years of bar adsorptive microextraction (BA μ E): A review*, *Analytica Chimica Acta*, in preparation;
- **S.M. Ahmad**, M.N. Oliveira, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Microextraction techniques for the enrichment of controlled substances in biological matrices*, *Journal of Chromatography B*, in preparation.

b) Comunicações orais em encontros científicos:

- XVI Congresso Latino-Americano de Cromatografia e 9º Encontro Nacional de Cromatografia (XVI COLACRO & 9ENC), 5 a 9 de janeiro de 2016, Lisboa, Portugal:
 - A.H. Ide, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction (BA μ E) for the determination of sulfonamides in water matrices*;
 - **S.M. Ahmad**, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction (BA μ E) coated with mixed sorbent phases – Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in real matrices in combination with capillary electrophoresis*.
- 40th International Symposium on Capillary Chromatography (40th ISCC), 29 de maio a 3 de junho de 2016, Riva del Garda, Itália:
 - **S.M. Ahmad**, A.S. Mestre, N.R. Neng, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, *Hydrochars as new coating material for bar adsorptive microextraction for the determination of pharmaceuticals and personal care products in aqueous matrices*.

- Beyond Adsorption I - Satellite Symposium to CARBON 2016, 16 de julho de 2016, Nova Iorque, Estados Unidos da América:
 - A.S. Mestre, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, C.O. Onia, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, *Porous carbons as promising enrichment materials for trace level analysis of pharmaceutical compound*
- XVI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques (XVI SECyTA), 2 a 4 de novembro de 2016, Sevilha, Espanha
 - **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, H.M. Gaspar, J.M.F. Nogueira, *Screening of synthetic cannabionoids in oral fluids by bar adsorptive microextraction.*
- CQB Day 2017, 31 de maio 2017, Lisboa, Portugal:
 - N.R. Neng, A.H. Ide, **S.M. Ahmad**, J.M.F. Nogueira, *Considerations on sample preparation in the age of Green Analytical Chemistry.*
- NPS – Desafios, Estratégias e Resultados, 1 de junho de 2017, Lisboa, Portugal:
 - **S.M. Ahmad**, *BA μ E: uma nova estratégia para o rastreio de canabinóides sintéticos em saliva.*
- 19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (Extech 2017), 27 a 30 junho de 2017, Santiago de Compostela, Espanha:
 - **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, H.M. Gaspar, J.M.F. Nogueira, *Application of bar adsorptive microextraction (BA μ E) for the screening of synthetic cannabinoids in oral fluids.*
- 7th International Conference on Carbon for Energy Storage and Environment Protection (CESEP'17), 23 a 26 de outubro de 2017, Lyon, França:

- A.S. Mestre, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, C.O. Onia, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, *Pharmaceuticals analysis by using hydrochars as effective enrichment phases.*

- 6th International Meeting on Forensic Science and Criminal Behaviour, 4 e 5 de maio de 2018, Monte da Caparica, Portugal:
 - **S.M. Ahmad**, *Contributo científico dos licenciados em ciências forenses para o avanço da investigação criminal.*

- Forensic Summit, 24 de maio de 2018, Monte da Caparica, Portugal:
 - **S.M. Ahmad**, *Impacto societal das ciências forenses – Portugal necessita de mais formação?*

- 9^o Encontro da Divisão de Química Analítica da Sociedade Portuguesa de Química (Analítica 2018), 26 a 27 de maio 2018, Porto, Portugal:
 - **S.M. Ahmad**, J.M.F. Nogueira, *High throughput bar adsorptive microextraction (HT-BA μ E) - a new effective approach to screen benzodiazepines in biological matrices.*

- 10^o Encontro Nacional de Cromatografia (10ENC), 4 a 6 de dezembro de 2018, Bragança, Portugal:
 - **S.M. Ahmad**, J.M.F. Nogueira. *High Throughput Bar Adsorptive Microextraction (HT-BA μ E): A novel cost-effective tool for monitoring psychotropic drugs in biological matrices.*

c) Comunicações em painel em encontros científicos:

- XVI Congresso Latino-Americano de Cromatografia e 9^o Encontro Nacional de Cromatografia (XVI COLACRO & 9ENC), 5 a 9 de janeiro de 2016, Lisboa, Portugal:

- A.H. Ide, A.M. Segurado, A.M. Fernandes, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Novel technologies for sample preparation using the green analytical chemistry principles*;
 - A.M. Segurado, **S.M. Ahmad**, C.R. Queirós, N.R. Neng, H.M. Gaspar, J.M.F. Nogueira, *Application of a new analytical approach for the determination of psychoactive cathinones in oral fluid*;
 - **S.M. Ahmad**, M.I. Gomes, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Determination of organochlorine pesticides in black tea and tobacco by bar adsorptive microextraction*;
 - **S.M. Ahmad**, A.S. Mestre, N.R. Neng, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, *Hydrochars as new coating material for bar adsorptive microextraction for the determination of pharmaceuticals and personal care products in aqueous matrices*;
 - **S.M. Ahmad**, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction (BA μ E) coated with mixed sorbent phases – Determination of non steroidal anti-inflammatory drugs in aqueous matrice*;
 - **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Application of bar adsorptive microextraction for trace level analysis of water pollutants included in the “European Union water framework directive’s ‘watch list’ for priority substances”*;
 - G.P.S. Maciel, **S.M. Ahmad**, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, E.B. Caramão, *Removal of indole and carbazole from commercial diesel using activated carbon obtained from rice husk pyrolysis*.
- 40th International Symposium on Capillary Chromatography (40th ISCC), 29 maio a 3 junho de 2016, Riva del Garda, Itália:
 - N.R. Neng, A.M. Segurado, A.M. Fernandes, A.H. Ide, **S.M. Ahmad**, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction (BA μ E): an outstanding analytical tool for trace analysis*;
 - A.M.S. Fernandes, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Application of hollow fibers as effective phases for floating sampling technology - the role on the sorption-desorption steps*;

- A.M. Segurado, **S.M. Ahmad**, C.R. Queirós, N.R. Neng, H.M. Gaspar, J.M.F. Nogueira, *BA μ E: A new approach for the analysis of pschoactive cathinones in oral fluid*;
- A.H. Ide, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *New generation BA μ E devices for microextraction analysis*.

- 8º Encontro da Divisão de Química Analítica da Sociedade Portuguesa de Química (Analítica 2016), 6 a 7 de junho de 2016, Lisboa, Portugal:
 - A.H. Ide, A.M. Segurado, A.M. Fernandes, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction (BA μ E) - A simple, robust and effective sample preparation technique*.

- CQB Day 2016, 28 de junho de 2016, Lisboa, Portugal:
 - A.H. Ide, A.M. Fernandes, A.M. Segurado, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *New developments for sample preparation based on floating sampling technology*.

- Chem&Biochem Post Graduate Student Meeting of FCUL 2017, 9 de fevereiro de 2017, Lisboa, Portugal:
 - **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, H.M. Gaspar, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction – screening of synthetic cannabinoids in oral fluids*.

- 19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (Extech 2017), 27 a 30 de junho de 2017, Santiago de Compostela, Espanha:
 - B.B.C. Calado, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Enhanced the performance of bar adsorptive microextraction using mixed sorbent phases - application for monitoring benzotriazoles, benzothiazoles and benzenesulfonamides in environmental matrices*.

- CQE Days – Spring Meeting, 30 e 31 de maio de 2019, Lisboa, Portugal:

- S.C.F. Amorim, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F Nogueira, *Analysis of the aroma profile of wines samples by headspace using novel microextraction techniques*;
 - **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F Nogueira, *High throughput bar adsorptive microextraction (HT-BA μ E) – Application for monitoring nicotine and cotinine in large number of urine samples*;
 - M.N. Oliveira, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F Nogueira, *Development of an analytical method for the determination of 6 tricyclic antidepressants in biological matrices*;
 - J.M.M. Praça, O.C. Gonçalves, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F Nogueira, *Insights of sorbent selectivity and ph effects on bar adsorptive microextraction*.
- 4^o Encontro do Colégio de Química da Universidade de Lisboa (4ECQUL), 16 a 19 de julho de 2019, Lisboa, Portugal:
 - M.N. Oliveira, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Applying bar adsorptive microextraction (BA μ E) for the determination of tricyclic antidepressants*;
 - **S.M. Ahmad**, J.M.F. Nogueira, *Application of high throughput bar adsorptive microextraction (HT-BA μ E) for the simultaneous enrichment of ketamine and norketamine from large number of urine matrices*.
 - XVII Congresso Latino-Americano de Cromatografia (XVII COLACRO), 14 a 19 de julho de 2019, Aracaju, Brasil:
 - M.N. Oliveira, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Determination of tricyclic antidepressants in biological matrices by bar adsorptive microextraction (BA μ E)*;
 - **S.M. Ahmad**, J.M.F. Nogueira, *High throughput bar adsorptive microextraction (HT-BA μ E): a cost-effective tool to monitor nicotine and cotinine levels in large number of urine samples*;
 - L.F.D. Santos, **S.M. Ahmad**, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, S. Navickiene, *Application of bar adsorptive microextraction (BA μ E) for the determination of norharman and harman in cigarettes*.

d) Revisão de manuscrito por convite de uma revista internacional da especialidade com arbitragem científica:

- International Journal of Environmental Analytical Chemistry, Print ISSN: 0306-7319, Online ISSN: 1029-0397, CiteScore (2018) 1.43, 2019.

Agradecimentos

A todas as pessoas e instituições que contribuíram para a execução desta dissertação, deixo aqui o meu profundo agradecimento.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo financiamento da bolsa individual de doutoramento (SFRH/BD/107892/2015), assim como à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, nomeadamente ao Departamento de Química e Bioquímica, ao Centro de Química e Bioquímica e ao Centro de Química Estrutural, pelo acolhimento e desenvolvimento com sucesso da presente tese.

Ao Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira, agradeço a orientação com rigor e autonomia, a amizade e a boa disposição. Fico-lhe muito agradecido por me ter aceitado como seu aluno ao longo de todos estes anos.

À Doutora Helena Gaspar, pelo trabalho em colaboração, pela amizade e por me ter aceitado como seu monitor e assistente em várias unidades curriculares.

À Professora Doutora Ana Paula Carvalho e à Doutora Ana Mestre pelo trabalho em colaboração e pelo esclarecimento de mecanismos de adsorção.

À Professora Doutora Ana Paula Paiva e Ana Viana pelo acompanhamento da presente dissertação e pela coordenação do doutoramento.

À Doutora Cristina Oliveira pelo uso do agitador orbital.

Ao Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária pela cedência dos canabinóides sintéticos usados na presente tese.

À Clínica Joaquim Chaves Saúde, e em especial ao Dr. Carlos Cardoso, pelas amostras de plasma, soro e urina.

À Estação de Tratamento de Águas Residuais de Alcântara pelas amostras de efluentes.

A todos os voluntários anónimos que forneceram amostras biológicas para a conclusão dos vários estudos da presente tese.

À Professora Doutora Nathalie Antunes-Ferreira, à Professora Doutora Alexandra Bernardo, à Professora Doutora Paula Silva, e em especial, ao Professor Doutor Alexandre Quintas do Instituto Universitário Egas Moniz, a oportunidade de demonstrar os conhecimentos adquiridos.

Ao Doutor Carlos Almeida, ao Doutor Nuno Neng e à Doutora Alessandra Ide, pela amizade, auxílio e convívio ao longo destes anos.

A todos os colegas do Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar, do Laboratório de Espetrometria de Massa e dos demais laboratórios do DQB, em especial àqueles que tive oportunidade trabalhar e colaborar.

À minha família e amigos pelo apoio incondicional.

Os meus mais profundos agradecimentos aos meus sogros, ao Sr. Armando, à Dona Alice, ao Sr. José, e especialmente à Dona Delfina, pela ajuda nos momentos mais atribulados, pela compreensão e por me terem aceitado como vosso “neto” e “filho”. Nunca esquecerei a vossa amizade.

Como sempre, a minha maior gratidão vai para a minha querida mãe, Idália Marcos, para os meus irmãos, Adhil e Aminah, e para o Bejekas, que sempre serão minha parte integrante e sem os quais não imagino que este trabalho fosse possível.

Finalmente, nunca existirão palavras para reconhecer e agradecer o apoio que a minha esposa, Susana Martins Fonseca, me proporcionou ao longo de todos estes anos. O seu amor e amizade permitiram que a presente tese fosse finalizada com sucesso. Este amor culminou com o nascimento do nosso querido filho, Mateus, que nos deu forças redobradas para perseguir os nossos sonhos. Amo-vos hoje, mais do que ontem, e menos que amanhã!

Resumo

A monitorização vestigial de contaminantes e substâncias de abuso emergentes em matrizes ambientais e biológicas é uma tarefa de grande relevância na sociedade contemporânea, exigindo sempre uma etapa de 'preparação da amostra' prévia à análise instrumental. Neste contexto, são recorrentemente adotadas técnicas de microextração que promovam o enriquecimento dos analitos alvo por forma a incrementar a sensibilidade e a seletividade das metodologias analíticas.

As técnicas de microextração estática têm vindo a adquirir notoriedade, uma vez que, para além de apresentarem bom desempenho e custo-benefício adequado, contemplam ainda os princípios da Química Analítica Verde. A técnica de microextração adsortiva em barra (BA μ E), em particular, destaca-se das demais, uma vez permitir selecionar a melhor fase sorvente para determinada aplicação, apresentar elevada simplicidade e robustez, para além de comprovada eficácia no enriquecimento de classes de compostos com diferentes propriedades físico-químicas em diversos tipos de matrizes.

A presente dissertação propõe metodologias analíticas inovadoras baseadas em BA μ E para a monitorização vestigial de contaminantes (ex., produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, etc.), bem como de substâncias de abuso (ex., canabinóides sintéticos, etc.) emergentes em matrizes ambientais (ex., água estuarina, etc.) e biológicas (ex., urina, etc.). Durante o desenvolvimento, foram introduzidos diversos avanços por forma a melhorar o desempenho analítico da técnica, em particular com recurso a novos materiais sorventes (ex., hidrocarbonizados porosos, etc.) para revestimento dos dispositivos, assim como a introdução de uma nova configuração experimental, a BA μ E de alto rendimento (HT-BA μ E). Esta abordagem inovadora possibilita, de forma simples e conveniente, a microextração e subsequente retroextração de até 100 amostras em simultâneo. Globalmente, os resultados demonstraram que as metodologias propostas são simples, amigas do ambiente e com custo-benefício vantajoso. As inovações propostas evidenciaram grande abrangência, versatilidade, eficiência e robustez, sendo alternativas inequívocas sempre que as aplicações exijam tomadas de decisão rápidas.

Palavras-chave

Microextração adsortiva em barra (BA μ E)

Microextração adsortiva em barra de alto rendimento (HT-BA μ E)

Contaminantes emergentes

Substâncias de abuso

Matrizes reais

Abstract

The trace monitoring of emerging contaminants and substances of abuse in environmental and biological matrices is a relevant task in contemporary society, always requiring a 'sample preparation' step prior to instrumental analysis. In this regard, microextraction techniques that lead to the enrichment of the target analytes are commonly employed in order to increment the sensitivity and selectivity of the analytical methodologies.

Static microextraction techniques have been gaining notoriety, once they present good performance and adequate cost-effectiveness, as well as taking into account the principles of Green Analytical Chemistry. Bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique, in particular, stands out from the others, once it allows to choose of the best sorbent phase for a given application, it presents high simplicity and robustness, as well as having proven effectiveness for the enrichment of classes of compounds with different physico-chemical properties in the most varied matrices.

The present dissertation proposes innovative BA μ E-based analytical methodologies for trace monitoring of emerging contaminants (*e.g.*, pharmaceutical and personal care products) and substances of abuse (*e.g.*, synthetic cannabinoids, etc.) in environmental (*e.g.*, estuarine water, etc.) and biological matrices (*e.g.*, urine). During the development, several advances were introduced in order to enhance the analytical performance of the technique, namely in the use of new sorbent materials (*e.g.*, porous hydrochars, etc.) as coating for the devices, as well as the introduction of a new experimental configuration, high-throughput BA μ E (HT-BA μ E). This innovative approach allows for a simple and convenient simultaneous microextraction and subsequent back-extraction of up to 100 samples. In general, the results demonstrated that the proposed methodologies are simple, environmentally friendly and advantageous cost-effectiveness, allowing to achieve considerable analytical performance. The proposed innovations showed great comprehensiveness, versatility, efficiency and robustness, being unequivocal alternatives whenever the applications require rapid decision making.

Keywords

Bar adsorptive microextraction (BA μ E)

High throughput bar adsorptive microextraction (HT-BA μ E)

Emerging contaminants

Substances of abuse

Real matrices

Abreviaturas, acrónimos e símbolos

μLD	Microdessorção líquida (do inglês <i>Microliquid Desorption</i>)
½BAμE	Microextração adsortiva em barra miniaturizada (do inglês <i>Half Bar Adsorptive Microextraction</i>)
1-PrOH	Propan-1-ol
2-PrOH	Propan-2-ol
5F-UR-144	[1-(5-fluoropentil)indol-3-il]-(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)metanona
96-blade SPME	Microextração em fase sólida em camada fina automatizada (do inglês <i>Automated Thin-Film Solid-Phase Microextraction</i>)
AC	Carvão ativado
ACN	Acetonitrilo
ALD	Aldrina
AM-694	1-[(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il]-(2-iodofenil)metanona
AMT	Cloridrato de amitriptilina
APINACA	<i>N</i> -(1-adamantil)-1-pentilindazole-3-carboxamida
BAμE	Microextração adsortiva em barra (do inglês <i>Bar Adsorptive Microextraction</i>)
BGE	Tampão ou eletrólito de corrida (do inglês <i>Background Electrolyte</i>)
BMA	Butil-metacrilato
C18	Octadecilo
C8	Octilo
CE	Eletroforese capilar (do inglês <i>Capillary Electrophoresis</i>)
CEC-UV	Eletrocromatografia capilar-detector de ultravioleta (do inglês <i>Capillary Electrochromatography-Ultra-Violet Detector</i>)
CE-MS	Eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massa (do inglês <i>Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry</i>)
CFA	Ácido clofíbrico
CMZ	Carbamazepina
CNT	Nanotubo de carbono (do inglês <i>Carbon Nanotube</i>)
CQB	Centro de Química e Bioquímica
CS	Canabinóide sintético
Cumyl-5F-	1-(5-fluoropentil)- <i>N</i> -(2-fenilpropan-2-il)indazole-3-carboxamida
PINACA	
CW/TPR	Resina de Carbowax
DAD	Deteção por rede de díodos (do inglês <i>Diode Array Detection</i>)
DCF	Diclofenac
DDD	4,4'-diclorodifenildicloroetano
DDE	4,4'-diclorodifenildicloroetileno
DDT	4,4'-diclorodifeniltricloroetano
DIE	Dieldrina

DI-SPME	Microextração em fase sólida por imersão direta (do inglês <i>Direct Immersion Solid-Phase Microextraction</i>)
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês <i>Liquid-Liquid Microextraction</i>)
DOT	Cloridrato de dosulepina
dSPE	Extração em fase sólida dispersiva (do inglês <i>Dispersive Solid-Phase Extraction</i>)
DVB	Divinilbenzeno
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
EE2	17 α -etinilestradiol
EE-DI-SPME	Microextração em fase sólida por imersão direta auxiliada por potenciais elétricos (do inglês <i>Electroenhanced Direct Immersion Solid-Phase Microextraction</i>)
EG	Etilenoglicol
EMCDDA	Centro Europeu de Monitorização de Drogas e Toxicodependência (do inglês <i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>)
END	Endrina
ENDA	Aldeído de endrina
ENDK	Cetona de endrina
ESS	Sulfato de endosulfan
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
EtOH	Etanol
ETS	Exposição ambiental ao fumo do tabaco (do inglês <i>Environmental Tobacco Smoke</i>)
EVB	Etildivinilbenzeno
Fru	Frutose
FCUL	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
FUR	Furosemida
Glc	Glucose
GAC	Química analítica verde (do inglês <i>Green Analytical Chemistry</i>)
GC	Cromatografia em fase gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i>)
GC-FID	Cromatografia em fase gasosa com deteção de ionização por chama (do inglês <i>Gas Chromatography-Flame Ionization Detection</i>)
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espetrometria de massa (do inglês <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
GC-MS/MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espetrometria de massa em - <i>Tandem</i> (do inglês <i>Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i>)

GCxGC-MS	Cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massa (do inglês <i>Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
GFB	Gemfibrozil
GO-D- μ -SPE	Micro-extração em fase sólida à base de óxido de grafeno (do inglês <i>Graphene Oxide-Based Dispersive Micro-Solid Phase Extraction</i>)
HC	Hidrocarbonizado poroso (do inglês <i>Porous Hydrochar</i>)
HCE	Heptacloro epóxico
HCL	Heptacloro
HF	Fibra oca
HF μ E	Microextração em fibra oca (do inglês <i>Hollow Fiber Microextraction</i>)
HF-LPME	Microextração em fase líquida suportada por fibra oca (do inglês <i>Hollow Fibre Liquid-Phase Microextraction</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HS-SPME	Microextração em fase sólida por <i>headspace</i> (do inglês <i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i>)
HT-BA μ E	Microextração adsortiva em barra de alto rendimento (do inglês <i>High-Throughput Bar Adsorptive Microextraction</i>)
H-U-HF-LPME	Técnica de alto rendimento de microextração em fase líquida suportada por fibra oca e assistida por ultrassons (do inglês <i>High-Throughput Ultrasonication Enhanced Hollow-Fibre Liquid-Phase Microextraction</i>)
IMP	Cloridrato de imipramina
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.
JWH-018	Naftalen-1-il-(1-pentilindol-3-il)metanona
JWH-122	(4-metilnaftalen-1-il)-(1-pentilindol-3-il)metanona
KET	Cetamina
KET	Cetoprofeno
LC	Cromatografia em fase líquida (do inglês, <i>Liquid Chromatography</i>)
LC-MS	Cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massa (do inglês <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em <i>Tandem</i> (do inglês <i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i>)
LC-TOF/MS	Cromatografia líquida-espectrometria de massa por tempo de voo (do inglês <i>Liquid Chromatography-Time-Of-Flight/Mass Spectrometry</i>)
LD	Dessorção líquida
LDTD/APCI-MS/MS	Desorção térmica por laser de diodo/ionização química por pressão atmosférica acoplada à espectrometria de massa em <i>Tandem</i> (do inglês <i>Diode Laser Diode Thermal Desorption/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>)

LLE	Extração líquido-líquido (do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LLLME	Microextração líquido-líquido-líquido (do inglês <i>Liquid-Liquid-Liquid Microextraction</i>)
LLOQ	Limite inferior de quantificação
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LPC	Laboratório de Polícia Científica
LPME	Microextração em fase líquida (do inglês <i>Liquid Phase Microextraction</i>)
LSD	Dietilamida do ácido lisérgico
LVI	Injeção de grandes volumes (do inglês <i>Large Volume Injection</i>)
MAM-2201	[1-(5-fluoropentil)indol-3-il]-(4-metilnaftalen-1-il)metanona
MCL	Metoxicloro
MDPBP	4'-metilenodioxo- α -pirrolidinobutiofenona
MDPPP	3,4-metilenodioxo- α -pirrolidinopropiofenona
MDPV	3,4-metilenodioxipirovalerona
ME	Efeito de matriz (do inglês <i>Matrix Effect</i>)
MEB	Mebeverina
MeOH	Metanol
MEPS	Microextração com sorventes empacotados (do inglês <i>Microextraction by Packed Sorbent</i>)
MFA	Ácido mefenâmico
MIA	Cloridrato de mianserina
MIR	Mirtazapina
MS	Espectrometria de massa
MWCNT	Nanotubo de carbono de múltiplas paredes (do inglês <i>Multi-Walled Carbon Nanotubes</i>)
ngBA μ E	Microextração adsortiva em barra de nova geração (do inglês <i>New Generation Bar Adsorptive Microextraction</i>)
NKET	Norcetamina
NPS	Nova substância psicoativa (do inglês <i>New Psychoactive Substances</i>)
NPX	Naproxeno
NSAID	Anti-inflamatório não esteroide (do inglês <i>Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug</i>)
NVP	N-vinilpirrolidona
OCP	Pesticida organoclorado
PA	Poliacrilato
PALME	Extração paralela artificial em membrana líquida (do inglês <i>Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction</i>)
PANI	Polianilina
PDMS	Polidimetilsiloxano

PES	Polietersulfona
PhC	Farmacêutico
PI	Padrão interno
PIL	Líquido iônico polimérico
PJ	Polícia Judiciária
PPCPs	Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (do inglês <i>Pharmaceutical and Personal Care Products</i>)
PS	Poliestireno
PTV	Vaporização com temperatura programada (do inglês <i>Programmed Temperature Vaporization</i>)
PU	Poliuretano
PVA	Álcool polivinílico
RE	Percentual relativo do erro
RR	Resíduos relativos
RSD	Desvio padrão relativo
Suc	Sacarose
S/N	Razão sinal/ruído
SAM	Método da adição de padrão (do inglês <i>Standard Addition Method</i>)
SBME	Microextração em barra sólida (do inglês <i>Solid Bar Microextraction</i>)
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação (do inglês <i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>)
SCA	Ácido salicílico
SDME	Microextração em gota única (do inglês <i>Single Drop Microextraction</i>)
SIM	Monitorização de iões selecionados (do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i>)
SLM	Membrana líquida suportada (do inglês <i>Supported Liquid Membrane</i>)
SMX	Sulfametoxazol
SPDE	Extração dispersiva em fase sólida (do inglês <i>Solid-Phase Dispersive Extraction</i>)
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid-Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês <i>Solid-Phase Microextraction</i>)
TCS	Antidepressivo tricíclico (do inglês <i>Tricyclic Antidepressant</i>)
TCS	Triclosan
TD	Dessorção térmica (do inglês <i>Thermal Desorption</i>)
TFME	Microextração em filme fino (do inglês <i>Thin-Film Microextraction</i>)
THC	(-)-trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
TRI	Trimipramina
UE	União Europeia
UHPLC-MS/MS	Cromatografia em fase líquida de ultra alta eficiência acoplado a espectrometria de massa de triplo quadrupolo (do inglês <i>Ultra High</i>

	<i>Performance Liquid Chromatography coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry</i>);
UR-144	(1-pentilindol-3-il)-(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)metanona
USEPA	Agência de proteção ambiental norte americana (do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>)
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
WWC	Conselho Mundial da Água (do inglês <i>World Water Council</i>)
α -CLD	<i>Cis</i> -clordano
α -EDS	α -endosulfan
α -HCH	α -hexaclorociclohexano
α -PVP	α -pirrolidinopentiotiofenona
α -PVT	α -pirrolidinopentiotiofenona
β -CLD	<i>Trans</i> -clordano
β -EDS	β -endosulfan
β -HCH	β -hexaclorociclohexano
γ -HCH	γ -hexaclorociclohexano
δ -HCH	δ -hexaclorociclohexano
μ -SPE	Micro-extração em fase sólida (do inglês <i>Micro-Solid Phase Extraction</i>)

a	Altura
A_{BET}	Área superficial aparente
c	Concentração
c	Comprimento
$C_{\text{Água}}$	Concentração do analito na fase aquosa
C_M	Concentração relativa de um componente na fase móvel
C_{PDMS}	Concentração do analito na fase de PDMS
c_S	Concentração relativa de um componente na fase estacionária
E	Campo magnético
EOF	Fluxo eletroosmótico (do inglês <i>Electroosmotic Flow</i>)
H	Altura do prato teórico
K	Coefficiente de distribuição
k'	Fator de capacidade
K_{fs}	Coefficiente de partição do analito
$K_{O/W}$	Coefficiente de distribuição octanol-água
$K_{PDMS/W}$	Coefficiente de distribuição PDMS-água
I	Largura

L	Comprimento da coluna
Log D	Simétrico do logaritmo decimal da partição de um composto entre a fase aquosa e a fase orgânica (octanol) para um determinado valor de pH da solução
$m_{\text{Água}}$	Massa do analito na fase aquosa
m_{PDMS}	Massa do analito na fase de PDMS
N	Número de pratos teóricos
n	Número dos valores dos replicados de um conjunto de dados
pH	Escala logarítmica decimal da concentração em hidrogeniões
pH_{pzc}	pH do ponto de carga zero
$\text{p}K_{\text{a}}$	Simétrico do logaritmo decimal da constante de acidez
r	Raio
r^2	Coefficiente de determinação
R_{s}	Resolução
S_{A}	Sinal de um composto na amostra
S_{API}	Sinal de um padrão interno na amostra
S_{S}	Sinal de um composto na solução padrão usada para fortificação
S_{SPI}	Sinal de um padrão interno na solução padrão usada para fortificação
t_{E}	Tempo de retenção ajustado
t_{M}	Tempo morto
t_{R}	Tempo de retenção
V	Volume
$V_{\text{Água}}$	Volume de amostra aquosa
V_{meso}	Volume mesoporoso
V_{micro}	Volume de microporos
V_{PDMS}	Volume em PDMS
V_{total}	Volume total de poros
W	Largura do pico
x_i	Valores individuais de um conjunto de dados
α	Seletividade
η	Viscosidade
λ	Comprimento de onda
μ_{e}	Mobilidade eletroforética
v_{EF}	Velocidade de um ião
σ	Desvio padrão
χ	Média de um conjunto de dados

±	Mais ou menos
%	Porcentagem
~	Aproximadamente
<	Menor
≤	Menor ou igual
>	Maior
≥	Maior ou igual
°C	Graus Celsius
μA	Microampere
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
cm	Centímetro
Da	Dalton
eV	Eletrão-volt
g	Grama
kV	Kilovolt
h	Hora
L	Litro
m/z	Razão massa/carga
M	Molar
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mmol	Milimol
mm	Milímetro
mbar	Milibar
mUA	Miliunidade de absorvância
ng	Nanograma
nL	Nanolitro
nm	Nanómetro
psi	Unidade de pressão (pressão por centímetro quadrado)
Pa	Pascal
ppm	Partes por milhão
ppb	Partes por bilião
p/v	Peso por volume
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
v/v	Volume por volume

Índice geral

Prefácio	v
Agradecimentos	xv
Resumo	xvii
Palavras-chave	xviii
Abstract	xix
Keywords	xx
Abreviaturas, acrónimos e símbolos	xxi
Índice geral	xxix
Índice de figuras	xxxvii
Índice de tabelas	xlvii

Capítulo 1. Introdução	1
1.1 A água é vida	3
1.2 Substâncias de abuso	7
1.3 A química analítica	10
1.4 A preparação de amostras	12
1.4.1 Microextração baseada em líquidos	15
1.4.1.1 Microextração em gota única (SDME)	17
1.4.1.2 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	18
1.4.1.3 Microextração em fase líquida suportada por fibra oca (HF-LPME)	20
1.4.1.3.1 Microextração em fibra oca (HF μ E)	21
1.4.2 Microextração baseada em sólidos	23
1.4.2.1 Microextração em fase sólida (SPME)	23
1.4.2.2 Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)	26
1.4.2.3 Microextração adsortiva em barra (BAμE)	28
1.4.2.3.1 O ciclo analítico da BA μ E	33
1.4.2.3.2 Melhoramentos da BA μ E	35
1.4.3 Técnicas miniaturizadas de alto rendimento	37
1.5 Referências	40

Capítulo 2. Objetivos da tese	45
Capítulo 3. Parte experimental	49
3.1 Padrões analíticos	51
3.2 Reagentes químicos	52
3.3 Material corrente e equipamento de laboratório	52
3.4 Fases sorventes	54
3.5 Amostras	57
3.6 Procedimento experimental	58
3.6.1 Preparação das soluções de trabalho	58
3.6.2 Condições de operação instrumental	59
3.6.2.1 HPLC-DAD	59
3.6.2.2 GC-MS	60
3.6.2.3 CE-DAD	61
3.6.3 Preparação dos dispositivos e <i>apparatus</i> analíticos para microextração	62
3.6.3.1 Dispositivos BA μ E	62
3.6.3.2 Aparelho HT-BA μ E	63
3.6.4 Desenvolvimento e otimização dos métodos analíticos	64
3.6.4.1 Trabalhos envolvendo a técnica BA μ E	64
3.6.4.2 Trabalhos envolvendo a técnica HT-BA μ E	65
3.6.5 Validação das metodologias analíticas	66
3.6.5.1 Linearidade, sensibilidade e seletividade	67
3.6.5.2 Precisão e exatidão	68
3.6.5.3 Efeito de matriz e recuperação	68
3.6.6 Aplicação a amostras reais	69
3.6.6.1 Adição de padrão	69
3.6.6.2 Padrão externo	70
3.7 Referências	71
Capítulo 4. Determinação de anti-inflamatórios não esteroides em matrizes ambientais e biológicas por BAμE(P_{MIX})-μLD/CE-DAD)	73
4.1 Considerações gerais	75

4.2 Resultados e discussão	77
4.2.1 Otimização instrumental	77
4.2.2 Otimização do método analítico	78
4.2.2.1 <i>Seleção da fase sorvente</i>	78
4.2.2.2 <i>Etapa de retroextração</i>	81
4.2.2.3 <i>Etapa de microextração</i>	83
4.2.2.4 <i>Mistura de fases sorventes (P_{MIX})</i>	88
4.2.3 Validação do método analítico	89
4.2.4 Aplicação a matrizes reais	91
4.3 Conclusões	93
4.4 Referências	93

Capítulo 5. Aplicação de BA μ E(Strata-X)- μ LD/HPLC-DAD para a determinação de micropoluentes orgânicos em matrizes ambientais aquosas

	95
5.1 Considerações gerais	97
5.2 Resultados e discussão	98
5.2.1 Otimização instrumental	98
5.2.2 Otimização do método analítico	99
5.2.2.1 <i>Seleção da fase sorvente</i>	99
5.2.2.2 <i>Etapa de retroextração</i>	101
5.2.2.3 <i>Etapa de microextração</i>	102
5.2.3 Validação do método analítico	106
5.2.4 Comparação com outras técnicas de microextração	107
5.2.5 Aplicação a matrizes reais	109
5.3 Conclusões	111
5.4 Referências	111

Capítulo 6. Hidrocarbonizados Porosos como Nova Fase Sorvente para BA μ E - Aplicação na análise de farmacêuticos em matrizes ambientais aquosas

	113
6.1 Considerações gerais	115
6.2 Resultados e discussão	118

6.2.1	HCs	118
6.2.2	Otimização instrumental	118
6.2.3	Otimização do método analítico	119
6.2.3.1	<i>Seleção da fase sorvente</i>	119
6.2.3.2	<i>Etapa de retroextração</i>	120
6.2.3.3	<i>Etapa de microextração</i>	123
6.2.4	Validação do método analítico	131
6.2.5	Comparação com outras técnicas de microextração	133
6.2.6	Aplicação a matrizes reais	135
6.3	Conclusões	136
6.4	Referências	136

Capítulo 7. Método Baseado em BAμE para a Análise de Canabinóides Sintéticos em Fluido Oral	139	
7.1	Considerações gerais	141
7.2	Resultados e discussão	143
7.2.1	Otimização instrumental	143
7.2.2	Otimização do método analítico	143
7.2.2.1	<i>Seleção da fase sorvente</i>	144
7.2.2.2	<i>Etapa de retroextração</i>	145
7.2.2.3	<i>Etapa de microextração</i>	146
7.2.3	Validação do método analítico	150
7.2.4	Figuras de mérito	152
7.3	Conclusões	154
7.4	Referências	154

Capítulo 8. HT-BAμE: Uma Nova Ferramenta Efetiva para a Monitorização de Benzodiazepinas num Elevado Número de Amostras Biológicas	157	
8.1	Considerações gerais	159
8.2	Resultados e discussão	161
8.2.1	Otimização instrumental	161
8.2.2	Implementação de HT-BAμE	162

8.2.3	Otimização da metodologia	163
8.2.4	Validação do método analítico	168
8.2.5	Avaliação da metodologia HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD	171
8.2.6	Comparação com outras técnicas de microextração	172
8.2.7	Aplicação a matrizes reais	174
8.3	Conclusões	175
8.4	Referências	176

Capítulo 9. HT-BA μ E: Aplicação para a Determinação de Nicotina e Cotinina em Amostras de Urina

		179
9.1	Considerações gerais	181
9.2	Resultados e discussão	183
9.2.1	Otimização instrumental	183
9.2.2	Otimização da metodologia	184
9.2.3	Validação do método analítico	188
9.2.4	Comparação com outras técnicas de microextração	189
9.2.5	Aplicação a matrizes reais	190
9.3	Conclusões	193
9.4	Referências	194

Capítulo 10. HT-BA μ E: Abordagem Rápida para a Determinação de Cetamina e Norcetamina em Amostras de Urina

		195
10.1	Considerações gerais	197
10.2	Resultados e discussão	198
10.2.1	Otimização instrumental	198
10.2.2	Otimização da metodologia	199
10.2.3	Validação do método analítico	202
10.2.4	Figuras de mérito	204
10.3	Conclusões	206
10.4	Referências	206

Capítulo 11. Outros Trabalhos em Colaboração	209
11.1 Considerações gerais	211
11.2 Determinação de carbazol em amostras de gasóleo por ACs derivados da pirólise da casca do arroz	211
11.3 Determinação de OCPs em matrizes de chá e tabaco	213
11.4 Determinação de irgarol em águas de estuário	216
11.5 Monitorização de catinonas sintéticas em fluido oral	217
11.6 Determinação de farmacêuticos em matrizes reais	219
11.7 Determinação de antibióticos sulfonamidas em matrizes reais	222
11.8 Nanotubos de carbono como nova fase sorvente para BAμE	224
11.9 Determinação de antidepressivos tricíclicos em matrizes de urina	226
11.10 Conclusões	228
11.11 Referências	229
Capítulo 12. Conclusões Finais e Perspetivas Futuras	231
12.1 Conclusões finais	233
11.2 Perspetivas futuras	236
Anexos	I
Anexo I – Técnicas de separação	III
A.I.1 Técnicas cromatográficas	III
A.I.1.1 <i>Aspetos históricos</i>	III
A.I.1.2 <i>Descrição geral e conceitos teóricos</i>	IV
A.I.1.3 <i>Cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC)</i>	VIII
A.I.1.4 <i>Cromatografia em fase gasosa (GC)</i>	X
A.I.1.5 <i>Cromatografia em fase gasosa-espetrometria de massa (GC-MS)</i>	XII
A.I.2 Eletroforese capilar (CE)	XIII
A.I.3 Referências	XVII
Anexo II – Preparação e caracterização dos HCs, assim como de CN1 e R	XIX
A.II.1 Síntese dos hidrocarbonizados porosos	XIX
A.II.2 Caracterização dos materiais de carbono	XX
A.II.2.1 <i>Caraterização textural</i>	XX

A.II.2.2 <i>Caraterização química</i>	XXI
A.II.2.3 <i>Caraterização morfológica</i>	XXII
A.II.3 Referências	XXII
Anexo III – Cálculos realizados para comparar o efeito de cada parâmetro testado para a otimização das metodologias propostas	XXIII
Anexo IV – Condições instrumentais empregadas para outros trabalhos em colaboração (capítulo 11)	XXV
A.IV.1 GC×GC-MS	XXV
A.IV.2 HPLC-DAD	XXVI
A.IV.3 GC-MS	XXVII

Capítulo 1

Introdução

Índice de figuras

1.1	Exemplos de estruturas químicas de PPCPs, tendo sido obtidas com recurso a <i>software</i> específico [15]	6
1.2	Ocorrência de PPCPs no meio ambiente. Uso de PPCPs por humanos (1a) e animais (1b); eliminação de carcaças de animais (1c); águas residuais provenientes de hospitais e outras unidades de saúde (2); efluente de esgoto doméstico privado (3a) ou coletivo (ETAR, 3b); transferência para sistemas de compostagem (4); exposição direta em águas superficiais (5); descargas industriais (6); aterros (7); aquacultura (8); fitofarmacêuticos (9); destino final dos PPCPs (10). Adaptado de [13].	6
1.3	Possíveis interações da química analítica com outras áreas do conhecimento. Adaptado de [36].	10
1.4	Principais etapas de qualquer processo analítico. Adaptado de [38]	11
1.5	Representação esquemática das principais técnicas baseadas em LPME. Adaptado de [51].	16
1.6	Imagens referentes aos diferentes modos de operação com recurso a SDME. Adaptado de [56].	18
1.7	Imagens relativas ao procedimento habitual por DLLME. Adaptado de [59].	19
1.8	Imagens referentes aos componentes do mecanismo de extração por HF-LPME. Adaptado de [64]	20
1.9	Esquema relativo ao procedimento experimental proposto no ciclo HF μ E. Adaptado de [65,66].	22
1.10	Imagens referentes ao procedimento experimental de SPME por <i>headspace</i> com TD e posterior análise por GC. Adaptado de [69].	24
1.11	Representação esquemática dos constituintes de um dispositivo usada na SBSE. Adaptado de [76]	26
1.12	Modos de extração em SBSE: por imersão direta (a) ou por <i>headspace</i> (b). Adaptado de [77].	27
1.13	Recuperações teóricas de SPME(PDMS: 0,5 μ L) e SBSE(PDMS: 50 μ L) em função de $\log K_{OW}$ a condições experimentais idênticas. Adaptado de [79]	27
1.14	Representação esquemática de dispositivo BA μ E. Adaptado de [67].	29
1.15	Grupos ativos de oxigénio, azoto, enxofre e fósforo que podem ser encontrados à superfície de carvões ativados. Adaptado de [93]. As estruturas químicas foram obtidas com recurso a <i>software</i> específico [15].	30
1.16	Estruturas químicas de alguns polímeros usados como fase sorvente para BA μ E. Estas estruturas foram obtidas com recurso a <i>software</i> específico [15].	31
1.17	Imagem real e representação esquemática exemplificando a metodologia de amostragem por flutuação usada em BA μ E. A imagem à direita foi criada a partir do endereço eletrónico www.biorender.com	32

1.18	Fluxograma que descreve uma estratégia de otimização univariada usada em estudos de otimização por BA μ E-LD. Adaptado de [99].....	33
1.19	Comparação dos dispositivos BA μ E (1) e ½BA μ E (2) antes (a) e durante o processo de retroextração (b). Adaptado de [89].....	35
1.20	Dispositivo ngBA μ E. Adaptado de [107]..	36
1.21	Procedimento analítico proposto para o ciclo ngBA μ E desde a etapa de microextração até à análise por LC. Adaptado de [65,107].....	36
1.22	Plano superior do sistema de 96-blade SPME (a). Plano aproximado dos 96 dispositivos de SPME empregues nesta técnica (b). O sistema inclui os seguintes componentes (c): agitadores orbitais para extração (A), dessorção (C) e condicionamento (D); uma estação para o passo de limpeza dos dispositivos (B); o braço robótico que movimenta os 96 dispositivos de SPME (E); estação de evaporação por azoto (F); braço robótico que movimenta a seringa para injeção no sistema cromatográfico (G). Adaptado de [109].	38
1.23	Representação esquemática do dispositivo PALME (a), assim como de um dos seus poços. Adaptado de [110].....	39
1.24	Fotografia do dispositivo PALME (a), assim como da ilustração esquemática do processo de extração de compostos alcalinos (b). Adaptado de [111]... ..	40
3.1	<i>Apparatus</i> HT-BA μ E (a), assim como o interior da tampa do mesmo (c), e uma visão amplificada do posicionamento dos dispositivos BA μ E nas hastes de poliestireno presentes no aparelho (b).....	63
4.1	Efeito da seletividade de ACs para a microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, Mix (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassónico; evaporação sob suave corrente de N ₂ e redissolução com BGE (200 μ L). As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.....	79
4.2	Efeito da seletividade de fase poliméricas para a microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, Mix (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassónico; evaporação sob suave corrente de N ₂ e redissolução com BGE (200 μ L). As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.....	81
4.3	Efeito da variação do solvente na retroextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 30 min sob tratamento ultrassónico; evaporação sob suave corrente de N ₂ e redissolução com BGE (200 μ L), exceto aquando do uso de BGE para μ LD. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.	82

4.4	Efeito da variação do tempo na retroextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, BGE (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.	83
4.5	Efeito da variação do tempo na microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, BGE (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.	84
4.6	Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 16 h, pH 5,5; retroextração, BGE (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.	84
4.7	Efeito da variação do pH da matriz na microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm); retroextração, BGE (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.	85
4.8	Efeito da variação da força iônica da matriz na microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, BGE (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.	86
4.9	Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, BGE (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.	87
4.10	Recuperações médias para os NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX, MAX ou P _{MIX} . Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, BGE (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.	88
4.11	Eletroferogramas obtidos de ensaios realizados em água ultrapura (a) e em água de estuário (b) fortificadas a 80,0 μ g L ⁻¹ , assim como de amostras de urina depois de hidrólise (c), realizados por BA μ E(P _{MIX})- μ LD/CE-DAD sob condições experimentais otimizadas. (i) – amostra de urina #A; (ii) – amostra de urina #B; 1 – SCA; 2 – MFA; 3 – DCF; 4 – NPX; PI – padrão interno.	92

5.1	Efeito da seletividade de vários sorventes para a microextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.....	100
5.2	Efeito da seletividade das duas fases poliméricas empregues neste estudo para a microextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados	101
5.3	Efeito da variação do solvente na retroextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 200 μ L, 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.....	101
5.4	Efeito da variação do tempo na retroextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.....	102
5.5	Efeito da variação do tempo de microextração no enriquecimento dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.....	103
5.6	Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h, pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.....	103
5.7	Efeito da variação do pH da matriz na microextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm); retroextração, MeOH (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados	104
5.8	Efeito da variação da adição de sal na matriz para a microextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.....	105
5.9	Efeito da variação da adição de modificador orgânico na matriz para a microextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH	

	(200 µL), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados	105
5.10	Cromatogramas obtidos de ensaios realizados em água ultrapura (a), de mar (b) e de rio (c) fortificadas a 8,0 µg L ⁻¹ , realizados por BAµE(Strata-X)-µLD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. 1 – CMZ; 2 – EE2; 3 – E2; 4 – DCF; 5 – TCS.	110
6.1	Imagens de microscopia eletrônica de varrimento dos HCs empregados no presente estudo	118
6.2	Efeito da seletividade de vários sorventes para a microextração dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BAµE-µLD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, ACN (100 µL), 60 min sob tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 µL de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados	120
6.3	Efeito da variação do solvente na retroextração dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BAµE-µLD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 100 µL, 60 min sob tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 µL de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados	121
6.4	Efeito da variação do tempo na retroextração dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BAµE-µLD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, ACN (100 µL), tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 µL de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados	122
6.5	Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BAµE-µLD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condições experimentais: microextração, 16 h, pH 5,5; retroextração, ACN (100 µL), 60 min sob tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 µL de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados	124
6.6	Efeito da variação do tempo de microextração no enriquecimento dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BAµE-µLD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, ACN (100 µL), 60 min sob tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 µL de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados	125
6.7	Efeito da variação do pH da matriz na microextração dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BAµE-µLD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm); retroextração, ACN (100 µL), 60 min sob tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 µL de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados	126

- 6.8 Efeito da variação da força iônica da matriz na microextração dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 2,0; retroextração, ACN (100 μ L), 60 min sob tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 μ L de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados 130
- 6.9 Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 2,0; retroextração, ACN (100 μ L), 60 min sob tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 μ L de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados 131
- 6.10 Cromatogramas obtidos de ensaios realizados em água ultrapura fortificada a 8,0 μ g L⁻¹ (a), assim como de amostra de ETAR não fortificada (b), realizados por BA μ E(HC-S) μ LD/HPLC-DAD sob condições experimentais otimizadas..... 135
- 7.1 Estruturas químicas e log K_{OW} (em parênteses) dos CSs estudados. *Software* específico foi usado para prever as propriedades físico-químicas, assim como a estrutura das moléculas: Marvin 6.2.2, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)..... 142
- 7.2 Efeito da seletividade de vários sorventes para a microextração dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, ACN (100 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados 144
- 7.3 Efeito da variação do solvente na retroextração dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 100 μ L, 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados 145
- 7.4 Efeito da variação do tempo na retroextração dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, ACN (100 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados 146
- 7.5 Efeito da variação do pH da matriz no enriquecimento dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm); retroextração, ACN (100 μ L), 15 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados 147
- 7.6 Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, ACN (100 μ L), 15 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados 147
- 7.7 Efeito da variação da força iônica da matriz na microextração dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3h

- (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, ACN (100 μ L), 15 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados 148
- 7.8 Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h, pH 5,5, 10 % MeOH; retroextração, ACN (100 μ L), 15 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados 149
- 7.9 Efeito da variação do tempo de microextração no enriquecimento dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5, 10 % MeOH; retroextração, ACN (100 μ L), 15 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados 149
- 7.10 Cromatogramas obtidos de ensaios realizados em amostras de fluido oral fortificadas (50,0 μ g L⁻¹) e não fortificadas, obtidas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. 1: AM-694; 2: Cumyl-5F-PINACA; 3: MAM-2201; 4: 5F-UR-144; 5: JWH-018; 6: JWH-122; 7: UR-144; 8: APINACA 153
- 8.1 Estruturas químicas, log K_{OW} e pK_a das oito BZDs estudadas. *Software* específico foi usado para prever as propriedades físico-químicas, assim como a estrutura das moléculas: Marvin 6.2.2, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>) 161
- 8.2 Ciclo HT-BA μ E- μ LD proposto. Barra de poliestireno com ou sem um dispositivo BA μ E na parte inferior (a); O *apparatus* tem a possibilidade de acomodar até 100 dispositivos BA μ E (b); *Apparatus* fechado e contendo 100 frascos de amostragem prontos para a etapa de microextração (c); 100 microextrações simultâneas *via* cavitação em banho ultrassônico (d); *Apparatus* fechado e contendo 100 *inserts* colocados em frascos de vidro para a μ LD (e); 100 μ LD em simultâneo *via* cavitação em banho ultrassônico (f); Frascos fechados e prontos para análise por HPLC-DAD (g). O *apparatus* pode ser reutilizado após lavagem 163
- 8.3 Efeito da seletividade de vários polímeros na microextração das BZDs alvo em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 2 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados. 164
- 8.4 Efeito da variação do solvente (a) e tempo (b) na retroextração dos BZDs alvo em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 2 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 100 μ L. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados 165
- 8.5 Efeito da variação do pH da matriz no enriquecimento das BZDs alvo em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 1 h (1000 rpm); retroextração, Mix (100 μ L), 60 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados 166

8.6	Efeito da variação da força iónica (a) e da polaridade (b) da matriz na microextração das BZDs alvo em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, Mix (100 μ L), 60 min sob tratamento ultrassónico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.....	167
8.7	Efeito da variação do tempo de microextração no enriquecimento das BZDs alvo em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, Mix (100 μ L), 60 min sob tratamento ultrassónico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados	168
8.8	Cromatogramas de obtidos a partir de ensaios realizados em amostra de urina fortificada (500,0 μ g L ⁻¹) e real, obtidas por HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. 1 - Bromazepam; 2 - Oxazepam; 3 - Lorazepam; 4 - Alprazolam; 5 - Temazepam; 6 - Diazepam; 7 – Loflazepato de etilo; 8 - Prazepam.	175
9.1	Efeito da seletividade do sorvente para o enriquecimento de nicotina e cotinina em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). Condições experimentais: microextração, 120 min (sonicação), pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob tratamento ultrassónico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.....	185
9.2	Efeito do solvente (a) e tempo (b) de retroextração, assim como do pH (c), da adição de modificador orgânico (d) e da força iónica (e) da matriz para o enriquecimento de nicotina e cotinina em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.....	187
9.3	Efeito do tempo de microextração para o enriquecimento de cotinina e nicotina em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). Condições experimentais: microextração, sonicação, pH 11,0; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob tratamento ultrassónico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.....	188
9.4	Fragmentograma obtido a partir de ensaio realizado em amostra de urina real de um voluntário fumador, obtida por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas	191
9.5	Teste <i>t</i> de <i>Student</i> realizado com base nos valores médios de nicotina e cotinina apresentados nas amostras de urina dos grupos #2 e #3. As barras de erro representam o desvio padrão.	193

10.1	Efeito da seletividade da fase polimérica (a), do solvente (b) e tempo (c) de μ LD, assim como do pH (d), polaridade (e) e força iônica (f) da matriz, da velocidade de agitação (g) e do tempo de microextração (h) para o enriquecimento de KET e NKET em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados	201
10.2	Fragmentogramas obtidos a partir de ensaios realizados em amostras de urina fortificadas (125,0 μ g L ⁻¹) e não fortificadas, obtidas por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.....	205
11.1	Cromatograma bidimensional de uma amostra de gasóleo fortificada com carbazol (0,1 mg L ⁻¹), obtido por BA μ E(AC)- μ LD/GC \times GC-MS. Adaptado de [1].	212
11.2	Fragmentogramas de ensaios realizados em água ultrapura (a), chá preto (b) e tabaco (c) fortificadas a 80,0 μ g L ⁻¹ para todos os OCPs em estudo, obtidos por BA μ E(Strata-X)- μ LD/GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. 1: α -HCH; 2: γ -HCH; 3: β -HCH; 4: δ -HCH; 5: HCL; 6: ALD; 7: HCE; 8: α -CLD; 9: α -EDS; 10: β -CLD; 11: DDE; 12: DIE; 13: END; 14: β -EDS; 15: DDD; 16: ENDA; 17: ESS; 18: DDT; 19: ENDK; 20: MCL. Adaptado de [13]	215
11.3	Traçado de corrente iônica de um ensaio realizado numa amostra de água do rio Tejo fortificada a 14,0 μ g L ⁻¹ , assim como o espectro de massa do irgarol (indicando os três íões mais abundantes), obtido por BA μ E(AC)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. Adaptado de [19]	217
11.4	Fragmentogramas de ensaios realizados em amostras de fluido oral e após fortificação (500,0 μ g L ⁻¹), obtidos por BA μ E(Strata-X)- μ LD/GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. 1: α -PVP; 2: α -PVT; 3: MDPV	219
11.5	Cromatogramas obtidos de ensaios realizados em água ultrapura fortificada a 4,0 μ g L ⁻¹ (a) a diferentes comprimentos de onda, assim como cromatogramas parciais obtidos de ensaios realizados em amostra de água do mar, de ETAR #1 e de urina U ₁ (b), por BA μ E(Strata-X)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Adaptado de [29].....	221
11.6	Cromatogramas obtidos de ensaios realizados por BA μ E(LiChrlout EN)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas, a amostras de água ultrapura (a) e de água da torneira (b) fortificadas a 8,0 μ g L ⁻¹ . Adaptado de [33].....	223
11.7	Cromatogramas obtidos de ensaios realizados em amostras de água de ETAR fortificadas a 5,0 e 50,0 μ g L ⁻¹ , assim como sem fortificação, usando BA μ E(MWCNT)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.....	225
11.8	Traçados de corrente iônica de uma amostra de urina controlo fortificada a 100,0 μ g L ⁻¹ (a) e de uma amostra de urina real (b), obtidos por BA μ E(ENVI-18)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. Adaptado de [42].....	228

A.I.1.1	Ilustração do tempo morto (t_M), de retenção ajustado (t_E) e do tempo de retenção (t_R) num cromatograma típico. Adaptado de [8].	V
A.I.1.2	Classificação dos principais métodos cromatográficos.	VII
A.I.1.3	Diagrama de blocos mostrando alguns dos componentes típicos de um sistema para HPLC. Adaptado de [8].	VIII
A.I.1.4	Diagrama de blocos de um GC convencional. Adaptado de [8].	X
A.I.1.5	Representação esquemática de um quadrupolo usado habitualmente em hifenação a GC. Adaptado de [5].	XIII
A.I.2.1	Aparelho convencional de CE. Adaptado de [5].	XIV
A.I.2.2	Representação do perfil do EOF (a) e do fluxo induzido por pressão (b), assim como as diferenças de eficiência resultante dos mesmos. Adaptado de [5].	XVI
A.I.2.3	Dois tipos de células utilizadas para aumentar a sensibilidade da deteção por UV/VIS ou DAD: células em Z (a) e capilares com bolha (b). Adaptado de [9].	XVII
A.II.2.1	Isotérmicas de adsorção de N ₂ a -196 °C dos HCs e ACs comerciais.	XX
A.II.2.2	Distribuições diferenciais (b) e cumulativas (c) de tamanho de poros obtidas do método 2D-NLDFT-HS aplicado às isotérmicas de adsorção de N ₂ dos HCs e ACs comerciais	XXI
A.II.2.3	Espetros DRIFT (a) e perfis termogravimétricos (TG) e curvas derivadas (DTG) (b) dos três HCs.	XXII

Índice de tabelas

3.1	Principais características dos materiais à base de carvão usados na presente tese.	55
3.2	Principais características das fases poliméricas empregadas na presente tese.	56
3.3	Condições experimentais utilizadas para análise de cada classe de compostos estudados por HPLC-DAD	59
3.4	Condições experimentais utilizadas para análise de cada classe de compostos estudados por GC-MS. Os iões apresentados são os qualificadores e os quantificadores (a sublinhado).....	60
4.1	Estruturas químicas, $\log K_{OW}$ e pK_a dos NSAIDs estudados.	76
4.2	Valores de LODs, LOQs, r^2 , assim como de repetibilidade e precisão intermédia expressos como RSD (%) das recuperações a diferentes valores de fortificação em água ultrapura, obtidas por BA μ E(P _{MIX})- μ LD/CE-DAD sob condições experimentais otimizadas	90
4.3	Valores de r^2 e de recuperação media (R, \pm RSD, %) para os quatro NSAIDs em estudo, alcançados por SAM em amostras de água de mar, de estuário e de rio, assim como de duas amostras de urina hidrolisadas fortificadas a 80,0 μ g L ⁻¹ , obtidos por BA μ E(P _{MIX})- μ LD/CE-DAD, sob condições experimentais otimizadas..	91
5.1	Estruturas químicas, $\log K_{OW}$ e pK_a dos micropoluentes orgânicos estudados	98
5.2	Valores de LODs, LOQs, r^2 , assim como de repetibilidade e precisão intermédia expressos como RSD (%) das recuperações obtidas por BA μ E(Strata-X)- μ LD/HPLC-DAD sob condições experimentais otimizadas a diferentes valores de fortificação em água ultrapura.	106
5.3	Comparação dos LODs e recuperações obtidas para os cinco micropoluentes orgânicos em estudo com outras técnicas de microextração estática.	108
6.1	Estruturas químicas, $\log K_{OW}$ e pK_a dos FMCs estudados.....	117
6.2	Efeito do pH da matriz na recuperação dos FMCs alvo empregando HC-S, HC-F ou CN1 como fases sorventes para BA μ E. Os valores de $\log D$ são apresentados para cada composto do respetivo valor de pH do ensaio. Abaixo de cada FMC, em parênteses, são apresentados os respetivos valores de pK_a	128

6.3	Valores de LODs, LOQs, assim como de repetibilidade e precisão intermédia alcançadas para os dez FMCs em estudo, obtidas por BA μ E(HC-S)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.	132
6.4	Comparação dos LODs e recuperações obtidas para os dez FMCs em estudo com outras técnicas de microextração estática	133
7.1	Valores de repetibilidade (precisão intradia) e de precisão intermédia (precisão interdias), assim como de exatidão intra e interdias para os oito CSs em fluido oral, obtidas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas..	151
7.2	Efeito de matriz e recuperação para os oito CSs em fluido oral, usando dois níveis de fortificação, obtidas por BA μ E(ENVI-18)- μ LD/HPLC-DAD sob condições experimentais otimizadas.....	152
8.1	Recuperações médias (\pm RSD %) alcançadas para as oito BZDs, usando dois níveis de fortificação, em urina, plasma e soro, obtidas por HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.....	169
8.2	Efeito de matriz (%) (\pm RSD %) alcançado para as oito BZDs, usando dois níveis de fortificação, em urina, plasma e soro, obtidas por HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.....	169
8.3	Valores exatidão (%) intra ($n = 6$) e interdias ($n = 18$), assim como de repetibilidade e precisão intermédia (\pm RSD, %) alcançadas para as oito BZDs em urina, soro e plasma, obtidas por HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Os níveis de fortificação “LLOQ”, “baixo”, “médio” e “alto” foram de 20,0, 50,0, 100,0 e 500,0 μ g L ⁻¹ em matrizes de urina, 50,0, 100,0, 200,0 e 1000,0 μ g L ⁻¹ para matrizes plasma e 100,0, 200,0, 500,0 e 1000,0 μ g L ⁻¹ para matrizes soro, respetivamente.....	170
8.4	Comparação dos LODs, recuperações, precisão e tempo de preparação de amostra para as oito BZDs em estudo com outras técnicas de microextração.	173
9.1	Estruturas químicas, log K_{OW} e p K_a , assim como os tempos de retenção (t_R) e iões (m/z) selecionados para a nicotina e a cotinina, obtidos por LVI-GC-MS(SIM), sob condições instrumentais otimizadas... ..	184
9.2	Valores exatidão (%) intra ($n = 6$) e interdias ($n = 18$), assim como de repetibilidade e precisão intermédia (\pm RSD, %), eficiências de extração (% \pm RSD, %), efeitos de matriz (% \pm RSD, %), curvas de calibração e coeficientes de determinação (r^2) para análise de	

	cotina e nicotina em matrizes de urina, obtidas por BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas, Os valores de fortificação “LLOQ”, “baixo”, “médio” e “alto” são, respetivamente, 20,0, 60,0, 600,0 e 1200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	189
9.3	Comparação da metodologia proposta com outras abordagens analíticas já publicadas, para a determinação de cotina e nicotina em matrizes de urina.....	190
9.4	Resultados obtidos para as amostras positivas de urina para nicotina e/ou cotina, com ênfase no intervalo de tempo entre fumar (ou a exposição a ETS) e a amostragem. Não são apresentados valores para os voluntários do grupo #1, pois não foi detetado nenhum dos compostos alvo nas mesmas (< LOD).....	192
10.1	Estruturas químicas, log K_{OW} e pK_a , assim como os tempos de retenção (t_R) e iões (m/z) selecionados para a KET and NKET obtidos por LVI-GC-MS(SIM), sob condições instrumentais otimizadas.....	199
10.2	Valores exatidão (%) intra ($n = 6$) e interdias ($n = 18$), assim como de repetibilidade e precisão intermédia (\pm RSD, %), recuperações médias ($\% \pm$ RSD, %) e os efeitos de matriz ($\% \pm$ RSD, %) usando quatro níveis de fortificação, assim como as curvas de calibração e os r^2 , para análise de KET e NKET em matrizes de urina, obtidas por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.....	203
10.3	Comparação do método proposto com outras técnicas de microextração já publicadas, para a determinação de KET e NKET em amostras de urina.....	204
11.1	Valores de r^2 , gamas lineares, valores de repetibilidade e precisão intermédia, expressos como RSDs das recuperações a vários níveis de fortificação, para os vinte OCPs, obtidos por BA μ E(Strata-X)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas....	214
11.2	Valores de recuperação obtidos de ensaios de repetibilidade e precisão intermédia, assim como de LODs, LOQs, gamas e r^2 para os seis farmacêuticos em estudo, obtidos por (BA μ E(Strata-X)- μ LD/HPLC-DAD), sob condições experimentais otimizadas... ..	220
11.3	Recuperações médias, LODs, LOQs, gamas lineares e valores de r^2 obtidos para os quatro antibióticos em estudo, por BA μ E(LiChrolut EN)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.....	223
11.4	Recuperações médias ($\%, \pm$ RSD) a três níveis de fortificação ($n = 4$), assim como valores de r^2 , obtidas para as amostras reais usando BA μ E(MWCNT)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.....	225

11.5	Valores exatidão (%) intra ($n = 6$) e interdias ($n = 18$), assim como de repetibilidade e precisão intermédia (\pm RSD, %) usando quatro níveis de fortificação, obtidos por BA μ E(ENVI-18)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.....	227
A.IV.2.1	Condições experimentais utilizadas para análise por HPLC-DAD para cada estudo em colaboração..	XXVI
A.IV.3.1	Condições experimentais utilizadas para análise por GC-MS para cada estudo em colaboração. Os iões apresentados são os qualificadores e os quantificadores (a sublinhado).	XXVIII
A.IV.3.2	Tempos de retenção e iões monitorizados para os diferentes OCPs referente aos estudo do capítulo 11.3 Os iões apresentados são os qualificadores e os quantificadores (a sublinhado).....	XXIX

1.1 A água é vida

A água é vida! A água é um dos recursos mais importantes para a humanidade. A água é a molécula essencial das funções biológicas de todos os organismos vivos, incluindo os seres humanos, plantas e animais. Não existe substituto conhecido para a água. A água é o que distingue o planeta Terra de todos os outros, atribuindo-lhe a cor azul. A água possui uma série de características físicas e químicas únicas, tornando-a indispensável para muitos processos industriais, para a produção de energia hidroelétrica, para o transporte e para a produção alimentar. A nossa vida económica, social e cultural depende profundamente da disponibilidade e da acessibilidade do fornecimento de água potável e limpa. A maioria dos ecossistemas, se não todos, depende diretamente da disponibilidade de água, especialmente de água doce, para a sua existência [1].

Por essa razão, foi criado em 1996, o Conselho Mundial da Água (WWC, do inglês *World Water Council*), como o centro internacional de reflexão sobre políticas hídricas dedicadas a assessorar, auxiliar, defender e consciencializar o público e, particularmente os decisores políticos e económicos, sobre questões globais sobre a água [2].

Esta importância é igualmente reconhecida pelas Nações Unidas, no qual a água, em todas as suas dimensões, encontra-se no cerne do desenvolvimento sustentável, tendo um papel preponderante entre os 17 objetivos estabelecidos em 2015, e acordados por mais de 150 líderes mundiais, que deverão ser cumpridos até 2030 [3].

Da mesma forma, a União Europeia (UE) reconhece que todos os cidadãos, organizações ambientais, a natureza e os setores na economia que usam água precisam indiscutivelmente de rios e lagos mais limpos, bem como de águas subterrâneas e balneares livres de poluição. Chapman [4] propõe a seguinte distinção entre contaminante e poluente:

“A contaminação é simplesmente a presença de uma substância onde não deveria estar ou em concentrações acima do esperado. A poluição é uma contaminação que resulta, ou pode resultar, em efeitos biológicos adversos para as comunidades residentes (fauna e flora). Todos os

poluentes são contaminantes, mas nem todos os contaminantes são poluentes”.

Posto isto, deve-se averiguar se um contaminante é poluente por forma a minimizar a sua presença e o seu impacto nos diferentes *habitats*.

A UE também reconhece que a água não é um produto comercial como outro qualquer, mas um património que deve ser protegido, defendido e tratado como tal. Por essa razão, a proteção da água é uma das prioridades da Comissão Europeia. Neste sentido, a “Política Europeia da Água” serve para prevenir e enfrentar a ocorrência de águas poluídas, assim como para assegurar que as águas limpas continuem como tal [5]. O Parlamento e o Conselho Europeus também reconhecem que a poluição química das águas superficiais (*i.e.*, lagos, rios, etc.) representa uma ameaça para o ambiente aquático, podendo ter efeitos tóxicos agudos e crónicos nos organismos neles residentes, acumulação no ecossistema, assim como perda de *habitats* e de biodiversidade, para além de constituir uma ameaça para a saúde humana. Segundo as mesmas organizações, as causas da poluição deverão ser identificadas e as emissões deverão ser tratadas na origem, com carácter de prioridade, da maneira mais eficaz em termos económicos e ambientais [6]. Neste sentido, a diretiva 2000/60/CE tem como objetivo promover a eliminação das substâncias poluentes e contribuir para a consecução, no ambiente marinho, de valores próximos normalmente encontradas para as substâncias naturalmente presentes [5]. Foi depois proposto, sob a forma da diretiva 2008/105/CE [6], atualizada pela diretiva 2013/39/EU [7], normas de qualidade ambiental no domínio da política da água na qual uma lista de substâncias prioritárias e de outros poluentes (‘emergentes’) deveriam ser controlados. Estes incluem metais pesados, vários tipos de pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, entre muitos outros. Esta legislação sofreu novas alterações em 2015 com a introdução de uma “*watch list*” [8], atualizada em 2018 [9], na qual estabelece grupos de substâncias para os quais devem ser recolhidos, a nível da UE, dados de monitorização a fim de servirem de base a futuros exercícios de estabelecimento de prioridades. Esta lista inclui compostos farmacêuticos, hormonas esteroides, entre outros. Contudo, existe contínua monitorização e atualização por parte do Parlamento e do Conselho Europeus por forma a assegurar elevados padrões de qualidade

ambiental no domínio da política da água. Desta forma, é expectável que estas listas venham a ser atualizadas no futuro próximo.

A agência de proteção ambiental norte americana (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) classifica os poluentes em dois grupos [10]:

- Poluentes prioritários
- Poluentes emergentes

Os primeiros dizem respeito àquelas substâncias químicas que são reguladas, tendo sido selecionadas com base na suspeita de carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade ou toxicidade aguda, e para as quais existem métodos analíticos bem definidos, ex., aqueles listados nas diretivas europeias [5–9]. Por outro lado, e segundo Wells *et al.* [10], os poluentes emergentes podem ser definidos como:

“Qualquer produto químico sintético ou natural [...] que não seja comumente monitorizado no ambiente, mas que tenha o potencial de entrar no ambiente e causar efeitos adversos (conhecidos ou suspeitos), na saúde humana e/ou ecológica”.

Os poluentes emergentes podem ser divididos em diversas classes, nomeadamente fitofarmacêuticos (ex., inseticidas), metais pesados (ex., chumbo), surfatantes (ex., agentes emulsionantes), solventes e aditivos industriais (ex., agentes dispersantes), produtos industriais e de habitação (ex., selantes), bem como produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PPCPs, do inglês *Pharmaceutical and Personal Care Products*) [11]. Na atualidade, os PPCPs representam uma percentagem considerável dos poluentes orgânicos, sendo um grupo diversificado de produtos químicos que incluem medicamentos prescritos e não prescritos, medicamentos veterinários, suplementos nutricionais e agentes de diagnóstico, bem como uma variedade de produtos de consumo, como fragrâncias, protetores solares e cosméticos [12–14] (figura 1.1).

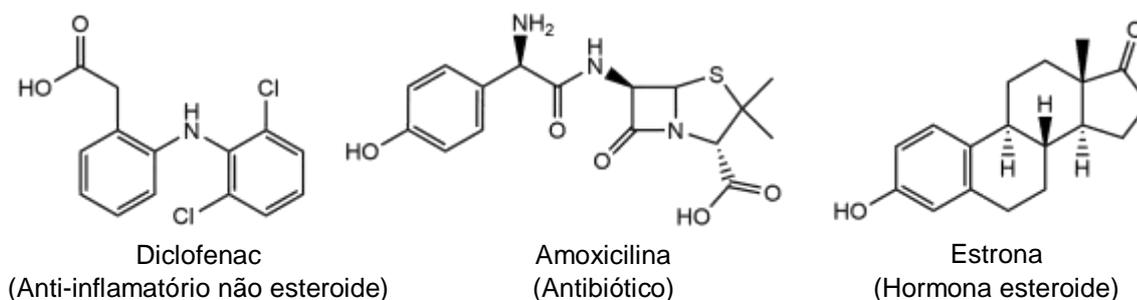


Figure 1.1 – Exemplos de estruturas químicas de PPCPs, tendo sido obtidas com recurso a *software* específico [15].

Uma das principais fontes de poluentes orgânicos prioritários é a descarga de efluentes provenientes de estações de tratamento de águas residuais (ETARs). Assim, a ocorrência destes compostos nos recursos aquáticos é na maioria, consequência dos processos de tratamento de águas residuais. Estas são produzidas por indústrias, habitações, agricultura, hospitais, entre outras atividades humanas [10,11] (figura 1.2).

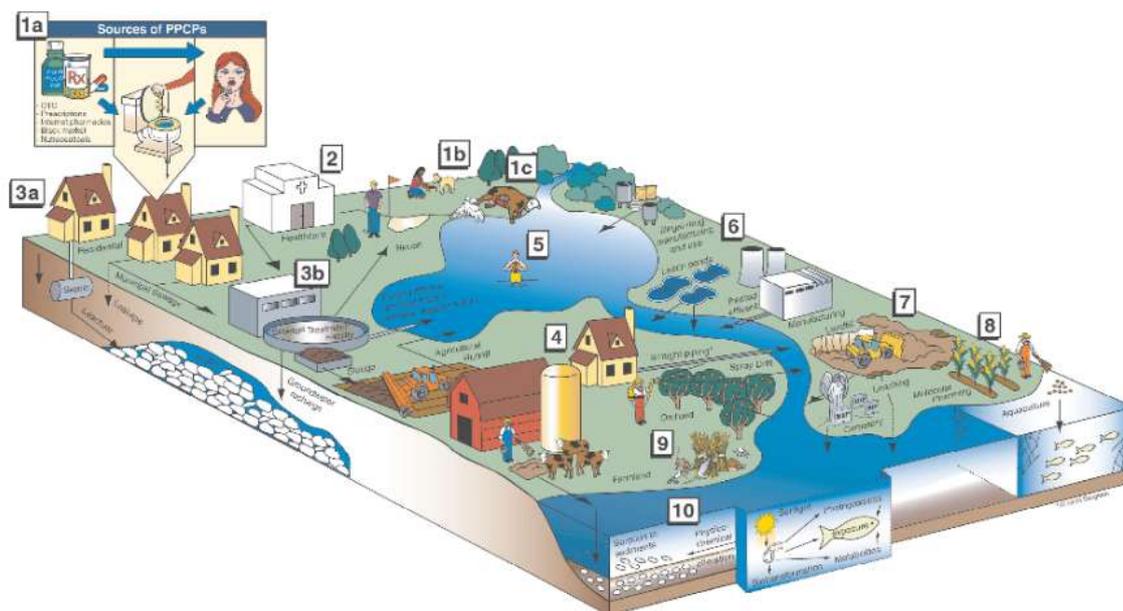


Figura 1.2 – Ocorrência de PPCPs no meio ambiente. Uso de PPCPs por humanos (1a) e animais (1b); eliminação de carcaças de animais (1c); águas residuais provenientes de hospitais e outras unidades de saúde (2); efluente de esgoto doméstico privado (3a) ou coletivo (ETAR, 3b); transferência para sistemas de compostagem (4); exposição direta em águas superficiais (5); descargas industriais (6); aterros (7); aquacultura (8); fitofarmacêuticos (9); destino final dos PPCPs (10). Adaptado de [13].

Os poluentes prioritários e emergentes podem igualmente ser considerados como micropoluentes, pois são usualmente encontrados em matrizes ambientais em concentrações muito baixas, nomeadamente ao nível traço ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou $\mu\text{g kg}^{-1}$) ou ultratraço (ng L^{-1} ou ng kg^{-1}) [10–12].

Ribeiro *et al.* [16] realizaram uma extensa revisão da literatura sobre a ocorrência destes compostos em águas superficiais, subterrâneas, de consumo humano e de ETAR em Portugal entre os anos de 2001 a 2015. As principais conclusões revelaram a existência de uma elevada prevalência de poluentes prioritários e emergentes (ex., pesticidas e compostos farmacêuticos) em Portugal, estando esta informação em concordância com outros países europeus. No entanto, e segundo estes autores, mais investigação é necessária para compreender, de uma forma transversal, a ocorrência destes compostos nos ambientes aquáticos portugueses.

Uma vez as matrizes ambientais apresentarem elevado grau de complexidade e a presença de níveis de poluentes ao nível vestigial, métodos eficientes de preparação da amostra são indispensáveis previamente à análise instrumental por forma a obter dados analíticos com qualidade e de confiança.

1.2 Substâncias de abuso

Desde a antiguidade o Homem ingere substâncias que podem alterar a mente (psicoativas). As primeiras evidências do uso destas substâncias remontam a práticas curativas, cerimoniais e/ou religiosas. A maioria eram derivadas de plantas como a khat (*catha edulis*), a papoila do ópio (*papaver somniferum*), o cato peiote (*lophophora williamsii*), a canábis (*cannabis sativa*), a coca (*erythroxylum coca*), entre muitas outras. Embora o uso destas plantas se possa ter tornado crónico como consequência do fenómeno de dependência, as circunstâncias que levaram à atual epidemia de substâncias de abuso surgiram no início do século XIX, quando foi demonstrado que um ingrediente psicoativo poderia ser isolado e obtido de forma altamente purificada a partir do material vegetal [17]. Um exemplo deste fenómeno é a morfina, isolada a partir da papoila do ópio, tendo sido mais tarde comercializada e distribuída para a população [18].

O Centro Europeu de Monitorização de Drogas e Toxicodependência (EMCDDA, do inglês *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*) classifica as “drogas” como toda e qualquer substância que levem a uma alteração do estado mental, físico ou emocional (ou seja, substâncias psicoativas). Esta definição também inclui o tabaco, o álcool, os medicamentos e as substâncias voláteis (ex., inalantes). Por outro lado, as drogas controladas são apenas aquelas listadas na Convenção Única das Nações Unidas sobre Substâncias Narcóticas (Nova York, 1961, emendada em 1972) [19], na Convenção sobre Substâncias Psicotrópicas (Viena, 1971) [20] e na Convenção contra o Tráfico Ilícito de Narcóticos e Substâncias Psicotrópicas (Viena, 1988) [21]. Estas listagens, que incluem mais de 250 compostos e precursores, foram criadas para facilitar o controlo e limitar o uso. Estes compostos incluem a canábida, a cocaína, a heroína, as anfetaminas, a dietilamida do ácido lisérgico (LSD), a cetamina, entre muitos outros [22–25].

Estima-se que 5,5 % da população adulta mundial, ou cerca de 271 milhões de pessoas entre os 15 e os 64 anos, tenham consumido pelo menos uma substância de abuso em 2016. Este valor representa um aumento de 30 % em relação a 2009. Destas, estima-se que mais de 35,3 milhões sofram de “perturbação por uso de substâncias” [26]. Esta é definida como uma perturbação mental caracterizada pelo consumo de uma ou mais substâncias, podendo resultar em prejuízos ou dificuldades clinicamente significativas. Embora o termo “substância” se possa referir a qualquer matéria física, neste contexto restringe-se ao consumo de drogas psicoativas [27]. Estima-se que em 2017 cerca de 585000 pessoas tenham falecido e que 42 milhões de anos de “vida saudável” foram perdidas (*i.e.*, mortes prematuras e anos vividos com incapacidade) como resultado do consumo de substâncias de abuso [26].

Mais de um milhão de apreensões de drogas ilícitas são relatadas anualmente na Europa. A canábida, a droga mais comumente apreendida, representa cerca de 70 % das apreensões. A cocaína ocupa o segundo lugar (9 %), seguida pelas anfetaminas (5 %), a heroína (5 %) e a metilendioximetanfetamina (MDMA, *ecstasy*; 2 %). Estima-se que ocorreram na UE em 2015, pelo menos 7 585 mortes por *overdose* envolvendo pelo menos uma droga ilícita ou controlada [24].

Para além das “drogas clássicas” como as referidas anteriormente, as substâncias de abuso emergentes têm vindo a tornar-se um enorme problema de saúde pública. Destas, destacam-se as novas substâncias psicoativas (NPS, do inglês *New Psychoactive Substances*). Entende-se por NPS novos estupefacientes ou psicotrópicos, puros ou em preparações, que não sejam listados e controlados pelas convenções anteriormente mencionadas, mas que possam constituir uma ameaça para a saúde pública comparável à das substâncias enumeradas nas mesmas convenções [28–30]. Estes compostos têm sido tradicionalmente vendidos em *smart shops* e na atualidade através da *Internet*, como produtos inócuos, tendo-se tornado uma alternativa às drogas ilícitas clássicas. O número total de NPS controladas pelo EMCDDA atingiu um total superior a 730 substâncias em 2018. Destas, cerca de 180 são canabinóides sintéticos ou compostos canabimiméticos, tendo sido detetados numa ampla gama de produtos diferentes [24,26].

Para além das substâncias ilícitas, como as NPS, uma enorme preocupação prende-se com o consumo crónico e/ou agudo de psicofármacos para uma finalidade médica e/ou não-médica, como por exemplo as benzodiazepinas, os opiáceos, os antidepressivos tricíclicos, a nicotina, entre inúmeros outros.

É estimado que o custo económico mundial e anual do abuso de substâncias seja de sensivelmente 600 000 milhões de dólares (cerca de 530 000 milhões de euros). Aproximadamente 70 % destes custos estão relacionados com a diminuição da produtividade (doença, morte prematura e encarceramento), 10 % estão relacionados com os cuidados de saúde (prevenção, tratamento e hospitalização), e 20 % com os danos materiais e esforços de fiscalização [31].

Por todas estas razões, a análise de substâncias de abuso em amostras biológicas, como urina, sangue, plasma, fluido oral, etc., é prioritária [25,32], tendo como principal propósito:

- O diagnóstico inicial de dependência de drogas;
- A monitorização em alguns programas de tratamento, nomeadamente no local de trabalho;
- O controlo de antidopagem;

- A triagem como método de monitorização dos efeitos de medicamentos ao longo do tempo;
- A identificação da substância em caso de sobredosagem;
- A identificação/quantificação da substância em casos forenses;
- A determinação da adesão ao tratamento em programas de abstinência.

No entanto, a análise de substâncias de abuso e psicofármacos em fluidos biológicos é um enorme desafio devido à sua complexidade. A presença de interferentes endógenos, como proteínas no plasma ou no soro, assim como de sais inorgânicos na urina, exige uma etapa de preparação das amostras (*clean-up*) antes da análise instrumental. Para além disso, os compostos alvo encontram-se geralmente presentes em concentrações muito baixas (ng mL^{-1} a $\mu\text{g mL}^{-1}$) [33–35]. Por este motivo, métodos eficientes de preparação da amostra tornam-se cruciais por forma a obter resultados analíticos credíveis e confiáveis.

1.3 A química analítica

A química analítica desempenha uma função crucial em diversas áreas do conhecimento, tendo um papel determinante na indústria, medicina e em praticamente todas as áreas científicas (figure 1.3).



Figura 1.3 – Possíveis interações da química analítica com outras áreas do conhecimento. Adaptado de [36].

O objetivo de qualquer processo analítico é fornecer informação qualitativa e/ou quantitativa (figura 1.4) [37,38]. Embora em alguns casos a determinação no local seja possível, a maioria das amostras são transportadas para o laboratório para se proceder à correspondente análise química. Deste modo, em muitos casos, uma das primeiras questões a considerar é o número de amostras (ou subamostras) a serem tomadas, assim como determinar o seu tamanho e proveniência, por forma garantir a sua representatividade. O protocolo de amostragem deve ser considerado cuidadosamente a fim de obter dados fidedignos. A amostragem é um processo complexo que depende, em primeiro lugar, da natureza da matriz a ser amostrada (sólida, líquida ou gasosa), do seu tamanho (como um todo ou como subamostras) e do objetivo da análise (ex., determinação de componentes principais ou análise vestigial, etc.). O transporte e condicionamento das amostras tem igualmente um papel importante neste processo, pois estas devem manter-se inalteradas até ao momento da respetiva análise.

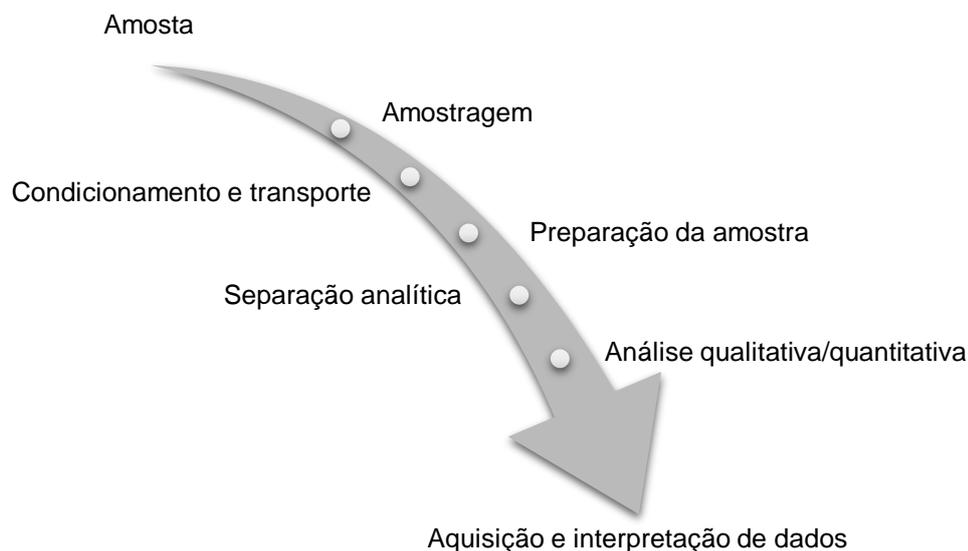


Figura 1.4 – Principais etapas de qualquer processo analítico. Adaptado de [38].

A preparação da amostra desempenha um papel crítico em qualquer laboratório analítico ou bioanalítico. Este passo é essencial quando são analisadas matrizes complexas, quando os compostos estão presentes em baixas concentrações (requerendo sua pré-concentração) e/ou quando existem

substâncias interferentes, bem como para preparar a amostra para a análise instrumental [39,40]. O tempo dispendido na preparação da amostra pode ser superior a 60 % do tempo total envolvido na análise química e as fontes de erro geradas podem ser da ordem dos 30 %, especialmente se as metodologias forem desenvolvidas para análise vestigial [41]. A preparação da amostra pode envolver diversas operações, nomeadamente a filtração, a extração, a evaporação, a derivatização, o *clean-up*, a hidrólise, a diluição, o ajuste de pH, entre muitas outras.

Depois da preparação da amostra, segue-se a separação analítica, tipicamente num sistema instrumental. A instrumentação escolhida deve ser definida de acordo com as características físicas e/ou químicas dos analitos envolvidos, assim como da amostra. Por outro lado, a sensibilidade e a seletividade necessárias devem ser tidas em consideração na escolha do sistema de separação. As técnicas de separação mais comumente utilizadas para a análise de poluentes orgânicos ou substâncias de abuso em matrizes ambientais ou biológicas são a cromatografia em fase gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) ou a eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*), podendo estarem acopladas a espectrometria de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*), como são os casos do GC-MS, LC-MS ou CE-MS. O Anexo I apresenta uma breve descrição dos fundamentos e principais características destas técnicas cromatográficas e eletroforéticas.

1.4 A preparação da amostra

Antes da análise instrumental é geralmente necessário um passo prévio de extração e concentração dos analitos orgânicos das matrizes envolvidas. Como consequência, os compostos são isolados seletivamente, sendo a sua concentração incrementada por forma a diminuir os limiares analíticos e tornar possível a sua identificação e/ou quantificação, assim como para compatibilizar com os sistemas instrumentais de separação e identificação [42].

Uma das primeiras abordagens implementadas na preparação de amostras para matrizes aquosas foi a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) [43], também conhecida por extração por solventes. É um processo de partição que consiste na transferência de um dado soluto de uma fase para outra, sendo ambas imiscíveis ou parcialmente miscíveis entre si. Frequentemente, uma das fases é água, ou uma mistura aquosa, sendo a outra um líquido orgânico apolar. A LLE foi amplamente utilizada durante diversas décadas devido à possibilidade de escolha de uma ampla variedade de solventes que melhor pudessem promover a extração de solutos de matrizes aquosas. No entanto, a LLE utiliza volumes muito elevados de solventes orgânicos, muitos dos quais tóxicos, tornando o seu descarte um problema e, portanto, não é uma abordagem amiga do ambiente. Por outro lado, como este tipo de extração é geralmente realizada manualmente, torna-se numa operação lenta, que exige elevada manipulação e que limita o trabalho de rotina. Contudo, outras técnicas de preparação de amostras foram posteriormente introduzidas, como a extração por *soxhlet*, a extração com fluidos supercríticos, a extração por micro-ondas e a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*) [44].

A SPE foi introduzida em meados da década de 70 e tem sido genericamente usada desde 1985 [39], sendo hoje a técnica de preparação de amostras mais popular. Os princípios da SPE são geralmente semelhantes aos da LLE, envolvendo a partição de solutos entre duas fases. Contudo, em vez de duas fases líquidas imiscíveis, a SPE envolve a interação entre um líquido (matriz/amostra ou solvente com analitos) e uma fase sólida (sorvente). Esta técnica permite a concentração e purificação de analitos por sorção num sorvente sólido e purificação dos compostos após a sua extração [45]. A popularidade da SPE deveu-se à necessidade de metodologias alternativas para a análise vestigial de diversos produtos de degradação de micropoluentes orgânicos. Muitos destes apresentam características polares, sendo parcialmente ou bastante solúveis em água, não podendo ser extraídos com bons níveis de recuperação qualquer que fosse o solvente orgânico usado por LLE [46]. No entanto, a SPE apresenta limitações, nomeadamente a baixa reprodutibilidade, os elevados tempos de operação e número de etapas, bem como a necessidade de grandes quantidades de amostra e solventes orgânicos (que podem criar riscos para o operador e para o ambiente) [39,40]. Desta forma, tornou-se

necessário o desenvolvimento de metodologias e técnicas analíticas que fossem mais amigas do ambiente, para além de minimizar ou eliminar as desvantagens observadas.

O termo “Química Verde” foi inicialmente introduzido em 1994 por Anastas, o qual reconhece que deveria existir uma maior responsabilização e consciencialização da comunidade científica para a poluição ambiental derivada da eliminação de resíduos produzidos em laboratório [47]. Mais tarde, Namiesnik (1999) [48] introduz o termo “Química Analítica Verde” (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*), no qual incluiu a redução da produção de resíduos e a diminuição da quantidade e toxicidade dos reagentes como critérios importantes para a escolha da metodologia analítica.

Os 12 princípios da GAC incluem [49]:

1. A aplicação de técnicas de análise direta por forma a evitar metodologias de preparação da amostra;
2. A minimização da quantidade e número de amostras;
3. A realização de medições *in situ*;
4. A integração de processos e procedimentos analíticos que reduzam o consumo de energia e de reagentes;
5. A seleção de métodos automatizados e miniaturizados;
6. Evitar processos de derivatização;
7. A redução da produção de um volume alargado de resíduos analíticos e a realização de uma gestão adequada dos mesmos;
8. A escolha de métodos multi-analitos, multi-resíduos ou multi-parâmetros invés de métodos que analisem um analito de cada vez;
9. A minimização do consumo de energia;
10. A escolha de reagentes obtidos de fontes renováveis;
11. A eliminação ou substituição de reagentes tóxicos;
12. A incrementação da segurança do operador.

Tendo em conta estes 12 princípios, a análise direta *in situ* parece ser a metodologia analítica mais “verde”. Contudo, na maioria dos casos, as matrizes são demasiado complexas e os analitos alvo encontram-se presentes em concentrações muito baixas, juntamente com dezenas ou mesmo centenas de

interferentes. Por estas razões, é necessário incluir quase sempre um passo de preparação da amostra na metodologia analítica.

Atualmente, as abordagens de amostragem miniaturizadas ganharam mais aceitação em quase todas as áreas científicas, devido à relação custo-benefício e manuseamento mais facilitado, bem como a sua simplificação, redução acentuada ou mesmo ausência de solventes orgânicos tóxicos, assim como de baixos volumes de amostra [48]. Estas técnicas podem ser divididas em técnicas de microextração baseadas em líquidos ou sólidos.

1.4.1 Microextração baseada em líquidos

A microextração baseada em líquidos é normalmente denominada por microextração em fase líquida (LPME, do inglês *Liquid Phase Microextraction*). A LPME engloba metodologias de preparação de amostra miniaturizadas baseadas em LLE, no qual apenas poucos μL de solvente são necessários para concentrar os analitos alvo da amostra, invés de dezenas ou centenas de mL necessários em LLE convencional [50]. Geralmente, o enriquecimento é acelerado via agitação magnética ou manual. Estas técnicas oferecem maior capacidade de extração, facilidade de adaptação, possibilidade de injeção direta do extrato final em sistemas instrumentais (*i.e.*, GC, LC ou CE), menor custo, maior estabilidade da fase extratora e possível ausência de efeitos de memória [51].

Na LPME, a extração normalmente ocorre entre uma pequena quantidade de um solvente orgânico imiscível ou pouco miscível em água (fase recetora) e uma amostra aquosa contendo os analitos alvo (fase dadora). Existem duas abordagens em LPME: de duas fases (bifásica) ou de três fases (trifásica). Na primeira, a fase extratora encontra-se em contacto direto com a amostra, o que facilita o processo de extração. No entanto, a seletividade e a remoção de interferentes (*clean-up*) é reduzida. Neste modo, o solvente de extração é limitado a solventes orgânicos imiscíveis com água. Em LPME trifásica, a fase dadora e a fase recetora encontram-se separadas através de um terceiro solvente (ou fase), que é imiscível nas anteriores. Esta configuração melhora

consideravelmente a seletividade do método e torna possível a utilização de uma fase recetora aquosa, permitindo a injeção direta em LC ou CE [51].

A LPME pode ser dividido em três técnicas principais [52] (figura 1.5):

- Microextração de gota única (SDME, do inglês *Single Drop Microextraction*);
- Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*);
- Microextração em fase líquida suportada por fibra oca (HF-LPME, do inglês *Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction*).

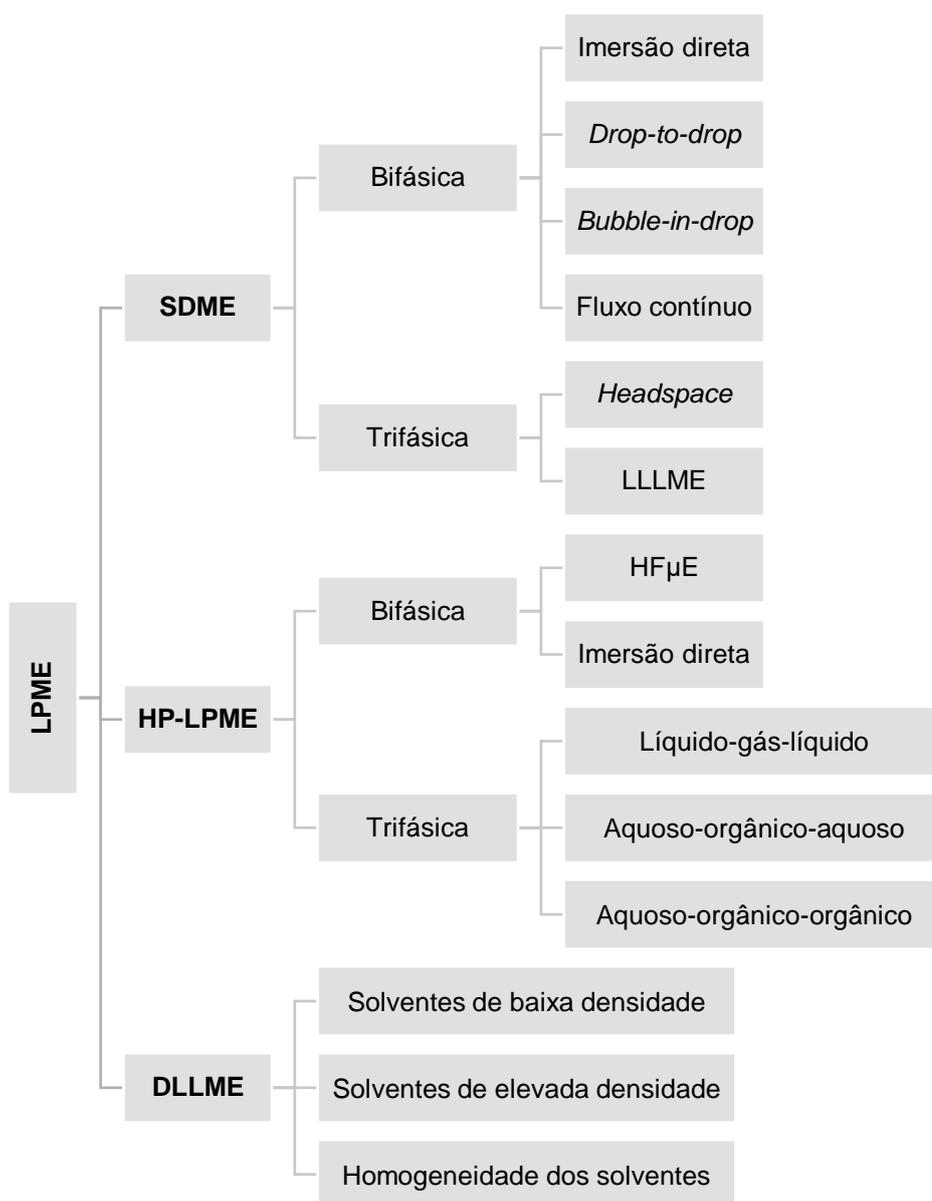


Figura 1.5 – Representação esquemática das principais técnicas baseadas em LPME. Adaptado de [51].

1.4.1.1 Microextração de gota única (SDME)

O uso de uma única gota como fase extratora foi relatado pela primeira vez por Liu e Dasgupta em 1995 [53]. Este trabalho envolveu a aplicação de uma gotícula como fase extratora por forma a enriquecer amoníaco e dióxido de enxofre em meio gasoso. Um ano depois, os mesmos autores publicaram um trabalho no qual usaram apenas uma gota de clorofórmio (~ 1,3 µL) para extrair dodecil sulfato de sódio em meio aquoso [54]. Nesse mesmo ano, Jeannot e Cantwell publicam um trabalho no qual descrevem o uso de uma microseringa por forma a suspender apenas uma gota de solvente imiscível (~ 8 µL) para enriquecimento em matriz aquosa, para posterior injeção direta em GC [55]. Esta técnica foi denominada de “*solvent microextraction into a single drop*”, que mais tarde viria a obter a designação de “*single drop microextraction*” (SDME).

Atualmente, a técnica de SDME apresenta muitas variantes, podendo operar com recurso a partição por duas ou três fases (LLLME, do inglês *Liquid-Liquid-Liquid Microextraction*), em modo de imersão direta ou por *headspace*, em modo estático ou contínuo, usando muito pouca quantidade de amostra (*drop-to-drop*) ou aumentando a área superficial da gota com recurso à formação de bolhas (*bubble-in-drop*) [50,56–58]. As figuras 1.5 e 1.6 mostram os diferentes modos de operação com recurso a SDME.

As principais áreas de aplicação da SDME têm sido a ambiental e a clínica/forense [57], sendo uma técnica simples e que exige pouca aquisição de equipamentos. Apresenta também baixo consumo de solvente orgânico e tem elevado potencial de automação. No entanto, apresenta baixa precisão, sendo a sua principal desvantagem a instabilidade das gotas extradoras, particularmente quando altas velocidades de extração são empregadas. A manipulação das seringas para a formação da gota é igualmente maçadora [51].

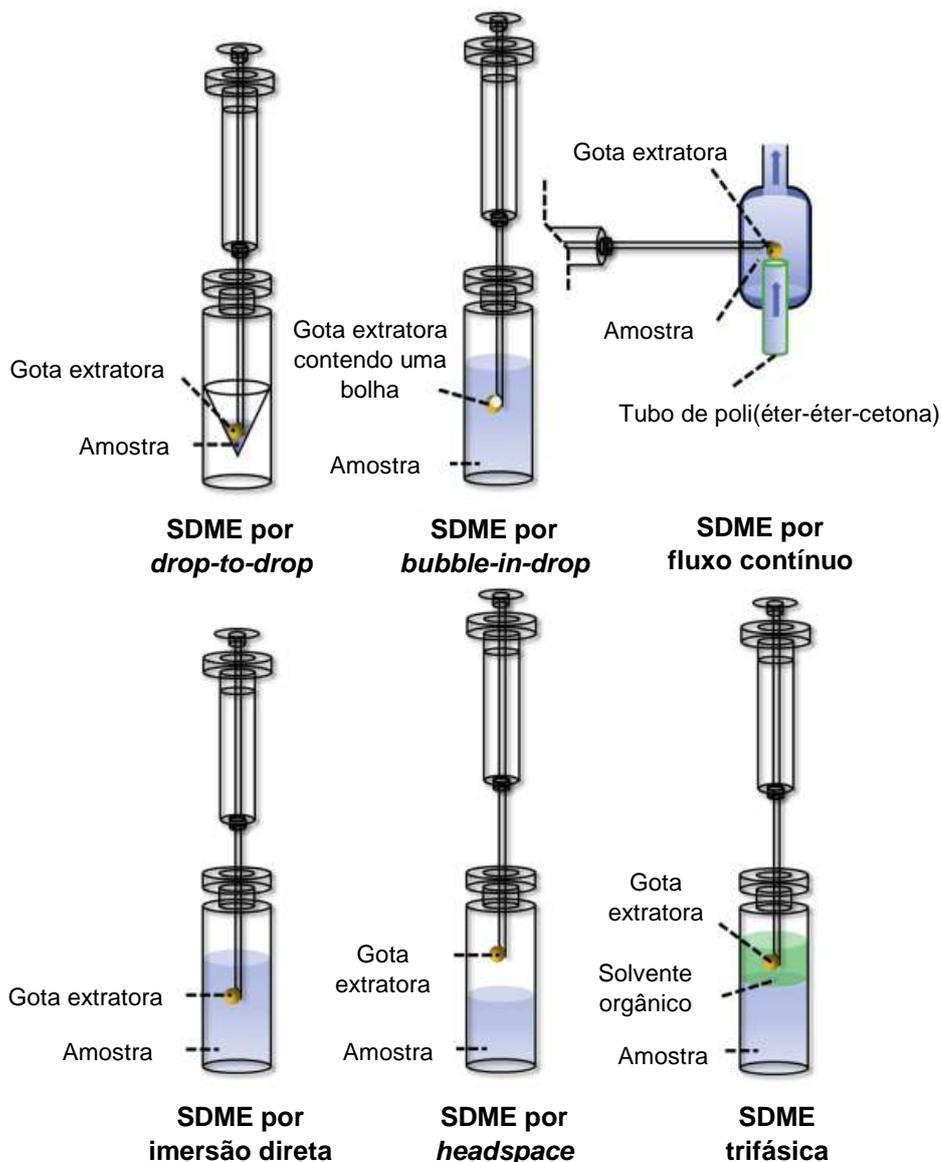


Figura 1.6 – Imagens referentes aos diferentes modos de operação com recurso a SDME. Adaptado de [56].

1.4.1.2 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A DLLME foi introduzida por Rezaee *et. al.* como uma nova técnica miniaturizada baseada em LLE. Os mecanismos de extração são os mesmos que a LLE convencional, na qual a transferência de massa ocorre pelas diferenças de partição (solubilidade) entre os analitos alvo e a fase aquosa (amostra ou dadora) e a fase orgânica (extratora ou recetora) imiscível ou pouco miscível com a fase aquosa. No entanto, em DLLME as áreas de contacto entre

estas duas fases é incrementada pela adição de um solvente dispersor (orgânico, usualmente mais denso que a água), levando à formação de inúmeras gotículas em solução. Isto permite que a cinética e eficiência de extração sejam aumentadas pela existência de uma maior área de contacto entre as duas fases [50,51].

Em DLLME, o procedimento habitual (figura 1.7) envolve a rápida injeção dos solventes de extração e de dispersão na amostra aquosa, levando à formação de múltiplas gotículas, podendo ser auxiliada por agitação magnética ou manual, ou ainda por sonicação. Posteriormente ocorre um passo de centrifugação no sentido do solvente de extração (por ser mais denso que a matriz) se depositar no fundo no frasco de amostragem. No final, este subnadante pode ser injetado diretamente no sistema instrumental.

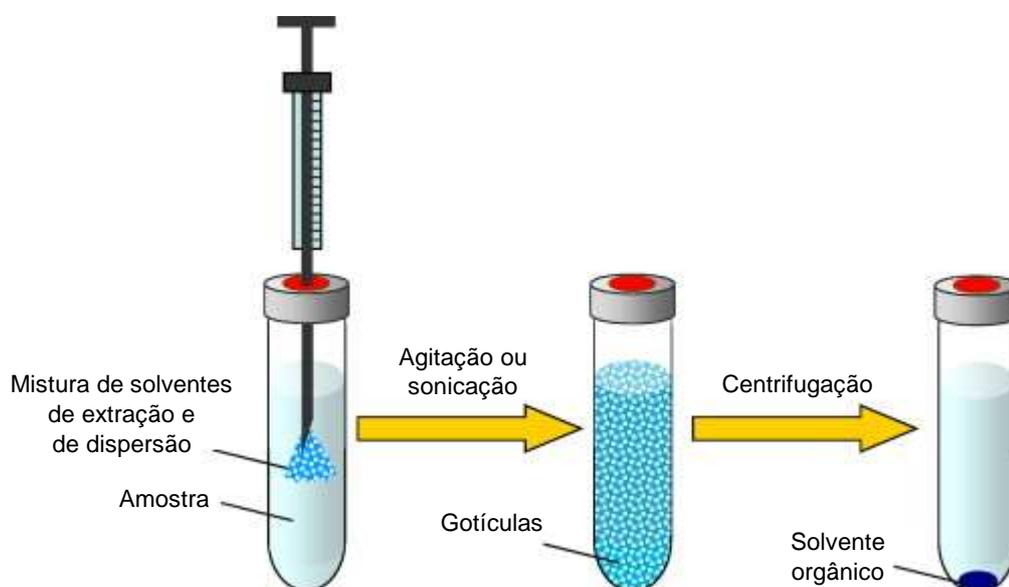


Figura 1.7 – Imagens relativas ao procedimento habitual por DLLME. Adaptado de [59].

As principais vantagens de DLLME são a simplificação, baixo custo, eficiência, elevados fatores de concentração e tempos de extração baixos [50]. Contudo, algumas desvantagens são reconhecidas, principalmente na análise de amostras muito complexas (ex., fluidos biológicos), uma vez não ser uma técnica muito seletiva. Esta abordagem é igualmente limitada na análise com compostos de baixa polaridade [60].

1.4.1.3 Microextração em fase líquida suportada por fibra oca (HF-LPME)

A HF-LPME foi introduzida em 1999 por Pedersen-Bjergaard como forma de contornar algumas das limitações da SDME [61], nomeadamente a instabilidade da gota durante o processo de microextração. Deste modo, a HF-LPME foi inicialmente desenvolvida como uma configuração “protegida” de SDME, por forma a serem obtidos processos de microextração mais estáveis e com maior reprodutibilidade.

Em HF-LPME, um solvente orgânico é pipetado e depois imobilizado nos poros de uma fibra oca de polipropileno, hidrofóbica e porosa (1,5-10 cm de comprimento), por forças capilares. É então formada uma membrana líquida suportada (SLM, do inglês *Supported Liquid Membrane*). Depois, uma fase recetora, que pode ser um solvente orgânico, uma solução ácida ou básica, é introduzida no lúmen da fibra oca por intermédio de uma microseringa. De seguida, coloca-se a fibra na amostra, sendo a transferência de massa acelerada via agitação magnética. Estas fibras podem ter a forma de “U” por forma a maximizar a área superficial e facilitar o manuseamento das mesmas. Por fim, é retirada a fase recetora do interior da fibra oca, sendo depois injetada no sistema instrumental [62,63]. Na figura 1.8 estão representados alguns dos componentes do procedimento via HF-LPME.



Figura 1.8 – Imagens referentes aos componentes do mecanismo de extração por HF-LPME. Adaptado de [64].

Desde o seu desenvolvimento, a HF-LPME tem sido largamente aceite pela comunidade científica, graças à simplicidade, notável processo de *clean-up*, eficiência, baixo custo e consumo negligenciável de solventes orgânicos [63]. Este fenómeno também se deveu ao facto desta técnica usar dispositivos descartáveis que são aplicados apenas uma vez, não havendo o risco de contaminação cruzada ou de efeitos de memória [61].

A técnica de HF-LPME pode ser empregue como sistema de extração bifásico, se a fase recetora for um solvente orgânico (normalmente o mesmo empregue para SLM, ex., tolueno ou *n*-octanol), ou trifásico, se a fase recetora for uma solução aquosa (normalmente HCl ou NaOH com baixa concentração). Assim, para o primeiro, a eficiência de extração é regida pela partição do analito entre a amostra (aquosa) e o solvente orgânico imobilizado no SLM e presente no lúmen da fibra. Para o segundo, este mecanismo ocorre por partição entre o analito na amostra (aquosa) e o solvente orgânico imobilizado no SLM, e depois entre este e a fase recetora (igualmente aquosa). Neste sentido, os analitos hidrofóbicos ou mais apolares são facilmente extraídos usando HF-LPME bifásico. Por outro lado, os analitos iónicos hidrofóbicos são facilmente recuperados por HF-LPME trifásico, pois são normalmente extraídos na sua forma neutra, ficando depois retidos na fase recetora após ionizarem [51,62,63]. No entanto, esta técnica não é indicada para a microextração de compostos polares, uma vez apresentarem baixa solubilidade em solventes orgânicos imiscíveis com a água [50]. Adicionalmente, HF-LPME é de difícil manipulação, uma vez o volume da fase recetora a ser retirado do interior da fibra oca com uma microsseringa para análise instrumental ser muito reduzido. Outra limitação desta técnica prende-se com a sua difícil automatização, sendo bastante limitada para análise de rotina.

1.4.1.3.1 Microextração em fibra oca (HF μ E)

De forma a contornar algumas das limitações de HF-LPME, nomeadamente a falta de praticidade da técnica, foi desenvolvida uma técnica híbrida, a microextração em fibra oca (HF μ E, do inglês *Hollow Fiber Microextraction*), para a análise vestigial de compostos orgânicos em matrizes

reais [65,66]. Na HF μ E, a etapa de microextração é realizada com recurso a um dispositivo analítico descartável e de baixo custo, constituído por uma membrana oca de polipropileno semelhante à HF-LPME (10 mm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro interno). Este dispositivo é seguidamente embebido num solvente orgânico adequado e operado sob a tecnologia de amostragem por flutuação [67]. Seguidamente, o dispositivo HF μ E é inserido num frasco contendo um *insert* e 100 μ L do mesmo solvente utilizado na microextração. Este é posteriormente fechado e submetido ao tratamento ultrassónico por alguns minutos por forma ocorrer a retroextração ou a difusão dos compostos, sendo depois colocado no amostrador automático para a análise instrumental (neste caso por GC-MS). Na figura 1.9 encontra-se representado o ciclo analítico proposto para a HF μ E.



Figura 1.9 – Esquema relativo ao procedimento experimental proposto no ciclo HF μ E.
Adaptado de [65,66].

Devido às reduzidas dimensões da HF, a retroextração pode ser realizada num único passo sem a necessidade de remoção do dispositivo, havendo

espaço suficiente para a operação de injeção. Desta forma, a HF μ E pode ser facilmente combinada com amostradores automáticos de sistemas instrumentais convencionais presentes em laboratórios de química analítica, sendo uma abordagem abrangente e dedicada ao uso em rotina. No entanto, embora esta técnica seja de extrema simplificação e de baixo custo, continua a ser apenas dedicada ao enriquecimento de compostos com elevada solubilidade em solventes orgânicos (imiscíveis com a água), nomeadamente aos que apresentam características de baixa polaridade.

1.4.2 Microextração baseada em sólidos

Para além das técnicas baseadas em partição, como as de microextração baseada em líquidos, as tecnologias de amostragem baseadas em sorção também ganharam relevo nas últimas décadas, uma vez apresentarem elevada performance para o enriquecimento de compostos orgânicos [67]. Destas, destacam-se as técnicas de microextração estática, nomeadamente a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*), a extração sortiva em barra de agitação (SBSE, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*) e a microextração adsortiva em barra (BA μ E, do inglês *Bar Adsorptive Microextraction*).

1.4.2.1 Microextração em fase sólida (SPME)

A SPME foi introduzida por Arthur e Pawlizyn em 1990 [68]. Este trabalho correspondeu à primeira aplicação de um dispositivo para o enriquecimento estático baseado em sorção (nesta caso usando um filme de poliimida) para compostos orgânicos em matrizes aquosas previamente à injeção direta num sistema cromatográfico. É de realçar a característica *solventless* (sem recurso a solvente) da etapa de retroextração empregando a desorção térmica (TD, do inglês *Thermal Desorption*). Em SPME, uma fibra de sílica fundida contendo um sorvente que pode ser usada para o enriquecimento de compostos orgânicos em meio aquoso tanto por imersão direta como por *headspace*. Depois, os

compostos podem ser retroextraídos tanto por dessorção líquida (LD, do inglês *Liquid Desorption*) como por TD, dependendo essencialmente dos analitos alvo e do sistema instrumental empregado. Na figura 1.10 encontra-se representado um possível procedimento experimental com recurso a SPME.

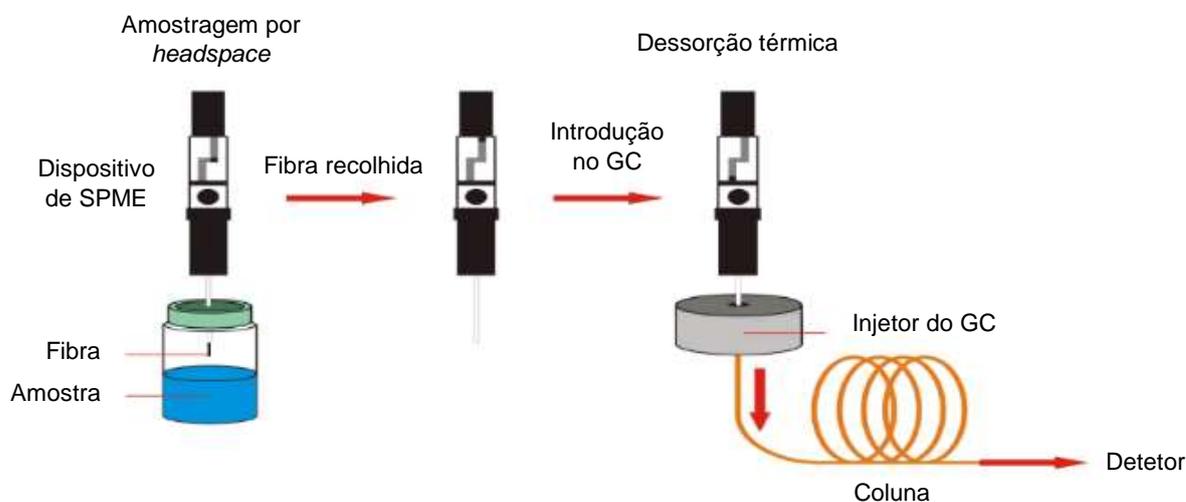


Figura 1.10 – Imagens referentes ao procedimento experimental de SPME por *headspace* com TD e posterior análise por GC. Adaptado de [69].

A fase sorvente mais amplamente usada em SPME tem sido o polidimetilsiloxano (PDMS), um revestimento polimérico à base de silicone. Esta fase polimérica apolar promove interações hidrofóbicas com os analitos alvo, nomeadamente através de forças de Van-der-Waals, embora ligações de hidrogénio possam ocorrer com os átomos de oxigénio no PDMS, dependendo essencialmente da estrutura química dos analitos envolvidos [70]. O PDMS possui propriedades muito interessantes de difusão e termoestabilidade, permitindo que seja empregue numa ampla gama de temperaturas (-20 a 320 °C). Por esta razão, encontra-se presente na maioria das colunas capilares de GC [71].

Desde o seu desenvolvimento, a técnica de SPME demonstrou inúmeras vantagens para a análise de compostos orgânicos em diferentes matrizes, nomeadamente [43]:

- A redução ou eliminação do uso de solventes;

- Requer pequena quantidade de amostra;
- Emprega menores tempos de preparação de amostra;
- A automatização é relativamente simples, permitindo análises de alto rendimento;
- Permite a extração e pré-concentração de analitos em matrizes sólidas, líquidas ou gasosas;
- Permite a implementação de análises no local de amostragem ou *in vivo*.

A eficiência de extração por SPME pode ser calculada teoricamente [72], uma vez que ocorre por equilíbrio entre duas fases. Após alcançado o equilíbrio e, quando o volume de amostra é substancialmente superior ao volume do material sorvente, a quantidade de massa dos analitos extraídos pode ser calculada, tal como é descrito pela equação 1.1:

$$n = K_{fs} \times V_f \times C_0 \quad (1.1)$$

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

Atualmente são propostos inúmeros materiais sorventes comerciais ou preparados em laboratório para revestimento em SPME, incluindo nanotubos de carbono, divinilbenzeno (DVB), poliacrilonitrila, líquidos iônicos poliméricos (PILs), polianilina (PANI), fluoroplástico politetrafluoroetileno amorfo, entre muitos outros [73,74]. No entanto, o revestimento por PDMS ainda é amplamente empregue para SPME.

As principais desvantagens de SPME prendem-se com o custo relativamente elevado das fibras, a capacidade limitada de extração da mesma, assim como ser propenso a elevados efeitos de matriz.

1.4.2.2 Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)

Por forma a contornar algumas das limitações de SPME(PDMS), Baltussen *et. al.* [75] introduziram, em 1999, a SBSE como uma nova técnica de enriquecimento de amostras para matrizes aquosas. Esta consiste no uso de uma barra de agitação magnética (10 a 20 mm de comprimento) revestida com material sortivo (usualmente PDMS) imobilizado sob a mesma (figura 1.11).



Figura 1.11 – Representação esquemática dos constituintes de um dispositivo usada na SBSE. Adaptado de [76].

SBSE pode operar tanto por imersão direta como por *headspace* (figura 1.12), enquanto a retroextração pode ser efetuada com recurso a TD ou LD. A primeira é mais direta, *solventless* e *on-line*, sendo no entanto limitada para compostos voláteis e semi-voláteis, requerendo uma unidade dedicada para a operação de aquecimento e apenas compatível com análise por GC. Por outro lado, a abordagem por LD pode ser combinada com qualquer sistema instrumental, seja GC, HPLC ou mesmo eletroforese capilar (CE), permitindo também a reanálise [77].

Em SBSE(PDMS), as eficiências de extração de um analito dependem da partição entre os mesmos e o PDMS presente na barra de agitação, e a matriz (aquosa), apresentando um comportamento semelhante à distribuição descrita pelo coeficiente de partição octanol-água ($K_{PDMS/água} \approx K_{O/água}$). Assim, o coeficiente de distribuição entre o PDMS e a água ($K_{PDMS/água}$) é definido pela razão entre a concentração do analito na fase de PDMS (C_{PDMS}) e na fase aquosa ($C_{água}$), depois de atingido o equilíbrio da extração, tal como é descrito pela equação 1.2:

$$K_{O/\text{Água}} \approx K_{\text{PDMS}/\text{Água}} = \frac{C_{\text{PDMS}}}{C_{\text{Água}}} = \frac{m_{\text{PDMS}}}{m_{\text{Água}}} \times \frac{V_{\text{PDMS}}}{V_{\text{Água}}} \quad (1.2)$$

onde m_{PDMS} é a massa do analito na fase de PDMS, $m_{\text{Água}}$ a massa do analito na fase aquosa, $V_{\text{Água}}$ o volume de amostra na fase aquosa e V_{PDMS} o volume em PDMS [72,75]. Assim sendo, a quantidade de PDMS e polaridade dos analitos (definido pelo logaritmo coeficiente de partição octanol-água, $\log K_{O/W}$) é crítica para a eficiência de extração de SBSE(PDMS). Isto permitiu que Baltussen e colaboradores obtivessem uma eficiência superior quando comparados com a SPME(PDMS) [78], pois SBSE usa volumes muito superiores de PDMS - figura 1.13.

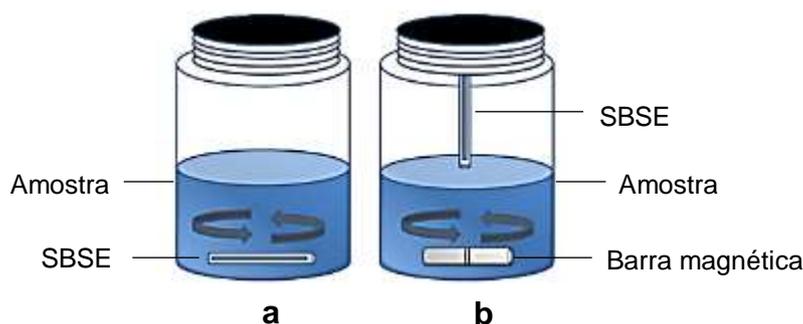


Figura 1.12 – Modos de extração em SBSE: por imersão direta (a) ou por *headspace* (b). Adaptado de [77].

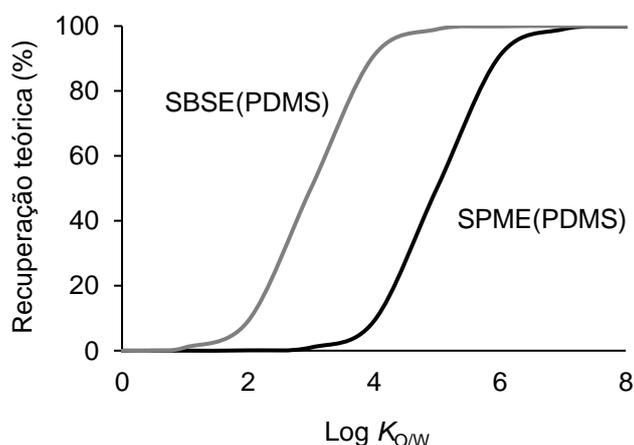


Figura 1.13 – Recuperações teóricas de SPME(PDMS: 0,5 μL) e SBSE(PDMS: 50 μL) em função de $\log K_{O/W}$ a condições experimentais idênticas. Adaptado de [79].

Contudo, a SBSE(PDMS) é limitada à recuperação de compostos com baixa polaridade, sendo uma grande desvantagem para a análise de compostos poluentes ou contaminantes, uma vez que uma pequena percentagem apresenta elevada polaridade ($\log K_{OW} < 3$). Por forma a contornar esta limitação, foi introduzido SBSE revestida com outros materiais, nomeadamente PDMS/poliacrilato (PA) e PDMS/etilenoglicol (EG), que provaram alguma melhoria em relação a SBSE(PDMS) para a extração daqueles compostos [80]. Adicionalmente, surgiram outras fases de revestimento para SBSE, principalmente por síntese em laboratório usando tecnologia *sol-gel* e síntese de materiais monolíticos. Estes incluem líquidos iónicos [81], β -ciclodextrina [82], álcool polivinílico (PDMS/PVA) [83], carvão ativado (PDMS/AC) [84], *N*-vinilpirrolidona (NVP)-co-divinilbenzeno (DVB) [85], entre muitas outras [28,86]. Embora estas modificações para SBSE tenham apresentado bons resultados para a extração de compostos mais polares, algumas desvantagens ainda subsistem, nomeadamente na dificuldade de síntese destes materiais e da respetiva robustez, bem como o número de extrações que podem ser efetuadas pelos mesmos antes da performance começar a decrescer [87].

1.4.2.3 Microextração adsortiva em barra (BA μ E)

A técnica de BA μ E foi introduzida em 2010 por Neng *et. al.* [88]. Esta abordagem foi apresentada como uma alternativa para as baixas eficiências de SPME e SBSE no sentido do enriquecimento de compostos mais polares ($\log K_{OW} < 3$) em meio aquoso. Esta técnica tem vindo a demonstrar elevada eficácia para a análise vestigial tanto de compostos polares como de apolares numa grande variedade de matrizes [10,59,78], uma vez permitir selecionar o sorvente mais seletivo de acordo com cada aplicação.

Os dispositivos BA μ E consistem num tubo oco de polipropileno (15 mm em comprimento, 2 mm de diâmetro interno e 0,5 mm de espessura de parede) no qual é fixado material sorvente adequado por via de um adesivo conveniente (figura 1.14). A quantidade de material sorvente fixado é geralmente compreendido entre 0,5 e 5,0 mg [88,89], dependendo essencialmente da fase sorvente, tendo desvio padrão relativo (RSD) inferior a 5 % [90].

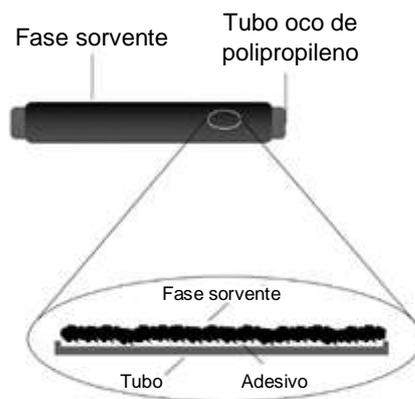


Figura 1.14 – Representação esquemática de dispositivo BAμE. Adaptado de [67].

Os sorventes mais vulgarmente usados em BAμE têm sido os carvões ativados (ACs) e as fases poliméricas.

Os ACs possuem boa capacidade de retenção de compostos orgânicos ($\approx 100\text{-}500 \mu\text{g mg}^{-1}$) devido à estrutura porosa e de locais ativos que apresentam, nos quais fenómenos eletrostáticos e/ou dispersivos podem ocorrer, sendo dependente de seu pH_{PZC} (pH do ponto de carga zero), da área superficial e das dimensões dos poros [91]. Quando o pH da solução é igual ao pH_{PZC} , o número de grupos superficiais positivos e negativos é igual, tornando a carga superficial do AC nula. Por outro lado, se o pH da solução for abaixo do pH_{PZC} , a carga superficial dos ACs será negativa, se for acima do pH_{PZC} , a carga superficial será positiva [92]. Esta característica pode ser usada por forma a incrementar as eficiências de extração manipulando o pH da solução para promover este tipo de interações, uma vez alguns compostos prioritários serem ionizáveis para valores de pH compreendidos entre 2,0 e 12,0. Por outro lado, a presença de heteroátomos à superfície dos ACs, nomeadamente azoto, enxofre, fósforo, e principalmente oxigénio (figura 1.15), pode favorecer a ocorrência de pontes de hidrogénio com compostos orgânicos. Adicionalmente, devido à natureza orgânica destes materiais, podem igualmente ocorrer interações do tipo $\pi\text{-}\pi$, o que favorece a adsorção de compostos aromáticos e/ou hidrofóbicos [93]. Por fim, as elevadas áreas superficiais destes biomateriais (até $2500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), derivadas da presença de um grande volume de macroporos ($> 50 \text{ nm}$), mesoporos (2-50 nm) e microporos ($< 2 \text{ nm}$), são uma vantagem inequívoca relativamente a outros materiais sorventes.

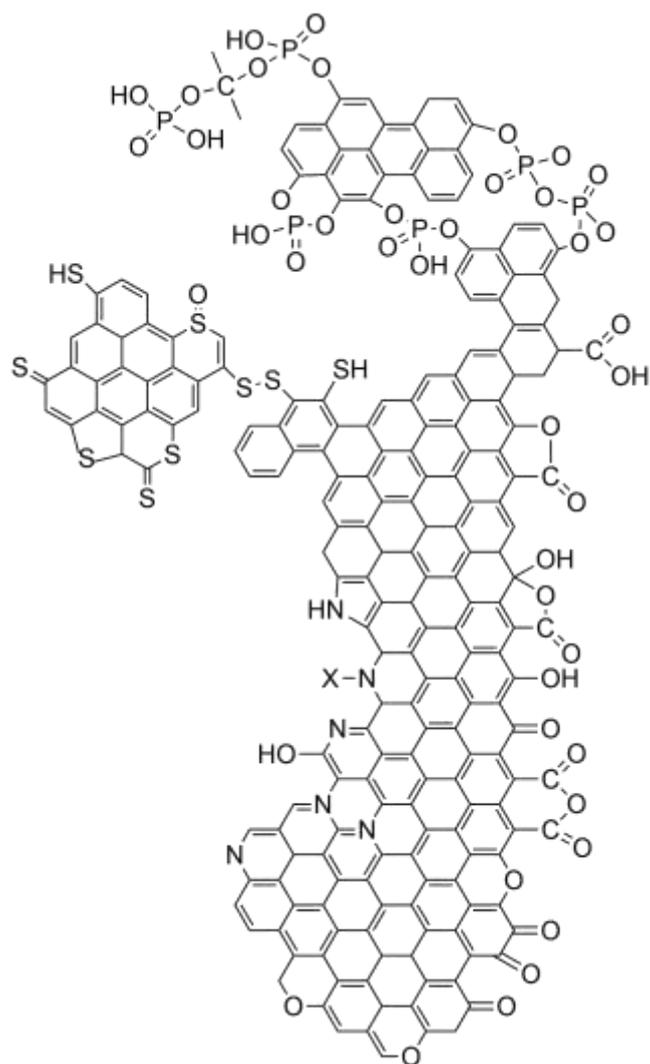


Figura 1.15 – Grupos ativos de oxigênio, azoto, enxofre e fósforo que podem ser encontrados à superfície de carvões ativados. Adaptado de [93]. As estruturas químicas foram obtidas com recurso a *software* específico [15].

Para além dos ACs, as fases poliméricas usadas tradicionalmente em SPE apresentam igualmente capacidade de reter compostos orgânicos por vários fenómenos de interação, incluindo do tipo fase reversa ou iónica. Destes, destacam-se o poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB), o poliestireno-divinilbenzeno-co-*N*-vinilpirrolidona (PS-DVB-NVP), o octadecil sílica (C18), o ciano (CN), o etilvinilbenzeno-co-divinilbenzeno (EVB-DVB), o etildivinilbenzeno-co-*N*-vinilpirrolidona (EVB-NVP) e suas modificações, nomeadamente para troca aniónica ou catiónica (figura 1.16), entre outros. Os mecanismos presentes podem ser do tipo π - π , dipolo-dipolo, ligações de hidrogénio e interações

hidrofóbicas, assim como de permuta iônica, dependendo essencialmente do polímero usado.

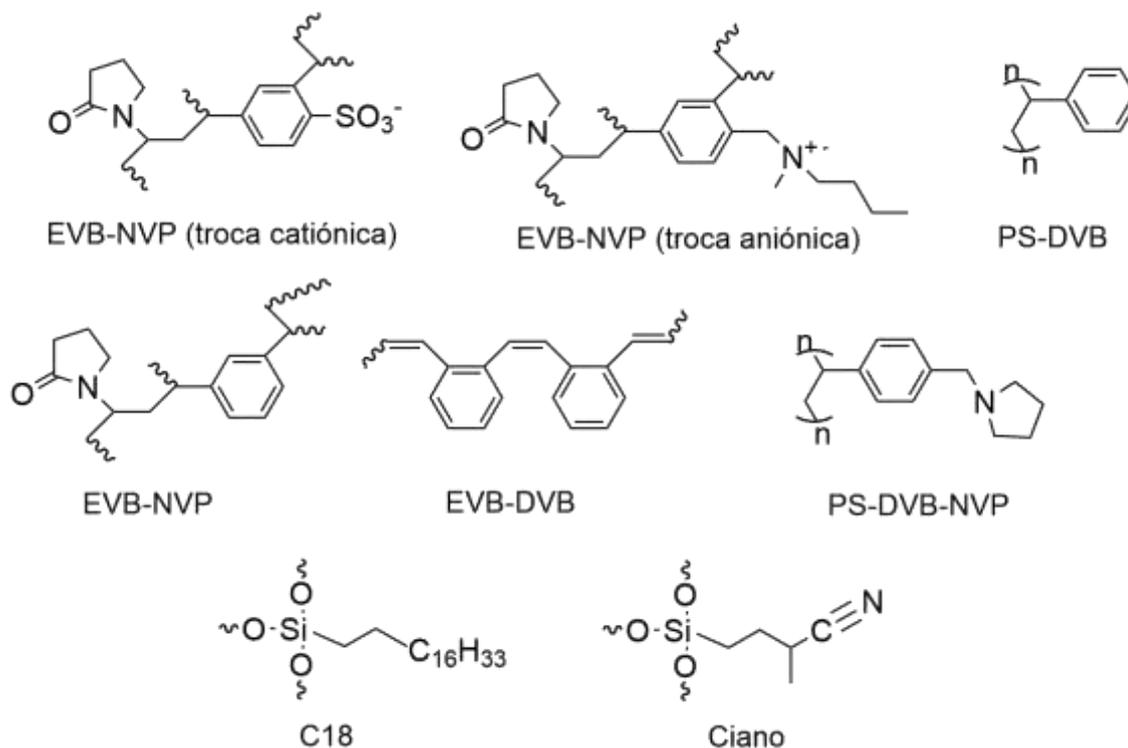


Figura 1.16 – Estruturas químicas de alguns polímeros usados como fase sorvente para BAμE. Estas estruturas foram obtidas com recurso a *software* específico [15].

A BAμE permite fixar facilmente ACs e fases poliméricas a dispositivos convenientes sem comprometer as propriedades químicas dos mesmos. Por outro lado, esta técnica tem em conta alguns dos objetivos da GAC [49], nomeadamente:

- Uma abordagem analítica que permite um processo de enriquecimento estático e miniaturizado;
- O uso de volumes negligenciáveis de solventes orgânicos;
- O uso de pequenas quantidades de material sorvente;
- A redução ou eliminação da necessidade de derivatização;
- A promoção da redução das etapas analíticas sem comprometer a eficiência, especialmente para os compostos mais polares.

Enquanto a técnica de SPME e SBSE emprega processos de enriquecimento por *headspace* ou imersão direta, a técnica de BA μ E opera por “tecnologia de amostragem por flutuação”. Neste caso, os dispositivos de microextração, sendo menos densos que a água, são alocados imediatamente sob do vórtice formado pela agitação magnética (figura 1.17). Esta nova abordagem permite obter resultados reproduzíveis e robustos, sem a degradação física que pode ocorrer durante o processo de equilíbrio, como por exemplo acontece com a técnica de SBSE [94], uma vez que os dispositivos BA μ E não estão em contacto físico com as paredes de vidro do frasco de amostragem.

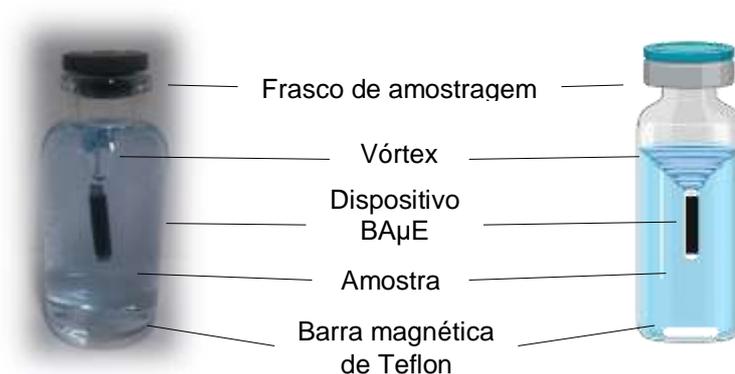


Figura 1.17 – Imagem real e representação esquemática exemplificando a metodologia de amostragem por flutuação usada em BA μ E. A imagem à direita foi criada a partir do endereço eletrônico www.biorender.com.

Após o processo de microextração, os dispositivos são submetidos a uma etapa de LD que irá dessorver os analitos por sonicação usando um solvente adequado para posterior análise instrumental, *i.e.*, HPLC-DAD, GC-MS, CE-DAD, ou LC-MS.

Devido à enorme versatilidade de BA μ E, nomeadamente para a escolha do sorvente adequado para determinada aplicação, a técnica foi já aplicada para a análise de uma variedade de compostos orgânicos em matrizes biológicas, ambientais e alimentares, *ex.*, substâncias de abuso [95], fungicidas [96], ácidos fenólicos [97], PPCPs [98], entre muitos outros.

1.4.2.3.1 O ciclo analítico da BA μ E

Conforme referido anteriormente, o ciclo analítico da técnica BA μ E, como para SPME e SBSE, envolve duas etapas: a microextração dos analitos da amostra, seguida da retroextração dos mesmos da fase sorvente para um solvente adequado para posterior análise no sistema instrumental. Desta forma, são realizados ensaios por forma a otimizar a recuperação dos compostos alvo, tendo em conta os parâmetros que podem afetar positivamente ou negativamente aquelas duas etapas. Na figura 1.18 encontra-se representado uma estratégia de otimização univariada que pode ser empregue em BA μ E-LD [99].

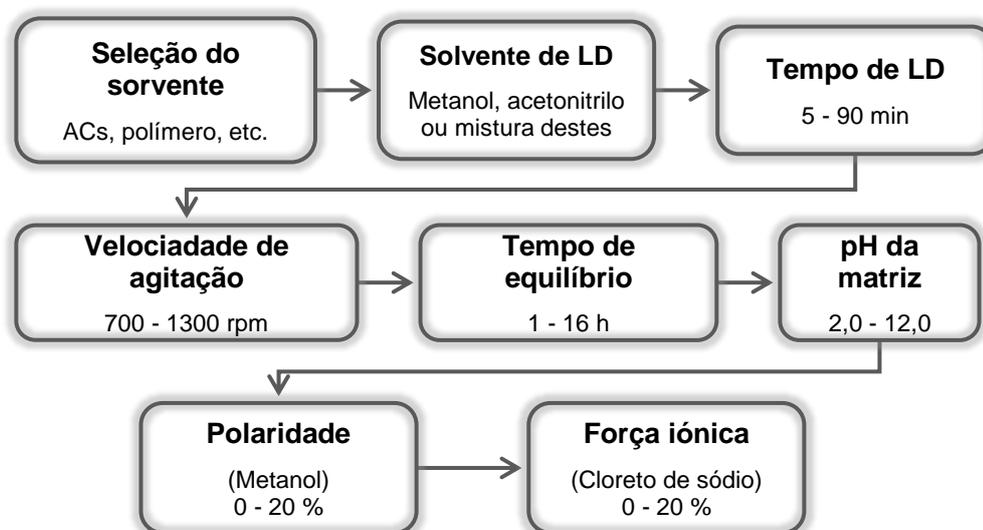


Figura 1.18 – Fluxograma que descreve uma estratégia de otimização univariada usada em estudos de otimização por BA μ E-LD. Adaptado de [99].

Genericamente, o processo de otimização de BA μ E-LD começa com a escolha do melhor sorvente para microextração (*i.e.*, ACs, polímeros, etc.) usando condições padrão: 3 h de tempo de equilíbrio, pH 5,5, 1000 rpm; retroextração por 30 min sob sonicação usando 200 μ L de metanol. Ao usar essas condições, a seletividade do material sorvente em meio aquoso pode ser rapidamente avaliada [88–90,95,96,98,99].

Os parâmetros que podem afetar a etapa de retroextração dizem respeito ao tempo e tipo de solvente usado para a LD, por forma a garantir a completa dessorção dos analitos da fase sorvente.

Os fatores que podem afetar a etapa de extração prendem-se com a velocidade de agitação e tempo de equilíbrio, uma vez condicionarem significativamente a distribuição e cinética dos compostos alvo entre as duas fases (amostra e sorvente) [88]. Por outro lado, as características da matriz (pH, força iónica e polaridade) podem ser manipuladas e otimizadas por forma a maximizar a recuperação dos analitos. O controlo do pH é muito importante sobretudo quando envolve a análise de compostos ionizáveis, uma vez a forma química poder influenciar diretamente as interações que podem ocorrer com a fase sorvente. De uma forma geral, os melhores resultados com BA μ E são obtidos quando o pH da matriz favorece a não ionização dos compostos alvo, e permita que a carga superficial dos ACs seja próximo de zero [98,100–102], favorecendo as interações hidrofóbicas e π - π . Para a maioria das aplicações publicadas usando BA μ E com revestimento polimérico, as maiores recuperações são geralmente obtidas quando os compostos alvo e a fase sorvente (geralmente DVB e suas modificações) não estão ionizados [90,103–105], podendo favorecer as interações do tipo de fase reversa. No entanto, os mecanismos envolvidos não são totalmente compreendidos, sendo necessários estudos adicionais por forma a estabelecer uma relação clara entre as propriedades físico-químicas dos ACs ou dos polímeros e as eficiências de extração por BA μ E.

A polaridade da matriz desempenha um papel importante na adsorção de compostos orgânicos no processo de equilíbrio, incluindo em BA μ E. Este parâmetro é particularmente importante para os compostos mais apolares ($\log K_{ow} > 5,0$), pois no processo de enriquecimento estático, estes analitos podem ser adsorvidos nas paredes do frasco de vidro (“*wall effect*”) [77]. Por forma a contornar esta possibilidade, são geralmente realizados ensaios usando metanol como modificador orgânico em concentrações compreendidas entre 0 e 20 % (v/v), para aumentar a solubilidade dos analitos na matriz [100]. No entanto, a solubilidade na matriz pode aumentar de tal ordem que limita a microextração pelos dispositivos BA μ E.

A força iónica da amostra também desempenha um papel relevante no processo de microextração, a qual é normalmente controlada pela adição de sais

inertes, como o cloreto de sódio (NaCl, 0 a 20 %, p/v). Foi relatado que, para a abordagem SBSE(PDMS), a adição de NaCl dificulta o processo de microextração para os compostos apolares ($\log K_{OW} > 3,5$), podendo levar à migração destes para a superfície da matriz aquosa (“oil effect”) [77,87]. Por outro lado, a adição de NaCl parece melhorar as recuperações para os analitos polares na metodologia SBSE(PDMS), uma vez a presença de sais inertes diminui a solubilidade em água, forçando os compostos para fase sorvente (“salting out effect”) [105]. Estes fenómenos também podem ser extrapolados para a técnica de BA μ E, principalmente quando revestido por fases poliméricas.

1.4.2.3.2 Melhoramentos da BA μ E

Desde sua gênese, a tecnologia BA μ E tem vindo a ser constantemente melhorada, com especial ênfase na simplificação das etapas analíticas, *i.e.*, na eliminação da derivatização (sempre que possível), na redução das etapas de evaporação e troca do solvente, etc. A primeira grande melhoria foi a acentuada miniaturização do dispositivo original ($\frac{1}{2}$ BA μ E – figuras 1.19), que permitiu a eliminação das etapas de evaporação e troca do solvente, bem como a duplicação do fator de concentração (até 250) usando metade da quantidade de fase sorvente, sem comprometer o desempenho analítico [89,105]. Isto foi conseguido utilizando um *insert* num frasco de vidro contendo apenas 100 μ L de solvente para LD. Esta melhoria permitiu a recuperação completa (~ 100%) de nove hormonas esteroides de várias matrizes ambientais e biológicas [105] ou boas recuperações (63,8-84,2%) de antibióticos sulfonamidas a partir de matrizes aquosas [106].

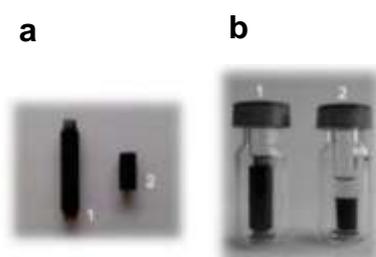


Figura 1.19 – Comparação dos dispositivos BA μ E (1) e $\frac{1}{2}$ BA μ E (2) antes (a) e durante o processo de retroextração (b). Adaptado de [89].

Recentemente, uma outra melhoria constituiu no desenvolvimento de dispositivos BA μ E de nova geração (ngBA μ E, do inglês *New Generation BA μ E*), que permitiu diminuir ainda mais os passos analíticos [107]. Estes novos dispositivos são cilíndricos, tendo um suporte flexível à base de *nylon* (7,5 mm em comprimento e 1 mm de diâmetro - figuras 1.20 e 1.21), na qual apenas 0,5 mg de fase sorvente é usado.

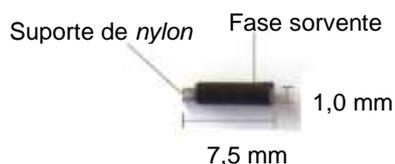


Figura 1.20 – Dispositivo ngBA μ E. Adaptado de [107].



Figura 1.21 – Procedimento analítico proposto para o ciclo ngBA μ E desde a etapa de microextração até à análise por LC. Adaptado de [65,107].

Ao aplicar estes dispositivos, um novo ciclo analítico foi introduzido: após a etapa de dessorção, os dispositivos não são removidos dos *inserts* do frasco de vidro, sendo imediatamente selados e colocados no amostrador automático para análise instrumental. Este procedimento não compromete os sistemas de injeção dos instrumentos cromatográficos, uma vez os dispositivos serem muito pequenos e serem preparados com suportes flexíveis à base de *nylon*, o que deixa espaço suficiente para introdução das agulhas dos injetores dos sistemas de HPLC ou do GC. A figura 1.21 mostra os passos empregues neste novo ciclo analítico.

1.4.3 Técnicas miniaturizadas de alto rendimento

Atualmente existe a necessidade de abordagens analíticas que sejam simples, fáceis de usar, amigas do ambiente, com poucos passos analíticos e que tenham configuração de alto rendimento, sendo especialmente relevante quando estão envolvidos a análise de número alargado de amostras ou para trabalhos de rotina. Desta forma, as técnicas de alto rendimento como a microextração em fase sólida em camada fina automatizada (96-blade SPME, do inglês *Automated Thin-Film Solid-Phase Microextraction*) [108,109] ou a extração paralela artificial em membrana líquida (PALME, do inglês *Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction*) [110] apresentam-se como contribuições inovadoras para dar resposta a este requisito, pois tornam a preparação da amostra ainda mais simples e com a possibilidade de realizar até 96 microextrações em simultâneo.

A 96-blade SPME emprega os mesmos princípios de SPME convencional, mas para a microextração e conseqüente retroextração de até 96 amostras em simultâneo (figura 1.22). O sistema é composto por um braço robótico que movimenta os 96 dispositivos de SPME entre vários agitadores orbitais, permitindo a total automatização do mesmo.

No entanto, algumas das mesmas limitações atribuídas à SPME convencional podem ser encontradas em 96-blade SPME, nomeadamente a ocorrência de efeitos de matriz consideráveis, especialmente quando a análise envolve matrizes muito complexas (ex., fluidos biológicos), levando à redução de

recuperação dos compostos alvo [108]. Adicionalmente, esta não envolve a extração exaustiva dos analitos, comprometendo a sensibilidade da metodologia, especialmente se empregada em combinação com sistemas instrumentais menos sensíveis (ex., HPLC-DAD). Por outro lado, este sistema é muito dispendioso, não sendo possível de adquirir por boa parte dos laboratórios analíticos.

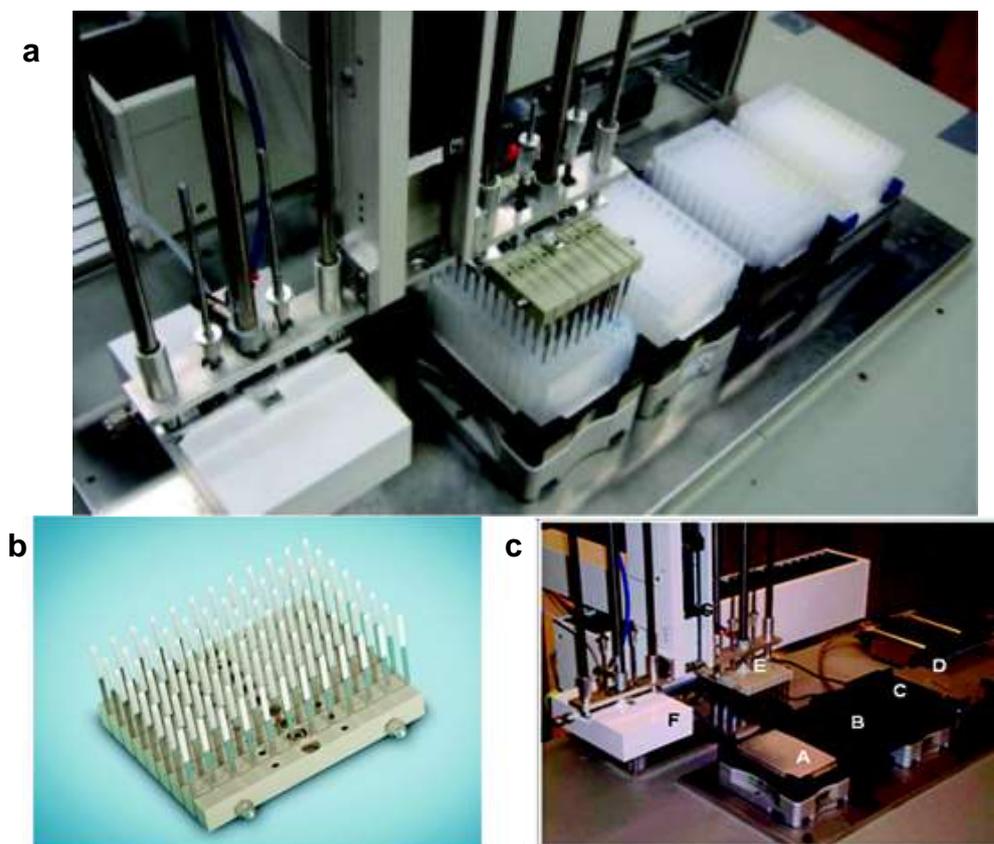


Figura 1.22 – Plano superior do sistema de 96-blade SPME (a). Plano aproximado dos 96 dispositivos de SPME empregues nesta técnica (b). O sistema inclui os seguintes componentes (c): agitadores orbitais para extração (A), dessorção (C) e condicionamento (D); uma estação para o passo de limpeza dos dispositivos (B); o braço robótico que movimentava os 96 dispositivos de SPME (E); estação de evaporação por azoto (F); braço robótico que movimentava a seringa para injeção no sistema cromatográfico (G). Adaptado de [109].

A PALME foi introduzida em 2013 por Gjelstad *et. al.* [110] como uma técnica inovadora, comercial, de fácil utilização, de reduzido custo e de elevado rendimento para o enriquecimento de compostos orgânicos em matrizes biológicas. Esta técnica emprega os mesmos conceitos de HF-LFME, mas

usando um dispositivo contendo 96 poços para a realização de várias microextrações em simultâneo (figura 1.23).

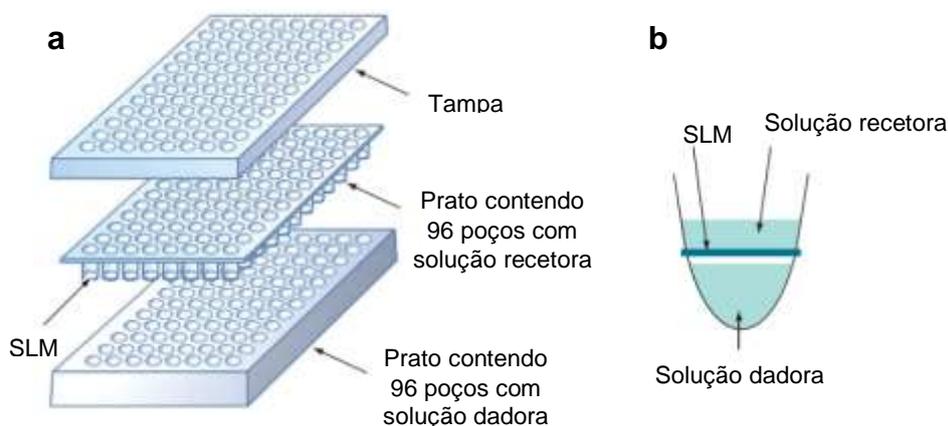


Figura 1.23 – Representação esquemática do dispositivo PALME (a), assim como de um dos seus poços. Adaptado de [110].

Neste formato, os analitos alvo são extraídos de um pequeno volume de fluido biológico (até 300 μL), através do SLM (similar a HF-LPME, mas usando uma membrana à base de fluoreto de polivinilideno) para uma solução recetora. A figura 1.24 exemplifica a extração de compostos básicos por PALME.

Tal como para HF-LPME, a técnica de PALME apresenta elevada eficiência para a recuperação de compostos básicos, ácidos ou neutros, com $\log K_{OW} > 1,5-2,0$. No entanto, para analitos mais polares, a transferência para o SLM (usualmente um solvente orgânico apolar) é muito reduzida, sendo as recuperações bastante comprometidas [112]. Por outro lado, a quantidade de amostra é bastante limitada (200-300 μL), podendo ser uma desvantagem para quem empregue sistemas instrumentais menos sensíveis, ex. HPLC-DAD. Adicionalmente, a membrana usada em PALME pode apresentar propriedades de adsorção para proteínas (presentes em fluidos biológicos, ex., plasma) e, neste sentido, aumentar a possibilidade dos analitos de interesse serem adsorvidos nas mesmas, comprometendo desta forma as eficiências de extração [113].

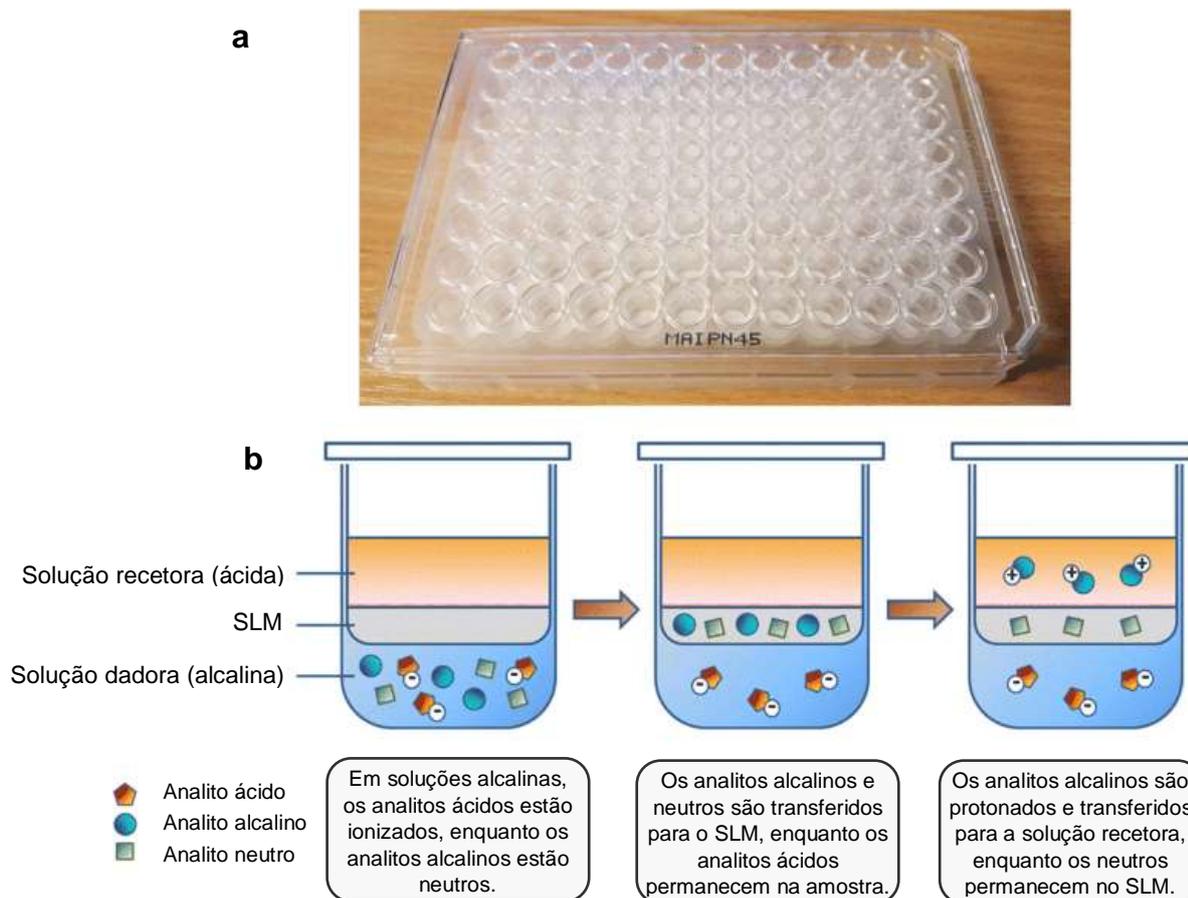


Figura 1.24 – Fotografia do dispositivo PALME (a), assim como da ilustração esquemática do processo de extração de compostos alcalinos (b). Adaptado de [111].

Neste contexto, e face às diversas limitações apresentadas pelas técnicas descritas, é necessário o desenvolvimento de novas abordagens dedicadas para análise de rotina, que apresentem bom custo-benefício, que permitam uma abordagem de alto rendimento e que sejam compatíveis com os princípios da GAC, assim como a combinação com sistemas instrumentais convencionais disponíveis em qualquer laboratório de análise (bio)química, sem nunca comprometer a performance analítica.

1.5 Referências

- [1] M. Abu-Zeid, *Water Policy* 1 (1998) 9–19.
- [2] World Water Council, *Water Security, Sustainability and Resilience* (2018), Marselha.

- [3] United Nations Secretary-General's Plan, *Water Action Decade 2018-2028* (2018), Nova Iorque.
- [4] P.M. Chapman, *Environ. Int.* 33 (2007) 492–501.
- [5] Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de outubro de 2000.
- [6] Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008.
- [7] Directiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de agosto de 2013.
- [8] Decisão de execução (UE) 2015/495 da Comissão de 20 de março de 2015.
- [9] Decisão de execução (UE) 2018/840 da Comissão de 5 de junho de 2018.
- [10] F.G. Calvo-Flores, J. Isac-García, J.A. Dobado, *Emerging Pollutants: Origin, Structure and Properties* (2018) Weinheim, Wiley-VCH Verlag.
- [11] S. Vaz, *Analytical Chemistry Applied to Emerging Pollutants* (2018) Gewerbestrasse, Springer.
- [12] P.K. Jjemba, *Pharma-Ecology: The Occurrence and Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment* (2019) Hoboken, John Wiley & Sons.
- [13] A.M. Bahadir, G. Duca, *The Role of Ecological Chemistry in Pollution Research and Sustainable Development* (2009) Dordrecht, Springer.
- [14] A.J. Ebele, M. Abou-Elwafa Abdallah, S. Harrad, *Emerg. Contam.* 3 (2017) 1–16.
- [15] PerkinElmer, (2014) versão 14.0.0.117.
- [16] C. Ribeiro, A.R. Ribeiro, M.E. Tiritan, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 238 (2016) 1–44.
- [17] R.A. Musah, *Analysis of drugs of abuse* (2018) Nova Iorque, Humana Press.
- [18] M.J. Brownstein, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90(12):539 (1993) 1–3.
- [19] Nações Unidas, *Single Convention on Narcotic Drugs* (1961).
- [20] Nações Unidas, *Convention on Psychotropic Substances* (1971).
- [21] Nações Unidas, *Convention Against Illicit Traffic in Narcotic Drugs and Psychotropic Substances* (1988).
- [22] United Nations Office on Drugs and Crime, *World Drug Report 2016*, Nova Iorque.
- [23] United Nations Office on Drugs and Crime, *World Drug Report 2018*, Nova Iorque.
- [24] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *European Drug Report 2018: Trends and Developments* (2018) Publications Office of the European Union, Luxemburgo.
- [25] National Institute for Health and Care Excellence, *Controlled Drugs: Safe Use and Management* (2016) <https://www.nice.org.uk/guidance/ng46/resources/controlled-drugs-safe-use-and-management-pdf-18374>.
- [26] United Nations Office on Drugs and Crime, *World Drug Report 2019*, Nova Iorque.
- [27] American Psychiatric Association, *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-5* (2013) Porto Alegre, Artmed.
- [28] Diário da República, 1.ª série, N.º 75, Decreto-Lei n.º 54/2013 de 17 de abril.
- [29] H.H. Maurer, S.D. Brandt, *New Psychoactive Substances - Pharmacology, Clinical, Forensic and Analytical Toxicology* (2018) Suíça, Springer.
- [30] Decisão 2005/387/JAI do Conselho de 10 de maio de 2005.
- [31] S. Sussman, S.L. Ames, *Drug Abuse: Concepts, Prevention and Cessation* (2008) Cambridge, Cambridge University Press.
- [32] A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material* (2011) Londres, Pharmaceutical Press.
- [33] A.G. Verstraete, *Ther. Drug Monit.* 26 (2004) 200–5.

- [34] M. Vandevenne, H. Vandebussche, A. Verstraete, *Acta Clin. Drug Abuse Concepts, Prevention, and Cessation*. Belg. 55 (2000) 323–333.
- [35] N.M. Cassiano, V. V. Lima, R. V. Oliveira, A.C. De Pietro, Q.B. Cass, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1462–1469.
- [36] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry* (2014) Belmont, Brooks/Cole, Cengage Learning.
- [37] J. Workman, M. Koch, B. Lavine, R. Chrisman, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4623–4643.
- [38] L. Ramos, *Chem. Anal. Food Tech. Appl.* (2012) 3–24.
- [39] E.M. Thurman, M.S. Mills, *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice* (1998) Nova Iorque, John Wiley & Sons.
- [40] J.S. Fritz, *Analytical Solid-Phase Extraction* (1999) Verlag, John Wiley & Sons.
- [41] S. Mitra, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry* (2009) Nova Jersey, John Wiley & Sons.
- [42] R.M. Smith, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 3–27.
- [43] J. Pawliszyn, *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists* (2012) Amesterdão, Academic Press.
- [44] S. Moldoveanu, V. David, *Modern Sample Preparation for Chromatography* (2015) Amesterdão, Elsevier
- [45] M. Biziuk, *Polish J. Environ. Stud.* 15 (2006) 677–690.
- [46] M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3–54.
- [47] M. de la Guardia, S. Armenta, *Green Analytical Chemistry: Theory and Practice in Comprehensive Analytical Chemistry* (2011) Amesterdão, Elsevier.
- [48] M. Tobiszewski, A. Mechlińska, B. Zygmunt, J. Namieśnik, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 943–951.
- [49] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84.
- [50] A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1–14.
- [51] Y. Yamini, M. Rezazadeh, S. Seidi, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 112 (2019) 264–272.
- [52] M. Rutkowska, J. Płotka-Wasyłka, M. Sajid, V. Andrich, *Microchem. J.* 149 (2019) 103989:1–8.
- [53] S. Liu, P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2042–2049.
- [54] H. Liu, P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817–1821.
- [55] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236–2240.
- [56] S. Tang, T. Qi, P.D. Ansah, J.C. Nalouzebi Fouemina, W. Shen, C. Basheer, H.K. Lee, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 306–313.
- [57] M.A. Jeannot, A. Przyjazny, J.M. Kokosa, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2326–2336.
- [58] J.M. Kokosa, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 194–204.
- [59] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *Anal. Chim. Acta.* 629 (2008) 6–23.
- [60] M. Rutkowska, K. Dubalska, P. Konieczka, J. Namieśnik, *Molecules* 19 (2014) 7581–7609.
- [61] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650–2656.
- [62] V. Sharifi, A. Abbasi, A. Nosrati, *J. Food Drug Anal.* 24 (2016) 264–276.
- [63] A. Esrafil, M. Baharfar, M. Tajik, Y. Yamini, M. Ghambarian, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 314–322.
- [64] M. Ghambarian, Y. Yamini, A. Esrafil, *Microchim. Acta.* 177 (2012) 271–294.
- [65] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 153 (2018) 126–134.
- [66] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 2911–2920.

- [67] J.M.F. Nogueira, *Anal. Chim. Acta.* 757 (2012) 1–10.
- [68] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [69] K. Schmidt, I. Podmore, *J. Biomarkers* 2015 (2015) 1–16.
- [70] I. Rykowska, W. Wasiak, *Acta Chromatogr.* 25 (2013) 27–46.
- [71] J.M.F. Nogueira, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 214–223.
- [72] A. Sarullo, P.A. Martos, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (2002) 1992–1998.
- [73] N.H. Godage, E. Gionfriddo, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 111 (2019) 220–228.
- [74] M. Lashgari, Y. Yamini, *Talanta.* 191 (2019) 283–306.
- [75] B. Erik, S. Pat, D. Frank, C. Carel, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747.
- [76] Gerstel, Twister/Stir Bar Sorptive Extraction SBSE, <http://www.gerstel.com/en/twister-stir-bar-sorptive-extraction.htm>.
- [77] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2642–2666.
- [78] F. David, N. Ochiai, P. Sandra, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 112 (2019) 102–111.
- [79] M. Kawaguchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 500–508.
- [80] N. Gilart, N. Miralles, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, *Anal. Chim. Acta.* 774 (2013) 51–60.
- [81] W. Fan, X. Mao, M. He, B. Chen, B. Hu, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 7261–7273.
- [82] S. V Duy, P.B. Fayad, B. Barbeau, M. Prevost, S. Sauve, *Talanta* 101 (2012) 337–345.
- [83] C. Yu, B. Hu, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 147–153.
- [84] J.Y. Barletta, P.C.F. de L. Gomes, A.J. Dos Santos-Neto, F.M. Lancas, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1317–25.
- [85] D. Bratkowska, R.M. Marce, P.A.G. Cormack, F. Borrull, N. Fontanals, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 135–142.
- [86] N. Gilart, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 54 (2014) 11–23.
- [87] F.J. Camino-Sánchez, R. Rodríguez-Gómez, A. Zafra-Gómez, A. Santos-Fandila, J.L. Vilchez, *Talanta.* 130 (2014) 388–99.
- [88] N.R. Neng, A.R. Silva, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7303–7310.
- [89] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 120 (2014) 126–134.
- [90] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1348 (2014) 17–26.
- [91] A.S. Mestre, J. Pires, J.M.F. Nogueira, J.B. Parra, A.P. Carvalho, C.O. Ania, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 1720–1726.
- [92] R.C. Bansal, M. Goyal, *Activated Carbon Adsorption* (2005) Boca Raton, CRC Press.
- [93] J.F. Kwiatkowski, *Activated Carbon: Classifications, Properties and Applications* (2012) Nova Iorque, Nova Science Publishers.
- [94] J.M.F. Nogueira, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 214–223.
- [95] N.R. Neng, S.M. Ahmad, H. Gaspar, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 144 (2015) 105–109.
- [96] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1265 (2012) 7–16.
- [97] N.R. Neng, R.C.P. Sequeiros, J.M.F. Nogueira, *Electrophoresis* 35 (2014) 2488–2494.
- [98] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Anal. Bioanal. Chem* 402 (2012) 1355–1364.
- [99] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. B.* 1008 (2016) 115–24.
- [100] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. B A* 969C (2014) 35–41.

- [101] A.F. Goncalves, N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 574–581.
- [102] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Anal. Methods* 9 (2017) 5260–5265.
- [103] S.M. Ahmad, A.H. Ide, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 97 (2017) 484–498.
- [104] C. Almeida, A. Stepkowska, A. Alegre, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1311 (2013) 1–10.
- [105] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 136 (2015) 145–54.
- [106] A.H. Ide, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 593–599.
- [107] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 153 (2018) 126–134.
- [108] F.S. Mirnaghi, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 1261 (2012) 91–98.
- [109] F.S. Mirnaghi, Y. Chen, L.M. Sidisky, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 83 (2011) 6018–6025.
- [110] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, M.P. Parmer, S. Pedersen-Bjergaard, *Bioanalysis* 5 (2013) 1377–85.
- [111] L. Vårdal, G. Wong, Å.M.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, E.L. Øiestad, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 4967–4978.
- [112] V. Pilařová, M. Sultani, K.S. Ask, L. Nováková, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, *J. Chromatogr. B* (2017) 25–32.
- [113] A. Gjelstad, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 25–31.

Capítulo 2

Objetivos da tese

Não obstante as diversas vantagens das técnicas de microextração apresentadas, algumas limitações subsistem, sendo indispensável o contínuo aperfeiçoamento das abordagens existentes e/ou o desenvolvimento de metodologias de preparação de amostras ainda mais inovadoras, no sentido da maior simplicidade e custo-benefício adequado. Por outro lado, devem igualmente possibilitar configurações experimentais de elevado rendimento para posterior aplicação em trabalho de rotina, devendo ser compatíveis com os princípios da GAC, sem comprometer o desempenho analítico.

Neste sentido, a presente dissertação tem como foco a introdução de abordagens inovadoras em técnicas de microextração estática, como metodologias alternativas para análise vestigial de contaminantes e substâncias de abuso emergentes em matrizes ambientais e biológicas, tendo como principais objetivos:

- A avaliação do desempenho da técnica BA μ E, usando revestimentos à base de misturas de fases sorventes, para a determinação vestigial de anti-inflamatórios não esteroides (ácido salicílico, ácido mefenâmico, diclofenac e naproxeno) e de micropoluentes orgânicos (triclosan, carbamazepina, diclofenac, 17 α -etinilestradiol e 17 β -estradiol) em matrizes ambientais, como alternativa a outras metodologias analíticas;

- O recurso a novas fases nanoestruturadas (*i.e.*, sorventes à base de hidrocarbonizados porosos) para revestimento dos dispositivos BA μ E, e avaliação do desempenho na determinação vestigial de diversas classes de compostos farmacêuticos (sulfametoxazol, carbamazepina, diclofenac, ácido mefenâmico, 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, estrona, gemfibrozil e ácido clofíbrico) em matrizes ambientais;

- A aplicação da técnica BA μ E na determinação de canabinóides sintéticos, recentemente detetados no mercado nacional e europeu (AM-694, cumyl-5F-PINACA, MAM-2201, 5F-UR-144, JWH-018, JWH-122, UR-144 e APINACA), em matrizes de fluido oral;

- A introdução de uma abordagem inovadora, a BA μ E de alto rendimento (HT-BA μ E, do inglês *High Throughput Bar Adsorptive Microextraction*), que possibilita uma nova configuração experimental, mais simples e eficaz, permitindo o enriquecimento, e subsequente retroextração, de até 100 amostras em simultâneo;

- A avaliação do desempenho da técnica HT-BA μ E na determinação vestigial de benzodiazepinas (diazepam, prazepam, bromazepam, oxazepam, lorazepam, alprazolam, temazepam e loflazepato de etilo) em amostras de urina, plasma e soro, bem como de nicotina (e cotinina) ou de cetamina (e norcetamina) em matrizes de urina.

- Demonstrar ainda, em colaboração com outros investigadores, a grande abrangência das metodologias baseadas em BA μ E para análise vestigial de outras classes de compostos prioritários em diversos tipos de matrizes, nomeadamente:

- Na determinação de carbazol em gasóleo, usando dispositivos revestidos com carvões ativados à base de derivados da pirólise da casca do arroz;
- Na monitorização de pesticidas organoclorados em matrizes vegetais, nomeadamente de chá e tabaco;
- Na determinação de irgarol em águas estuarinas;
- Na análise de catinonas sintéticas em fluido oral;
- Na determinação de compostos farmacêuticos em matrizes ambientais e biológicas;
- Na análise de antibióticos sulfonamidas em matrizes ambientais e biológicas;
- Na aplicação de nanotubos de carbono como fase sorvente inovadora para revestimento do dispositivo;
- Na determinação de antidepressivos tricíclicos em matrizes de urina.

Capítulo 3

Parte Experimental

3.1 Padrões analíticos

A maioria dos compostos estudados eram de grau analítico, nomeadamente a carbamazepina (99,0 %), triclosan (97,0 %), diclofenac sódico (98,0 %), 17- β -estradiol (98,0 %), estrona (99,0 %), gemfibrozil (98,5 %), ácido mefenâmico (98,5 %), ácido clofíbrico (98,0 %), sulfametoxazol (98,0 %), (-)-nicotina (98,0 %), (-)-cotinina, as soluções metanólicas de hidrocloreto de cetamina (1,0 mg L⁻¹) e de hidrocloreto de (\pm)-norcetamina (1,0 mg L⁻¹), o ácido 4-aminobenzóico (usado como padrão interno, PI, em CE-DAD, 99,0 %) e difenilamina (usado como PI em GC-MS, 98,0 %), foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Alemanha); o 17- α -etinilestradiol (98,0 %) foi fornecido pela Riedel-de-Haën (Alemanha); e o naproxeno (98,0 %) pela Fluka (Suíça).

Os oito canabinóides sintéticos foram fornecidos pelo Laboratório de Polícia Científica (LPC) da Polícia Judiciária (PJ), ao abrigo de um protocolo existente com a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL); destacam-se o AM-694 [1-(5-fluoropentil)-3-(2-iodobenzoil)indol], cumyl-5F-PINACA [1-(5-fluopentil)-*N*-(2-fenilpropano-2-il)indazol-3-carboxamida], MAM-2201 [(1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il)(4-metil-1-naftil)metanona], 5F-UR-144 [(1-pentil-1H-indol-3-il)(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)metanona], JWH-018 [1-naftil(1-pentil-1H-indol-3-il)metanona], JWH-122 [(4-metil-1-naftil)(1-pentil-1H-indol-3-il)metanona], UR-144 [(1-pentil-1H-indol-3-il)(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)metanona] e APINACA [*N*-(adamantano-1-il)-1-pentil-1H-indazol-3-carboxamida].

As benzodiazepinas estudadas foram obtidas a partir de formulações farmacêuticas comerciais, nomeadamente o Alprazolam Mylan produzido pela Mylan (Lisboa, Portugal), contendo 1 mg de alprazolam; o Bromazepam Pharmakern produzido pela PharmaKERN (Algés, Portugal), contendo 1,5 mg de bromazepam; o Victan produzido pela Sanofi (Porto Salvo, Portugal), contendo 2 mg de loflazepato de etilo; o Serenal produzido pela Meda Pharma (Lisboa, Portugal), contendo 15 mg de oxazepam; o Demetrin produzido pela Pfizer (Porto Salvo, Portugal), contendo 10 mg de prazepam; Normison produzido pela Teofarma (Valle Salimbene, Itália), contendo 20 mg de temazepam; o Lorazepam Generis produzido pela Generis (Amadora, Portugal),

contendo 1 mg de lorazepam; e o Diazepam Ratiopharm produzido pela Ratiopharm (Porto Salvo, Portugal), contendo 5 mg de diazepam.

3.2 Reagentes químicos

O metanol (MeOH, 99,8 %), acetonitrilo (ACN, 99,8 %) e etanol absoluto anidro (EtOH, 99,9 %) de qualidade para HPLC, bem como os ácidos clorídrico (HCl, 37 %), acético (CH₃COOH, 99,8 %) e fórmico (COOH, 99,0 %) foram fornecidos pela Carlo Erba (Itália). O cloreto de sódio (NaCl, 99,9 %), hidróxido de sódio (NaOH, 98,0 %), propan-1-ol (1-PrOH, 99,8 %) de qualidade para HPLC, glucose (G, 99,0 %), frutose (F, 99,0 %) e sacarose (S, 99,0 %) foram fornecidos pela AnalaR BDH Chemicals (Reino Unido). O propan-2-ol (2-PrOH, 99,9 %) de qualidade para HPLC foi obtido da Fisher Scientific (Reino Unido). O cloreto de lítio (LiCl, 99,0 %) e o cloreto de zinco (Cl₂Zn, 99,0 %) foram adquiridos à Merck (Alemanha) e à Acros Organics (Bélgica), respetivamente. O ácido clorídrico (HCl, 37,0 %) e o carbonato de sódio (Na₂CO₃, 99,5 %) foram fornecidos da Riedel-de Haën (Alemanha). O hidrogeno fosfato dissódico anidro (Na₂HPO₄, 99,0 %) foi obtido da Panreac (Espanha). O di-hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄, 99,5 %) e o etanol para lavagem (96 %) foram fornecidos pela Scharlau (Espanha). O tetraborato de sódio decahidratado (Na₂B₄O₇·10H₂O, 99,5 %), assim como a β -glucuronidase de *Escherichia coli* tipo IX-A, em pó liofilizado, 1.000.000-5.000.000 unidades g⁻¹, foram da Sigma-Aldrich (Alemanha). A água ultrapura tipo I usada nos diversos ensaios foi obtida através de um sistema de purificação de água Mili-Q (Merck Milipore, Estados Unidos da América).

3.3 Material corrente e equipamento de laboratório

Para o desenvolvimento da presente dissertação, além de material de vidro e de plástico corrente de laboratório, foram igualmente usadas microseringas analíticas com êmbolo flexível de 10, 50, 100 e 500 μ L (Hamilton, Estados Unidos da América), micropipetas de volume regulável 20-200 μ L, 100-

1000 μL e 500-5000 μL e respetivas pontas de polipropileno (Labbox, Espanha), frascos de vidro transparente para amostragem de 25 mL com tampas de borracha de 20 mm, assim como frascos de vidro transparente de 10 mL com tampas de plástico de 22 mm, e barras para agitação magnética (15 mm de comprimento e 4,5 mm de diâmetro) da VWR Internacional (Portugal). Foram igualmente usados frascos de vidro transparentes convencionais de 2,0 mL (12 de diâmetro e 32 mm de altura) para sistemas cromatográficos, tampas com septo de borracha (11 mm de diâmetro) e *inserts* de vidro transparente de base plana (6 de diâmetro e 31 mm de altura) da Labbox (Espanha). Frascos de polipropileno de 1,0 mL e de 0,3 mL, juntamente com as respetivas tampas (11 mm) da Agilent Technologies (Estados Unidos da América), foram igualmente usados. Foi também utilizado um encapsulador manual da Agilent Technologies (Estados Unidos da América). Foram igualmente empregados filtros de papel (125 mm de diâmetro, 10-13 μm de tamanho de poro, Cat No 1001 125; Whatman, Reino Unido) e de *nylon* (0,45 μm de tamanho de poro, Laborspirit, Portugal). Foram usados frascos de polipropileno com tampa de 5, 10 e 50 mL para amostragem e armazenamento das amostras biológicas (Labbox, Espanha).

Os ensaios de microextração foram efetuados em placas de agitação magnética com quinze posições (Variomag H + P Labortechnik Multipoint 15, Alemanha), em banho de ultrassons equipado com termostato (Branson 3510 E-DTH, 42 +/- 2,5 kHz, 100 W, Suíça) e num agitador orbital (Janke 164 & Kunkel IKA-VIBRAX-VXR, Alemanha). As pesagens foram efetuadas numa balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça) e as medições de pH num medidor de pH modelo 744 pH Meter, equipado com um elétrodo de vidro combinado (Metrohm, Suíça). Foi igualmente usado um vórtex (Velp, Itália) e uma estufa (modelo ED 115/E2, Binder, Alemanha). Foram também utilizados um frigorífico (0 a 6 $^{\circ}\text{C}$, Liebherr FKEX 2600, Áustria), um congelador vertical convencional (-20 $^{\circ}\text{C}$, Jocel JCV-220L, Portugal) e um congelador vertical a temperaturas ultrabaixas (-80 $^{\circ}\text{C}$, Panasonic KM-DU53Y1E, Japão).

O presente trabalho foi desenvolvido com recurso aos seguintes sistemas instrumentais: um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrómetro de massa (GC-MS), um cromatógrafo líquido de alta eficiência com deteção por rede de díodos (HPLC-DAD) e um sistema de eletroforese capilar 3D com deteção por

DAD (CE-DAD), todos da Agilent Technologies (Alemanha). O sistema GC-MS era constituído por um GC (Agilent 6890 Series) equipado com amostrador automático (Agilent 7683) e injetor de vaporização com temperatura programada (PTV, do inglês *Programmed Temperature Vaporization*), acoplado ao detetor seletivo de massas (Agilent 5973N). O registo de dados e o controlo instrumental foram efetuados a partir do *software* MS ChemStation (G1701; versão E.02.02.1431; Agilent Technologies). A coluna capilar utilizada foi uma Zebron ZB-5 (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de fase estacionária; 95 % dimetil, 5 % difenil polissiloxano) da Phenomenex (Estados Unidos da América). O sistema de HPLC-DAD era constituído por um desgaseificador (G1322A), uma bomba quaternária (G1311A), um amostrador automático (G1313A), um compartimento da coluna termostaticado (G1316A) e um DAD (G1315B). O registo de dados e controlo instrumental foram efetuados a partir do *software* LC3D ChemStation (versão Rev.A.10.02.1757; Agilent Technologies). As separações cromatográficas foram efetuadas em colunas Kinetex C18 ou Kinetex hexil-fenil (ambas com 150 × 4,6 mm, 2,6 µm de tamanho de partícula; Phenomenex, Estados Unidos da América). As separações eletroforéticas foram realizadas por via de capilares de sílica fundida com percurso ótico estendido (52,1 cm de comprimento, 43,8 cm de comprimento efetivo, Ø 75 µm, Agilent Technologies, Alemanha). O registo de dados e controlo instrumental foram efetuados a partir do *software* ^{3D}CE ChemStation (Rev.A.08.03, G1601, Agilent Technologies).

3.4 Fases sorventes

Os ACs comerciais empregados nos diversos ensaios foram o CN1, o CA1, o SX1, o N2 e o R. Este último foi obtido da Riedel-de-Häen (Alemanha). Os restantes eram da Cabot-Norit, tendo sido doados pela Salmon & Cia (Lisboa, Portugal). Os hidrocarbonizados porosos à base de glucose (HC-G), frutose (HC-F) e sacarose (HC-S) foram preparados e caracterizados pelo grupo de Adsorção e Materiais Adsorventes do Centro de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (CQB/FCUL). Este grupo caracterizou ainda os sorventes CN1 e R. Todos os procedimentos encontram-se descritos

pormenorizadamente no anexo II. A tabela 3.1 resume as principais características dos hidrocarbonizados porosos e dos ACs usados no presente trabalho.

Tabela 3.1 – Principais características dos materiais à base de carvão usados na presente tese.

Material sorvente	A_{BET}^a ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	V_{total}^b ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	V_{meso}^c ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	V_{micro}^d ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	pH_{PZC}
CN1 ^e	1179	0,98	0,68	0,30	5,1
CA1 ^f	1400	n.d.	n.d.	n.d.	2,2
SX1 ^f	900	n.d.	n.d.	n.d.	8,4
N2 ^g	896	0,6	0,29	0,31	10,6
R ^e	964	0,65	0,37	0,28	6,5
HC-G ^e	529	0,58	0,47	0,11	3,0
HC-F ^e	407	0,28	0,16	0,12	2,7
HC-S ^e	487	0,47	0,35	0,12	3,1

n.d. Informação indisponível

^a Área superficial aparente

^b Volume total de poros

^c Volume de mesoporos

^d Volume de microporos

^e Dados obtidos experimentalmente (anexo II)

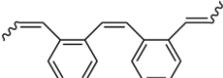
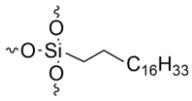
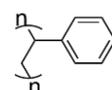
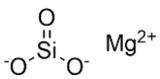
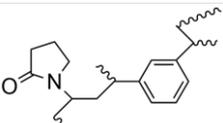
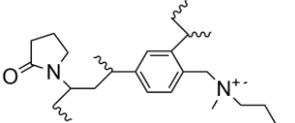
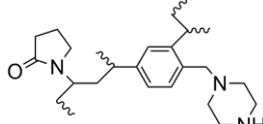
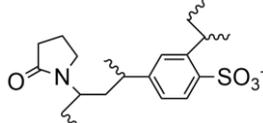
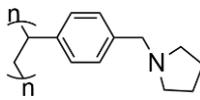
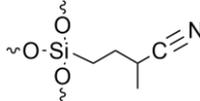
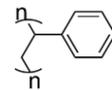
^f Dados fornecidos pelo fabricante

^g Dados obtido na literatura [1]

As fases poliméricas comerciais empregadas para revestimento em BAμE nos diversos ensaios foram o LiChrolut EN da Merck Millipore (Alemanha); o ENVI-18, ENVI-Florisil e ENVI-Chrom P da Supelco (Estados Unidos da América); o HLB, MAX, WAX e MCX da Oasis (Waters, Estados Unidos da América); e o Strata-X, Strata SDB-L e Strata-CN da Phenomenex (Estados Unidos da América). Algumas das características físico-químicas destes materiais são disponibilizados pelos fabricantes, estando resumidas na tabela 3.2.

3. Parte experimental

Tabela 3.2 – Principais características das fases poliméricas empregadas na presente tese.

Nome comercial	Fase sorvente	Estrutura química	Área superficial (m ² g ⁻¹)	Tamanho de partícula (μm)	Tamanho do poro (Å)
LiChrolut EN	EVB-DVB		1200	40-120	n.d.
ENVI-18	C18		475	45	60
ENVI-Chrom P	PS-DVB		900	80-160	20-300
ENVI-Florasil	Silicato de magnésio		289	149-250	n.d.
HLB	EVB-NVP		810	30	80
MAX	EVB-NVP de troca aniônica (forte)		830	30	80
WAX	EVB-NVP de troca aniônica (fraca)		830	30	80
MCX	EVB-NVP de troca catiónica (forte)		830	30	80
Strata-X	PS-DVB-NVP		800	33	85
Strata-CN	Silica-co-ciano		500	55	70
Strata SDB-L	PS-DVB		500	100	260

n.d. Informação indisponível

3.5 Amostras

Todas as amostras utilizadas nos estudos da presente dissertação foram obtidas em Portugal continental. As amostras de água do mar foram recolhidas em praias da Costa da Caparica e do Estoril, as de água de rio na praia fluvial de Avô (rio Alva) e da Ribeira da Enxurrada (Trafaria), as de água estuarina no estuário do rio Tejo nas zonas do Seixal e da Ponta do Mato (Almada), as de água subterrânea num poço nas Caldas da Rainha, as de água superficial de um lago em Almada e no Jardim Mário Soares (Lisboa) e as de água para consumo a partir dos sistemas de fornecimento de águas municipais de Lisboa e de Almada. As amostras de efluentes foram obtidas da ETAR de Alcântara (Lisboa) depois de decantação primária e filtração.

Várias amostras biológicas (urina, soro e plasma) foram gentilmente cedidos pela Clínica Joaquim Chaves Saúde (Algés, Lisboa), sendo usadas nos trabalhos envolvendo a análise de benzodiazepinas e de cetamina (e norcetamina). Outras amostras de urina e de fluido oral foram obtidas de voluntários que não consumiram qualquer substância de abuso. Adicionalmente, amostras de urina de dois adultos de 26 anos que consumiram 500 mg de Ponstan (ácido mefenâmico) ou 1000 mg de Aspirina (ácido acetilsalicílico) na noite anterior à amostragem foram usadas no trabalho envolvendo a análise de anti-inflamatórios não esteroides. Uma amostra de urina de um voluntário de 60 anos, sob tratamento de benzodiazepinas (Medipax, clorazepato dipotássico, 5 mg, duas vezes ao dia), foi igualmente usada no trabalho envolvendo a análise de benzodiazepinas.

Para o trabalho envolvendo a análise de nicotina e cotinina, as amostras de urina foram recolhidas junto da comunidade académica da FCUL entre abril e junho de 2018. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Recolha e Proteção de Dados de Ciências, sendo que todos os participantes forneceram o seu consentimento informado por escrito. Os voluntários foram solicitados a fornecer uma amostra de urina em frascos criogénicos, tendo sido igualmente pedidos a preencher um formulário indicando os hábitos tabágicos, bem como se tinham memória da última vez que estiveram expostos a fumo de tabaco (particularmente em espaços fechados). Os formulários foram correspondidos com a respetiva amostra. No total eram 86 indivíduos, com idades

compreendidas entre os 18 e os 53 anos, tendo sido divididos em três grupos: não fumadores e não expostos a fumo de tabaco por pelo menos uma semana antes da amostragem ($n = 16$; grupo #1), não fumadores e expostos a fumo de tabaco uma semana antes da amostragem ($n = 64$; grupo #2) e fumadores ($n = 6$; grupo #3).

Todas as amostras analisadas no mesmo dia da amostragem foram armazenadas a 4 °C. As restantes foram congeladas a -20 ou -80 °C (dependendo da disponibilidade do congelador vertical a temperaturas ultrabaixas) até ao ensaio.

3.6 Procedimento experimental

3.6.1 Preparação das soluções de trabalho

As soluções padrão de anti-inflamatórios não esteroides, de micropoluentes orgânicos, de farmacêuticos, de canabinóides sintéticos, de cotinina e de nicotina foram preparadas a partir da pesagem rigorosa de 1,0 mg de cada padrão analítico dissolvidos em 1,0 mL de MeOH em frascos de vidro de 2 mL, tendo a concentração final de 1000,0 mg L⁻¹. A solução mãe de cetamina e norcetamina foram preparadas igualmente em MeOH (100,0 mg L⁻¹), a partir da diluição dos conteúdos das respetivas ampolas. As soluções padrão das benzodiazepinas foram preparadas de acordo com protocolos já descritos [2,3], tendo cada comprimido sido individualmente reduzido a pó e dissolvido em MeOH por forma a obter uma concentração final de 1000,0 mg L⁻¹. De seguida, as soluções foram sonicadas durante 15 min, centrifugadas a 3000 rpm (10 min) e filtradas com filtros de *nylon*. As soluções mistura foram preparadas mensalmente a partir da diluição das soluções padrão. As soluções de trabalho e de calibração instrumental foram preparadas semanalmente através da diluição adequada das soluções mistura. Todas as soluções foram armazenadas e conservadas a -20 °C em frascos de vidro âmbar.

3.6.2 Condições de operação instrumental

3.6.2.1 HPLC-DAD

Por forma a conseguir as melhores condições instrumentais por HPLC-DAD, os compostos alvo foram analisados individualmente com a finalidade de obter os respetivos tempos de retenção e espectros de UV/Vis. Diversos parâmetros foram estudados por forma a obter a melhor resolução, seletividade e sensibilidade, nomeadamente a composição da fase móvel, volume de injeção, temperatura da coluna, programa de separação, comprimento de onda, entre outros. Os dados mais relevantes encontram-se descritos na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Condições experimentais utilizadas para análise de cada classe de compostos estudados por HPLC-DAD.

Compostos	Volume de injeção (μL)	Fluxo (mL min ⁻¹)	Composição da fase móvel	Comprimento de onda (λ, nm)
Micropoluentes orgânicos^a	20	0,3	Eluente A: H ₂ O com 2,5 % de CH ₃ COOH Eluente B: MeOH Isocrático com 80 % B	280
Farmacêuticos^b	40	0,6	Eluente A: H ₂ O com 2,5 % de CH ₃ COOH Eluente B: ACN 0-24 min: 20-80 % B 24-27 min: 80 % B 27-30 min: 80-20 % B 30-35 min: 20 % B	254
Canabinóides sintéticos^a	20	0,6	Eluente A: H ₂ O Eluente B: ACN Isocrático com 80 % B	302
Benzodiazepinas^b	10	0,6	Eluente A: H ₂ O com 2,5 % de CH ₃ COOH Eluente B: ACN 0-5 min: 30 % B 5-12 min: 30-40 % B 12-15 min: 40-80 % B 15-18 min: 80 % B 18-21 min: 80-30 % B 21-26 min: 30 % B	254

^a A coluna Kinetex hexil-fenil foi usada para a separação cromatográfica

^b A coluna Kinetex C18 foi empregada para a separação cromatográfica

3.6.2.2 GC-MS

Por forma a alcançar as melhores condições instrumentais, recorreu-se a injeção de soluções mistura dos analitos no GC-MS operando no modo de varrimento contínuo (*full-scan*). A partir dos dados obtidos, os compostos alvo foram analisados individualmente para obter os parâmetros de retenção e espetros de massa correspondentes. Diversos parâmetros foram estudados por forma a obter a melhor resolução, seletividade e sensibilidade, nomeadamente o solvente, volume e programa de injeção (*i.e.*, temperatura, tempo de *vent*, rampa de aquecimento, velocidade de injeção, etc.), programa do forno, tempo de *solvent delay*, iões monitorizados, entre outros. Os dados mais relevantes para a análise em GC-MS encontram-se descritos na tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Condições experimentais utilizadas para análise de cada classe de compostos estudados por GC-MS. São apresentados os iões qualificadores e quantificadores (a sublinhado).

	Nicotina e cotinina	Cetamina e norcetamina
Parâmetros de injeção	Tempo de vent: 0,4 min; Fluxo: 60 mL min ⁻¹ ; Pressão: 0 psi; Fluxo de purga: 60 mL min ⁻¹ até aos 2 min	Tempo de vent: 0,49 min; Fluxo: 50 mL min ⁻¹ ; Pressão: 0 psi; Fluxo de purga: 12,9 mL min ⁻¹ até aos 2 min
Programa de injeção	60 °C (0,45 min) até aos 280 °C (600 °C min ⁻¹)	80 °C (0,5 min) até aos 280 °C (600 °C min ⁻¹)
Programa do forno	60 °C (1 min) até aos 280 °C (15 °C min ⁻¹) tempo total: 13 min	80 °C (1 min) até aos 200 °C (50 °C min ⁻¹); 20 °C min ⁻¹ até aos 225 °C (5 min); até aos 250 °C (20 °C min ⁻¹); até aos 280 °C (50 °C min ⁻¹); tempo total: 11,5 min
Tempo de retenção (min)	Nicotina: 7,23 Difenilamina: 9,12 Cotinina: 9,68	Difenilamina: 5,42 Norcetamina: 6,73 Cetamina: 6,97
Iões monitorizados (m/z)	Nicotina: <u>84</u> , 133, 162 Difenilamina: 83, 168, <u>169</u> Cotinina: <u>98</u> , 119, 176	Difenilamina: 83, 168, <u>169</u> Norcetamina: <u>166</u> , 168, 195 Cetamina: <u>180</u> , 182, 209

A fase móvel usada foi hélio de elevada pureza (99,999 %, GASIN, Espanha) mantida no modo de pressão constante (pressão média: 9,80 psi). As temperaturas da linha de transferência, fonte de ionização e quadrupólo foram mantidas a 280, 230 e 150 °C, respetivamente, tendo sido selecionado um *solvent delay* de 6 min para o trabalho envolvendo nicotina e a cotinina, e de 4 min para o trabalho envolvendo cetamina e a norcetamina. Um injetor PTV foi usado no modo *solvent vent* usando um *liner* revestido com lã de vidro. Foi empregado o modo de injeção de grandes volumes (LVI, *Large Volume Injection*), sendo que o volume e a velocidade de injeção foram de 10 µL e 100 µL min⁻¹, respetivamente, para ambos os estudos. Foi utilizada ionização eletrónica (70 eV), operando na gama de massas (*m/z*) compreendida entre 35 e 550 Da no modo *full-scan*, com uma corrente de ionização de 34,6 µA e um potencial multiplicador de 1200 V. No modo de monitorização de iões selecionados (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring mode*), um grupo de iões alvo foi monitorizado em diferentes janelas de tempo, definidas pelo tempo de retenção correspondente, usando um tempo de permanência de 100 ms. Três iões qualificadores e um quantificador foram selecionados para cada composto, de acordo com as características dos espectros de massa obtidos no modo *full-scan* e por comparação com a base de dados espectrais da biblioteca de Wiley (G1035B; Rev D.02.00; Agilent Technologies). A gravação de dados e o controlo instrumental foram realizados pelo *software* MSD ChemStation (G1701CA; Versão C.00.00; Agilent Technologies). Para fins de quantificação, foram efetuadas curvas de calibração usando a metodologia do padrão interno, sendo a integração feita com recurso ao *software* mencionado anteriormente.

3.6.2.3 CE-DAD

Por forma a alcançar as melhores condições instrumentais por CE-DAD, os compostos alvo foram analisados individualmente com a finalidade de se obter os respetivos tempos de migração e espectros de UV/Vis. Diversos parâmetros foram estudados por forma a conseguir a melhor resolução, tempo de migração e eficiência, nomeadamente a concentração e solvente do tampão borato, a voltagem, o pH da amostra, a pressão e tempo de injeção, entre outros.

A temperatura foi fixada nos 20 °C. O tampão ou eletrólito de corrida (BGE, do inglês *Background Electrolyte*) era composto por tampão borato em MeOH (25 mmol L⁻¹, pH 9,5), a injeção foi hidrodinâmica (2 s, 50 mbar), aplicando uma voltagem de -20 kV para a separação eletroforética, resultando num tempo de análise de 30 min. O comprimento de onda selecionado foi de 214 nm. Capilares novos eram inicialmente condicionados com 1,0 mol L⁻¹ de NaOH (20 min), seguido de passagem com água ultrapura (10 min), MeOH (10 min) e BGE (20 min). Antes de cada análise, os capilares eram purgados com 0,1 mol L⁻¹ de NaOH (2 min, 1 bar), seguido de água ultrapura (1 min), MeOH (1 min) e BGE (3 min). No final de cada análise, os capilares eram purgados com MeOH (2 min, 1 bar). Para fins de quantificação, foram realizadas curvas de calibração usando a metodologia de padrão interno, tendo a altura dos picos sido calculada com recurso a *software* mencionado anteriormente.

3.6.3 Preparação dos dispositivos e *apparatus* analíticos para microextração

3.6.3.1 Dispositivos BA μ E

Todos os dispositivos BA μ E foram preparados em laboratório. Foram empregados dispositivos BA μ E convencionais (15 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro) [4] para o trabalho envolvendo a análise de micropoluentes orgânicos, e dispositivos BA μ E miniaturizados (7,5 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro) [5] para os restantes trabalhos. Estes eram constituídos por um suporte cilíndrico em polipropileno revestido com o material sorvente finamente dividido, sendo fixado com adesivo adequado. Para o trabalho envolvendo a análise de anti-inflamatórios não esteroides, misturas com o mesmo peso de WAX e MAX (1/1, p/p) foram homogeneizadas seguido pelo revestimento em dispositivos BA μ E, como descrito anteriormente. Os dispositivos eram sempre lavados com MeOH e água ultrapura antes de serem armazenados e/ou utilizados. Os dispositivos eram de uso único, uma vez serem muito económicos, fáceis e rápidos de preparar, assim como para evitar eventuais efeitos de contaminação.

3.6.3.2 Apparatus HT-BA μ E

O *apparatus* HT-BA μ E [6] consistia numa caixa e tampa transparentes, à base de polipropileno com as seguintes dimensões: 18,0 × 11,5 × 3,6 cm (c × l × a) – figura 3.1. Este tinha a possibilidade de acomodar até 100 frascos de vidro convencionais (12 mm de diâmetro e 32 mm de altura; 2 mL). Na tampa interior do *apparatus*, 100 hastes de poliestireno (5 mm de diâmetro e 38 mm de comprimento) estavam posicionadas acima de cada frasco. Sempre que a caixa estava fechada, cada haste encontrava-se alinhada com o respetivo frasco para microextração ou para armazenamento. O *apparatus* possuía vários orifícios (1 mm de diâmetro) em cada lado, incluindo na parte superior e inferior, por forma a permitir a entrada de água para extração ou retroextração através de cavitação. A microextração era realizada usando os dispositivos miniaturizados BA μ E descritos no ponto anterior, sendo estes facilmente inseridos no lado inferior de cada haste de poliestireno. Estes dispositivos eram também de uso único. Após cada utilização, os dispositivos BA μ E eram descartados, sendo o *apparatus* HT-BA μ E lavado com EtOH e água ultrapura. Depois de secar, o *apparatus* era reutilizado.

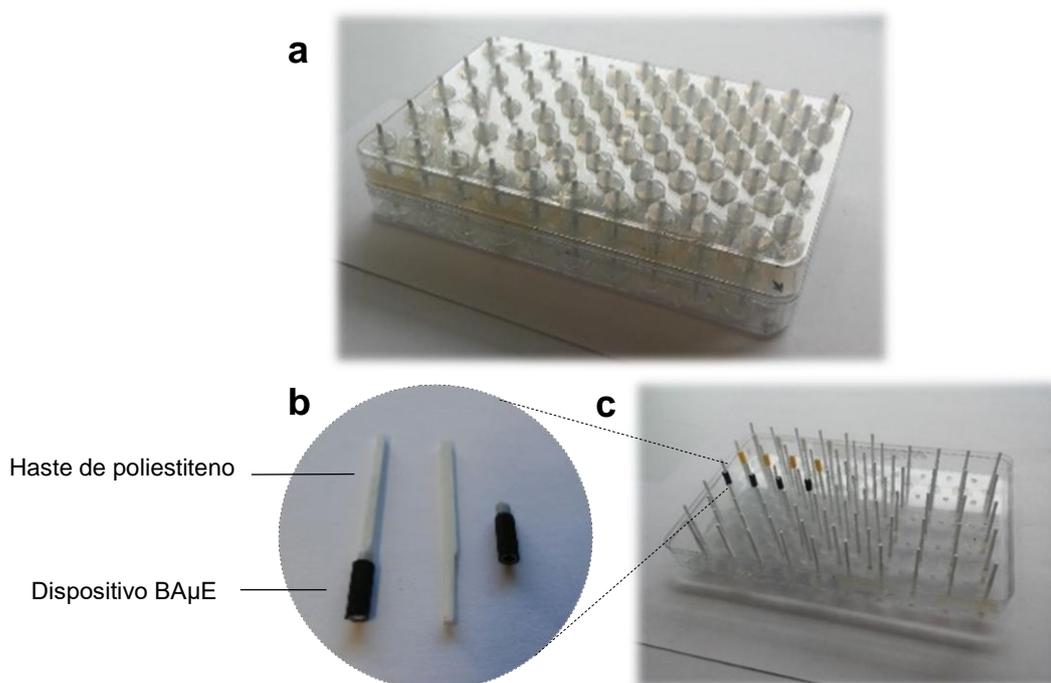


Figura 3.1 – *Apparatus* HT-BA μ E (a), assim como o interior da tampa do mesmo (c), e uma visão amplificada do posicionamento dos dispositivos BA μ E nas hastes de poliestireno presentes no aparelho (b).

3.6.4 Desenvolvimento e otimização dos métodos analíticos

Por forma a maximizar as eficiências das metodologias desenvolvidas, recorreu-se a uma estratégia de otimização univariada. Esta servia para comparar as recuperações médias obtidas por cada ensaio por forma a obter a melhor resposta analítica.

Os cálculos realizados para comparar o efeito de cada parâmetro testado podem ser encontrados no anexo III.

3.6.4.1 Trabalhos envolvendo a técnica BA μ E

Os ensaios de otimização eram realizados em frascos de amostragem contendo 25 ou 10 mL (para o caso do trabalho envolvendo a análise de canabinóides sintéticos) de água ultrapura fortificada com 100 ou 200 μ L (para o caso do trabalho envolvendo a análise dos anti-inflamatórios não esteroides e dos micropoluentes orgânicos) de uma solução de trabalho, seguida da introdução do dispositivo BA μ E e uma barra para agitação magnética. Estes ensaios eram realizados em placas de agitação magnética de quinze posições à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Por forma a avaliar a eficiência de BA μ E, estudos sistemáticos eram realizados em triplicado para otimização de vários parâmetros, como a seletividade da fase sorvente, o tempo de microextração (1 a 16 h), a velocidade de agitação (750 a 1250 rpm), assim como o pH (2,0 a 12,0), a polaridade (adição de MeOH de 0 a 20 %, v/v) e a força iónica (adição de NaCl de 0 a 20 %, p/v) da matriz.

Após a fase de microextração, os dispositivos BA μ E eram removidos das amostras com pinças limpas e colocados em *inserts* dentro de frascos de vidro transparentes convencionais para sistemas cromatográficos ou em frascos de polipropileno de 0,3 mL contendo 100 ou 200 μ L (para o caso do trabalho envolvendo a análise dos anti-inflamatórios não esteroides e dos micropoluentes orgânicos) de solvente para retroextração, garantindo a total imersão destes antes do tratamento ultrassónico, à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Para microdessorção líquida (μ LD), vários solventes como BGE, EtOH, 1-PrOH, 2-PrOH, ACN, MeOH ou mistura destes dois últimos (50/50, v/v) eram testados

(podendo ou não conter padrão interno), usando vários períodos de tempo (5 a 60 min) sob tratamento ultrassônico. Para o caso da análise de farmacêuticos, foi adicionado 100 μ L de água ultrapura depois do tratamento ultrassônico. Posteriormente, os dispositivos eram removidos dos *inserts* com pinças e os frascos eram selados e colocados no amostrador automático para análise por GC-MS, HPLC-DAD ou CE-DAD.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Foram igualmente efetuados ensaios em branco, que correspondem a todo o processo experimental descrito, usando água ultrapura sem qualquer fortificação.

3.6.4.2 Trabalhos envolvendo a técnica HT-BA μ E

Os ensaios de otimização realizados no *apparatus* HT-BA μ E com recurso a frascos de vidro transparentes convencionais para sistemas cromatográficos contendo 1,5 ou 1,0 mL (para o caso do trabalho envolvendo a análise de cetamina e norcetamina) de água ultrapura fortificada com 100 μ L de uma solução de trabalho. Em seguida, os dispositivos BA μ E revestidos com sorvente adequado foram instalados no lado inferior das hastes de poliestireno da tampa do *apparatus*. Posteriormente, a caixa foi fechada e colocada em banho ultrassônico para microextração *via* cavitação ou por agitação orbital (para o caso do trabalho envolvendo a análise de cetamina e norcetamina) à temperatura ambiente (~ 25°C). Por forma a avaliar a eficiência de HT-BA μ E, estudos sistemáticos foram realizados em triplicado para otimização de vários parâmetros, como a seletividade da fase sorvente, o tempo de microextração (5 a 180 min), a velocidade de agitação (de 600 a 2200 rpm, para o caso do trabalho envolvendo a análise de cetamina e norcetamina), bem como o pH (2,0 a 12,0), a polaridade (adição de MeOH de 0 a 20 %, v/v) e a força iônica (adição de NaCl de 0 a 20 %, p/v) da matriz.

Após a etapa de enriquecimento, a água era drenada do banho ultrassônico (exceto para o caso do trabalho envolvendo a análise de cetamina e norcetamina) e a tampa era colocada num papel absorvente por alguns minutos por forma a remover o excesso de solução. Em seguida, os frascos de amostragem eram substituídos por outros com *inserts* contendo 100 μ L de

solvente para retroextração, garantindo a total imersão destes antes do tratamento ultrassônico, à temperatura ambiente (~ 25 °C). Depois, o *apparatus* era fechada novamente e colocada no banho ultrassônico para μ LD *via* cavitação. Neste caso, diversos solventes como ACN, MeOH ou mistura destes dois últimos (50/50, v/v) eram testados (podendo ou não conter padrão interno), usando vários períodos de tempo (5 a 90 min) sob tratamento ultrassônico. Posteriormente, era retirado do banho ou do agitador orbital (para o caso do trabalho envolvendo a análise de cetamina e norcetamina), a tampa era removida e os *vials* eram selados e colocados no amostrador automático do HPLC-DAD e/ou GC-MS para a análise instrumental. Entre os ensaios, o *apparatus* HT-BA μ E era lavado com água ultrapura, seguido por EtOH e deixado secar.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Eram igualmente efetuados ensaios em branco, que correspondem a todo o processo experimental descrito, mas usando água ultrapura sem qualquer fortificação.

3.6.5 Validação das metodologias analíticas

O processo de validação das metodologias propostas foi realizado de forma semelhante à descrita na seção anterior para os trabalhos envolvendo a análise de anti-inflamatórios não esteroides, de micropoluentes orgânicos e de farmacêuticos. No entanto, durante a validação foram efetuados ensaios com diferentes níveis de concentração sob condições experimentais otimizadas para determinação da sensibilidade, linearidade, gama de trabalho, repetibilidade e precisão intermédia. Foram ainda realizados ensaios em branco usando água ultrapura sem qualquer fortificação. Exceto quando especificado, todos os ensaios relativos a estas validações foram efetuados em triplicado.

Para fins de validação das metodologias propostas para a análise de canabinóides sintéticos, benzodiazepinas, nicotina (e cotinina) e cetamina (e norcetamina), diversos parâmetros foram avaliados, nomeadamente a linearidade, a sensibilidade, a seletividade, a precisão, a exatidão, a recuperação e o efeito de matriz, conforme previamente descrito [7–9]. Exceto quando especificado, todos os ensaios de validação foram realizados em triplicado.

3.6.5.1 Linearidade, sensibilidade e seletividade

Por forma a demonstrar a linearidade das diferentes metodologias desenvolvidas, foram realizados diversos ensaios com recurso a fortificação (dez pontos) de amostras em branco de fluido oral, urina, soro ou plasma, seguida da metodologia otimizada, descrita nos pontos anteriores. Estas amostras ou provinham de voluntários que não consumiram qualquer uma das substâncias de abuso em estudo ou da Clínica Joaquim Chaves Saúde depois de analisadas por forma a comprovar a ausência dos analitos alvo. Os resultados permitiram a produção de curvas de regressão linear, que não foram forçadas na origem. O critério de aceitação foi que todos os pontos da curva não poderiam ter um desvio superior a 15,0 % da sua concentração nominal (resíduos relativos, RR) e o coeficiente de determinação (r^2) ser superior a 0,99. A linearidade foi igualmente estimada empregando o teste “*lack-of-fit*” (intervalo de confiança de 95 %) e aplicado para todos os compostos nas matrizes estudadas. Por outro lado, a sensibilidade da metodologia foi verificada através dos limites de deteção (LODs) e quantificação (LOQs) tendo uma razão sinal/ruído (S/N) de 3/1 e 10/1, respetivamente. O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi igualmente avaliado, tendo sido definido como os valores de concentração mais baixos que se encontravam dentro dos níveis aceitáveis de exatidão e de precisão, sendo o calibrador de concentração mais baixa.

Por fim, a seletividade foi avaliada através da verificação de compostos interferentes que poderiam ocorrer devido a materiais endógenos presentes nas matrizes biológicas estudadas. Isto foi conseguido através da aplicação das metodologias otimizadas a dez amostras em branco (das várias matrizes estudadas) não fortificadas e verificando os cromatogramas resultantes para quaisquer compostos interferentes, especialmente nos tempos de retenção característicos de cada composto. Para este caso, o critério de aceitação foi de que nenhum composto interferente coeluisse nos tempos de retenção dos compostos alvo em estudo.

3.6.5.2 Precisão e exatidão

A precisão intermédia e exatidão interdias ($n = 6$; 3 dias consecutivos), assim como a repetibilidade e exatidão intradia ($n = 6$) das metodologias desenvolvidas foram avaliadas através da fortificação de amostras em branco (das várias matrizes estudadas) por forma a obter uma concentração final no “LLOQ”, “baixa”, “média” ou “alta”. Estes valores variavam consoante o trabalho em causa. A exatidão foi calculada como o percentual relativo do erro (RE), segundo a equação (3.5):

$$RE = \frac{E-T}{T} \times 100 \quad (3.5)$$

onde E diz respeito à concentração determinada experimentalmente e T à concentração teórica. A repetibilidade e a precisão intermédia foram calculadas como desvio padrão relativo (RSD) dos ensaios de exatidão interdias e intradia, respetivamente. Os critérios de aceitação para precisão e exatidão foram de que o RE e o RSD deveriam ambos de ser inferiores a 15,0 %.

3.6.5.3 Efeito de matriz e recuperação

O efeito de matriz e a recuperação foram igualmente avaliados conforme descrito anteriormente [7–10]. Em suma, foram analisados, sob condições otimizadas, três conjuntos de amostras (conjuntos A, B e C), cada uma com duas ou quatro concentrações diferentes. O conjunto A ($n = 6$) consistiu numa mistura padrão em solvente. Os conjuntos B ($n = 6$) e C ($n = 6$) foram preparados usando seis matrizes biológicas. As amostras do conjunto B foram fortificadas após a fase de microextração (antes de μLD). As amostras do conjunto C foram fortificadas antes da microextração.

O efeito de matriz (ME, do inglês *Matrix Effect*) foi calculado através da equação (3.6):

$$ME = \frac{\text{Conjunto B}}{\text{Conjunto A}} \times 100 \quad (3.6)$$

A recuperação foi calculado através da equação (3.7):

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Conjunto C}}{\text{Conjunto B}} \times 100 \quad (3.7)$$

Para além destes parâmetros, foi igualmente calculado o RSD do efeito da matriz e da recuperação por forma a avaliar as variações que poderiam surgir usando amostras provenientes de diferentes fontes (RSD \leq 20,0 % foi considerado aceitável).

3.6.6 Aplicação a matrizes reais

Os ensaios em matrizes reais foram realizados sob condições experimentais otimizadas e em triplicado. Foi adotado o método da adição de padrão para os trabalhos envolvendo a análise de anti-inflamatórios não esteroides, de micropoluentes orgânicos e de farmacêuticos por forma a suprimir eventuais efeitos de matriz nas amostras reais e o método de padrão externo para os restantes trabalhos.

3.6.6.1 Adição de padrão

Os ensaios envolvendo amostras de água de consumo humano, água superficial, água estuarina, água do mar, água de rio, água subterrânea e efluentes foram realizados conforme o procedimento experimental descrito nas secções anteriores, utilizando um volume de 25 mL filtrados com filtros de papel e sem diluição.

Para o trabalho envolvendo a análise de anti-inflamatórios não esteroides, as amostras foram previamente filtradas com filtros de papel, seguido de hidrólise alcalina, seguindo um protocolo existente [11]. Num frasco de vidro, eram adicionados 25 mL de amostra de urina e 25 mL de NaOH a 1,0 mol L⁻¹, juntamente com uma barra de agitação magnética. A hidrólise era realizada à temperatura ambiente (~25 °C) durante 1 h. De seguida, 25 mL de HCl (1,0 mol

L⁻¹) eram adicionados ao mesmo frasco. Posteriormente, 6 mL desta solução hidrolisada foram diluídos para 500 mL de água ultra pura. Por fim, os ensaios foram realizados conforme o procedimento experimental descrito nas seções anteriores, utilizando 25 mL desta solução de urina diluída. Foram igualmente realizados ensaios usando urina diluída 250 vezes sem o passo de hidrólise.

3.6.6.2 Padrão externo

Os ensaios envolvendo amostras biológicas foram realizados conforme os procedimentos experimentais HT-BA μ E descritos anteriormente. No entanto, foram sujeitas a passos prévias de preparação de amostra, variando consoante as amostras e o trabalho em causa.

Para o estudo envolvendo a análise de canabinóides sintéticos as amostras de fluido oral foram deixadas a descongelar até atingirem a temperatura ambiente. Foram depois homogeneizadas (vórtex, 30 s), seguido da adição de ACN para a precipitação das proteínas [9] numa proporção de 1/2 (ACN/amostra, v/v). Posteriormente, as amostras foram submetidas novamente a homogeneização (vórtex, 30 s), seguida de centrifugação (10 min a 4000 rpm). Subsequentemente, foram transferidos 750 μ L do sobrenadante para um frasco contendo 9,5 mL de água ultrapura/MeOH (8,5/1,0, v/v, pH 5,5), seguido da metodologia previamente otimizada.

Para o trabalho envolvendo a análise de benzodiazepinas, foi pipetado 1,0 mL de amostra de urina para um frasco de vidro presente no *apparatus* HT-BA μ E seguido de 0,5 mL de uma solução de β -glucuronidase (10.000-50.000 unidades mL⁻¹ em tampão fosfato 75,0 mmol L⁻¹, pH 6,8). Subsequentemente, estes frascos foram fechados e o *apparatus* incubado a 37 °C durante 1,5 h por forma a alcançar a desconjugação dos compostos glucuronados [12], de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante. Posteriormente, os frascos foram deixados a arrefecer até atingir a temperatura ambiente antes de serem submetidos a HT-BA μ E. Quanto às matrizes de soro e plasma, 1,0 mL de tampão fosfato (75,0 mmol L⁻¹, pH 6,8) foi adicionado a 0,5 mL de cada amostra tendo de seguida as soluções sido submetidas ao mesmo procedimento.

Para os restantes trabalhos, as amostras de urina foram deixadas a descongelar até atingirem a temperatura ambiente. Posteriormente, foram agitadas num vórtex durante alguns segundos e centrifugadas durante 10 min a 4500 rpm, sendo os sobrenadantes recolhidos. De seguida, para o trabalho envolvendo a análise de nicotina (e cotinina), 0,5 mL dos sobrenadantes foram pipetados para os frascos de microextração já presentes no *apparatus* de HT-BA μ E, sendo depois adicionado 1,0 mL de tampão de fosfato (50,0 mmol L⁻¹, pH 11,0). Para o trabalho envolvendo a análise de cetamina (e norcetamina) foi realizada hidrólise ácida para obtenção dos analitos livres dos seus correspondentes conjugados, de acordo com a literatura [13]. Neste sentido, 500 μ L dos sobrenadantes foram pipetados para os frascos de microextração já presentes no aparelho HT-BA μ E, sendo adicionados 150 μ L de HCOOH 10 % (v/v). Seguidamente, as amostras foram aquecidas a 40 °C por 1 h. Após as amostras até atingirem a temperatura ambiente, 350 μ L de tampão fosfato (75,0 mmol L⁻¹, pH 11,0) e 57,5 μ L de NaOH (10,0 mol L⁻¹) foram adicionados por forma a manter a solução a pH 11,0. Finalmente, estes frascos foram submetidos ao procedimento analítico HT-BA μ E anteriormente descrito.

3.7 Referências

- [1] N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 83 (2011) 1643–1649.
- [2] M.N. Uddin, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 31 (2008) 1258–1282.
- [3] V.F. Samanidou, A.P. Pechlivanidou, I.N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 679–687.
- [4] N.R. Neng, A.R. Silva, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7303–7310.
- [5] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 120 (2014) 126–134.
- [6] S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 199 (2019) 195–202.
- [7] P. Amaratunga, C. Thomas, B.L. Lemberg, D. Lemberg, *J. Anal. Toxicol.* 38 (2014) 315–321.
- [8] P. Amaratunga, B.L. Lemberg, D. Lemberg, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 622–628.
- [9] R. Dams, M.A. Huestis, W.E. Lambert, C.M. Murphy, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003) 1290–1294.
- [10] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [11] T. Hirai, S. Matsumoto, I. Kishi, *J. Chromatogr. B* 692 (1997) 375–388.
- [12] K. Persona, K. Madej, P. Knihnicki, W. Piekoszewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 239–264.

- [13] B. Anılanmert, F. Çavuş, I. Narin, S. Cengiz, Ş. Sertler, A.A. Özdemir, M. Açikkol, J. Chromatogr. B 1022 (2016) 230–241.

Capítulo 4

Determinação de Anti-Inflamatórios Não Esteroides em Matrizes Ambientais e Biológicas por BA μ E(P_{MIX})- μ LD/CE-DAD

S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Bar adsorptive microextraction (BA μ E) coated with mixed sorbent phases – Enhanced selectivity for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in real matrices in combination with capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B* 1008 (2016) 115–124 [1]

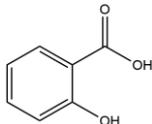
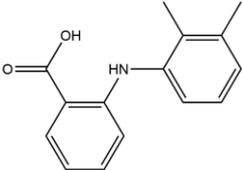
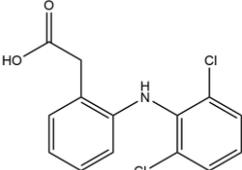
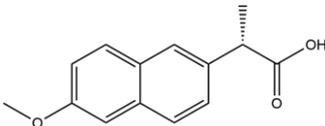
4.1 Considerações gerais

Os anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs, do inglês *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*), como o ácido acetilsalicílico, o diclofenac e o naproxeno, são os medicamentos mais prescritos no mundo [2–4]. Estes fármacos são utilizados para reduzir a dor e a inflamação, devido às suas propriedades antipiréticas, analgésicas e anti-inflamatórias. Apesar dos efeitos terapêuticos, podem ocorrer toxicidade e efeitos secundários, como problemas gastrointestinais e/ou renais [2]. Por estas razões, a sua determinação em fluidos biológicos, como a urina e o plasma, torna-se importante. Esta informação é necessária por forma a avaliar a segurança, os mecanismos de ação e o efeito terapêutico destes fármacos, tendo um forte impacto em áreas como a toxicologia forense e clínica [5]. Por outro lado, os NSAIDs foram também considerados como potenciais contaminantes de recursos aquáticos, como águas superficiais [6], estuarinas [7], fluviais, marítimas [8], assim como de água potável [9], podendo apresentar efeito tóxico no ambiente [10], ocorrendo geralmente a níveis vestigiais (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$) [11]. Neste sentido, os NSAIDs têm sido detetados em amostras águas subterrâneas no Japão (60 a $223 \mu\text{g L}^{-1}$) [12] e de rio na Eslovénia (17 a 313ng L^{-1}) [13], bem como em águas fluviais e marítimas em Espanha (8 a 410ng L^{-1}) [14].

Diversos métodos analíticos têm sido propostos para a determinação de NSAIDs em fluidos biológicos e matrizes aquosas [15]. Estas abordagens normalmente incluem um passo prévio de preparação de amostra, seguido da separação e análise por LC, GC e CE, ou hifenadas a MS [6,16,17]. Por outro lado, os NSAIDs apresentam propriedades de ácidos fracos com valores de constante de acidez (pK_a) compreendidas entre 3 e 7. Por este motivo, a CE, nos seus diversos modos de operação, oferece inúmeras vantagens para a análise destas substâncias, nomeadamente na drástica redução do custo, no tempo de análise e no impacto ambiental. Adicionalmente, o seu elevado poder de resolução e eficiência de separação, bem como a boa seletividade e o consumo muito baixo de solventes orgânicos, tornam esta técnica analítica uma alternativa amiga do ambiente para a análise de NSAIDs para fins clínicos, forenses e ambientais [17].

Neste contexto, o presente estudo visa avaliar o desempenho da técnica de BAμE, usando misturas de fases sorventes, seguida de microdessorção líquida (μLD) e análise por CE-DAD para monitorizar níveis vestigiais de quatro NSAIDs (ácido salicílico, SCA; ácido mefenâmico, MFA; diclofenac, DCF; e naproxeno, NPX) em matrizes aquosas. A tabela 4.1 apresenta as estruturas químicas, assim como os log K_{OW} e os pK_a destes compostos. A otimização do processo analítico, incluindo a influência de vários parâmetros experimentais, é discutida, o que inclui o uso de mistura de fases sorventes como uma nova melhoria em BAμE para fins de enriquecimento de amostras. A validação e aplicação da metodologia otimizada a matrizes ambientais e biológicas são também abordadas.

Tabela 4.1 – Estruturas químicas, log K_{OW} e pK_a dos NSAIDs estudados.

NSAIDs	Estrutura química	Log K_{OW}	pK_a
SCA		1,98	2,79; 13,23
MFA		5,40	3,89
DCF		4,26	4,00
NPX		2,99	4,19

As propriedades físico-químicas, assim como a estrutura das moléculas foram previstas com recurso a *software* específico: Marvin 6.2.2, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Otimização instrumental

No início do presente estudo foram avaliadas as condições para análise por CE-DAD, incluindo os espectros UV/vis para a detecção de cada NSAID envolvido, assim como as características do tempo de migração necessários para ocorrer separação e resolução. De acordo com a literatura, BGE constituído por tampão borato a 30,0 mmol L⁻¹ (pH 9,8; MeOH/H₂O, 70/30, v/v) já foi proposto com sucesso para a separação de alguns dos NSAIDs em estudo [18]. Por essa razão, diversos ensaios foram realizados utilizando uma estratégia de otimização univariada, por forma a avaliar a influência de vários parâmetros no tempo de migração, resolução e eficiência, usando o ácido 4-aminobenzóico como padrão interno (PI), por forma a corrigir o tempo de migração e a altura dos picos. Os critérios de seleção para o PI foram de que deveria possuir uma estrutura química similar aos compostos alvo, de fácil detecção, não estar presente de forma endógena em amostras reais e não apresentar toxicidade [19]. Inicialmente foi avaliada a influência das concentrações do tampão borato e do solvente, assim como a voltagem aplicada, o pH da amostra e as características de injeção. As condições instrumentais otimizadas resultaram no uso de BGE contendo tampão borato com concentração de 25,0 mmol L⁻¹ em MeOH (pH 9,5), recorrendo a injeção hidrodinâmica (50 mbar, 2 s) e uma voltagem de -20 kV. Estas condições proporcionaram a melhor separação num tempo analítico conveniente (< 30 min). A calibração instrumental foi realizada com soluções padrão contendo concentrações compreendidas entre 0,5 e 40,0 mg L⁻¹, resultando em excelentes respostas lineares para os quatro NSAIDs, com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,9991. A sensibilidade instrumental foi igualmente determinada através dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), obtidos pela injeção de soluções padrão e calculados a partir de uma razão sinal/ruído (S/N) de 3/1 e 10/1, respetivamente. Os LODs e LOQs foram de 0,1 e 0,4 mg L⁻¹, respetivamente, para os quatro NSAIDs estudados. Por forma a avaliar a precisão instrumental, foram realizadas seis injeções consecutivas de uma mistura padrão (10,0 mg L⁻¹), resultando em desvios padrão relativos (RSD) inferiores a 4,7 % para os analitos alvo.

4.2.2 Otimização do método analítico

Numa primeira abordagem, foram estabelecidas as condições experimentais que poderiam permitir maiores níveis de recuperação por BA μ E- μ LD para os analitos selecionados. Neste sentido, estudos sistemáticos usando uma estratégia de otimização univariada, foram realizados em água ultrapura fortificada (80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), com o objetivo de otimizar vários parâmetros importantes que poderiam influenciar a eficiência de BA μ E- μ LD. Para a etapa de microextração, foram selecionados parâmetros como a seletividade da fase sorvente, o tempo e a velocidade de agitação, assim como o pH, a polaridade e a força iônica da matriz; para μ LD foram testados o tipo de solvente e tempo de retroextração, de acordo com trabalhos anteriores [20–23]. O estudo de mistura de fases sorventes foi igualmente efetuado, por forma a incrementar a eficiência de extração e a seletividade da metodologia.

4.2.2.1 Seleção da fase sorvente

Foram realizados diversos ensaios por forma a selecionar o sorvente para revestimento dos dispositivos BA μ E que apresentasse melhores eficiências de microextração para os quatro NSAIDs em meio aquoso. Desta forma, cinco ACs e seis polímeros foram testadas, sob condições experimentais padrão (microextração: 3 h (1000 rpm), pH 5,5; μ LD: MeOH/ACN (1/1, v/v; Mix), 30 min sob tratamento ultrassónico) [23].

Os ACs são materiais sólidos porosos que retêm solutos através de interações eletrostáticas e/ou dispersivas, sendo dependente do respetivo pH_{PZC} (pH do ponto de carga zero), das propriedades texturais, da área superficial e das dimensões dos poros]. Por outro lado, os polímeros testados retêm analitos através de múltiplos mecanismos devido aos diferentes grupos funcionais, assim como das características físicas dos mesmos, *i.e.*, a área de superfície, o tamanho de partícula e as dimensões de poros, bem como de mecanismos químicos nomeadamente interações π - π , pontes de hidrogênio, dipolo-dipolo, hidrofóbicas ou iónicas [1]. A figura 4.1 reproduz as recuperações médias dos compostos alvo usando diferentes ACs comerciais.

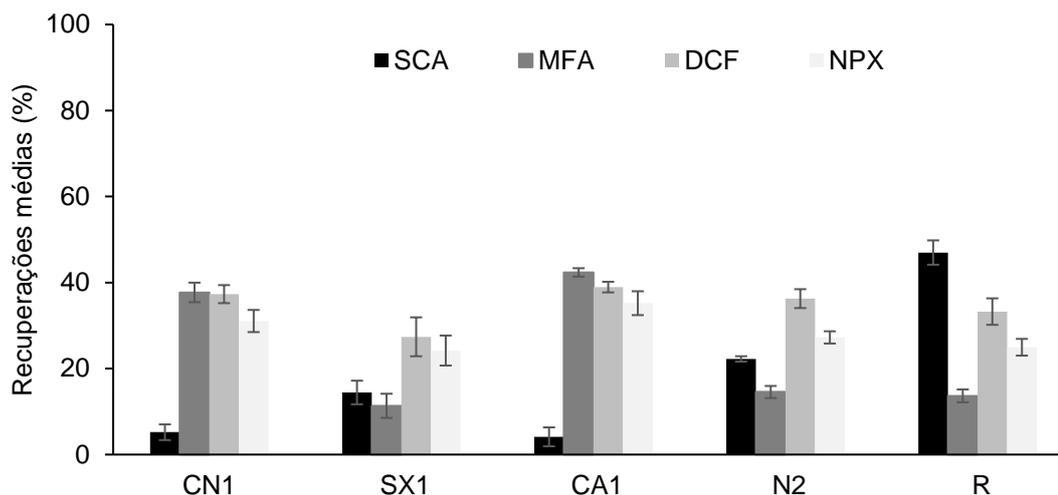


Figura 4.1 – Efeito da seletividade de ACs para a microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, Mix (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico; evaporação sob suave corrente de N₂ e redissolução com BGE (200 μ L). As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Os materiais CN1 e CA1 foram os que apresentaram as melhores eficiências de microextração dos quatro NSAIDs em estudo (> 31,1%), à exceção do SCA, quando comparados os demais ACs. Por outro lado, R apresentou a maior eficiência de extração para SCA (46,9%) entre todos os ACs testados. As interações entre os ACs e os NSAIDs em estudo parecem ser predominantemente influenciadas por interações eletrostáticas e/ou dispersivas, apesar das propriedades texturais destes sorventes nanoestruturados. Assim, uma vez o pH_{PZC} poder ter uma forte influência em quase todos os mecanismos de adsorção, as interações são definitivamente condicionadas pelo mesmo, através das características ácidas ou básicas da superfície dos materiais envolvidos. A principal contribuição para a natureza ácida/básica dos ACs é devido à ocorrência de heteroátomos à sua superfície, como por exemplo oxigênio, fósforo e azoto, que podem influenciar a capacidade adsortiva dos ACs em fase líquida [22]. Para uma amostra de pH ($pH_{Amostra}$) igual ao pH_{PZC} dos ACs, a carga superficial será nula. Por outro lado, se $pH_{Amostra} < pH_{PZC}$, a carga superficial torna-se positiva, e negativa se $pH_{Amostra} > pH_{PZC}$ [24]. Ao pH ensaiado (5,5), a carga superficial dos ACs varia de negativa (CA1), a positiva (SX1 e R) e quase neutra (CN1 e R), desempenhado um papel importante nas interações com as moléculas envolvidas. Mesmo assim, os dados obtidos demonstram que

a retenção aparenta ser efetiva, embora condicionada pelas propriedades texturais dos ACs, uma vez fases sorventes com pH_{PZC} similar apresentarem eficiências de extração muito diferenciadas, *i.e.*, CN1 (pH_{PZC} 6,4) e R (pH_{PZC} 6,5) permitiram obter recuperações para SCA de 5,2 e 46,9 %, respetivamente. Este facto pode ser ainda mais evidenciado pelos resultados de CN1 e CA1 (6,4 e 2,2, respetivamente), *i.e.*, embora apresentem valores de pH_{PZC} diferentes, é possível notar que foram alcançados eficiências de microextração muito semelhantes.

Por outro lado, a partir dos dados da figura 4.2, é evidente que a fase polimérica LiChrolut EN, com exceção para SCA, apresentou as melhores eficiências de microextração para os NSAIDs em estudo. Este resultado seria esperado uma vez este sorvente conseguir reter compostos por interações de tipo fase reversa, bem como apresenta elevada área superficial (1 200 m² g⁻¹) quando comparado com os restantes polímeros. Adicionalmente, os compostos em estudo apresentam características semi-polares a apolares, tendo log K_{OW} compreendidos entre 1,98 e 5,40 (tabela 4.1). Estes dados mostram que as interações predominantes entre LiChrolut EN e MFA, DCF e NPX parecem ser de tipo fase reversa, nomeadamente π - π e hidrofóbicas. Uma vez o SCA apresentar características de mais polaridade (log K_{OW} 1,98), essas interações podem ser dificultadas, resultando numa fraca retenção através daquele sorvente. Este racional parece explicar os perfis de recuperação das fases Strata SDB-L, Strata-X e HLB, uma vez esses sorventes poliméricos apresentarem tipos de interação semelhantes, embora áreas superficiais inferiores (< 810 m² g⁻¹), podendo resultar em menores eficiências de extração. Para além disso, WAX e MAX apresentaram, de uma forma global, as melhores eficiências de extração para todos os quatro NSAIDs alvo. Este resultado era igualmente esperado, uma vez que, para além de poderem reter compostos alvo por interações do tipo fase reversa, também permitem reter por mecanismos de troca iónica. Ao pH analisado (5,5), os NSAIDs em estudo encontram-se ionizados (tabela 4.1), o que pode favorecer interações iónicas com essas fases sorventes. Os resultados obtidos mostraram que várias formas de interação entre os NSAIDs e as fases envolvidas podem ocorrer, dependendo essencialmente das propriedades dos sorventes, dos analitos envolvidos e da matriz em causa. Uma

vez as fases sorventes WAX e MAX apresentarem perfis de extração muito semelhantes, foram selecionadas para ensaios posteriores.

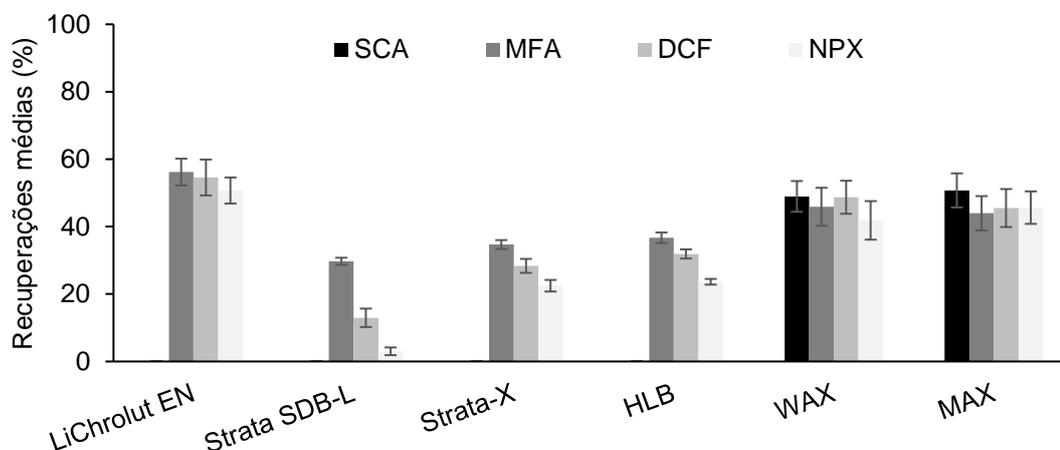


Figura 4.2 – Efeito da seletividade de fase poliméricas para a microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, Mix (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico; evaporação sob suave corrente de N₂ e redissolução com BGE (200 μ L). As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

4.2.2.2 Etapa de retroextração

Depois de selecionados os melhores sorventes (WAX e MAX) para a microextração dos NSAIDS em meio aquoso, prosseguiu-se com a otimização dos parâmetros que pudessem afetar a eficiência do processo de retroextração. Este passo é muito importante uma vez o solvente deve deter força suficiente para promover a dessorção completa dos compostos alvo da fase polimérica. Este processo pode ser acelerado com tratamento ultrassônico [20,25]. Neste sentido, avaliou-se a eficiência dos solventes (200 μ L) MeOH, ACN, Mix e BGE contendo PI (10,0 mg L⁻¹). Os dados obtidos mostraram que este último é o melhor solvente de μ LD (figura 4.3), uma vez garantir a melhor retroextração dos NSAIDS dos sorventes WAX e MAX. Estes resultados seriam esperados, uma vez o fabricante recomendar o uso de um solvente com pH alcalino no sentido de eluir compostos destas duas fases. *I.e.*, a pH elevado, os grupos azotados destas fases sorventes irão estar desprotonados, apresentando-se neutras e prevenindo interações de troca iônica com os compostos alvo. Como

consequência, serão mais facilmente dessorvidos. Adicionalmente, ao empregar BGE como solvente de μ LD, foi possível eliminar o passo de evaporação sob suave corrente de N₂, simplificando a metodologia proposta.

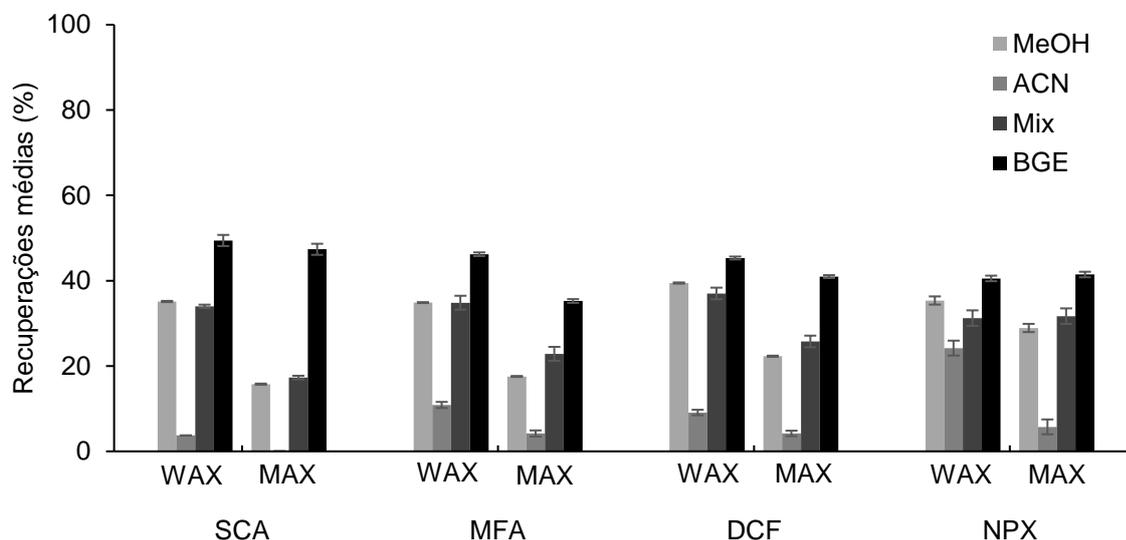


Figura 4.3 – Efeito da variação do solvente na retroextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 30 min sob tratamento ultrassônico; evaporação sob suave corrente de N₂ e redissolução com BGE (200 μ L), exceto aquando do uso de BGE para μ LD. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Após a seleção do solvente mais eficaz para μ LD (BGE), tempos de retroextração de 15, 30, 45 e 60 min foram igualmente avaliados (figura 4.4). Os dados obtidos mostraram que 15 min de μ LD apresentaram menores recuperações para SCA e MFA, sugerindo que períodos de tempo mais elevados serão necessários para dessorver por completo estes compostos de ambas as fases sorventes. Foi então selecionado um tempo de retroextração de 30 min para ensaios subsequentes, uma vez tempos mais elevados de sonicação (até 60 min) resultarem num ganho pouco significativo de recuperação para os quatro compostos alvo. Para além destes ensaios, o efeito de *carryover* foi ainda avaliado através de um passo adicional de μ LD após o inicial, não tendo sido detetado nenhum dos NSAIDs (< LOD).

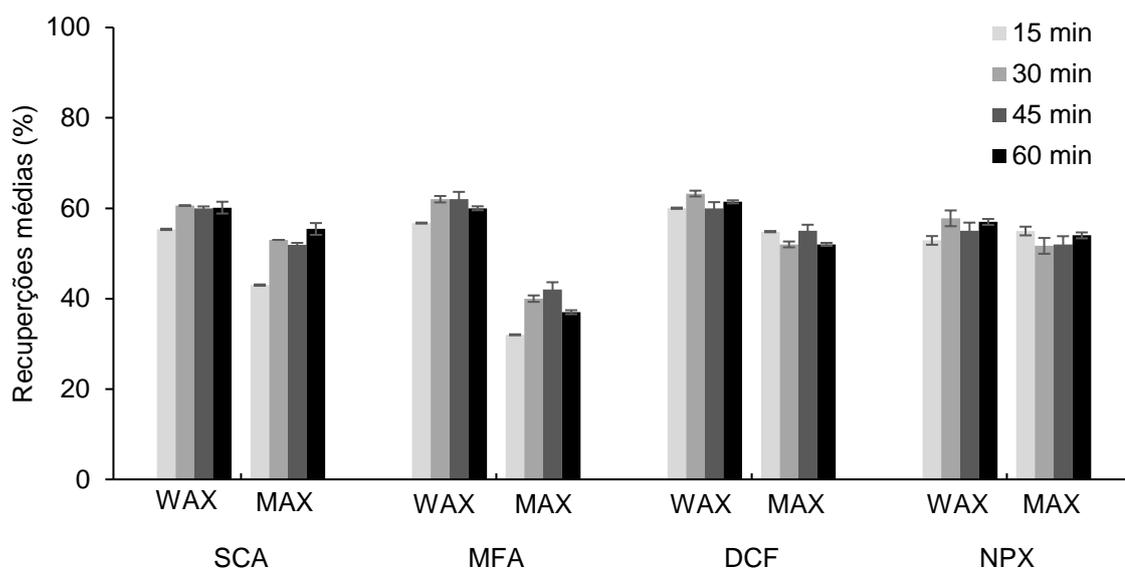


Figura 4.4 – Efeito da variação do tempo na retroextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, BGE (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

4.2.2.3 Etapa de microextração

Diversos parâmetros podem afetar a eficiência de extração, uma vez este processo ser baseado no equilíbrio dos analitos alvo entre a matriz e a fase sorvente. Neste sentido, este fenômeno pode ser afetado pelo tempo de equilíbrio e a velocidade de agitação [20,26].

O tempo de exposição dos analitos ao dispositivo de microextração é provavelmente um dos parâmetros mais importantes que podem condicionar a distribuição de compostos entre as duas fases envolvidas no processo, tendo um efeito pronunciado sobre as eficiências de extração. Assim, diversos ensaios foram realizados com recurso a dispositivos BA μ E revestidos com WAX ou MAX usando tempos de microextração de 1 a 16 h (~ 25 °C). A figura 4.5 mostra o efeito do tempo de microextração, no qual 16 horas parece ser a melhor escolha para o enriquecimento dos quatro analitos alvo usando ambas as fases sorventes. Embora 16 h possa ser considerado um período substancial de tempo de extração, foi decidido fixar este valor para ensaios posteriores, uma vez as técnicas de microextração estática como a BA μ E, terem a grande vantagem de poderem ser realizadas durante a noite sem quaisquer requisitos especiais.

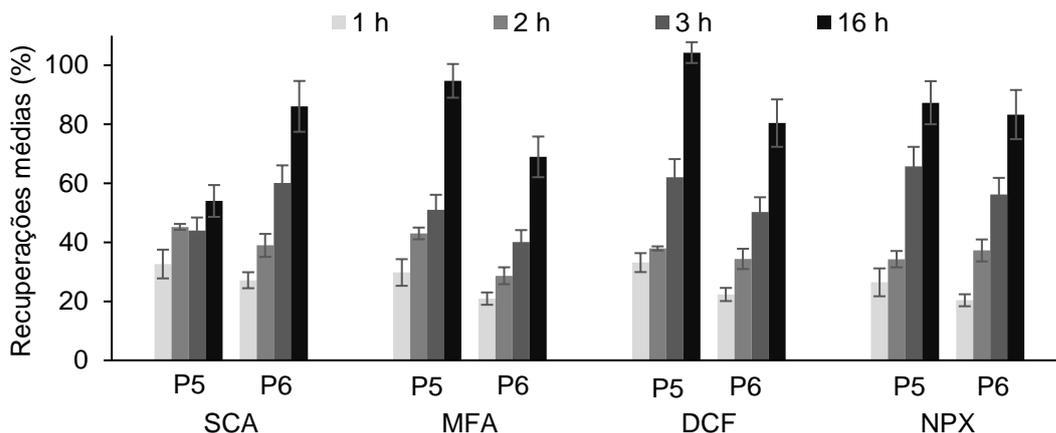


Figura 4.5 – Efeito da variação do tempo na microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, BGE (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

A velocidade de agitação pode igualmente ter grande influência na transferência de massas e no comportamento cinético dos analitos em relação à fase polimérica durante o processo de extração, uma vez a metodologia ser baseada na tecnologia de amostragem por flutuação [27]. Desta forma, três velocidades de agitação (750, 1000 e 1250 rpm) foram ensaiadas, verificando-se que a recuperação aumenta usando 1000 rpm para os quatro NSAIDs, para ambas as fases sorventes (figura 4.6). Contudo, não foram encontradas vantagens para velocidades de agitação mais elevada, tendo 1000 rpm sido selecionado para ensaios subsequentes.

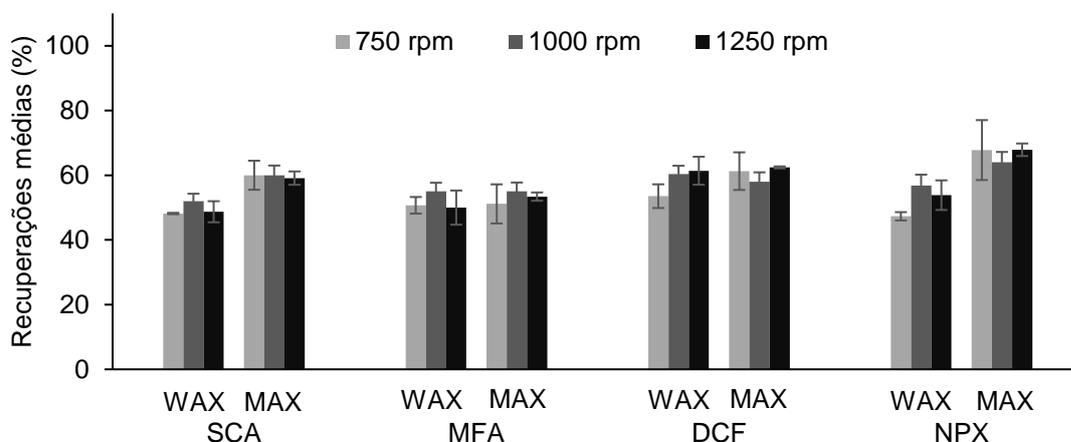


Figura 4.6 – Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 16 h, pH 5,5; retroextração, BGE (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Durante o presente estudo, foram igualmente avaliados os efeitos das características químicas da matriz na recuperação dos NSAIDs, em particular o pH, a força iônica e a polaridade. O pH é descrito como um dos parâmetros que apresenta maior influência no processo de microextração por BA μ E, uma vez as eficiências de extração podem ser condicionadas pelas formas iônicas ou neutras dos compostos alvo. Adicionalmente, as fases sorventes empregadas apresentam retenção mista (troca aniônica e de fase reversa), fazendo com que os seus fatores de retenção sejam fortemente influenciados pelo pH da matriz, *i.e.*, a pH mais baixo, as fases retêm os analitos por interações do tipo fase reversa, enquanto para pH mais elevado, ocorrem mais favoravelmente interações de troca aniônica. Por essa razão, diversos ensaios foram realizados à temperatura ambiente usando vários valores de pH da matriz (2,0, 5,5, 8,0 e 11,0). Os resultados obtidos (figura 4.7) mostram que o pH da matriz exerce uma forte influência na recuperação dos quatro analitos alvo, na qual parece haver um compromisso entre as interações do tipo fase reversa (interações π - π e hidrofóbicas) ou de troca aniônica com as formas neutra e ionizada dos quatro NSAIDs [28].

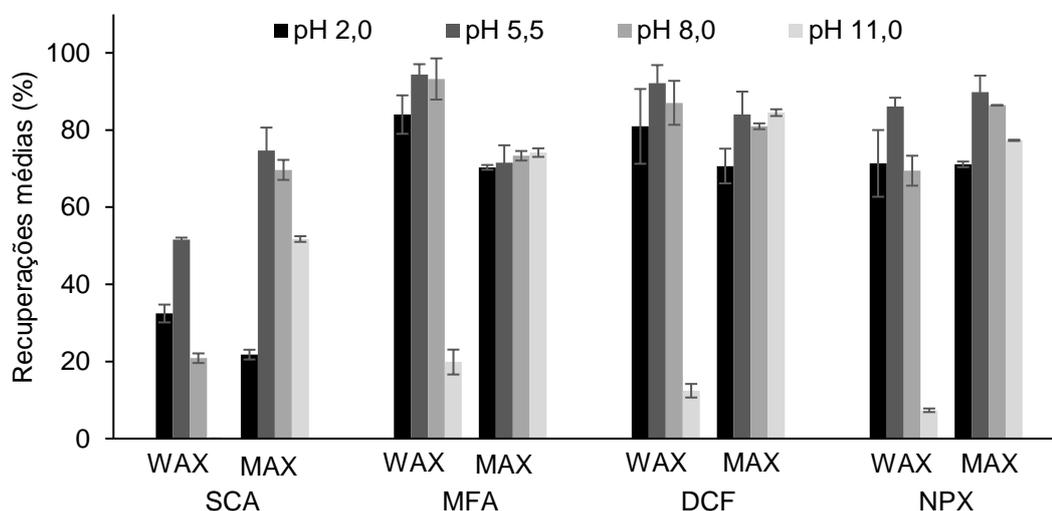


Figura 4.7 – Efeito da variação do pH da matriz na microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm); retroextração, BGE (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Os dados mostram ainda que a matriz a pH 5,5 apresenta as melhores eficiências de extração para todos os compostos em estudo. Segundo o fabricante, para este valor de pH, as fases sorventes WAX e MAX apresentam bons níveis de retenção para compostos ácidos tanto por interações do tipo fase reversa como por interações aniônicas. Por outro lado, a este valor de pH, os NSAIDs encontram-se totalmente ionizados (tabela 4.1), promovendo esse tipo de interação e, portanto, maximizando a retenção através das fases sorventes WAX e MAX.

De acordo com estudos anteriores [22,28], o efeito de “*salting-out*” consiste na diminuição da solubilidade dos analitos na matriz por forma a forçá-los para fase sorvente, podendo afetar fortemente as recuperações, especialmente para os compostos mais polares. Este fenómeno é quimicamente alcançado por adição de um eletrólito forte, que aumenta a força iónica e favorece a migração de compostos orgânicos da matriz para o material sorvente. Neste sentido, foram efetuados ensaios na qual a força iónica da matriz foi modificada através da adição de NaCl (5, 10 e 15 %; p/v). Os dados indicam que a adição progressiva de sal diminui significativamente as eficiências de extração dos analitos para ambas as fases sorventes, à exceção de MFA para a fase sorvente MAX, tal como reproduzido na figura 4.8.

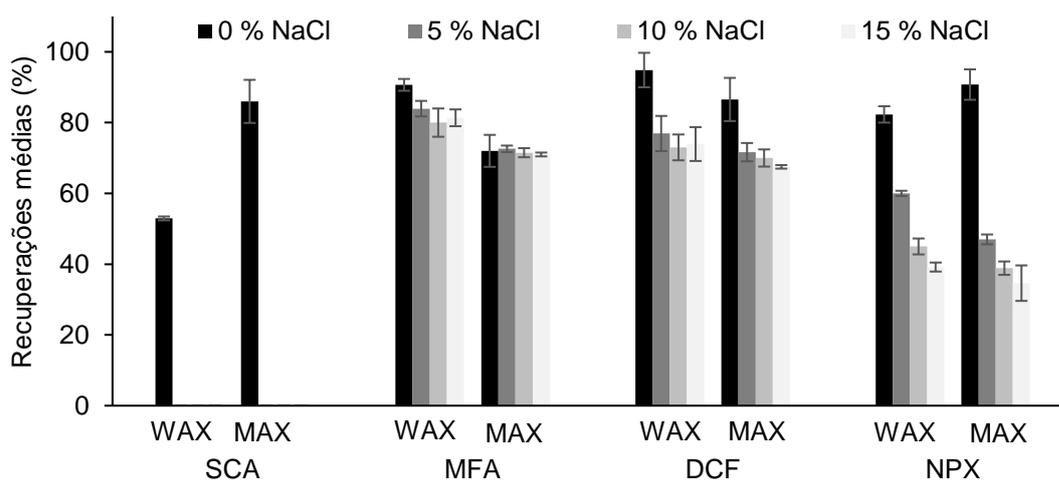


Figura 4.8 – Efeito da variação da força iónica da matriz na microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, BGE (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassónico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Os resultados obtidos permitiram verificar que SCA não foi recuperada ao ser empregado apenas 5 % de NaCl usando ambas as fases sorventes. Para os restantes NSAIDs, as eficiências de extração decresceram drasticamente com adições sucessivas de NaCl, à exceção do MFA. Estes resultados eram esperados, uma vez os compostos em estudo apresentarem características semi-polares a apolares. Adicionalmente, os resultados podem também ser condicionados pelo processo de extração das fases poliméricas testadas, uma vez estes materiais sorventes serem baseados no mecanismo de troca iônica e, portanto, a adição de íões poder competir com os locais onde ocorre o processo de microextração [28].

As eficiências de extração podem ainda ser condicionados pelo “*wall effect*”, podendo os analitos serem adsorvidos nas paredes de vidro do frasco de amostragem. Este fenómeno é mais pronunciado para os compostos apolares, como é o caso de alguns dos NSAIDs em estudo, podendo ser contornado pela modificação da polaridade da matriz por intermédio da adição de um modificador orgânico [21]. Desta forma, a polaridade da matriz foi modificada através da adição de MeOH (5, 10 e 15 %; v/v). Os resultados mostram que a adição progressiva de MeOH diminui significativamente as recuperações dos quatro NSAIDs em estudo, à exceção do MFA para ambas as fases sorventes (figura 4.9). Consequentemente, a metodologia foi otimizada na ausência de NaCl e MeOH.

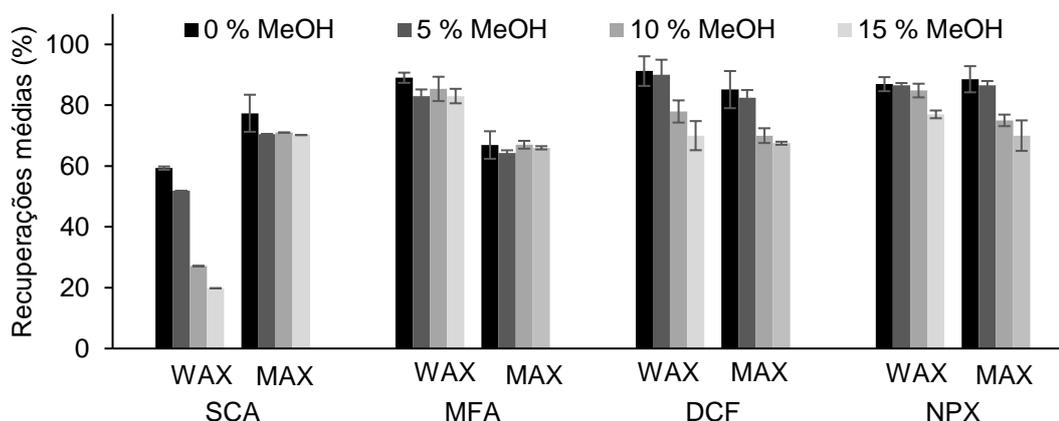


Figura 4.9 – Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX e MAX. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, BGE (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

A partir dos dados obtidos, as condições experimentais otimizadas para as fases sorventes WAX e MAX foram microextração: 16 h (1000 rpm), pH 5,5; μ LD: BGE contendo PI (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico.

4.2.2.4 Mistura de fases sorventes (P_{MIX})

Após o processo de otimização da metodologia, é possível concluir que os resultados obtidos foram satisfatórios para as recuperações dos NSAIDs em meio aquoso, usando as fases sorventes WAX e MAX para revestimento em BA μ E. Se por um lado, MAX permitiu obter melhores eficiências de extração para SCA (81,9%), por outro, WAX apresentou melhores resultados para MFA (95,0%), não se notando diferenças significativas quer para NPX como para DCF (figura 4.9, resultados para 0 % MeOH).

Por forma a maximizar as eficiências de extração dos quatro NSAIDs empregando estas duas fases poliméricas, testou-se a mistura de ambas, podendo ser combinada simultaneamente as vantagens de cada uma. Consequentemente, diversos ensaios foram realizados sob condições experimentais otimizadas usando uma mistura de fases sorventes WAX e MAX (P_{MIX}; 1/1, p/p) para revestimento de BA μ E. Os resultados obtidos são apresentados na figura 4.10, e mostram que foram obtidas eficiências de extração mais elevadas (> 85,0 %, SCA) utilizando a mistura sorvente (P_{MIX}) do que WAX ou MAX individualmente.

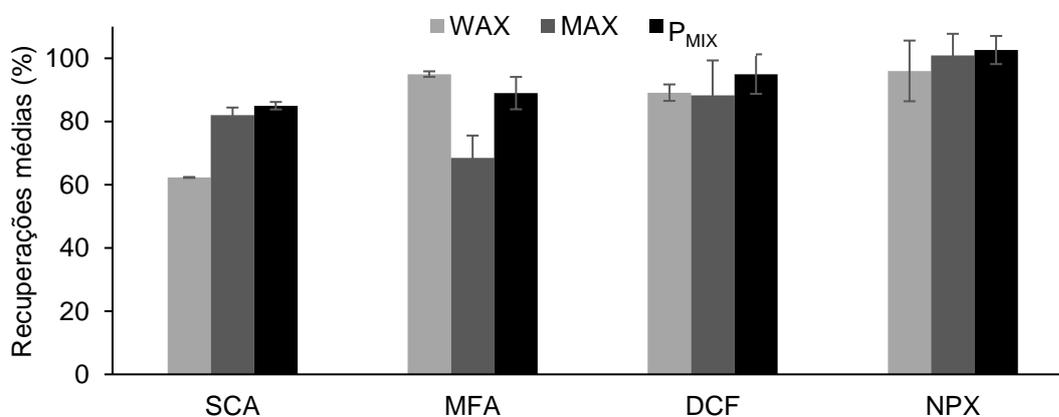


Figura 4.10 – Recuperações médias para os NSAIDs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/CE-DAD usando as fases poliméricas WAX, MAX ou P_{MIX}. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, BGE (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Esta abordagem sugere ser promissora para futuras aplicações BA μ E, uma vez existir a possibilidade de escolher uma, duas ou mais fases sorventes para cada aplicação em particular, podendo levar a maior seletividade e sensibilidade.

4.2.3 Validação do método analítico

Após a etapa de otimização, procedeu-se à validação da metodologia proposta, estando os dados resumidos na tabela 4.2. A linearidade foi determinada na gama de concentrações compreendidas entre 2,5 e 320,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, no qual foram obtidos bons valores de r^2 para os quatro NSAIDs ($> 0,9981$). Os LODs e LOQs, calculados com S/N de 3/1 e 10/1, foram de 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente. Deve ser enfatizado que os limites alcançados para estes compostos têm a mesma ordem de grandeza de outros trabalhos encontrados na literatura [29,30]. A presente metodologia foi igualmente avaliada através de ensaios de repetibilidade e precisão intermédia, calculada como RSD para cinco e nove ensaios, respetivamente. Os ensaios de precisão intermédia foram realizados como recurso a três replicados por dia em três dias consecutivos (80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Por outro lado, os ensaios de repetibilidade consistiram em cinco replicados realizadas no mesmo dia usando dois níveis de fortificação (16,0 e 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Os resultados obtidos indicam que foram alcançados bons níveis para repetibilidade, com RSDs $\leq 3,8\%$ (MFA, 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e, para precisão intermédia, com RSDs $\leq 4,4\%$ (DCF), sob condições experimentais otimizadas.

Os resultados mostram ainda que foi possível obter eficiências de extração compreendidas entre 82,6 (NPX) e 104,1 % (DCF) para os quatro NSAIDs em água ultrapura. Deve ser igualmente ressaltado que os dados obtidos apresentam maiores eficiências de extração quando comparados com outras técnicas de microextração estática baseadas em sorção como SBSE revestida com PDMS (9,8 % (NPX) - 71,3 % (MFA)) ou poliuretano (45,3 % (ácido acetilsalicílico) - 78,3 % (NPX)) [30], ou mesmo SBSE revestido com líquidos iónicos (52,7 %, NPX) [29]. A tabela 4.2 resume os LODs, LOQs e as eficiências de extração para os ensaios de repetibilidade e precisão intermédia, obtidos para os quatro NSAIDs, sob condições experimentais otimizadas.

Tabela 4.2 – Valores de LODs, LOQs, r^2 , assim como de repetibilidade e precisão intermédia expressos como RSD (%) das recuperações a diferentes valores de fortificação em água ultrapura, obtidas por BAμE(P_{MIX})-μLD/CE-DAD sob condições experimentais otimizadas.

NSAIDs	LODs (μg L ⁻¹)	LOQs (μg L ⁻¹)	r^2 *	Recuperação (%) ± RSD (%)		
				Repetibilidade		Precisão intermédia 80,0 μg L ⁻¹ (n = 9)
				16,0 μg L ⁻¹ (n = 5)	80,0 μg L ⁻¹ (n = 5)	
SCA			0,9981	85,1 ± 1,5	93,4 ± 2,1	91,7 ± 0,3
MFA	0,3	1,0	0,9986	84,4 ± 3,4	92,2 ± 3,8	98,3 ± 1,9
DCF			0,9992	87,3 ± 3,4	96,9 ± 1,9	104,1 ± 4,4
NPX			0,9989	82,6 ± 3,0	86,6 ± 0,5	91,4 ± 4,2

* Dez níveis de fortificação (de 2,5 a 320,0 μg L⁻¹)

4.2.4 Aplicação a matrizes reais

A aplicação da metodologia proposta a matrizes reais é um passo decisivo para demonstrar a respetiva capacidade analítica, uma vez as amostras reais geralmente apresentarem elevada complexidade. Desta forma, foi aplicada a metodologia proposta (BAμE(P_{MIX})-μLD/CE-DAD) para monitorizar os quatro NSAIDs em estudo em duas amostras de urina e três de água (de mar, de estuário e de rio). Para fins de quantificação e minimização do efeito matriz utilizou-se o método de adição de padrão (SAM, do inglês *Standard Addition Method*), através da fortificação das amostras reais com soluções padrão dos analitos por forma a ser obtida concentrações finais compreendidas entre 5,0 e 320,0 μg L⁻¹. Foram ainda realizados ensaios em branco, sem a adição dos mesmos. A tabela 4.3 resume os r^2 e as eficiências de extração para os quatro NSAIDs obtidos a partir das amostras analisadas.

Tabela 4.3 – Valores de r^2 e de recuperação média (R, \pm RSD, %) para os quatro NSAIDs em estudo, alcançados por SAM em amostras de água de mar, de estuário e de rio, assim como de duas amostras de urina hidrolisadas fortificadas a $80,0 \mu\text{g L}^{-1}$, obtidos por BAμE(P_{MIX})-μLD/CE-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

Amostra	NSAID				
	SCA	MFA	DCF	NPX	
Água de mar	r^2	–	0,9989	0,9998	0,9996
	R \pm RSD (%)	–	84,4 \pm 4,9	90,0 \pm 7,3	81,5 \pm 7,2
Água de estuário	r^2	0,9963	0,9991	0,9994	0,9994
	R \pm RSD (%)	10,9 \pm 4,3	91,2 \pm 3,6	83,3 \pm 4,2	82,5 \pm 7,6
Água de rio	r^2	0,9982	0,9997	0,9996	0,9990
	R \pm RSD (%)	87,0 \pm 7,6	94,1 \pm 5,8	90,8 \pm 6,4	79,6 \pm 5,1
Urina #A	r^2	0,9951	0,9968	0,9996	0,9994
	R \pm RSD (%)	77,5 \pm 5,1	–	83,3 \pm 2,8	89,4 \pm 1,7
Urina #B	r^2	0,9976	0,9961	0,9970	0,9994
	R \pm RSD (%)	–	88,2 \pm 3,7	97,8 \pm 6,5	80,7 \pm 10,8

A figura 4.11 exemplifica eletroferogramas obtidos de amostras de água ultrapura (a) e estuarina (b) fortificadas a $80,0 \mu\text{g L}^{-1}$, bem como de amostras de urina não fortificadas (c), com recurso à metodologia proposta.

Deve ser enfatizado que, embora um dos voluntários tenha consumido aspirina (ácido acetilsalicílico), este é rapidamente metabolizado no organismo para ácido salicílico. Por outro lado, fenómenos de conjugação com ácido glucurónico é bastante comum no processo de excreção [31]. Por este motivo, os ensaios efetuados nas duas amostras de urina (#A e #B) foram realizados após um passo prévio de hidrólise. As concentrações de NSAIDs obtidas das amostras de urina foram de $33,7 \pm 3,9 \text{ mg L}^{-1}$ (MFA) e $39,5 \pm 1,1 \text{ mg L}^{-1}$ (SCA), respetivamente. O primeiro caso pode ser comparado conforme descrito na literatura para jovens voluntários saudáveis que tomaram MFA ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$ [32]), embora neste caso em particular, o indivíduo tenha consumido apenas 250 mg de Ponstan e a amostra de urina tenha sido recolhida apenas 2 h após a ingestão do fármaco. Deve ser realçado que a metodologia proposta aplicada às matrizes de urina apresenta boa linearidade e r^2 superiores a 0,9991 (SCA), assim como

eficiências de extração acima de 77,4 % (SCA), conforme pode ser observado na tabela 4.3.

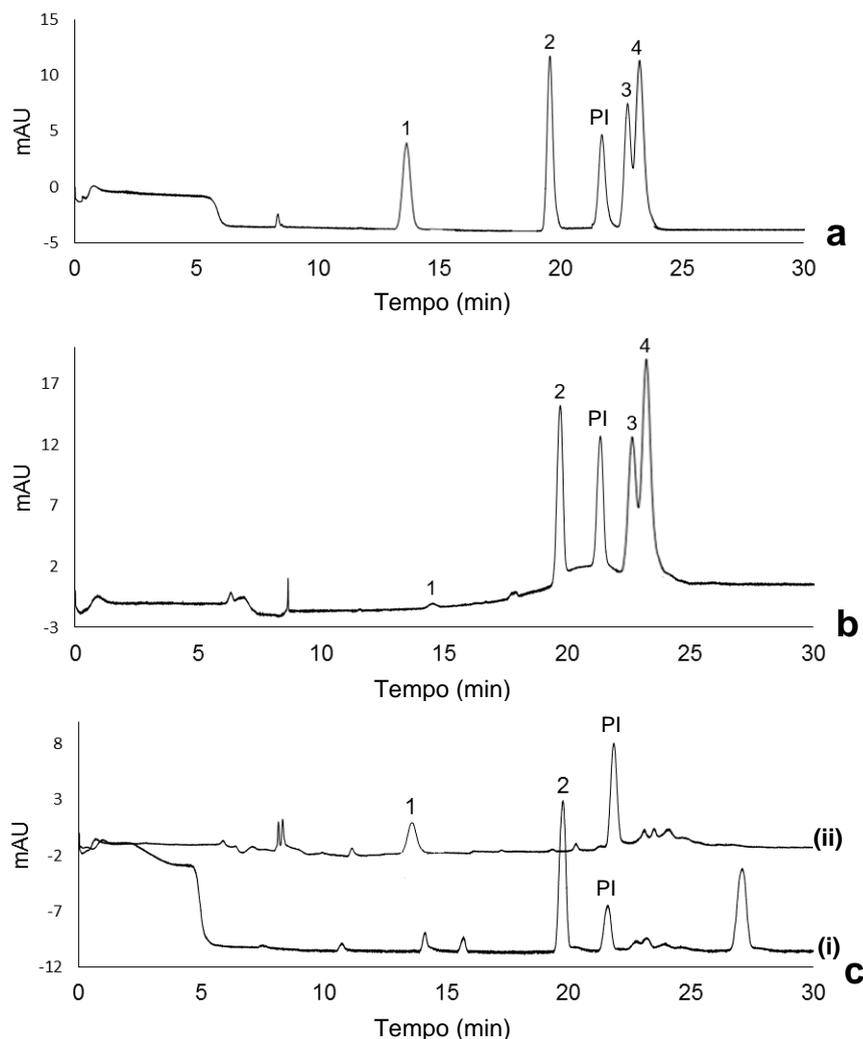


Figura 4.11 – Eletroferogramas obtidos de ensaios realizados em água ultrapura (a) e em água de estuário (b) fortificadas a 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, assim como de amostras de urina depois de hidrólise (c), realizados por BA μ E(P_{MIX})- μ LD/CE-DAD sob condições experimentais otimizadas. (i) – amostra de urina #A; (ii) – amostra de urina #B; 1 – SCA; 2 – MFA; 3 – DCF; 4 – NPX; PI – padrão interno.

Os ensaios realizados em amostras de água também revelaram boa linearidade, com r^2 superiores a 0,9982 (SCA) e recuperações acima de 79,5 % (NPX). No entanto, a sensibilidade foi significativamente comprometida para as amostras de estuário e de água do mar, principalmente para SCA, o que pode ser atribuído a efeitos de matriz (elevado teor de sal), como demonstrado a partir

dos ensaios relativos à força iônica. Embora a metodologia proposta tenha apresentado elevada sensibilidade a nível vestigial, os analitos em estudo não foram detetados (< LODs) nas matrizes de água estudadas.

4.3 Conclusões

A metodologia proposta, BA μ E(P_{MIX})- μ LD/CE-DAD foi otimizada e validada para a monitorização de quatro NSAIDs em matrizes aquosas reais. Sob condições experimentais otimizadas, o presente método apresentou excelente desempenho analítico, com boa eficiência na extração dos compostos alvo, precisão adequada, limites de deteção ao nível vestigial e uma boa gama linear. A aplicação do método a matrizes reais, nomeadamente em amostras de urina, de água de mar, de estuário e de rio, demonstrou comportamento analítico satisfatório com boa resposta em todas as amostras estudadas. Para além disso, esta nova metodologia analítica potencia aplicações futuras usando BA μ E revestido com uma combinação de mais de um material sorvente (Ps, ACs, etc.) no sentido de serem obtidas as melhores eficiências de extração, levando a maior seletividade, para uma variedade de compostos alvo em diferentes matrizes.

4.4 Referências

- [1] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, J. Chromatogr. B 1008 (2016) 115–24.
- [2] A. Pilotto, D. Sancarlo, F. Addante, C. Scarcelli, M. Franceschi, Surg. Oncol. 19 (2010) 167–172.
- [3] A. Inotai, B. Hango, A. Meszaros, Pharmacoepidemiol. Drug Saf. 19 (2010) 183–190.
- [4] M. Wehling, Eur. J. Clin. Pharmacol. 17 (2014) 1159–1172.
- [5] C. Mardones, A. Rios, M. Valcarcel, Electrophoresis 22 (2001) 484–490.
- [6] C.H. Lee, Y. Shin, M.W. Nam, K.M. Jeong, J. Lee, Talanta 129 (2014) 552–559.
- [7] F. Comeau, C. Surette, G.L. Brun, R. Losier, Sci. Total Environ. 396 (2008) 132–146.
- [8] M. Varga, J. Dobor, A. Helenkar, L. Jurecska, J. Yao, G. Zaray, Microchem. J. 95 (2010) 353–358.
- [9] C.J. Houtman, J. Kroesbergen, K. Lekkerkerker-Teunissen, J.P. van der Hoek, Sci. Total Environ. 496 (2014) 54–62.

- [10] M. Gonzalez-Rey, M.J. Bebianno, *Aquat. Toxicol.* 148 (2014) 221–230.
- [11] S.D. Richardson, T.A. Ternes, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2813–2848.
- [12] Y.-L. Kuo, W.-L. Liu, S.-H. Hsieh, H.-Y. Huang, *Anal. Sci.* 26 (2010) 703–707.
- [13] T. Kosjek, E. Heath, A. Krbavcic, *Environ. Int.* 31 (2005) 679–85.
- [14] G.G. Noche, M.E.F. Laespada, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, S.M. Lorenzo, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9390–6.
- [15] A.I. Olives, V. Gonzalez-Ruiz, M.A. Martin, *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* 11 (2012) 65–95.
- [16] E. Dubreil-Cheneau, Y. Pirotais, M. Bessiral, B. Roudaut, E. Verdon, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6292–6301.
- [17] A. Macia, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Trac - Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 133–153.
- [18] A. Macia, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrophoresis* 24 (2003) 2779–2787.
- [19] K.D. Altria, S.M. Bryant, T.A. Hadgett, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1091–1101.
- [20] N.R. Neng, A.R. Silva, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7303–7310.
- [21] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. B* 969C (2014) 35–41.
- [22] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 120 (2014) 126–134.
- [23] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1348 (2014) 17–26.
- [24] A.S. Mestre, J. Pires, J.M.F. Nogueira, J.B. Parra, A.P. Carvalho, C.O. Ania, *Bioresour Technol.* 100 (2009) 1720–1726.
- [25] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Anal Bioanal Chem.* 402 (2012) 1355–1364.
- [26] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1265 (2012) 7–16.
- [27] J.M.F. Nogueira, *Anal. Chim. Acta.* 757 (2012) 1–10.
- [28] N.R. Neng, R.C. Sequeiros, J.M.F. Nogueira, *Electrophoresis* (2014).
- [29] W. Fan, X. Mao, M. He, B. Chen, B. Hu, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 7261–7273.
- [30] A.R.M. Silva, F.C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A.* 1209 (2008) 10–16.
- [31] J.E. Rice, *Organic Chemistry Concepts and Applications for Medicinal Chemistry* (2014) Amerterdão, Elsevier.
- [32] T. Madrakian, E. Haghshenas, M. Ahmadi, A. Afkhami, *Biosens. Bioelectron.* 68 (2015) 712–718.

Capítulo 5

Aplicação da BA μ E(Strata-X)- μ LD/HPLC-DAD para a Determinação de Micropoluentes Orgânicos em Matrizes Ambientais Aquosas

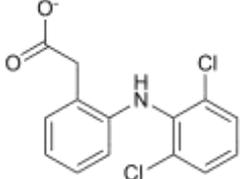
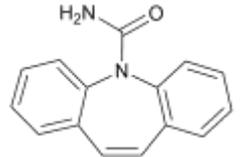
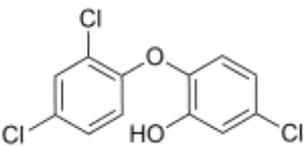
S. M. Ahmad, A. H. Ide, N. R. Neng, J. M. F. Nogueira, Application of bar adsorptive microextraction to determine trace organic micropollutants in environmental water matrices, International Journal of Environmental Analytical Chemistry 97:5 (2017) 484–498 [1]

5.1 Considerações gerais

Os micropoluentes orgânicos, como os PPCPs, podem ter efeitos agudos ou crônicos na vida selvagem e na saúde humana, mesmo quando a presença destas substâncias no ambiente ocorra ao nível dos traços ($\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}) [2]. Estes compostos incluem produtos farmacêuticos consumidos pelos humanos, assim como em contexto veterinário ou agrícola, podendo também fazer parte das formulações de produtos de higiene e cuidado pessoal [3]. Os produtos farmacêuticos são compostos biologicamente ativos que são normalmente solúveis em água, podendo ser encontrados frequentemente em águas residuais e naturais, incluindo águas subterrâneas, fluviais, marítimas e superficiais [4–6]. Os PPCPs abrangem múltiplas classes de compostos, incluindo reguladores lipídicos, antibacterianos/antifúngicos, agentes bloqueadores β -adrenérgicos, analgésicos e tranquilizantes, hormonas, antisséticos, entre outros [7]. A preocupação com os possíveis efeitos tóxicos destes compostos é refletida nas decisões do Parlamento Europeu no domínio da política da água. Esta instituição adicionou recentemente diversas classes de compostos farmacêuticos, incluindo 17α -etinilestradiol e 17β -estradiol, à lista de substâncias a monitorizar a nível da UE [8].

Neste contexto, o presente estudo visa avaliar o desempenho da técnica BA μ E, seguido por microdessorção líquida (μ LD) e análise por HPLC-DAD para monitorizar níveis vestigiais de cinco micropoluentes orgânicos (diclofenac, DCF; 17α -etinilestradiol, EE2; 17β -estradiol, E2; carbamazepina, CMZ; e triclosan, TCS) em matrizes aquosas ambientais. A tabela 5.1 apresenta as estruturas químicas, bem como os $\log K_{OW}$ e os $\text{p}K_a$ destes compostos. É discutida a otimização de diversos parâmetros experimentais no processo analítico, para além da validação e aplicação da metodologia otimizada a matrizes ambientais.

Tabela 5.1 – Estruturas químicas, log K_{OW} e p K_a dos micropoluentes orgânicos estudados.

Micropoluente orgânico	Estrutura química	Log K_{OW}	p K_a
DCF		4,26	4,00
CMZ		2,77	15,96
EE2		3,90	10,33
E2		3,75	10,33
TCS		4,98	7,68

Software específico foi usado para estimar as propriedades físico-químicas, assim como a estrutura das moléculas: Marvin 6.2.2, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Otimização instrumental

As condições para a análise por HPLC-DAD foram avaliadas tendo em conta os dados espectrais do UV/Vis para a deteção de cada analito, bem como as características do tempo de retenção e resolução, de acordo com trabalhos previamente publicados [9–11]. Neste sentido, foi selecionado o comprimento de onda de 280 nm, uma vez maximizar o S/N de todos os compostos. Por forma a obter as melhores condições cromatográficas, foi manipulado o gradiente de eluição, a temperatura da coluna e o volume de injeção, resultando num tempo analítico adequado (< 17 min). Uma vez a resolução completa de EE2 e E2 não ter sido alcançada sob as condições instrumentais otimizadas, resolveu-se

recorrer à altura dos picos ao invés das áreas para fins de quantificação. A calibração instrumental foi efetuada através da injeção de soluções padrão com concentrações compreendidas entre 30,0 e 2500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (dez níveis), tendo sido possível obter $r^2 \geq 0,9952$ (DCF) para os compostos alvo. Os LODs e LOQs alcançados foram de 1,0-8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 3,3-27,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, para os cinco micropoluentes orgânicos em estudo. A precisão instrumental foi avaliada por injeção de uma mistura padrão ($n = 6$, 1,0 mg L^{-1}), resultando em RSD inferiores a 5,3 % (CMZ).

5.2.2 Otimização do método analítico

Após o estabelecimento dos parâmetros instrumentais, prosseguiu-se com a otimização do processo de microextração e de retroextração empregando uma estratégia de otimização univariada e usando água ultrapura fortificada (8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Os parâmetros otimizados incluíram a seletividade do sorvente, o tempo de equilíbrio, a velocidade de agitação e as propriedades da matriz (pH, polaridade e força iônica), bem como o solvente para μ LD e o tempo de sonicação, de acordo com trabalhos anteriores [9–13].

5.2.2.1 Seleção da fase sorvente

No presente estudo, testaram-se três fases sorventes para BA μ E, por forma a alcançar boas eficiências de extração para os analito alvo. Neste sentido, um AC (CN1) e dois polímeros (Strata-X e LiChrolut EN) foram testadas, sob condições padrão: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5, μ LD: MeOH (200 μL), 30 min sob tratamento ultrassônico [9].

De acordo com a figura 5.1, as melhores eficiências de extração foram obtidas pelas duas fases poliméricas (≥ 40 %, DCF). Este resultado foi esperado, uma vez que ambas combinam elevadas áreas superficiais ($\geq 800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) com a possibilidade de ocorrência de interações de tipo fase reversa. Neste caso em particular, parece ocorrer principalmente interações hidrofóbicas ou π - π , uma vez

todos os compostos alvo terem pelo menos um anel aromático na respetiva estrutura química (tabela 5.1).

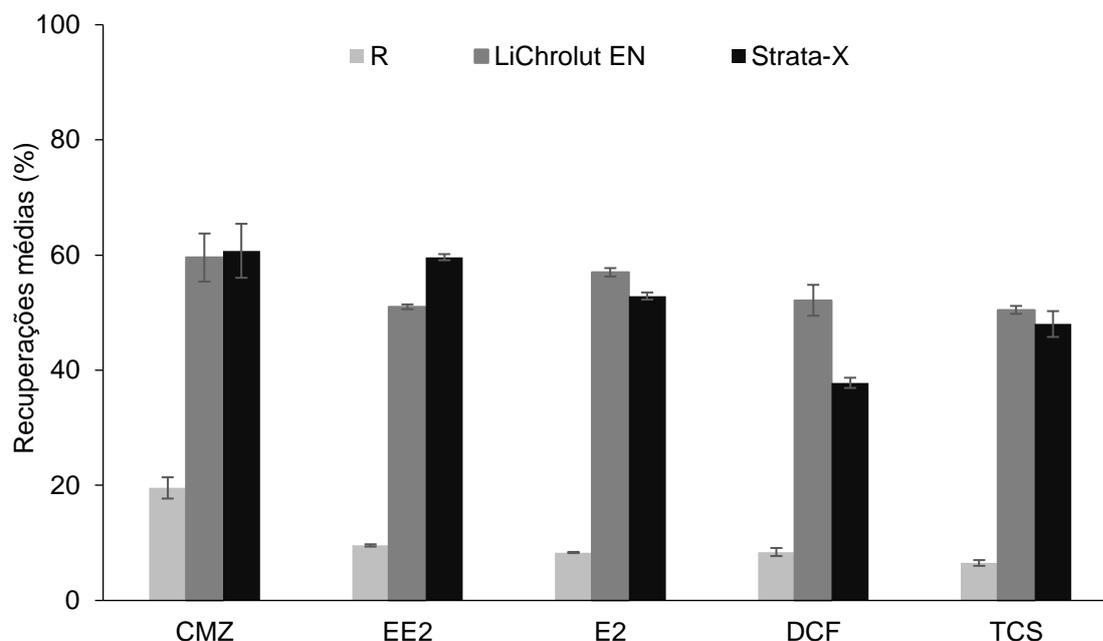


Figura 5.1 – Efeito da seletividade de vários sorventes para a microextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassónico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Por forma a escolher a melhor fase polimérica para a microextração dos cinco compostos em meio aquoso, foram realizados ensaios em triplicado usando condições experimentais similares às descritas anteriormente, mas usando 16 h de tempo de microextração, por forma a ter em conta a cinética envolvida. Os dados mostram (figura 5.2) que o polímero Strata-X apresentou maiores valores de recuperações que LiChrolut EN. Este resultado era esperado uma vez esta fase sorvente permitir, para além do descrito anteriormente, interações do tipo dipolo-dipolo ou por pontes de hidrogénio, sendo mais indicado para compostos com alguma polaridade, como é o caso dos analitos em estudo ($2,77 < \log K_{OW} < 4,98$; tabela 5.1). Uma vez o Strata-X ter exibido maiores recuperações médias ($> 71,5$ %, TCS), quando comparado com o outro polímero (LiChrolut EN), foi escolhido como fase de revestimento de BA μ E para ensaios posteriores.

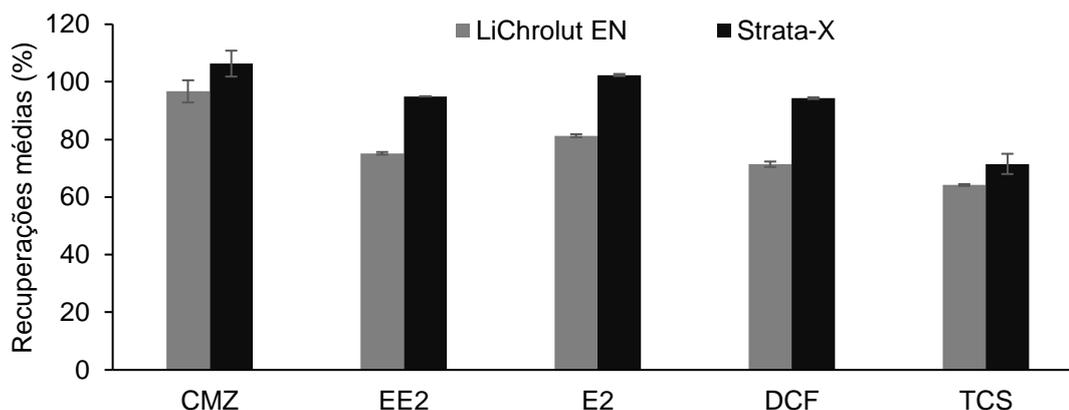


Figura 5.2 – Efeito da seletividade das duas fases poliméricas empregues neste estudo para a microextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

5.2.2.2 Etapa de retroextração

Depois de selecionado Strata-X como o sorvente mais adequado para microextrair os analitos alvo em meio aquoso, o desenvolvimento do método analítico prosseguiu com a otimização do tempo e o solvente para μ LD, similarmente ao descrito no capítulo anterior. Foram testados os solventes (200 μ L) MeOH, ACN e uma mistura de ambos (1/1, v/v; Mix) e tempos de sonicação de 15, 30, 45 e 60 min. Os dados obtidos mostram que MeOH (figura 5.3) empregado com um tempo de retroextração de 30 min (figura 5.4) permitiu obter melhores eficiências de extração.

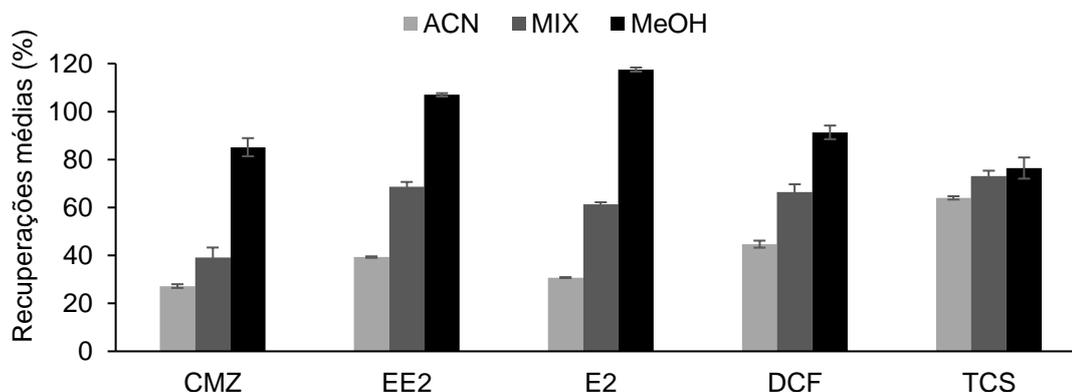


Figura 5.3 – Efeito da variação do solvente na retroextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 200 μ L, 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

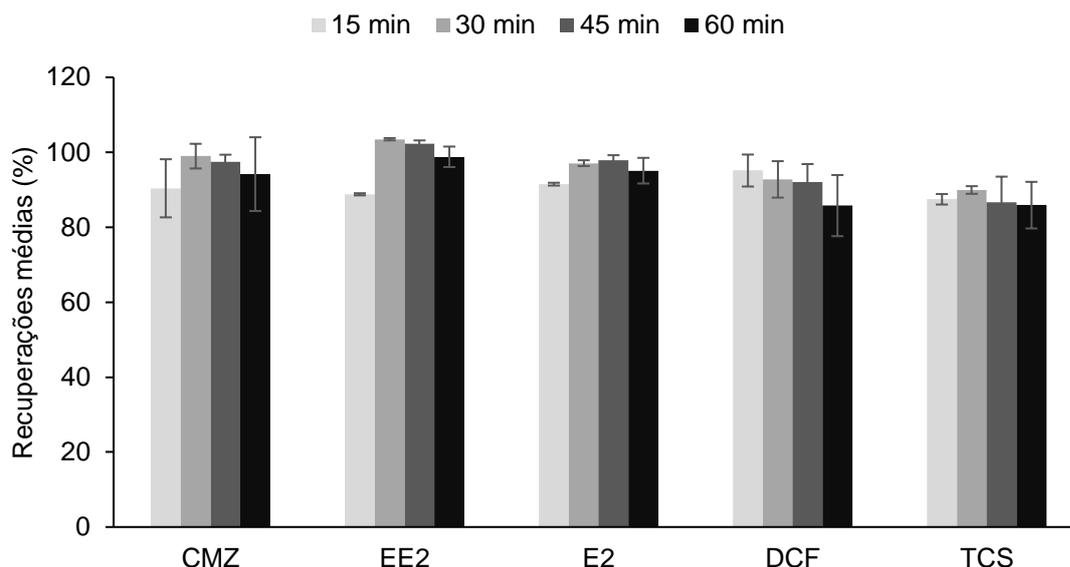


Figura 5.4 – Efeito da variação do tempo na retroextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

5.2.2.3 Etapa de microextração

Depois de otimizada a etapa de retroextração, prosseguiu-se o desenvolvimento analítico com o estudo da etapa de microextração, incluindo parâmetros como a velocidade e o tempo de equilíbrio, assim como das características da matriz (pH, polaridade e força iônica), no enriquecimento dos micropoluentes orgânicos em meio aquoso. Neste contexto, foram realizados diversos ensaios com BA μ E(Strata-X) empregando entre 1 e 16 h de tempo de equilíbrio, com velocidade de agitação entre 750 e 1250 rpm. De acordo com a figura 5.5, um tempo de microextração de 16 horas parece ser a melhor escolha para maximizar a recuperação dos cinco analitos alvo usando a fase sorvente Strata-X. Embora se tenha obtido uma cinética de extração lenta, foi decidido fixar este parâmetro (16 h) para ensaios posteriores, uma vez a técnica BA μ E poder ser empregada *overnight* sem quaisquer requisitos especiais.

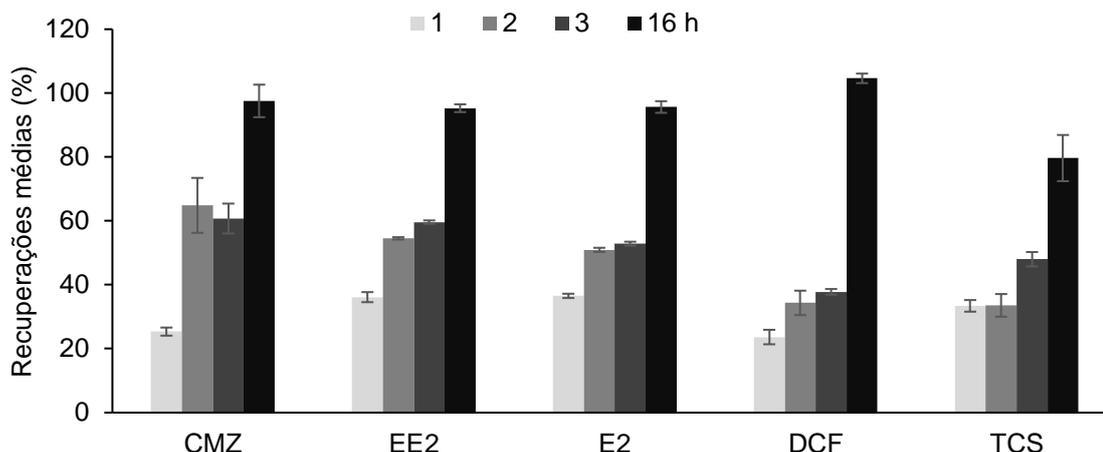


Figura 5.5 – Efeito da variação do tempo de microextração no enriquecimento dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Os resultados para a velocidade de agitação mostram que as recuperações dos cinco micropoluentes orgânicos não divergiram substancialmente usando 750 a 1250 rpm (figura 5.6). Assim, 1000 rpm foi selecionado para ensaios posteriores, uma vez permitir um posicionamento mais estável do dispositivo de microextração sob o vórtex formado durante o processo de amostragem por flutuação.

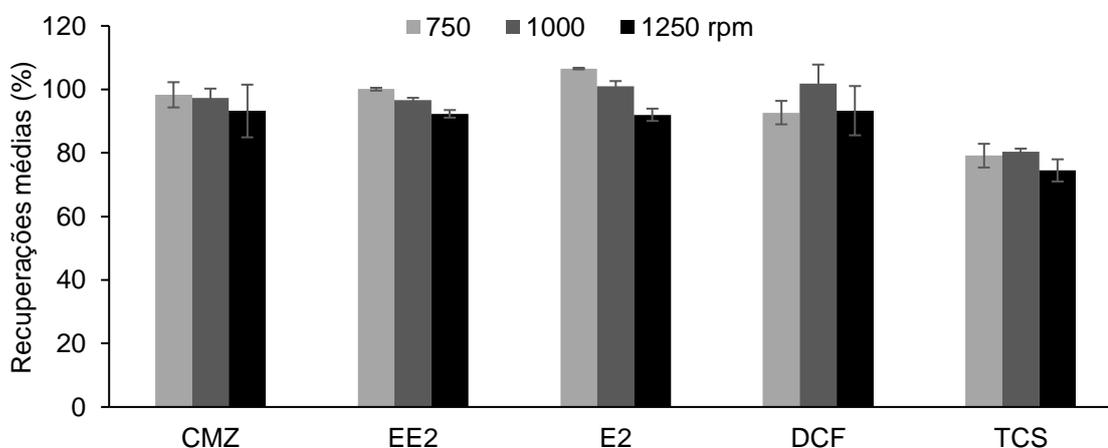


Figura 5.6 – Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h, pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Durante o desenvolvimento do método as características químicas da matriz foram igualmente avaliadas, em particular o pH, a força iônica e a polaridade. Neste sentido, foi avaliada a influência do pH da matriz (pH 2,0, 5,5, 8,0 e 11,0) na eficiência de BA μ E(Strata-X) para a microextração dos analitos em estudo. Os resultados obtidos (figura 5.7) demonstram que o pH da matriz não apresenta forte influência na recuperação dos cinco micropoluentes orgânicos, à exceção do DCF. Para valores de pH mais elevados (> 5,5), os dados mostram que as recuperações diminuem para este composto em particular. Esse resultado seria esperado, uma vez o DCF se tornar totalmente ionizado a pH 6,0, podendo minimizar as interações do tipo fase reversa com a fase sorvente. Quanto aos restantes compostos, o pH da matriz não afeta ou apenas diminui ligeiramente a eficiência de extração a pH 11,0, o que era previsível, uma vez estes quatro compostos só se ionizam para valores de pH mais elevados (à exceção do TCS). O resultado para o TCS foi inesperado, uma vez ser previsível a diminuição da recuperação para pH 8,0 e 11,0, pois encontra-se ionizado a esses valores (tabela 5.1). Contudo, a presença de dois anéis aromáticos parece atenuar esse fenómeno, permitindo uma boa retenção por interações de tipo fase reversa. Assim, a matriz a pH 5,5 sugere melhores desempenhos na eficiência de extração, sendo escolhida para estudos posteriores.

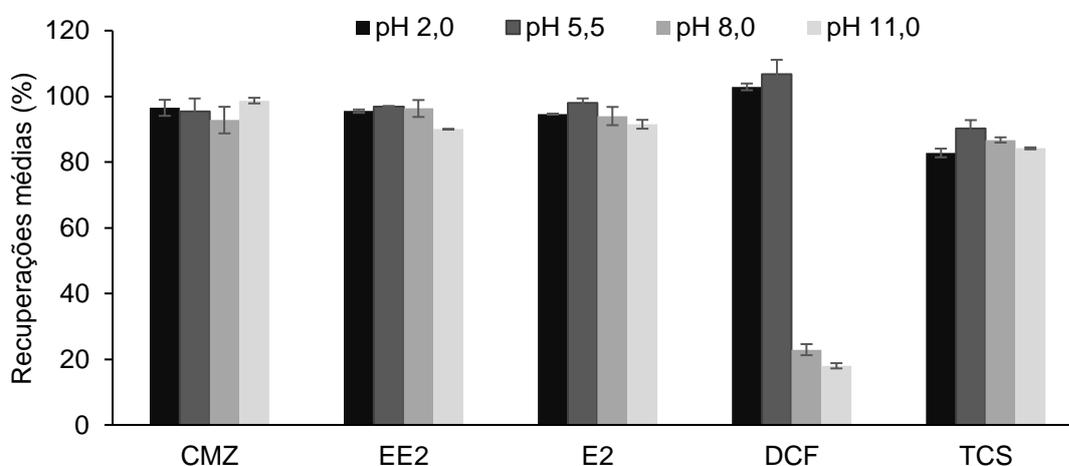


Figura 5.7 – Efeito da variação do pH da matriz na microextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm); retroextração, MeOH (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Conforme descrito anteriormente, decidi avaliar-se a força iônica e a polaridade da matriz na recuperação dos cinco micropoluentes orgânicos em meios aquoso por BA μ E(Strata-X). Neste sentido, foi adicionado NaCl (5, 10 e 15 %, p/v) e MeOH (5, 10 e 15 %, v/v) à matriz. Os resultados mostram que tanto a adição de sal (figura 5.8) como do solvente orgânico (figura 5.9) levam à diminuição do enriquecimento dos analito alvo em meio aquoso. Como consequência, a metodologia foi otimizada na ausência de NaCl e de MeOH.

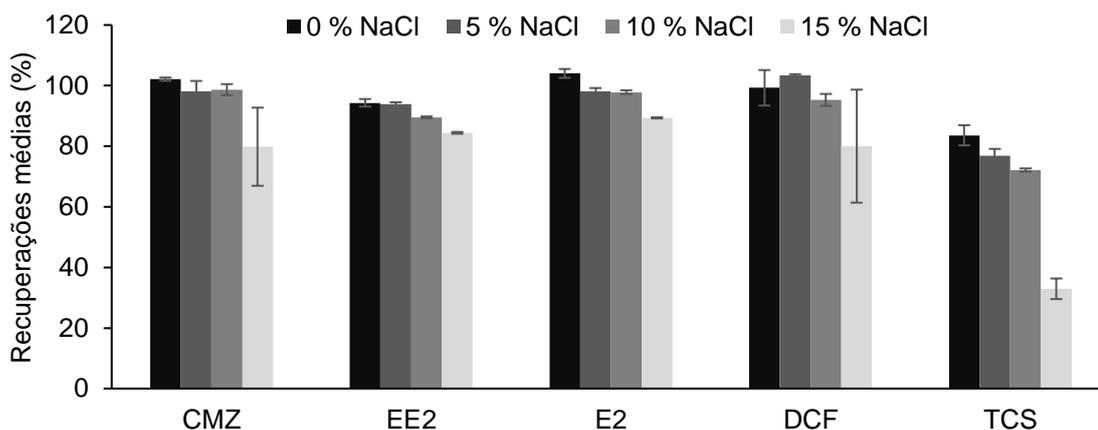


Figura 5.8 – Efeito da variação da adição de sal na matriz para a microextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

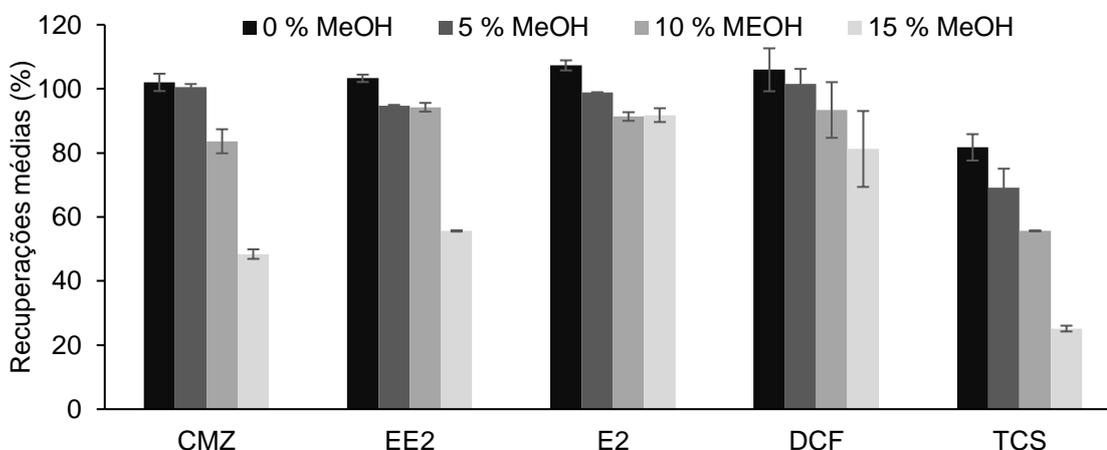


Figura 5.9 – Efeito da variação da adição de modificador orgânico na matriz para a microextração dos micropoluentes orgânicos alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (200 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

5.2.3 Validação do método analítico

Após a etapa de otimização, procedeu-se à validação da metodologia proposta. A tabela 5.2 resume os dados da validação da metodologia desenvolvida. A linearidade foi determinada na gama de concentrações compreendida entre 0,1 e 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, na qual foram obtidos bons valores de r^2 ($> 0,9909$) para os cinco micropoluentes orgânicos. Os LODs e LOQs foram calculados com S/N de 3/1 e 10/1, tendo sido de 0,02-0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,05-0,33 $\mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente. A presente metodologia foi ainda avaliada através de ensaios de repetibilidade e precisão intermédia, e calculada como RSD para cinco e nove ensaios, respetivamente. Os ensaios de precisão intermédia foram realizados com recurso a três replicados por dia em três dias consecutivos (8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Por outro lado, os ensaios de repetibilidade consistiram em cinco replicados realizadas no mesmo dia usando o mesmo valor de fortificação. Os resultados indicaram que foram alcançados bons níveis de repetibilidade, com RSDs iguais ou inferiores a 8,0 % (TCS), e para precisão intermédia, com RSDs iguais ou inferiores a 5,9 % (DCF), sob condições experimentais otimizadas.

Tabela 5.2 – Valores de LODs, LOQs, r^2 , assim como de repetibilidade e precisão intermédia expressos como RSD (%) das recuperações obtidas por BA μ E(Strata-X)- μ LD/HPLC-DAD sob condições experimentais otimizadas a diferentes valores de fortificação em água ultrapura.

Micropoluente orgânico	LODs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Recuperação (%) \pm RSD (%)	
				Repetibilidade ($n = 6$)	Precisão intermédia ($n = 18$)
CMZ	0,02	0,05	0,9951 ^a	102,4 \pm 0,8	99,9 \pm 2,7
EE2	0,10	0,33	0,9909 ^c	85,1 \pm 5,3	94,9 \pm 4,4
E2	0,10	0,33	0,9980 ^c	90,3 \pm 1,8	99,1 \pm 5,3
DCF	0,02	0,05	0,9940 ^a	87,4 \pm 3,6	100,8 \pm 5,9
TCS	0,03	0,10	0,9984 ^b	74,5 \pm 8,0	81,9 \pm 4,9

^a Dez níveis de fortificação (de 0,1 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$)

^b Dez níveis de fortificação (de 0,2 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$)

^c Dez níveis de fortificação (de 0,4 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$)

5.2.4 Comparação com outras técnicas de microextração

O desempenho da metodologia proposta foi comparada com outras técnicas de microextração estática já publicadas, com especial ênfase na sensibilidade (LODs) e nas recuperações, como apresentado na tabela 5.3. Conforme pode ser observado, a metodologia proposta revelou níveis de recuperação muito superiores quando comparada a outras técnicas de microextração estática, nomeadamente SBSE revestida com diferentes fases sorventes. Deve igualmente ser enfatizado que a metodologia proposta utiliza 5 a 25 menos solvente orgânico durante a fase de retroextração que outras técnicas de microextração estática indicadas na literatura [14–18]. Em relação aos LODs, é possível observar maior sensibilidade quando comparadas com técnicas que empregaram sistemas instrumentais similares, *i.e.*, HF-LPME ou SPME revestido com butil-metacrilato (BMA) [14,19] em combinação com DAD. Por outro lado, a presente metodologia permitiu obter LODs mais elevados para TCS do que SBSE revestido com polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), etilenoglicol (EG) [15] ou polímeros hidrofílicos baseados em poli(*N*-vinilpirrolidona)-co-divinilbenzeno (NVP-co-DVB) [16], bem como tubo de polietersulfona (PES) [20] e SPME revestido com PDMS [21]. No entanto, estas abordagens empregaram sistemas MS/MS, que são genericamente mais sensíveis e seletivas que DAD. Mesmo assim, os LODs alcançados pelo método proposto são menores que a maioria das outras técnicas baseadas em microextração, combinadas com sistemas instrumentais MS/MS, incluindo SBSE revestido com PDMS [15,22], PA ou EG [15].

Deve ainda ser enfatizado que foram obtidos resultados similares a outros trabalhos que aplicaram a técnica BA μ E em compostos similares, mas usando outras fases sorventes e/ou sistemas instrumentais. Por exemplo, TCS e CMZ estudados por BA μ E(PS-DVB ou AC) seguida de análise por GC-MS [23], e DCF enriquecido por BA μ E(MAX/WAX) seguida de análise por CE-DAD [24], apresentaram LODs e/ou recuperações similares. Por outro lado, para E2 e EE2, os dados obtidos revelam diferenças negligenciáveis quando comparados com outro trabalho já publicado empregando BA μ E para a análise de hormonas esteroides [25]. Estes resultados demonstram a notável robustez e reprodutibilidade da metodologia proposta.

Tabela 5.3 – Comparação dos LODs e recuperações obtidas para os cinco micropoluentes orgânicos em estudo com outras técnicas de microextração estática.

Micropolvente orgânico	Técnica de microextração estática	Sistema instrumental	Recuperação (%)	LOD (ng L ⁻¹)	Refs.
CMZ	SBSE(PDMS, PA ou EG)	LC-MS/MS	< 1,0	–	[15]
	SBSE(VPD-co-DVB)		83,0	10,0	[16]
	BA μ E(LiChrolut EN)	GC-MS	83,3	5,0	[23]
	BA μ E(R)		82,8	5,0	
	BA μ E(Strata-X)	HPLC-DAD	102,4	15,0	Este estudo
EE2	SBSE(PDMS)	LDTD/APCI-MS/MS	~ 40,0	2800,0	[22]
	PES tube	LC-MS/MS	31,0	1,0	[26]
	SPME(PDMS)		86,6	10,5	[21]
	HF-LPME		31,4	550,0	[19]
	BA μ E(Strata-X)	HPLC-DAD	98,0	70,0	[25]
	BA μ E(Strata-X)		94,9	100,0	Este estudo
E2	SBSE(PDMS)	LDTD/APCI-MS/MS	~ 30,0	2600,0	[22]
	SBSE(PES)	LC-MS/MS	38	14,0	[26]
	SPME(PDMS)		94,8	7,4	[21]
	HF-LPME		40,6	660,0	[19]
	BA μ E(Strata-X)	HPLC-DAD	98,0	50,0	[25]
	BA μ E(Strata-X)		99,1	100,0	Este estudo
DCF	SBSE(PDMS, PA ou EG)	LC-MS/MS	< 1,0	–	[15]
	SBSE(VPD-co-DVB)		80,0	10,0	[16]
	SPME(BMA)	CEC-DAD	98,7	15500	[14]
	BA μ E(MAX/WAX)	CE-DAD	104,1	300,0	[24]
	BA μ E(Strata-X)	HPLC-DAD	100,8	15,0	Este estudo
TCS	SBSE(PDMS, PA ou EG)	LC-MS/MS	40,0 - 80,0	5,0-10,0	[15]
	SBSE(VPD-co-DVB)		80,0	10,0	[16]
	BA μ E(LiChrolut EN)	GC-MS	97,3	5,0	[23]
	BA μ E(R)		73,6	10,0	
	BA μ E(Strata-X)	HPLC-DAD	81,9	30,0	Este estudo

LDTD/APCI-MS/MS, desorção térmica por laser de diodo/ionização química por pressão atmosférica acoplada à espectrometria de massa em *Tandem* (do inglês diode laser diode thermal desorption/atmospheric pressure chemical ionization coupled to tandem mass spectrometry); CEC-UV, electrocromatografia capilar-detetor de ultravioleta (do inglês capillary electrochromatography-ultra-violet detector)

Por último, apesar da decisão da UE 2018/840 [8] estabelecer LODs mais baixos que a metodologia proposta, particularmente para EE2 e E2, esta pode ainda ser empregue para monitorizar níveis vestigiais desses micropoluentes

orgânicos se combinada com sistemas MS ou MS/MS (*i.e.*, LC-MS ou LC-MS/MS). Por outro lado, a mesma decisão indica a utilização de volumes de amostra muito superiores para a análise destes compostos, em particular para EE2 (“SPE de grandes volumes”, que pode ir até 500 ou 1000 mL), quando comparado com a metodologia proposta (25 mL). Para além disso, o método desenvolvido está em conformidade com os LODs e LOQs especificados no método USEPA 1694 para a análise de TCS em água e outras matrizes ambientais; *i.e.*, 92 e 200 ng L⁻¹ para o LOD e o LOQ, respetivamente [27].

5.2.5 Aplicação a matrizes reais

Por forma a avaliar a aplicabilidade da metodologia proposta a matrizes reais, diversos ensaios foram realizados em amostras de água do mar, de lago, de um poço e de rio, através da metodologia SAM, conforme avançado no capítulo anterior. Num primeiro passo, as matrizes de água foram fortificadas com quatro padrões de trabalho por forma a obter concentrações de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os cinco micropoluentes em estudo. Ensaios sem fortificação foram igualmente realizados. Os resultados mostraram que foram alcançadas boas linearidades, com $r^2 > 0,9935$ (EE2; água de poço). A figura 5.10 exemplifica cromatogramas obtidos por BA μ E(Strata-X)- μ LD/HPLC-DAD a partir de ensaios realizados em amostras de água ultrapura (a), de lago (b) e de rio (c), enriquecidas com 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, sob otimização condições experimentais, nas quais é observado bom desempenho analítico. Embora a metodologia proposta tenha apresentado boa sensibilidade a nível vestigial e apesar de ser observada alguma complexidade para as amostras reais, os analitos em estudo não foram detetados nas matrizes de água avaliadas (< LODs). Contudo, deve ser realçado que a ocorrência destes compostos é comum em ambientes afetados por atividades antropogénicas, especialmente em áreas urbanas onde as populações humanas se concentram [2]. Por último, deve ser referido que os micropoluentes orgânicos estudados foram detetados em diversas matrizes de água ambiental acima dos LODs estabelecidos pela presente metodologia um pouco por todo o mundo. Por exemplo, CMZ, TCS e DCF foram detetados em

diversos rios da China [28], TCS em alguns rios de Espanha [29], CMZ e DCF em várias águas superficiais e subterrâneas localizadas em Itália [30] e muitas classes de hormonas esteroides (incluindo EE2 e E2) em águas de rios em Espanha e no Japão [20].

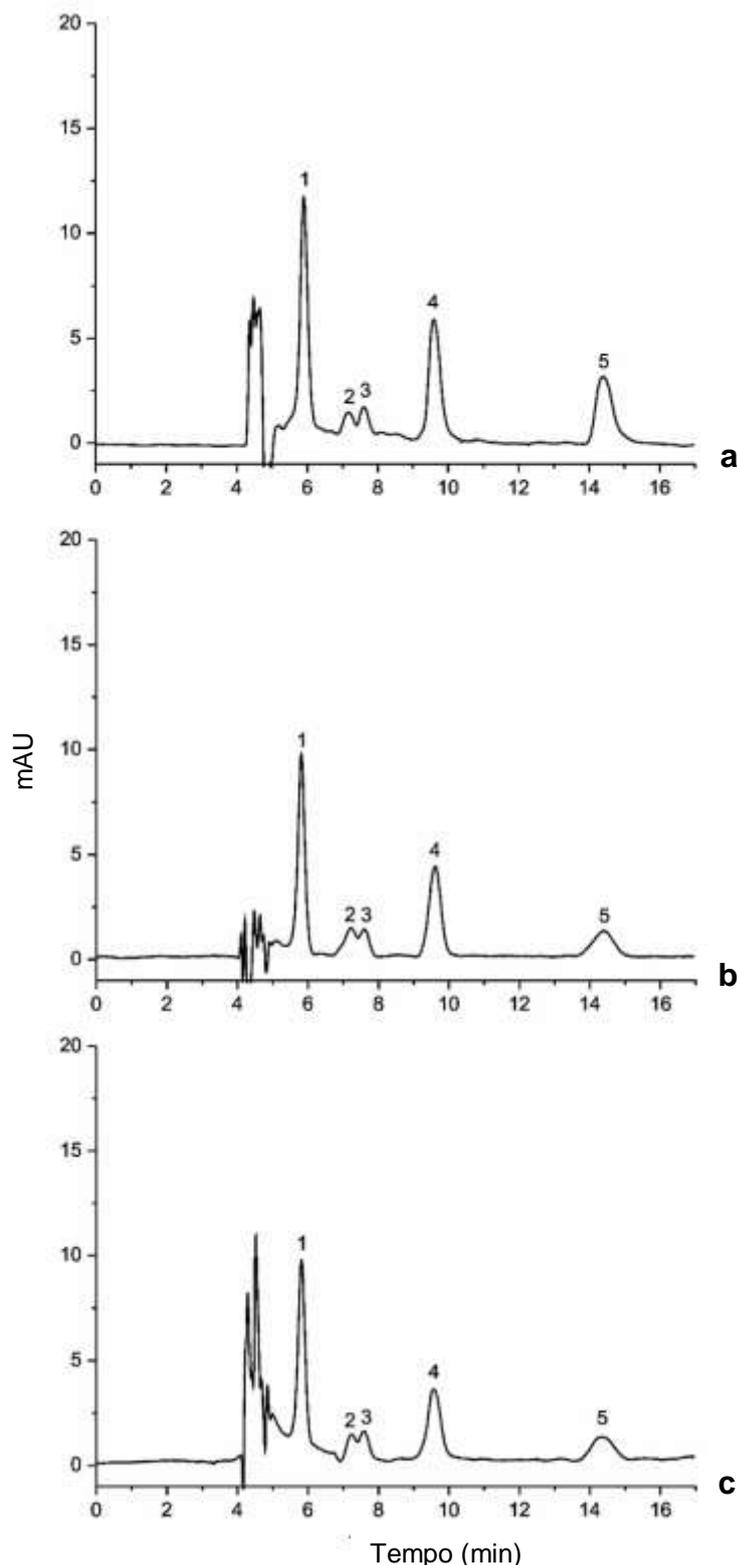


Figura 5.10 – Cromatogramas obtidos de ensaios realizados em água ultrapura (a), de mar (b) e de rio (c) fortificadas a 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, realizados por BA μ E(Strata-X)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. 1 – CMZ; 2 – EE2; 3 – E2; 4 – DCF; 5 – TCS.

5.3 Conclusões

A metodologia proposta, BA μ E(Strata-X)- μ LD/HPLC-DAD foi otimizada e validada para a determinação de cinco micropoluentes orgânicos em amostras de água do mar, de lago, de poço e de rio. Sob condições experimentais otimizadas, o presente método apresentou bom desempenho analítico, nomeadamente em termos de recuperações média, de sensibilidade e de linearidade. É possível constatar que a presente metodologia se revela uma boa alternativa a outras bem estabelecidas para a análise de micropoluentes em matrizes aquosas.

5.4 Referências

- [1] S.M. Ahmad, A.H. Ide, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 97 (2017) 484–498.
- [2] S.D. Richardson, T.A. Ternes, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2813–2848.
- [3] D.Q. Zhang, R.M. Gersberg, W.J. Ng, S.K. Tan, *Env. Pollut.* 184 (2014) 620–639.
- [4] W.C. Li, *Env. Pollut.* 187 (2014) 193–201.
- [5] W. Mnif, A.I. Hassine, A. Bouaziz, A. Bartegi, O. Thomas, B. Roig, *Int. J. Env. Res. Public Heal* 8 (2011) 2265–2303.
- [6] A.B. Caracciolo, E. Topp, P. Grenni, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 106 (2015) 25–36.
- [7] J.Q. Jiang, Z. Zhou, V.K. Sharma, *Microchem. J.* 110 (2013) 292–300.
- [8] Decisão de execução (UE) 2018/840 da Comissão de 5 de junho de 2018.
- [9] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. B* 969C (2014) 35–41.
- [10] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1348 (2014) 17–26.
- [11] N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 83 (2011) 1643–1649.
- [12] N.R. Neng, A.R. Silva, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7303–7310.
- [13] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 120 (2014) 126–134.
- [14] W.-L. Liu, S. Lirio, Y. Yang, L.-T. Wu, S.-Y. Hsiao, H.-Y. Huang, *J. Chromatogr. A* 1395 (2015) 32–40.
- [15] N. Gilart, N. Miralles, R.M. Marce, F. Borrull, N. Fontanals, *Anal. Chim. Acta* 774 (2013) 51–60.
- [16] D. Bratkowska, R.M. Marce, P.A.G. Cormack, F. Borrull, N. Fontanals, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 135–142.
- [17] D. Bratkowska, N. Fontanals, P.A.G. Cormack, F. Borrull, R.M. Marce, *J. Chromatogr. A* 1225 (2012) 1–7.
- [18] N. Gilart, P.A.G. Cormack, R.M. Marce, F. Borrull, N. Fontanals, *J. Chromatogr. A* 1295 (2013) 42–47.
- [19] B.B. Chen, Y.L. Huang, M. He, B. Hu, *J. Chromatogr. A* 1305 (2013) 17–26.

- [20] R. Guedes-Alonso, S. Montesdeoca-Esponda, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, *Trends Environ. Anal. Chem.* 3–4 (2014) 14–27.
- [21] K. Mitani, M. Fujioka, H. Kataoka, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 218–224.
- [22] S. V. Duy, P.B. Fayad, B. Barbeau, M. Prevost, S. Sauve, *Talanta* 101 (2012) 337–345.
- [23] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1355–1364.
- [24] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. B* 1008 (2016) 115–24.
- [25] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 136 (2015) 145–54.
- [26] O. Ros, A. Vallejo, L. Blanco-Zubiaguirre, M. Olivares, A. Delgado, N. Etxebarria, A. Prieto, *Talanta* 134 (2015) 247–255.
- [27] United States Environmental Protection Agency, *Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS* (2007) Washington, DC.
- [28] Q.W. Bu, B. Wang, J. Huang, S.B. Deng, G. Yu, *J. Hazard. Mater.* 262 (2013) 189–211.
- [29] M. Pedrouzo, F. Borrull, R.M. Marce, E. Pocurull, *Trac - Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 749–760.
- [30] R. Meffe, I. de Bustamante, *Sci. Total Environ.* 481 (2014) 280–295.

Capítulo 6

Hidrocarbonizados Porosos como Nova Fase Sorvente para BA μ E - Aplicação na análise de farmacêuticos em matrizes ambientais aquosas

S. M. Ahmad, A. S. Mestre, N. R. Neng, C. O. Ania, A. P. Carvalho, J. M. F. Nogueira, Carbon hydrochar coatings for the determination of pharmaceuticals using bar adsorption microextraction, *Applied Materials & Interfaces*, *in preparation*.

6.1 Considerações gerais

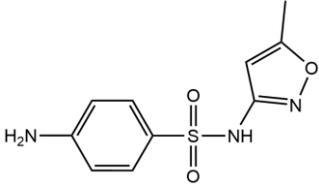
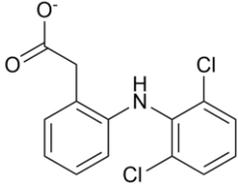
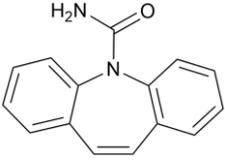
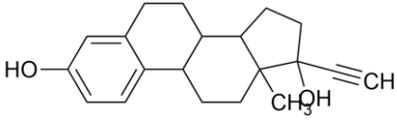
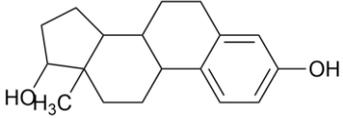
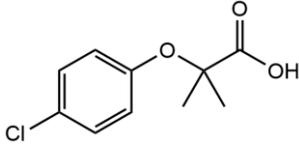
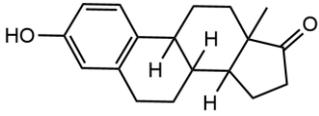
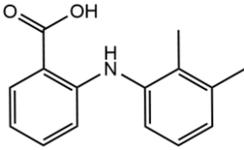
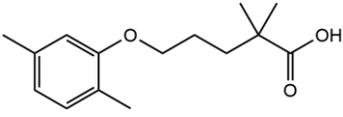
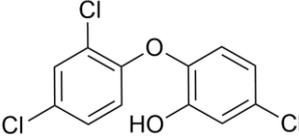
Os PPCPs englobam diversas classes de substâncias diferentes, como medicamentos usados em medicina humana e veterinária, fragrâncias, agentes de proteção solar e ingredientes de cosméticos, entre muitos outros. Mais de 3000 PPCPs são atualmente comercializados, sendo que novas moléculas entram no mercado anualmente, tornando a sua presença ainda mais frequente em águas ambientais [1]. Para além disso, os compostos farmacêuticos (FMCs) são substâncias biologicamente ativas e bastante solúveis em meio aquoso, sendo por isso frequentemente encontradas em águas residuais. Estas são posteriormente descarregadas para a natureza, fazendo com que sejam detetados em águas naturais, incluindo águas subterrâneas, de rios e de mar [2–4], geralmente no nível vestigial ($\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}) [5]. Os FMCs incluem várias classes de medicamentos, incluindo reguladores lipídicos, antibacterianos/antifúngicos, bloqueadores β -adrenérgicos, analgésicos, tranquilizantes, hormonas e antissépticos, entre muitos outros [6]. A preocupação com os possíveis efeitos ecotoxicológicos destes compostos é refletida nas decisões do Parlamento Europeu no domínio da política da água. Em 2013, três FMCs amplamente utilizados, incluindo as hormonas 17α -etinilestradiol e 17β -estradiol, assim como o analgésico diclofenac, foram colocadas numa lista de substâncias a serem monitorizadas pelos Estados-Membro da UE por forma a determinar medidas apropriadas para a avaliação do risco que estas representam [7]. A primeira revisão desta lista em 2015 manteve estes três produtos farmacêuticos [8], embora numa revisão mais recente, o diclofenac, juntamente com outras três substâncias, foram retiradas desta lista, uma vez a Comissão Europeia ter concluído já estarem disponíveis dados de monitorização suficientes [9]. Por estas razões, há uma necessidade concreta em abordagens analíticas inovadoras que permitam quantificação de FMCs em matrizes aquosas ambientais.

A técnica BA μ E, usando revestimento com ACs ou polímeros, já apresentou boa eficácia na determinação de FMCs em matrizes ambientais [10–12]. Contudo, e tendo em conta as decisões da UE no domínio da política da água referidas anteriormente, torna-se imperativo o desenvolvimento de metodologias mais simples, bem como amigas do utilizador e do ambiente, para

a análise simultânea dos diversos FMCs emergentes. Tal como referido anteriormente, estes compostos podem ser vulgarmente encontrados em matrizes ambientais ao nível vestigial, apresentando, propriedades físico-químicas distintas. Este facto torna a sua análise por métodos quantitativos desafiante uma vez estes incluïrem substâncias com propriedades polares e apolares. Por essa razão, são necessários novos materiais que permitam o enriquecimento dos mesmos. Neste sentido, para além dos ACs, outros materiais porosos à base de carbono podem desempenhar um papel relevante. Destes destacam-se os hidrocarbonizados porosos (HC, do inglês *Porous hydrochar*) – materiais de carbono obtidos pela carbonização hidrotérmica de hidratos de carbono na presença de uma mistura eutética. Face às temperaturas baixas durante a carbonização, estes materiais ganham porosidade hierárquica, enriquecida numa química superficial anfotérica [13].

Neste contexto, o presente estudo visa avaliar o desempenho da técnica BA μ E revestida com HCs à base de hidratos de carbono, seguida por μ LD e análise por HPLC-DAD de diversos FMCs (sulfametoxazol (SMX), triclosan (TCS), carbamazepina (CMZ), diclofenac (DCF), ácido mefenâmico (MFA), 17 α -etinilestradiol (EE2), 17 β -estradiol (E2), estrona (E1), gemfibrozil (GFB) e ácido clofíbrico (CFA)) em matrizes aquosas ambientais. Os HCs usados neste estudo foram preparados e caracterizados, estando os procedimentos pormenorizadamente descritos no anexo II. A tabela 6.1 apresenta a estrutura química, bem como os log $K_{O/W}$ e os p K_a dos compostos alvo. É discutida a otimização de diversos parâmetros experimentais do processo analítico, assim como a validação e a aplicação da metodologia otimizada a matrizes reais.

Tabela 6.1 – Estruturas químicas, log K_{OW} e p*K*_a dos FMCs estudados.

FMC	Estrutura química	Log K_{OW}	p <i>K</i> _a
SMX		0,79	1,97; 6,16
DCF		4,26	4,00
CMZ		2,77	15,96
EE2		3,90	10,33
E2		3,75	10,33
CFA		2,90	3,37
E1		4,31	10,33
MFA		5,40	3,89
GFB		4,39	4,42
TCS		4,98	7,68

Foi usado *software* específico para prever as propriedades físico-químicas, assim como a estrutura das moléculas: Marvin 6.2.2, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

6.2 Resultados e discussão

6.2.1 HCs

Os HCs foram preparados a partir de glucose (HC-Glc), frutose (HC-Fru) e sacarose (HC-Suc) na presença da mistura de sais eutéticos, originando aglomerados à nanoescala (20 - 50 nm) (figura 6.1) que se caracterizam por uma rede de micro a mesoporos. Contudo, esta rede apresenta menor volume em comparação com os ACs comerciais testados, derivada de menores áreas superficiais ($\sim 500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). A estrutura porosa é maioritariamente composta por mesoporos com larguras de 10 nm (HC-Fru) ou de 30 nm (HC-Glc e HC-Suc). Os HCs apresentam química superficial ácida ($\text{pH}_{\text{PZC}} \sim 3$), contendo grupos funcionais à base de oxigénio e ligações de carbono, nomeadamente, grupos hidroxílicos, alifáticos, aromáticos, quinonas e ácidos, bem como éteres, álcoois e fenólicos.

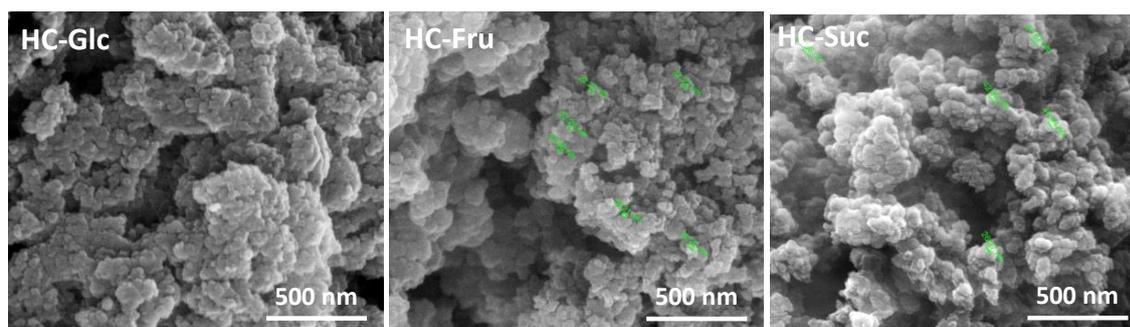


Figura 6.1 – Imagens de microscopia eletrónica de varrimento dos HCs empregados no presente estudo.

6.2.2 Otimização instrumental

As condições para a análise por HPLC-DAD foram avaliadas tendo em conta os dados espectrais do UV/Vis para a deteção de cada analito, assim como as características do tempo de retenção e resolução, de acordo com trabalhos previamente publicados [14–16]. Desta forma, foi selecionado comprimento de

onda de 280 nm, pois maximizava o S/N para todos os compostos. Por forma a obter as melhores condições cromatográficas, foi manipulado o gradiente de eluição, a temperatura da coluna e o volume de injeção, resultando num tempo analítico adequado (< 35 min). A calibração instrumental foi realizada através da injeção de soluções padrão com concentração compreendidas entre 10,0 ou 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (dependendo do FMC em questão) até 5000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (dez níveis), na qual foi possível obter $r^2 \geq 0,99$. Os LODs e LOQs alcançados foram de 1,0-10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5,0-27,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente, para os compostos em estudo. A precisão instrumental foi avaliada pela injeção de uma mistura padrão ($n = 6$, 1,0 mg L^{-1}), resultando em RSDs inferiores a 2,9 % (CMZ).

6.2.3 Otimização do método analítico

Após o estabelecimento dos parâmetros instrumentais, prosseguiu-se com a otimização do processo de microextração e de retroextração empregando uma estratégia de otimização univariada, tal como nos capítulos anteriores, usando água ultrapura fortificada (16,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Uma vez mais, os parâmetros otimizados incluíram a seletividade do sorvente, o tempo de microextração, a velocidade de agitação e as propriedades da matriz (pH, polaridade e força iónica), assim como o solvente para μLD e o tempo de sonicação, de acordo com trabalhos anteriores [14,15,17,18].

6.2.3.1 Seleção da fase sorvente

Os três HCs foram testados como fases de enriquecimento para a recuperação dos dez FMCs alvo e comparados com dois ACs comerciais (figura 6.2), sob as seguintes condições experimentais; microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; μLD , ACN (100 μL), 60 min sob tratamento ultrassónico, seguido de adição de 100 μL de água ultrapura. Nas condições experimentais avaliadas (pH 5,5) nenhum dos materiais de carbono foi capaz de recuperar o CFA embora, curiosamente, os materiais testados permitissem recuperar até 50 % dos outros dois compostos ácidos (DCF e MFA). O AC comercial R apresentou o pior

desempenho para a maioria dos FMCs, à exceção do SMX e da CMZ. As baixas recuperações obtidas por este AC podem ser parcialmente devidas ao fato de que, do conjunto de materiais em estudo, este foi o único material com uma superfície ligeiramente positiva no pH da solução ($\text{pH}_{\text{amostra}} > \text{pH}_{\text{PZC}}$, 6,5). Apesar de apresentarem porosidade menos desenvolvidos, os HCs, que apresentam carga superficial negativa ($\text{pH}_{\text{amostra}} < \text{pH}_{\text{PZC}}$, 2,7-3,1), comparam-se favoravelmente com os restantes ACs comerciais, à exceção para SMX. Para os outros fármacos, as recuperações médias variaram entre 40 % (EE2) e 80 % (E2 e E1), verificando-se que os HCs preparados a partir de sacarose e frutose apresentaram resultados similares quando comparados com CN1 para a maioria dos FMCs alvo. Desta forma, prosseguiu-se os ensaios de otimização com os materiais HC-Suc e HC-Fru, juntamente com CN1.

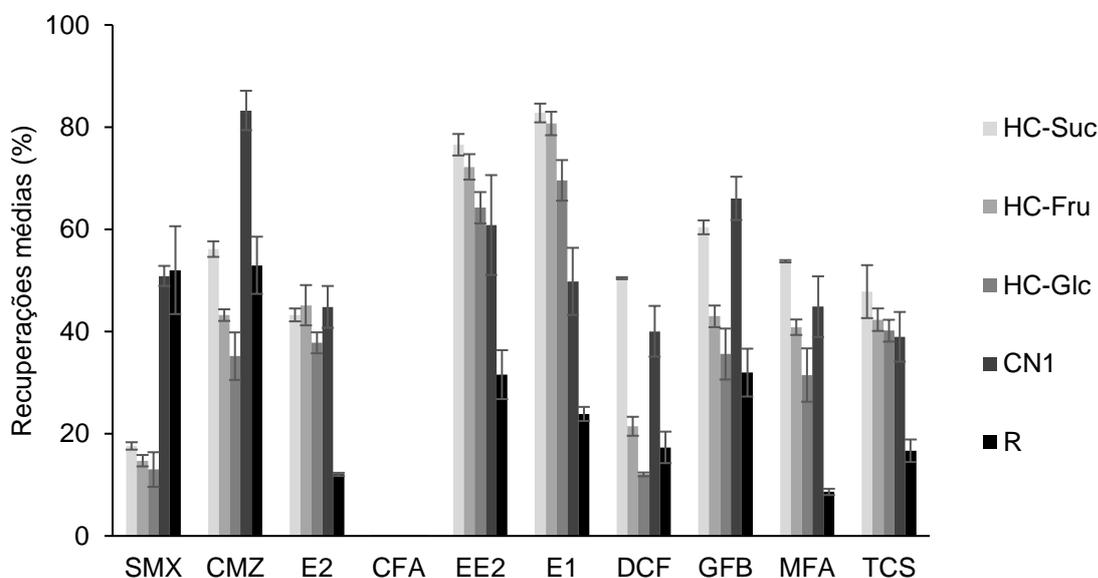


Figura 6.2 – Efeito da seletividade de vários sorventes para a microextração dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, ACN (100 μ L), 60 min sob tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 μ L de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

6.2.3.2 Etapa de retroextração

Foram testados os solventes MeOH, ACN e uma mistura equivalente de ambos (1/1, v/v; Mix) por forma a promover a completa dessorção dos FMCs

alvo das fases sorventes. Os resultados mostraram que ACN \acute{e} o melhor solvente para retroextrair usando os tr \acute{e} s materiais testados (figura 6.3).

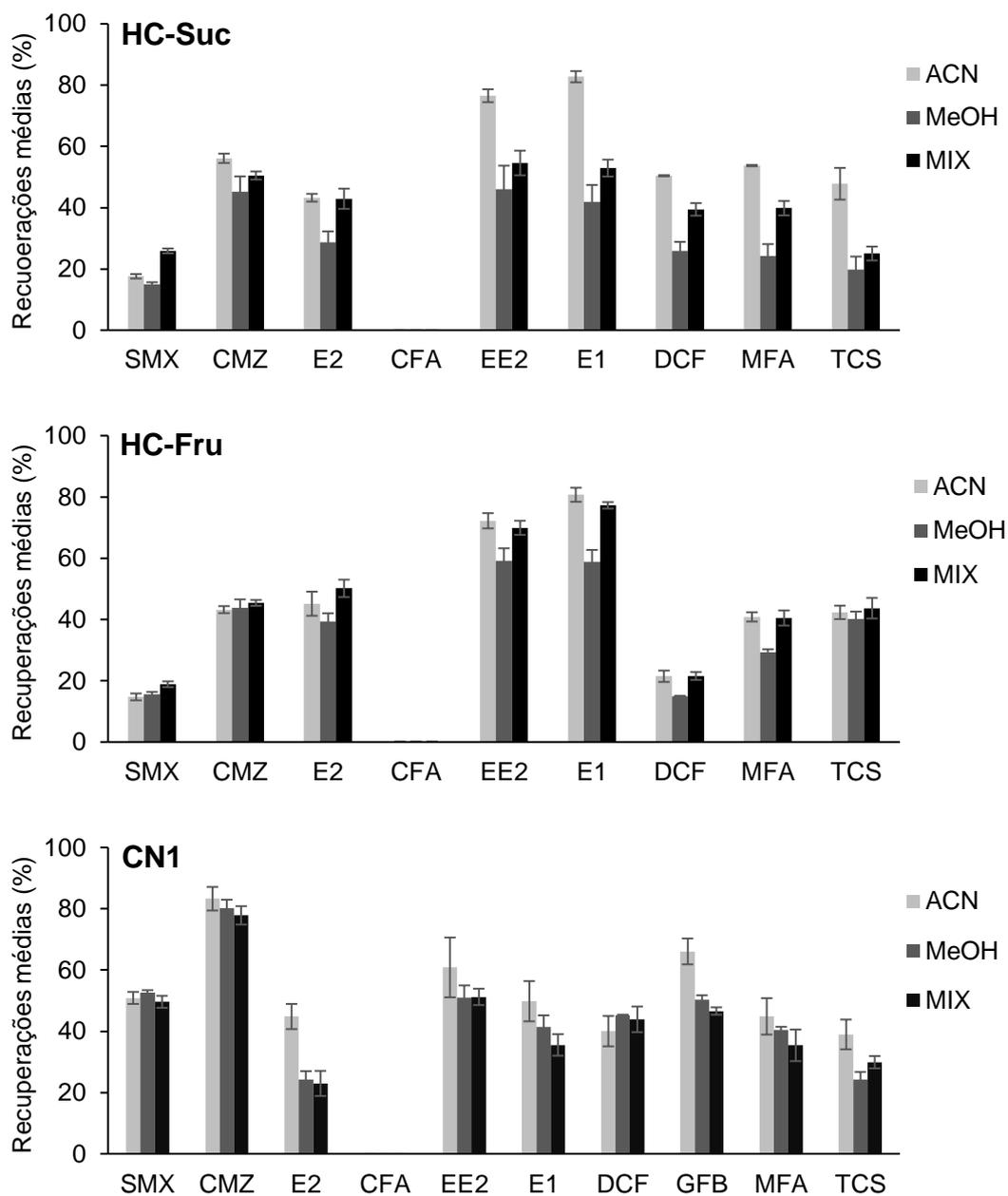


Figura 6.3 – Efeito da varia \acute{c} o do solvente na retroextra \acute{c} o dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condi \tilde{c} oes experimentais: microextra \acute{c} o, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextra \acute{c} o, 100 μ L, 60 min sob tratamento ultrass \acute{o} nico, seguido de adi \tilde{c} o de 100 μ L de \acute{a} gua ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padr \acute{o} de tr \acute{e} s replicados.

O efeito do tempo de dessor \tilde{c} o tamb \acute{e} m foi igualmente avaliado pela realiza \tilde{c} o de ensaios com 15, 30, 60 e 90 min de sonica \tilde{c} o. Os dados obtidos

exibem maior desempenho até 60 min, n \acute{a} o tendo sido obtidas vantagens ao empregar per \acute{o} dos mais longos (figura 6.4).

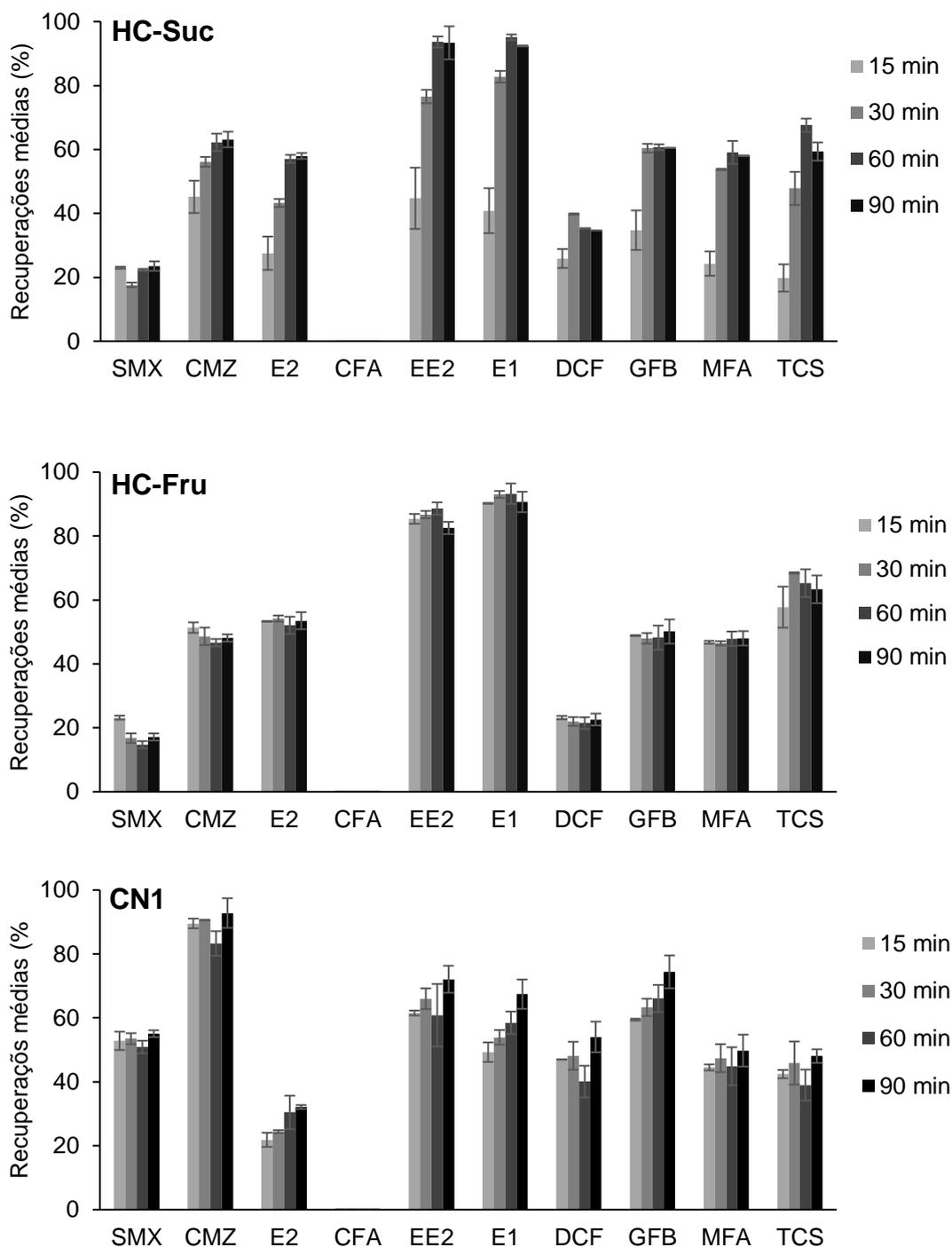


Figura 6.4 – Efeito da varia \c o do tempo na retroextra \c o dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condi \c es experimentais: microextra \c o, 16 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextra \c o, ACN (100 μ L), tratamento ultrass \acute{o} nico, seguido de adi \c o de 100 μ L de \acute{a} gua ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padr \acute{o} de tr \acute{e} s replicados.

6.2.3.3 Etapa de microextração

Diversos parâmetros experimentais podem afetar a eficiência da microextração. O tempo de equilíbrio e a velocidade de agitação desempenham um papel crucial neste tipo de abordagem analítica, uma vez ambos influenciarem a transferência de massa e o processo cinético [17,19]. Por estes motivos, diversos ensaios foram realizados por BA μ E, empregando 1 a 16 horas de tempo de microextração, assim como 750 a 1250 rpm de velocidade de agitação. Os resultados mostram que as melhores eficiências de extração foram, de uma forma geral, obtidos usando 1000 rpm (figura 6.5). Este resultado era esperado, uma vez que a estas velocidades de agitação o dispositivo BA μ E se torna mais estável após ser alocado sob o vórtex formado durante o enriquecimento por flutuação.

De acordo com a figura 6.6, um tempo de microextração de 16 h é consistentemente a melhor escolha para maximizar a recuperação de nove dos dez analitos alvo usando as fases testadas. Embora seja obtida cinética, decidiu-se fixar este parâmetro (16 h) para ensaios posteriores. Contudo, esta escolha não pode ser considerado uma desvantagem, uma vez que essa metodologia pode ser realizada durante a noite sem qualquer requisito especial.

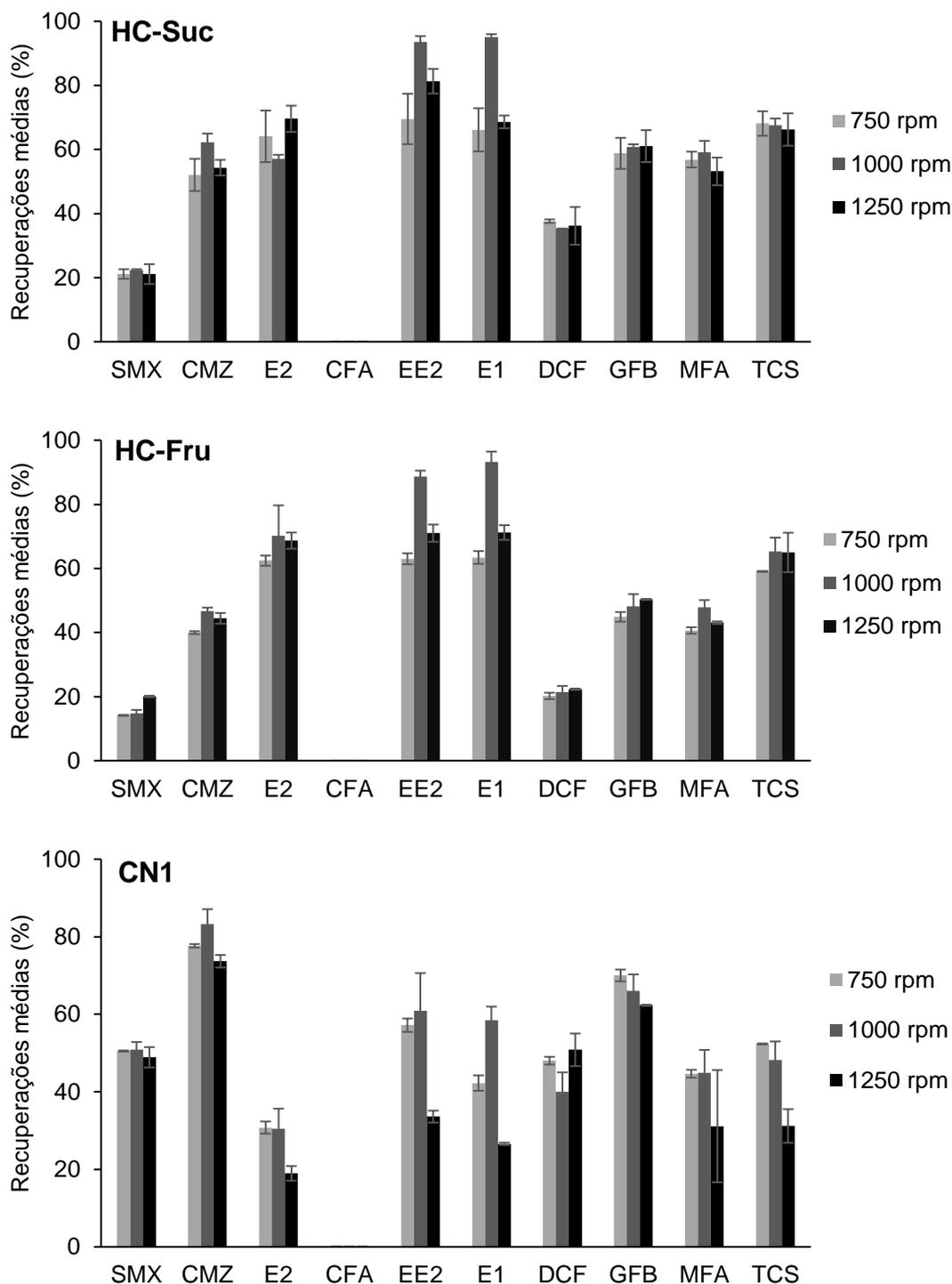


Figura 6.5 – Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condições experimentais: microextração, 16 h, pH 5,5; retroextração, ACN (100 μ L), 60 min sob tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 μ L de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

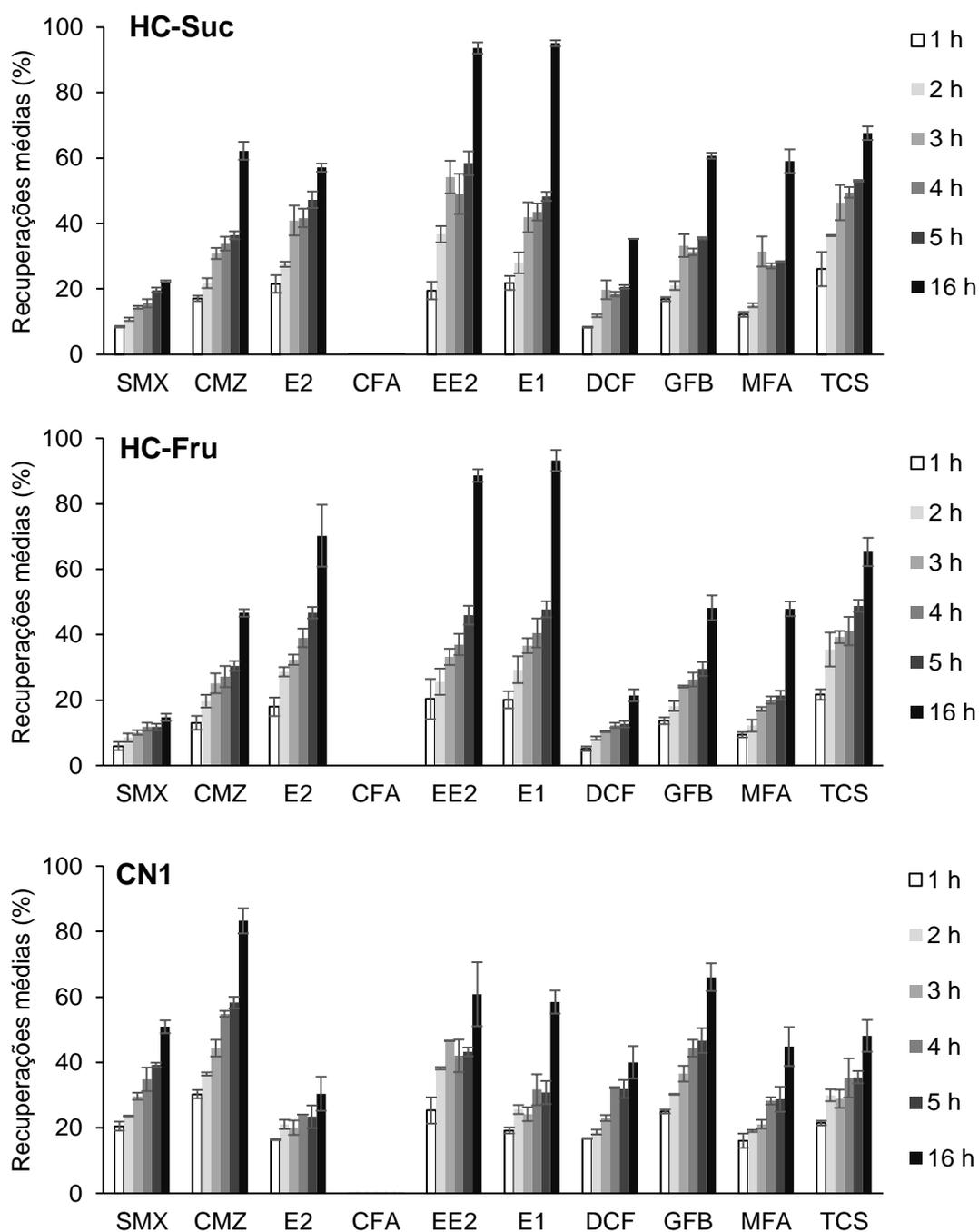


Figura 6.6 – Efeito da variação do tempo de microextração no enriquecimento dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, ACN (100 μ L), 60 min sob tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 μ L de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Durante o desenvolvimento da metodologia analítica, as características químicas da matriz também foram avaliadas, em particular o pH, a força iônica e

a polaridade. Inicialmente foi avaliado o efeito do pH da matriz (2,0, 5,5 e 11,0) na efici \acute{e} ncia de extra \acute{c} o de BA μ E para os analitos em estudo (figura 6.7).

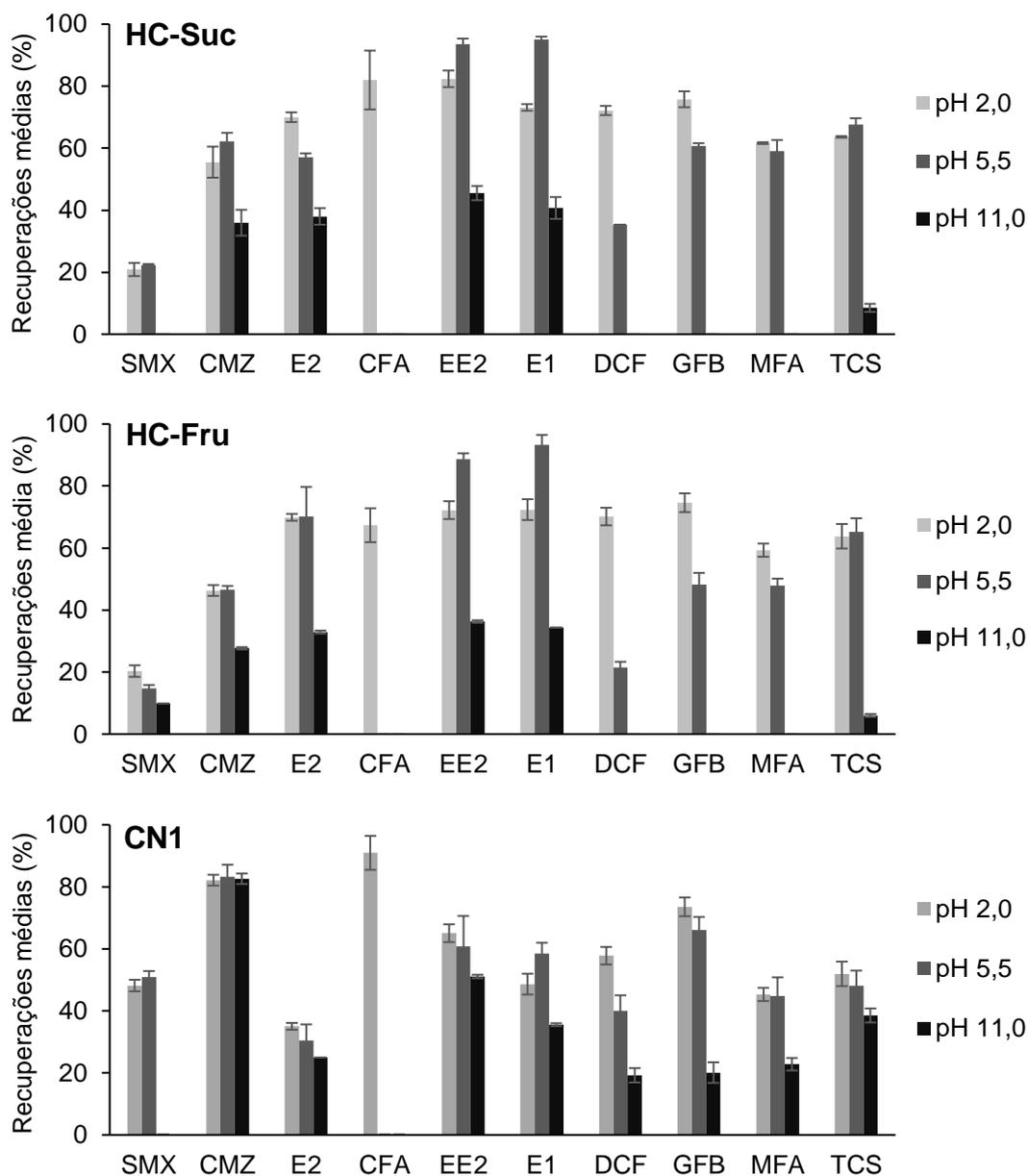


Figura 6.7 – Efeito da varia \acute{c} o do pH da matriz na microextra \acute{c} o dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condi \tilde{c} oes experimentais: microextra \acute{c} o, 16 h (1000 rpm); retroextra \acute{c} o, ACN (100 μ L), 60 min sob tratamento ultrass \acute{o} nico, seguido de adi \tilde{c} o de 100 μ L de \acute{a} gua ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padr \tilde{a} o de tr \acute{e} s replicados.

É sabido que este parâmetro pode ter uma influência significativa, uma vez as recuperações podem ser afetadas pelas formas iônicas ou neutras dos FMCs em meio aquoso [10], assim como pela carga superficial dos materiais de carbono. Os resultados obtidos com os dispositivos BA μ E demonstraram que, à exceção da recuperação de CMZ com CN1, o pH da matriz influencia fortemente a recuperação de todos os analitos em estudo. Deve ser igualmente enfatizado que sob meio bastante ácido, CFA (o FMC com o menor valor de pKa) foi finalmente extraído, tendo sido obtidas recuperações compreendidas entre 70 e 90 %. Estes resultados indicaram que a quantificação de CFA, utilizando HCs ou o AC comercial testados como fases de enriquecimento para BA μ E, só é possível quando este composto ácido e semi-polar se encontrar na sua forma neutra. Resultados obtidos por outro trabalho na qual empregou ACs derivados de cortiça como fase sorvente para BA μ E, também identificaram o papel crítico do pH da matriz na recuperação de CFA, tendo os melhores resultados sido igualmente obtidos em meio ácido [20].

Os dados mostram que as recuperações aumentam usando a matriz com pH 2,0 para as três fases sorventes e para a maioria dos compostos. A este valor de pH todos os materiais de carbono apresentam carga superficial ligeiramente positiva ($\text{pH}_{\text{amostra}} < \text{pH}_{\text{PZC}}$). Estes resultados podem ser racionalizados considerando os valores de log D dos FMCs alvo nos três valores de pH em estudo (2,0, 5,5 e 11,0). Este parâmetro corrige o valor de log K_{OW} para cada composto a um determinado valor de pH da matriz tendo em conta o seu pKa e usando equação 6.1:

$$\text{Log } D_{\text{valor de pH}} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}^{\text{ionizado}} + [\text{solute}]_{\text{octanol}}^{\text{não ionizado}}}{[\text{solute}]_{\text{água}}^{\text{ionizado}} + [\text{solute}]_{\text{água}}^{\text{não ionizado}}} \right) \quad (6.1)$$

De acordo com os dados da tabela 6.2, independentemente do valor de pH da amostra existe, de forma geral, um aumento das recuperações com o aumento nos valores do log D. A pH 2,0, os FMCs em estudo apresentam, na generalidade, maior solubilidade em octanol, favorecendo assim o processo de adsorção, o que contribui para maiores eficiências de extração. Contudo, quando o pH da matriz é superior ou similar ao pKa de um determinado FMC, a sua

recuperação aproxima-se de zero, justificando, assim, a maior redução nos rendimentos de extração para os compostos com valores mais baixos de pK_a .

Tabela 6.2 – Efeito do pH da matriz na recuperação dos FMCs alvo empregando HC-Suc, HC-Fru ou CN1 como fases sorventes para BAμE. Os valores de log D são apresentados para cada composto do respetivo valor de pH do ensaio. Abaixo de cada FMC, em parênteses, são apresentados os respetivos valores de pK_a .

FMC	pH da matriz	Log D	Recuperações médias (%)		
			HC-Suc	HC-Fru	CN1
SMX (1,97; 6,16)	2,0	0,5	20,9	20,3	48,2
	5,5	0,7	22,3	14,7	50,9
	11,0	-3,13	0	9,9	0
CMZ (15,96)	2,0	2,77	55,5	46,3	82,2
	5,5	2,77	62,2	46,6	83,3
	11,0	2,77	35,9	32,9	82,6
E2 (10,33)	2,0	3,75	70,0	69,9	35,0
	5,5	3,75	57,7	70,2	30,4
	11,0	2,99	38,0	32,9	25,0
CFA (2,90)	2,0	2,88	81,9	67,3	90,9
	5,5	0,77	0	0	0
	11,0	-3,63	0	0	0
EE2 (10,33)	2,0	3,9	82,4	72,2	65,0
	5,5	3,9	93,6	88,6	60,8
	11,0	3,14	45,5	36,3	51,1
E1 (10,33)	2,0	4,31	73,2	72,4	48,6
	5,5	4,35	95,1	93,2	58,5
	11,0	3,55	40,7	34,6	35,5
DCF (4,00)	2,0	4,25	72,2	70,1	57,8
	5,5	2,74	35,3	21,5	40,0
	11,0	-2,17	0	0	19,2
GFB (4,42)	2,0	4,39	61,7	74,6	73,5
	5,5	3,27	60,7	48,2	66,1
	11,0	-1,89	0	0	20,1
MFA (3,89)	2,0	5,39	61,7	59,3	45,3
	5,5	3,77	59,1	47,9	44,9
	11,0	-1,06	0	0	22,8
TCS (7,68)	2,0	4,98	63,7	63,8	51,9
	5,5	4,98	67,6	65,3	48,1
	11,0	1,66	8,5	6,0	38,5

Software específico foi usado para prever os valores de log D e de pK_a de cada FMC: Marvin 6.2.2, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

É possível concluir que as recuperações mais baixas estão provavelmente relacionadas com a desprotonação que leva a maior solubilidade e, portanto, maior estabilidade dos FMCs na matriz aquosa e, conseqüentemente, menor afinidade para com os materiais sorventes. Os FMCs mais alcalinos (com maiores valores de pK_a) alcançaram recuperações ligeiramente mais elevadas para um pH da matriz de 5,5 em comparação com pH 2,0.

Tal como abordado em capítulos anteriores, o efeito da força iônica da matriz foi igualmente avaliado neste estudo, uma vez a adição de um eletrólito poder favorecer a migração de compostos orgânicos da matriz para o sorvente (efeito de “*salting out*”) [18,21]. Desta forma, vários ensaios foram realizados adicionando NaCl à matriz aquosa (0, 5, 10 e 20 % p/v). A adição progressiva de sal, em geral, não melhora significativamente as recuperações dos analitos (figura 6.8). Como conseqüência, a adição de sal foi descartada para ensaios posteriores.

O efeito da adição de um modificador orgânico à matriz foi igualmente estudada. Este parâmetro é importante por forma a contornar o chamado “*wall effect*”, no qual analitos apolares poderem ser adsorvidos nas paredes dos frascos de vidro de amostragem, resultando em perdas na eficiência de extração [15,18]. Desta forma, a polaridade da matriz foi modificada pela adição de MeOH (0, 5, 10 e 20 %; v/v). A adição progressiva de MeOH, em geral, diminui significativamente os rendimentos de recuperação de todos os PhCs em estudo (figura 6.9). Conseqüentemente, a metodologia foi otimizada na ausência de MeOH.

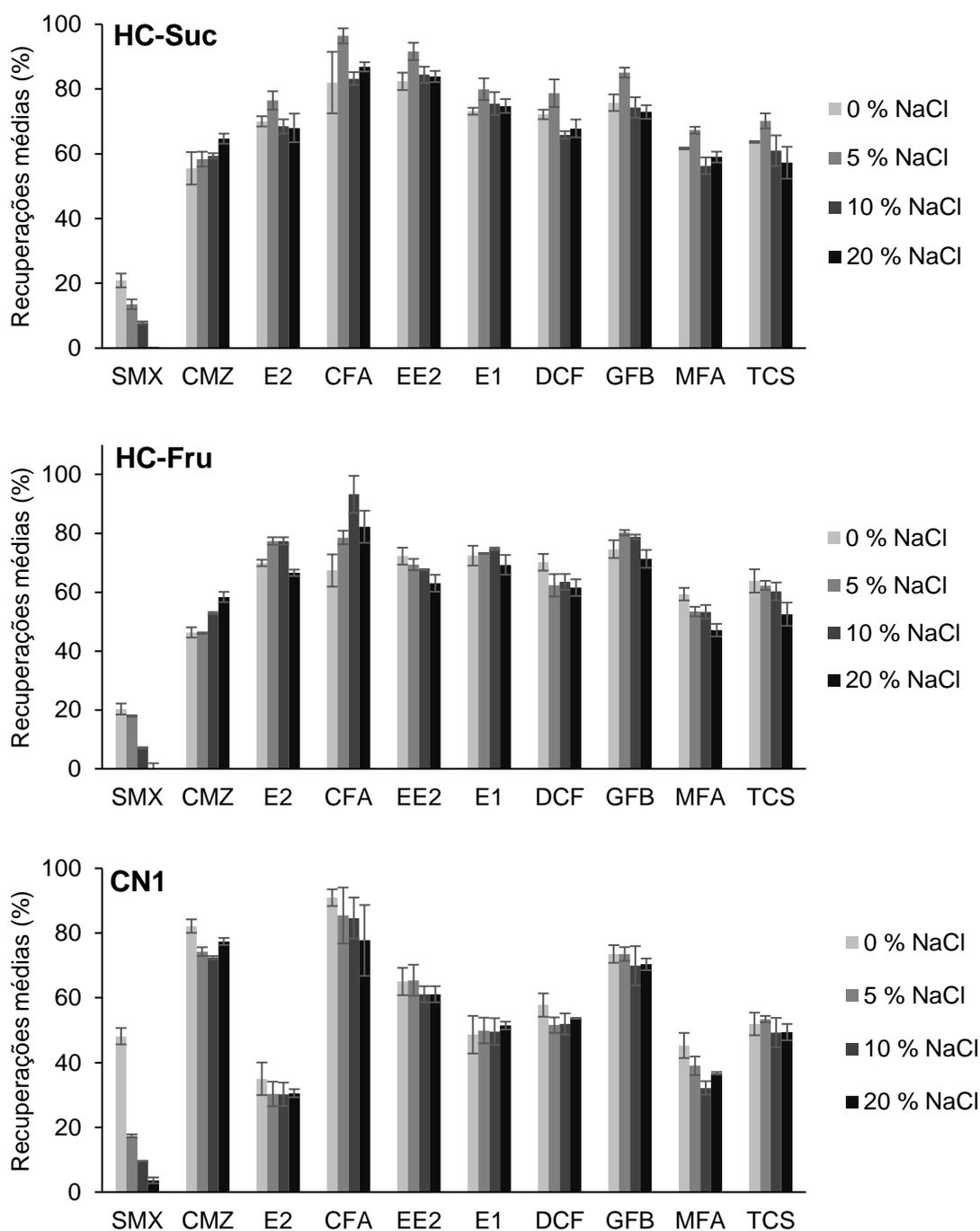


Figura 6.8 – Efeito da variação da força iônica da matriz na microextração dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 2,0; retroextração, ACN (100 μ L), 60 min sob tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 μ L de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

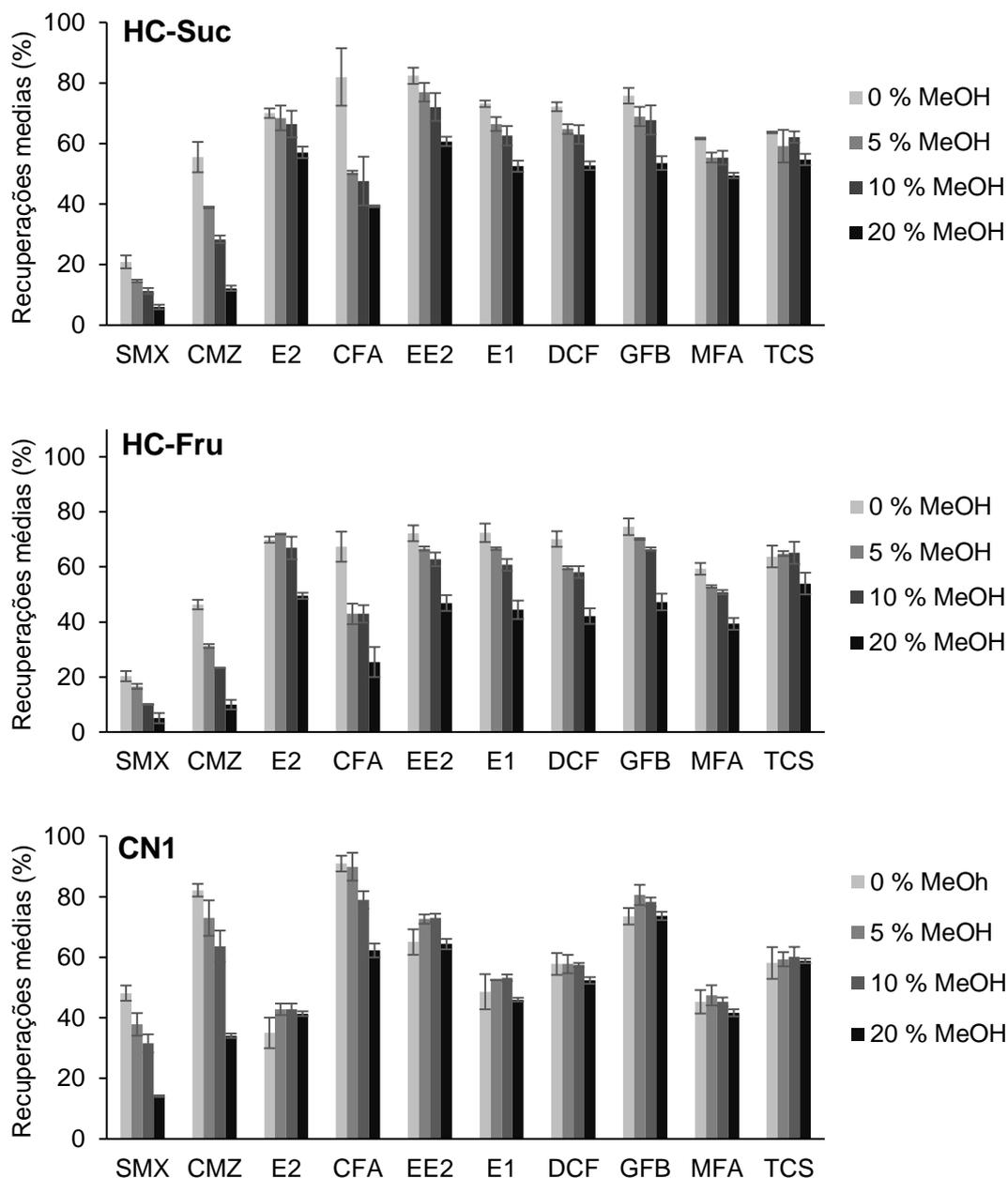


Figura 6.9 – Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos FMCs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, usando diferentes fases sorventes. Condições experimentais: microextração, 16 h (1000 rpm), pH 2,0; retroextração, ACN (100 μ L), 60 min sob tratamento ultrassônico, seguido de adição de 100 μ L de água ultrapura. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

6.2.4 Validação do método analítico

Ao utilizar as condições experimentais otimizadas para cada sorvente à base de carbono (CN1, HC-Fru e HC-Suc), foi possível obter recuperações médias compreendidas entre 20,3 e 90,9 % para todos os compostos alvo,

usando água ultrapura fortificada a 16,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Como consequência, decidiu-se prosseguir com os ensaios de validação utilizando a fase sorvente HC-Suc, uma vez ter geralmente apresentado melhores resultados que os demais materiais. A tabela 6.3 resume alguns dos dados dos ensaios de validação da metodologia proposta, obtidos para os dez FMCs em estudo.

Tabela 6.3 – Valores de LODs, LOQs, assim como de repetibilidade e precisão intermédia alcançadas para os dez FMCs em estudo, obtidas por BA μ E(HC-Suc)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

FMC	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetibilidade (RSD, %)			Precisão intermédia (RSD, %)
			5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n = 6)	24,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n = 6)	104,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n = 6)	16,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n = 18)
SMX	1,5	5,0	0,3	5,0	0,7	7,0
CMZ	0,5	1,5	5,3	0,9	0,7	8,3
E2	1,5	5,0	4,7	5,5	1,5	4,7
CFA	1,5	5,0	6,1	4,7	2,5	8,7
EE2	1,5	5,0	6,9	2,8	1,2	4,4
E1	1,5	5,0	3,8	3,6	1,9	3,6
DCF	0,5	1,5	8,4	4,1	1,1	5,7
GFB	1,0	3,0	6,5	3,6	1,4	4,7
MFA	0,5	1,5	6,9	5,4	0,9	12,3
TCS	1,0	3,0	4,3	8,2	1,4	10,2

A sensibilidade da metodologia foi avaliada através dos LODs (0,5-1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) e LOQs (1,5-5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), calculados com um S/N de 3/1 e 10/1, respetivamente. A presente abordagem também foi avaliada através de ensaios de repetibilidade e precisão intermédia, calculada como RSD de seis e dezoito ensaios, respetivamente. Os ensaios de precisão intermédia foram efetuados como seis replicados por dia em três dias consecutivos e, os ensaios de repetibilidade consistiram em seis replicados realizados no mesmo dia (usando três níveis de fortificação). Os resultados obtidos revelam que a metodologia proposta apresenta boas precisões para os ensaios de repetibilidade (RSD \leq 8,4 %, DCF) e precisão intermédia (RSD \leq 12,3 %, MFA), sob condições

experimentais otimizadas. Foram igualmente realizados ensaios em água ultrapura com concentrações variando entre 5,0 e 104,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, na qual foram obtidas bons níveis de linearidade ($r^2 > 0,99$) para todos os FMCs em estudo.

6.2.5 Comparação com outras técnicas de microextração

Nesta secção pretende-se comparar abordagem proposta com outras técnicas de microextração estática já publicadas, tal como apresentado na tabela 6.4. Conforme pode ser observado, a metodologia desenvolvida usando dispositivos BA μ E revestidos com HCs à base de sacarose (HC-Suc) apresenta recuperações semelhantes ou superiores a outras técnicas de microextração, como por exemplo, SBSE revestida com PDMS, PA ou EG [22] ou microextração em barra sólida (SBME, do inglês *Solid Bar Microextraction*) revestida com polímero C8 [23] para a extração de CMZ; microextração em filme fino (TFME, do inglês *Thin-film microextraction*) revestido com PDMS [24] para a extração de E2; SBSE revestida com PDMS [25] para a extração do CFA; SBSE revestida com poliuretano (PU) [26] para a extração de DCF, GFB ou MFA. Adicionalmente, a sensibilidade do método proposto é semelhante quando comparada a sistemas instrumentais similares [23,26,27] ou a sistemas instrumentais de espectrometria de massa ou *Tandem* [24,28].

Tabela 6.4 – Comparação dos LODs e recuperações obtidas para os dez FMCs em estudo com outras técnicas de microextração estática.

FMC	Técnica de microextração estática	Sistema instrumental	Recuperação (%)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Refs.
SMX	SPME(CW/TPR)	LC-MS/MS	59,2	14,0	[29]
	MEPS(C8)	HPLC-DAD	n.a.	LOQ: 5,0	[27]
	BA μ E(HC-Suc)		20,9	1,5	Este estudo
CMZ	SBSE(PDMS, PA ou EG)	LC-MS/MS	< 1,0	–	[22]
	TFME(PDMS)	GC-MS	67,1	0,72	[24]
	SBME(C8)	HPLC-UV	35,0-42,0	0,7	[23]
	BA μ E(HC-Suc)	HPLC-DAD	55,5	0,5	Este estudo

6. BA μ E revestido com HCs: análise de farmacêuticos em matrizes aquosas ambientais

EE2	SBSE(PDMS)	LDTD/APCI-MS/MS	~ 40,0	2,8	[28]
	TFME(PDMS)		85,0	0,41	[24]
	SPME(PA)	GC-MS	92,0-101,0	0,15	[30]
	SBSE(PDMS)		7,0	0,853	[25]
	BA μ E(HC-Suc)	HPLC-DAD	70,0	2,0	Este estudo
CFA	SPME(PA)	GC-MS	95,0-98,0	0,75	[30]
	SBSE(PDMS)		18,5	0,222	[25]
	BA μ E(AC)	HPLC-DAD	79,7-96,1	0,21-0,28	[20]
	BA μ E(HC-Suc)		82,0	2,5	Este estudo
E2	SBSE(PDMS)	LDTD/APCI-MS/MS	~ 30,0	2,6	[28]
	SPME(PA)	GC-MS	93,0-105,0	0,15	[30]
	SBSE(PDMS)		9,0	0,508	[25]
	BA μ E(HC-Suc)	HPLC-DAD	82,4	2,0	Este estudo
E1	SBSE(PDMS)	LDTD/APCI-MS/MS	~ 50,0	2,2	[28]
	SPME(PA)	GC-MS	92,0-99,0	0,15	[30]
	SBSE(PDMS)		12,7	0,789	[25]
	BA μ E(HC-Suc)	HPLC-DAD	73,1	2,0	Este estudo
DCF	SBSE(PDMS, PA ou EG)	LC-MS/MS	< 1,0	n.a.	[22]
	SBSE(PDMS)	GC-MS	21,0	0,037	[25]
	SBSE(PDMS)		34,6	1,6	[26]
	SBSE(PU)	HPLC-DAD	77,7	0,7	[23]
	SBME(C8)		47,0-52,0	0,9	[23]
	BA μ E(HC-Suc)		72,2	0,5	Este estudo
GFB	SBSE(PDMS)	GC-MS	15,5	0,013	[25]
	SBSE(PDMS)		73,4	1,7	[26]
	SBSE(PU)	HPLC-DAD	84,0	0,7	[26]
	BA μ E(HC-Suc)		75,8	1,0	Este estudo
MFA	SBSE(PDMS)	GC-MS	29,0	0,001	[25]
	SBSE(PDMS)		71,3	1,5	[26]
	SBSE(PU)	HPLC-DAD	48,4	1,3	[26]
	BA μ E(HC-Suc)		61,7	0,5	Este estudo
TCS	SBSE(PDMS, PA ou EG)	LC-MS/MS	40,0-80,0	5,0-10,0	[22]
	SPME(PA)	GC-MS	76,0-88,0	0,15	[30]
	SBSE(PDMS)		23,8	0,0002	[25]
	BA μ E(HC-Suc)	HPLC-DAD	63,7	1,0	Este estudo

CW/TPR: resina de Carbowax; PU: poliuretano; SBME: microextração em barra sólida; TFME: microextração em filme fino.

n.a. Informação indisponível.

6.2.6 Aplicação a matrizes reais

Por forma a avaliar a aplicabilidade da metodologia proposta às matrizes reais, diversos ensaios foram realizados em amostras de água do mar, superficial, estuário, torneira e ETAR, através do SAM. As amostras de água foram fortificadas a quatro níveis ($8,0 \mu\text{g L}^{-1}$ a $104,0 \mu\text{g L}^{-1}$) para os dez FMCs em estudo. Foram igualmente realizados ensaios sem fortificação. Os resultados mostram que foram alcançadas boas linearidades ($r^2 > 0,99$). Na figura 6.10 encontram-se exemplificados cromatogramas de água ultrapura fortificada a $8,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para os dez FMCs (a), bem como de amostra de ETAR sem fortificação (b), obtidos por BA μ E(HC-Suc)- μ LD/HPLC-DAD sob condições experimentais otimizadas. Embora a metodologia proposta tenha apresentado sensibilidade elevada ao nível dos traços, alguns dos analitos em estudo foram quantificados apenas na amostra de ETAR (CMZ: $4,01 \pm 0,46 \mu\text{g L}^{-1}$; DCF: $1,99 \pm 0,21 \mu\text{g L}^{-1}$).

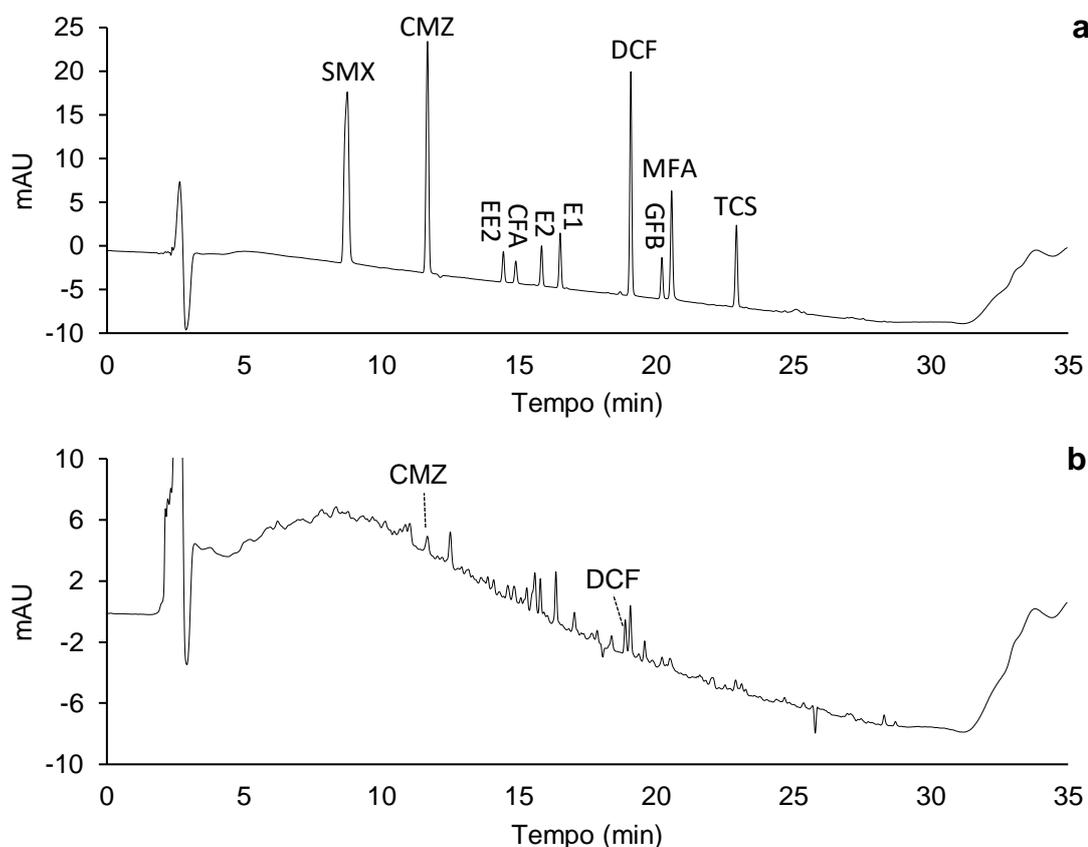


Figura 6.10 – Cromatogramas obtidos de ensaios realizados em água ultrapura fortificada a $8,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (a), assim como de amostra de ETAR não fortificada (b), realizados por BA μ E(HC-Suc) μ LD/HPLC-DAD sob condições experimentais otimizadas.

6.3 Conclusões

A metodologia desenvolvida, BA μ E revestida com HCs à base de sacarose (HC-Suc), seguida de μ LD e análise por HPLC-DAD, foi proposta para a análise vestigial de dez FMCs em matrizes de água ambiental. Os HCs preparados em laboratório provaram ser alternativos a ACs comerciais, uma vez a sua estrutura de micro e mesoporos, combinada com uma química superficial adequada, favorecer os processos de adsorção e dessorção durante a etapa de enriquecimento, contribuindo para um elevado desempenho ao nível vestigial. O método também demonstrou ser uma abordagem amiga do ambiente, fácil de implementar, sensível e robusta, recorrendo a baixo volume de amostra. Em suma, a metodologia analítica proposta parece ser uma alternativa eficaz para cumprir a decisão da UE 2018/840, assim como as diretrizes USEPA para a monitorização de FMCs, particularmente se combinadas com sistemas hifenados (ex., MS ou MS/MS), podendo fornecer ainda melhores níveis de sensibilidade e seletividade.

6.4 Referências

- [1] L. Arpin-Pont, M.J. Martínez-Bueno, E. Gomez, H. Fenet, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 4978–4991.
- [2] A.B. Caracciolo, E. Topp, P. Grenni, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 106 (2015) 25–36.
- [3] W. Mnif, A.I. Hassine, A. Bouaziz, A. Bartegi, O. Thomas, B. Roig, *Int. J. Env. Res. Public Heal* 8 (2011) 2265–2303.
- [4] W.C. Li, *Env. Pollut.* 187 (2014) 193–201.
- [5] S.D. Richardson, T.A. Ternes, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2813–2848.
- [6] J.Q. Jiang, Z. Zhou, V.K. Sharma, *Microchem. J.* 110 (2013) 292–300.
- [7] Directiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de agosto de 2013.
- [8] Decisão de execução (UE) 2015/495 da Comissão de 20 de março de 2015.
- [9] Decisão de execução (UE) 2018/840 da Comissão de 5 de junho de 2018.
- [10] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1355–1364.
- [11] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. B* 1008 (2016) 115–24.
- [12] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 136 (2015) 145–54.
- [13] N. Fechner, S.A. Wohlgemuth, P. Jäker, M. Antonietti, *J. Mater. Chem. A* 1 (2013) 9418–9421.
- [14] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1348 (2014) 17–26.

- [15] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, J. Chromatogr. B 969C (2014) 35–41.
- [16] N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, Talanta 83 (2011) 1643–1649.
- [17] N.R. Neng, A.R. Silva, J.M.F. Nogueira, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 7303–7310.
- [18] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, Talanta 120 (2014) 126–134.
- [19] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, J. Chromatogr. A 1265 (2012) 7–16.
- [20] N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6263–6270.
- [21] N.R. Neng, S.M. Ahmad, H. Gaspar, J.M.F. Nogueira, Talanta 144 (2015) 105–109.
- [22] N. Gilart, N. Miralles, R.M. Marce, F. Borrull, N. Fontanals, Anal. Chim. Acta 774 (2013) 51–60.
- [23] N. AL-Hadithi, B. Saad, M. Grote, Microchim. Acta. 172 (2011) 31–37.
- [24] A. Giordano, J. Vásquez, M. Retamal, L. Ascar, J. Braz. Chem. Soc. 27 (2016) 1744–1749.
- [25] M.G. Pintado-Herrera, E. González-Mazo, P.A. Lara-Martín, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 401–411.
- [26] A.R.M. Silva, F.C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, J. Chromatogr. A 1209 (2008) 10–16.
- [27] F.H. Salami, M.E.C. Queiroz, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 37 (2014) 2377–2388.
- [28] S. V Duy, P.B. Fayad, B. Barbeau, M. Prevost, S. Sauve, Talanta 101 (2012) 337–345.
- [29] V.K. Balakrishnan, K.A. Terry, J. Toito, J. Chromatogr. A 1131 (2006) 1–10.
- [30] C. V Antoniou, E.E. Koukouraki, E. Diamadopoulos, Water Environ. Res. 81 (2009) 664–669.

Capítulo 7

Análise de Canabinóides Sintéticos em Fluido Oral por BAμE

S. M. Ahmad, N. R. Neng, H.M. Gaspar, J. M. F. Nogueira, Bar adsorptive microextraction (BAμE) method for synthetic cannabinoid analysis in oral fluids, *Forensic Science International*, *in preparation*.

7.1 Considerações gerais

Os canabinóides sintéticos (CSs) são definidos como todas as substâncias com o objetivo de mimetizar os efeitos do (-)-*trans*-Δ9-tetrahydrocannabinol (THC), o principal composto ativo da *cannabis*. Os CSs interagem com o sistema endocanabinóide, em particular com os recetores CB1 e CB2 [1]. Este mecanismo está envolvido em vários processos fisiológicos, como por exemplo, na regulação do apetite e do sono, na sensação de dor, na cognição, entre muitos outros. Em comparação com o THC, alguns CSs apresentam quatro a cinco vezes mais afinidade com esses recetores [2]. Como consequência, diversos sintomas de toxicidade foram relatados e associados ao consumo destas substâncias, incluindo ansiedade, paranoia, taquicardia, irritabilidade, alucinações, dormência, convulsões, pressão alta, sonolência, fala arrastada e, em alguns casos, até a morte [3]. Tradicionalmente, estes compostos têm sido vendidos em “*smartshops*” e, hoje em dia, na *Internet* como produtos inócuos, tornando-se uma alternativa à *cannabis*. O número total de CSs controlados pelo EMCDDA atingiu um total de mais de 180 substâncias até ao final de 2018, incluindo 10 novos canabinóides identificados nesse mesmo ano [4]. Os CSs são a maior classe de NPS confiscada pelos órgãos de polícia criminal europeus, representando um aumento de mais de 250 vezes desde que os CSs foram reportados pela primeira vez na Europa, no final de 2008 [5]. Por estas razões, existe uma necessidade de metodologias analíticas que permitam a respetiva monitorização em muitos tipos de matrizes biológicas, especialmente através de uma abordagem não invasiva (ex., fluido oral). Outras vantagens do uso destas matrizes biológicas como meio de análise são o rápido tempo de amostragem, apresentando quaisquer riscos para a saúde, o facto de representar a fração livre de um fármaco, assim como dificilmente poder ser adulterada [6].

No presente estudo, é apresentado o desenvolvimento, a otimização, a validação e a aplicação de BAμE seguido de μLD com análise por HPLC-DAD, para a determinação de oito CSs em fluido oral. Os compostos seleccionados foram AM-694 (1-[(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il]-(2-iodofenil)metanona), cumyl-5F-PINACA (1-(5-fluoropentil)-*N*-(2-fenilpropan-2-il)indazole-3-carboxamida), MAM-2201 ([1-(5-fluoropentil)indol-3-il]-(4-metilnaftalen-1-il)metanona), 5F-UR-

144 ([1-(5-fluoropentil)indol-3-il]-(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)metanona), JWH-018 (naftalen-1-il-(1-pentilindol-3-il)metanona), JWH-122 ((4-metilnaftalen-1-il)-(1-pentilindol-3-il)metanona), UR-144 ((1-pentilindol-3-il)-(2,2,3,3-tetrametilciclopropil)metanona) e APINACA (*N*-(1-adamantil)-1-pentilindazole-3-carboxamida). A figura 7.1 apresenta a estrutura química, assim como os log K_{OW} destes compostos.

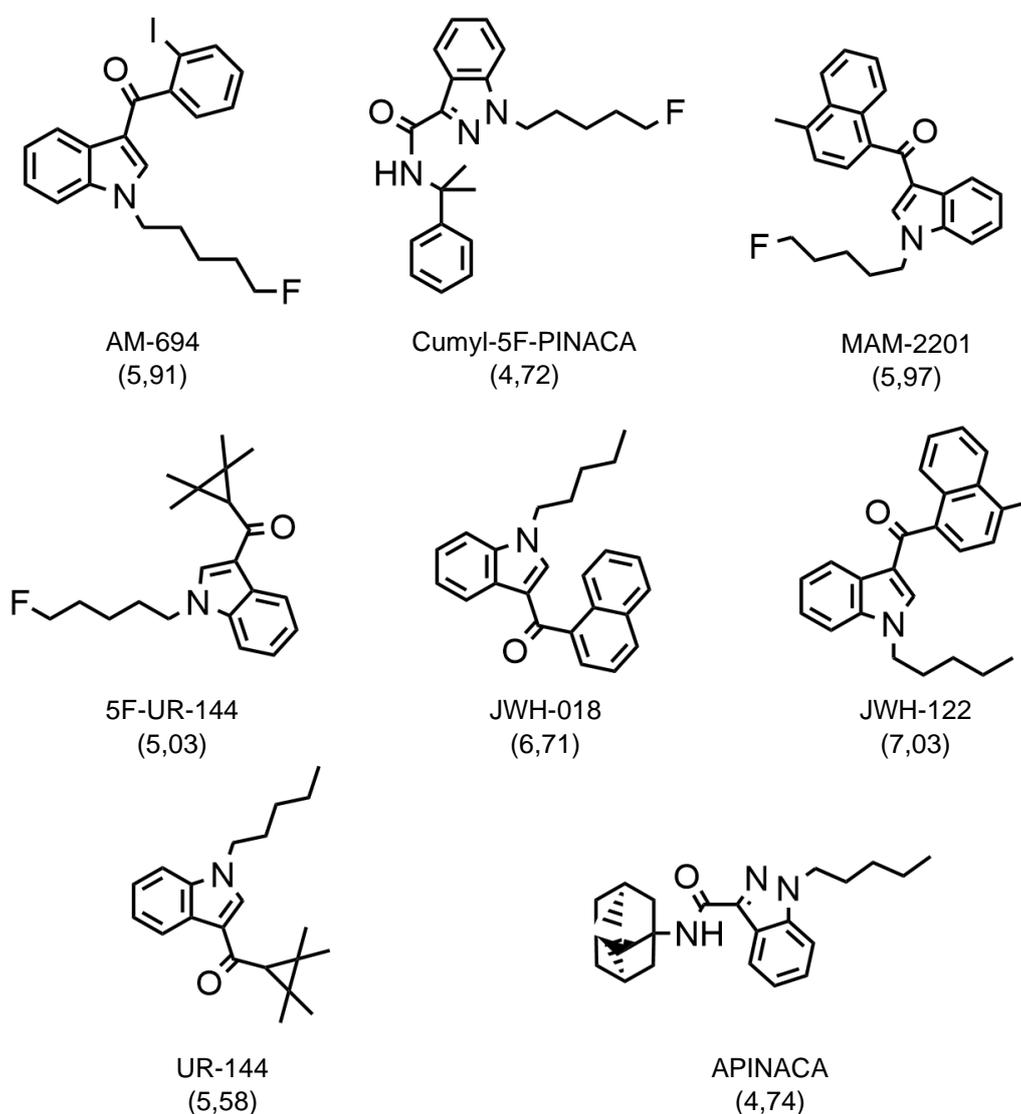


Figura 7.1 – Estruturas químicas e log K_{OW} (em parênteses) dos CSs estudados. Software específico foi usado para prever as propriedades físico-químicas, assim como a estrutura das moléculas: Marvin 6.2.2, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

7.2 Resultados e discussão

7.2.1 Otimização instrumental

O primeiro passo do trabalho foi estabelecer as condições instrumentais adequadas para a análise dos compostos alvo. Nesse sentido, foram injetadas soluções de trabalho de cada analito, usando o comprimento de onda de 302 nm, uma vez maximizar a razão S/N instrumental para cada composto em estudo. O sistema HPLC-DAD demonstrou uma boa resposta nas condições cromatográficas utilizadas para a separação dos CSs em estudo, resultando num tempo de análise inferior a 16 min. A calibração instrumental foi realizada através da injeção de soluções padrão contendo concentrações compreendidas entre 40,0, 60,0 ou 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (dependendo do CS) e 5000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (dez níveis), na qual foi possível obter $r^2 \geq 0,999$. Os LODs e LOQs alcançados foram de 10,0-30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 30,0-100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente, para todos os CSs em estudo.

A precisão foi igualmente avaliada através de replicados de injeções com diferentes níveis de concentração, tendo-se obtido RSDs inferiores a 2,7 % (JWH-018).

7.2.2 Otimização do método analítico

Após o estabelecimento dos parâmetros instrumentais, prosseguiu-se com a otimização do processo de microextração e de retroextração empregando uma estratégia de otimização univariada, e usando 10 mL de água ultrapura fortificada (20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Ao contrário dos trabalhos anteriores, foi decidido diminuir o volume da matriz para 10 mL pois seria expectável um incremento da eficiência e/ou cinética de extração, uma vez o processo em causa ser de equilíbrio, seguindo um processo similar a SPME(PDMS) [7,8]. Seguindo o racional dos trabalhos descritos nos capítulos antecedentes, estudaram-se diversos parâmetros incluindo a seletividade do sorvente, o tempo de microextração, a velocidade de agitação e as propriedades da matriz (pH, polaridade e força iónica), bem como o solvente para microdessorção líquida e o tempo de sonicação, de acordo com trabalhos anteriores [9–12].

7.2.2.1 Seleção da fase sorvente

Numa primeira abordagem, estudou-se a seletividade de 5 polímeros diferentes para a microextração dos CSs em estudo (figura 7.2), sob as seguintes condições experimentais; microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; μ LD, ACN (100 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico.

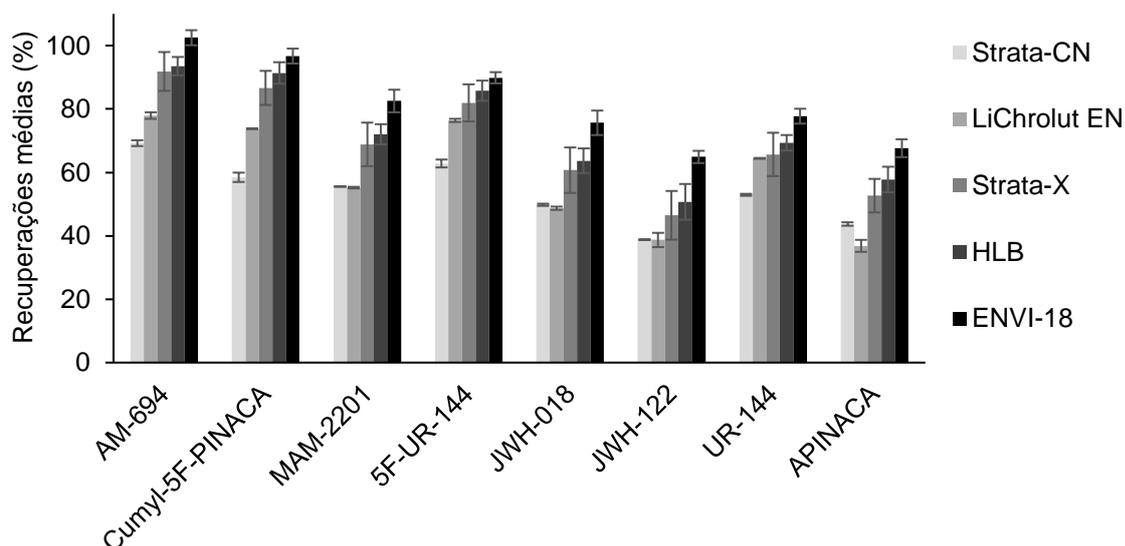


Figura 7.2 – Efeito da seletividade de vários sorventes para a microextração dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, ACN (100 μ L), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Todos os polímeros estudados retêm os compostos em meio aquoso por interações do tipo fase reversa, particularmente através de interações hidrofóbicas. Por outro lado, LiChrolut EN, Strata-X e HLB, permitem ainda a ocorrência de interações do tipo π - π , dipolo-dipolo e de ligações de hidrogênio. O polímero Strata-CN, para além de permitir este tipo de interações, também possibilita a retenção de compostos mais polares devido à presença de grupos ciano na sua estrutura química. Os dados mostram que ENVI-18 foi o sorvente que apresentou melhores recuperações, tendo sido escolhido para a próxima etapa do trabalho. Este fenómeno aparenta ser devido à presença de grupos octadecilo (C18) no polímero, que possivelmente apresentam interações hidrofóbicas muito favoráveis com as cadeias alifáticas presentes em todos os

compostos estudados (figura 7.1). Por outro lado, os CSs apresentam características apolares ($4,52 < \log K_{O/W} < 7,03$), o que sugere a ocorrência de retenção mais favorável para estes compostos por parte do referido polímero.

7.2.2.2 Etapa de retroextração

Após os parâmetros instrumentais definidos, e avaliado o sorvente que apresentou maior seletividade, deu-se início à otimização da extração por BA μ E(ENVi-18)- μ LD. Entre os parâmetros que podem afetar a μ LD, estudou-se o solvente (MeOH, ACN, EtOH, 1-PrOH e 2-PrOH) e o tempo de retroextração (5, 15, 30, 45 e 60 min). Este último constitui um passo de extrema importância, uma vez dever ser selecionado o solvente apropriado para promover a completa dessorção dos analitos do sorvente, sob tratamento ultrassônico. Os resultados indicaram que, geralmente, não ocorreram diferenças substanciais no uso dos diferentes solventes para a dessorção dos CSs alvo (figura 7.3). Desta forma, foi selecionado ACN para estudos posteriores uma vez ser um dos solventes usados como eluente no sistema cromatográfico. Adicionalmente, 15 min de sonicação pareceram ser suficientes para dessorver completamente os compostos em estudo (figura 7.4).

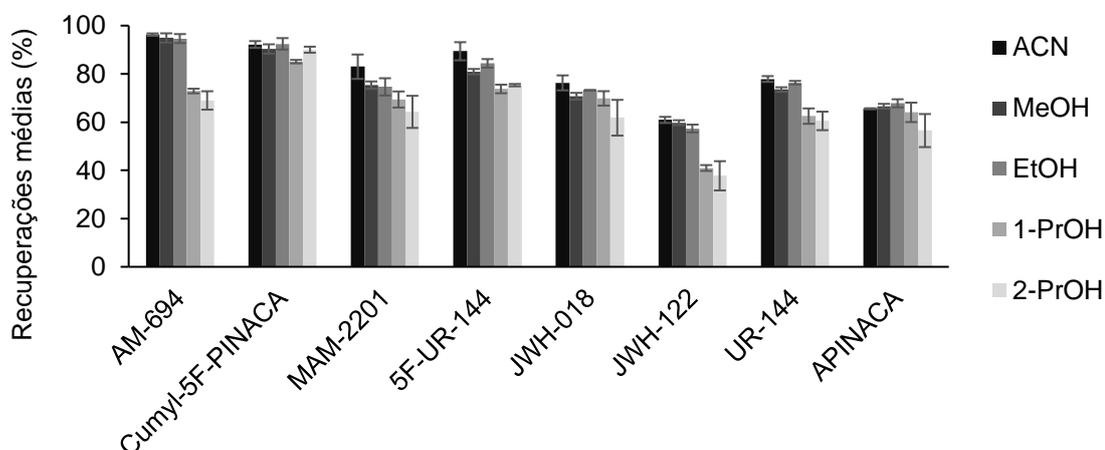


Figura 7.3 – Efeito da variação do solvente na retroextração dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 100 μ L, 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

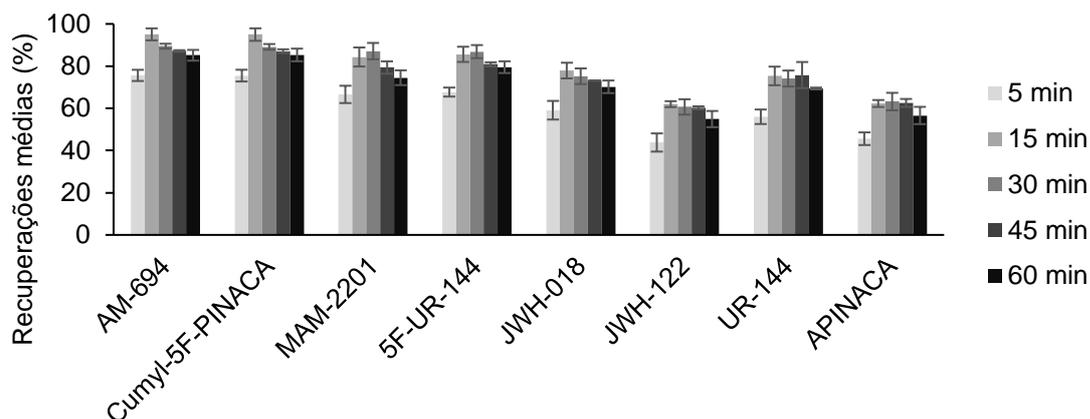


Figura 7.4 – Efeito da variação do tempo na retroextração dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, ACN (100 μ L), tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

7.2.2.3 Etapa de microextração

Depois da etapa de retroextração, prosseguiu-se com a avaliação das características da matriz, nomeadamente o pH, a força iônica e a polaridade na recuperação dos CSs em estudo. O pH normalmente assume grande importância uma vez determinar a ionização dos analitos, podendo afetar a afinidade dos mesmos com o sorvente. Foram testados diferentes valores de pH (2,0; 5,5; 8,0 e 11,0) tendo sido concluído que o mesmo não afeta as eficiências de extração dos compostos em estudo (figura 7.5). Este resultado era expectável, uma vez os compostos em causa não ionizarem naqueles valores de pH.

A polaridade da matriz pode ser modificada por intermédio da adição de um solvente orgânico, tendo-se usado MeOH (0 a 20 %, v/v). Através deste processo, os compostos apolares tornam-se mais solúveis na matriz, e assim evita-se a possível adsorção dos mesmos nas paredes do frasco de amostragem durante a microextração (“*wall effect*”). De uma forma geral, os dados obtidos demonstraram um acréscimo de recuperação média até aos 10 % de MeOH, não se obtendo vantagens significativas para maiores concentrações (figura 7.6). Este resultado foi igualmente esperado, uma vez os compostos em estudo apresentarem características apolares ($4,52 < \log K_{OW} < 7,03$; figura 7.1).

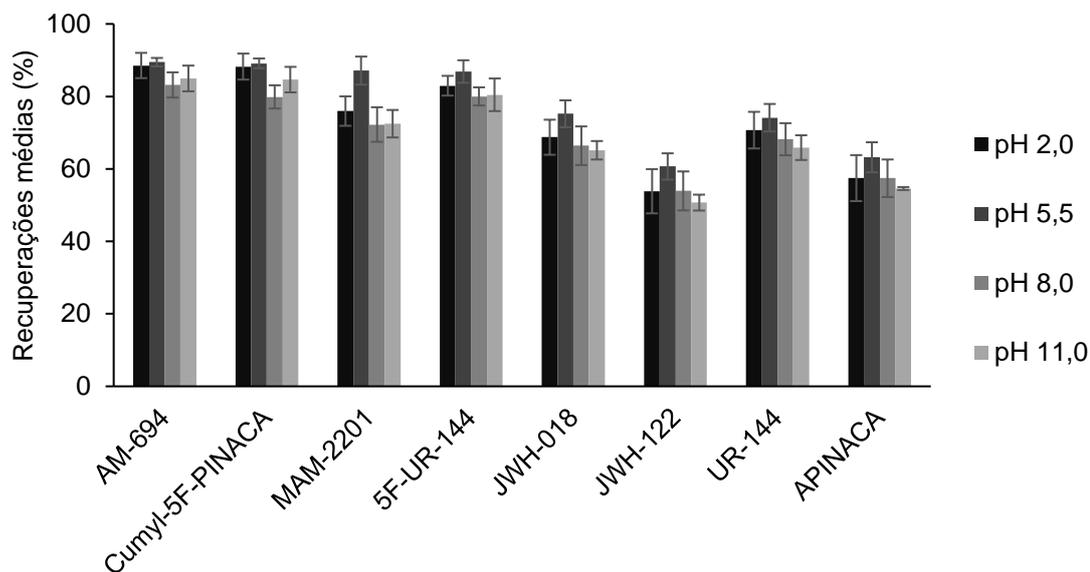


Figura 7.5 – Efeito da variação do pH da matriz no enriquecimento dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm); retroextração, ACN (100 μ L), 15 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

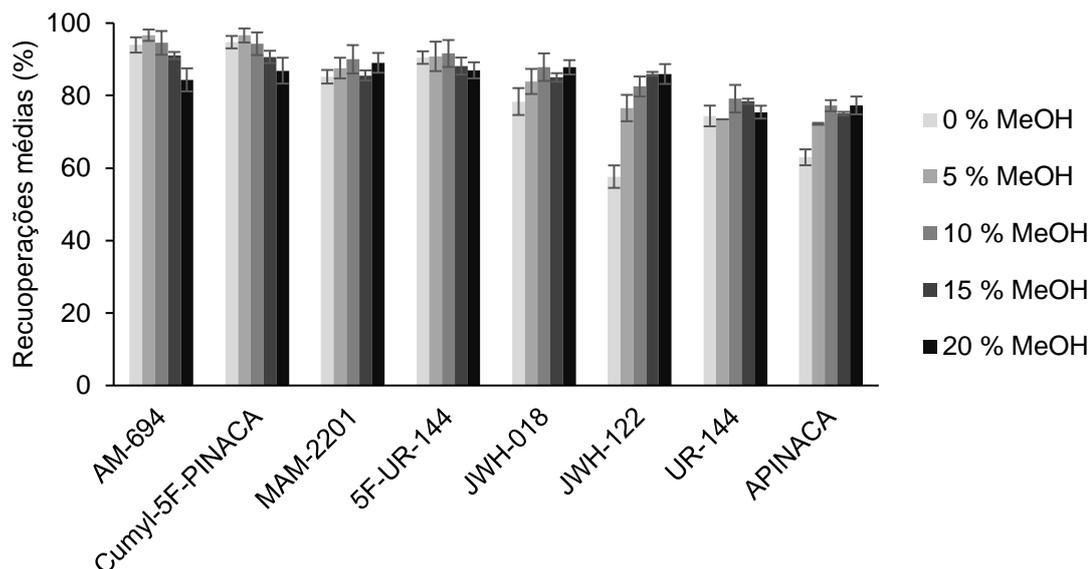


Figura 7.6 – Efeito da variação da polaridade da matriz na microextração dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, ACN (100 μ L), 15 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Finalmente, avaliou-se a força iônica. A adição de um eletrólito à matriz normalmente diminui a solubilidade de compostos orgânicos, principalmente dos

mais polares, favorecendo a sua migração para o sorvente (“*salting out effect*”). Desta forma, a força iônica foi estudada por meio da adição de 0 a 20 % (p/v) de NaCl à matriz, tendo os resultados demonstrado que a adição de sal diminuía significativamente a recuperação dos compostos em meio aquoso (figura 7.7).

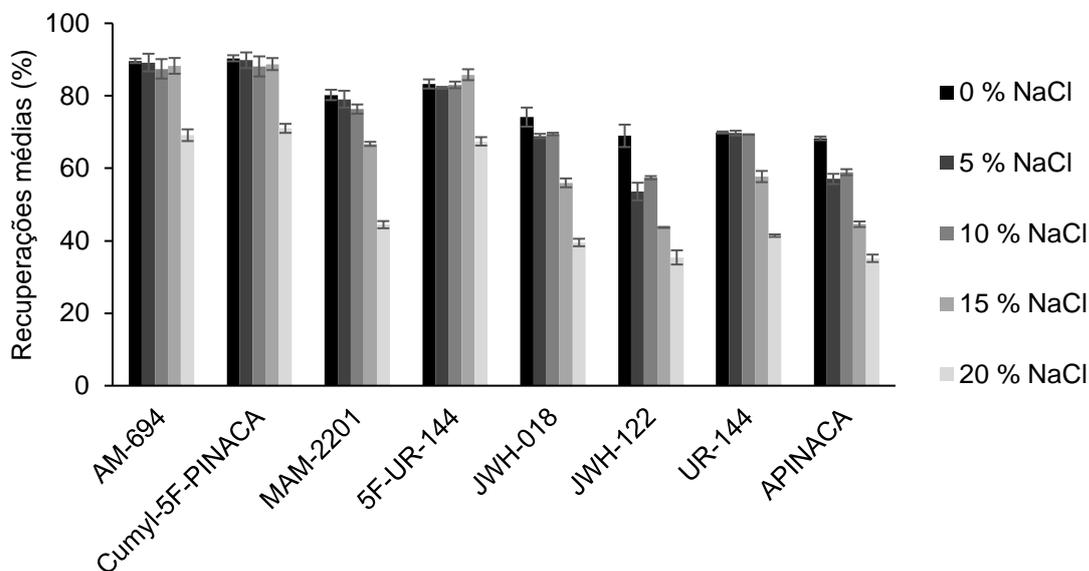


Figura 7.7 – Efeito da variação da força iônica da matriz na microextração dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, ACN (100 μ L), 15 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Posteriormente, foram avaliados os parâmetros que influenciam a cinética da extração, *i.e.*, tempo de equilíbrio e velocidade de agitação. Este último pode afetar a transferência de massa dos analitos para a fase sorvente. Velocidades de 750, 1000 e 1250 rpm foram testadas, tendo sido evitadas velocidades superiores, uma vez causarem elevada turbulência, levando à instabilidade do dispositivo, e assim afetar negativamente o processo de microextração. Os resultados indicaram que a 1000 rpm são observados melhores eficiências de extração, não tendo sido verificado vantagens adicionais para velocidades superiores (figura 7.8). O tempo de extração exerce grande influência no processo de microextração, uma vez limitar a cinética dos analitos entre a fase sorvente e a matriz. De entre os tempos estudados (1, 2, 3, 4, 5 e 16 h) concluiu-se que 3 h são suficientes para alcançar o equilíbrio, e assim maximizar as recuperações dos compostos em estudo.

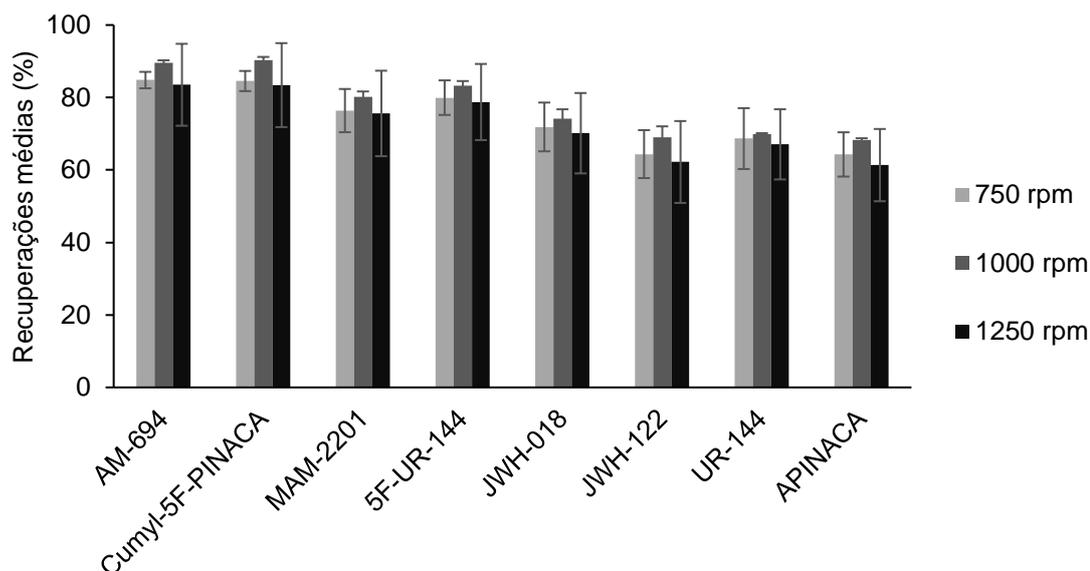


Figura 7.8 – Efeito da variação da velocidade de agitação na microextração dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BAμE-μLD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 3 h, pH 5,5, 10 % MeOH; retroextração, ACN (100 μL), 15 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

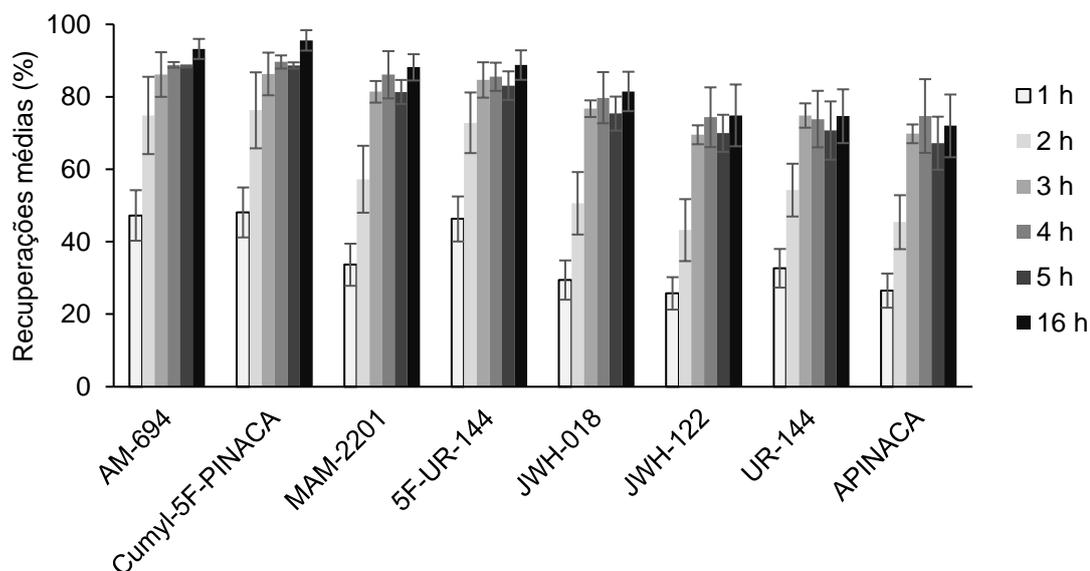


Figura 7.9 – Efeito da variação do tempo de microextração no enriquecimento dos CSs alvo em meio aquoso, obtido por BAμE-μLD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5, 10 % MeOH; retroextração, ACN (100 μL), 15 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

7.2.3 Validação do método analítico

Os parâmetros de validação encontram-se descritos na secção 3.6.5. seguindo o procedimento descrito na secção 3.6.6.2. Os resultados indicaram que foi possível obter um intervalo linear compreendido entre 20,0 (LLOQ) e 2000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os oito CSs em estudo, tendo resultado em r^2 compreendido entre 0,9969 (APINACA) e 0,9995 (5F-cumyl-PINACA), com RR \leq 14,9 % (APINACA). O método também não apresentou efeitos de *carryover*. Este parâmetro foi avaliado por análise de uma amostra de fluido oral em branco depois de ser injetado o padrão com concentração mais alta da curva de calibração, não apresentando picos para os analitos alvo.

A sensibilidade da metodologia foi verificada através dos LODs e LOQs calculados com S/N de 3/1 e 10/1, respetivamente. A metodologia desenvolvida permitiu obter LODs de 2,0 e LOQs de 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 5F-cumyl-PINACA, 5F-UR-144 e UR-144. Para AM-694, MAM-2201, JWH-018, JWH-122 e APINACA, os LODs e LOQs foram de 5,0 e 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente. A tabela 7.1 resume os bons resultados da repetibilidade (precisão intradia) e de precisão intermédia (precisão interdias), assim como de exatidão intra e interdias da metodologia desenvolvida.

Por forma a avaliar a seletividade da metodologia proposta, dez amostras de fluido oral em branco, obtidas de indivíduos que garantiram não ter consumido quaisquer drogas pelo menos 24 h antes da amostragem, foram testadas com recurso à metodologia proposta. Os resultados foram todos negativos para os analitos alvo, indicando que o método tem ainda a capacidade de excluir a interferência dos materiais endógenos de cada dador.

O efeito da matriz e a recuperação dos CSs em fluido oral foram ainda avaliados em sextuplicado empregando dois níveis de fortificação (50,0 e 300,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Conforme apresentado na tabela 7.2, a metodologia proposta mostrou excelentes recuperações médias (83,4 - 100,5 %, RSD \leq 13,3 %) e efeitos de matriz ($\leq \pm$ 10,81 %, RSD \leq 4,92 %) muito aceitáveis, indicando reduzida variação para a recuperação dos CSs ao usar matrizes com origem distinta.

Tabela 7.1 – Valores de repetibilidade (precisão intradia) e de precisão intermédia (precisão interdias), assim como de exatidão intra e interdias para os oito CSs em fluido oral, obtidas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

CS	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intradia		Interdias	
		Exatidão (RE, %)	Precisão (RSD, %)	Exatidão (RE, %)	Precisão (RSD, %)
AM-694	20,0	-2,6	7,7	2,4	3,0
	50,0	-1,41	7,02	-0,86	5,95
	300,0	-5,46	6,24	-3,88	5,22
	1000,0	10,10	4,67	6,26	4,78
5F-cumyl-PINACA	20,0	-13,6	8,4	5,8	14,7
	50,0	13,00	5,00	13,59	11,58
	300,0	3,02	6,66	1,87	5,95
	1000,0	8,44	4,79	9,68	5,59
MAM-2201	20,0	3,0	1,4	19,1	10,6
	50,0	-14,51	13,02	-7,95	11,16
	300,0	-13,80	9,01	-9,28	7,93
	1000,0	8,71	7,98	9,04	7,71
5F-UR-144	20,0	-3,3	15,5	-1,9	6,9
	50,0	-10,55	8,94	-4,97	7,92
	300,0	-10,04	6,57	-7,35	6,27
	1000,0	11,17	4,71	9,00	4,12
JWH-018	20,0	12,6	1,3	-2,0	19,0
	50,0	-12,22	14,94	-5,74	11,26
	300,0	-9,51	12,43	-1,44	11,04
	1000,0	9,05	10,81	4,42	9,14
JWH-122	20,0	-17,3	6,0	12,5	16,9
	50,0	-14,72	11,29	-14,37	9,23
	300,0	-12,10	13,55	10,40	7,96
	1000,0	-7,74	14,40	-1,78	7,96
UR-144	20,0	10,2	17,5	17,1	14,5
	50,0	-12,40	11,99	-11,32	7,96
	300,0	14,40	12,56	-11,63	8,66
	1000,0	6,70	10,45	1,95	8,81
APINACA	20,0	-3,5	13,5	-12,8	10,9
	50,0	-12,74	8,32	-9,89	5,69
	300,0	11,86	4,78	11,95	10,95
	1000,0	-12,39	14,39	-5,30	10,95

Tabela 7.2 – Efeito de matriz e recuperação para os oito CSs em fluido oral, usando dois níveis de fortificação, obtidas por BA μ E(ENVI-18)- μ LD/HPLC-DAD sob condições experimentais otimizadas.

CS	Efeito de matriz (%) \pm RSD (%)		Recuperação (%) \pm RSD (%)	
	50,0 μ g L ⁻¹	300,0 μ g L ⁻¹	50,0 μ g L ⁻¹	300,0 μ g L ⁻¹
AM-694	-8,73 \pm 1,84	0,35 \pm 0,79	95,63 \pm 4,70	97,82 \pm 1,65
5F-cumyl-PINACA	10,81 \pm 2,52	2,03 \pm 0,74	95,96 \pm 4,55	99,16 \pm 2,36
MAM-2201	-0,17 \pm 2,44	-1,39 \pm 0,79	97,39 \pm 4,69	99,49 \pm 5,96
5F-UR-144	0,27 \pm 3,29	0,24 \pm 0,75	98,08 \pm 4,75	100,45 \pm 3,88
JWH-018	-2,90 \pm 4,13	-3,07 \pm 0,40	91,90 \pm 9,03	92,42 \pm 9,25
JWH-122	-10,32 \pm 4,92	-4,79 \pm 1,92	91,35 \pm 8,38	88,43 \pm 12,39
UR-144	-3,94 \pm 2,69	-4,43 \pm 0,98	94,43 \pm 7,59	95,24 \pm 8,09
APINACA	-9,14 \pm 4,14	-8,80 \pm 0,63	87,90 \pm 13,31	92,74 \pm 13,19

7.2.4 Figuras de mérito

Diversos trabalhos foram publicados relativos à análise de CSs em fluido oral, principalmente com recurso a sistemas instrumentais como o LC/MS-MS [13–19]. Deve ser realçado que algumas destas aplicações empregam um passo de enriquecimento da amostra (por exemplo, LLE [15] ou SPE [18,19]) antes da análise instrumental. Contudo, estas técnicas usam grandes volumes de solvente orgânico, não tendo em conta os princípios da GAC [20]. A metodologia aqui proposta pode ser uma alternativa clara às referidas técnicas, uma vez empregar uma abordagem baseada em microextração estática para enriquecimento dos CSs estudados em fluido oral, resultando em 2,3 a 3,7 vezes menor uso de solvente orgânico [15,18,19]. A metodologia proposta não requer ainda passos adicionais de evaporação e/ou de mudança de solvente antes da análise instrumental [15–19]. Deve ser também mencionado que a técnica proposta apresenta excelentes recuperações (~ 100 %) quando comparadas com outros trabalhos publicados [15,16,18,19].

Conforme reproduzido na figura 7.10, a metodologia desenvolvida também apresenta seletividade adequada, não mostrando picos interferentes de compostos endógenos nos tempos de retenção dos canabinóides sintéticos selecionados. Contudo, para trabalhos futuros recomenda-se o estudo de compostos exógenos que possam interferir na seletividade do método, como já foi reportado por vários autores [15,16,18,19].

Embora a metodologia desenvolvida tenha sido totalmente validada para a gama linear compreendida entre 20,0 e 2000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, nenhum CS foi detetado ($< \text{LOD}$) nas amostras analisadas (10 amostras de fluido oral). Contudo, o método validado pode ser adequado para a análise destes compostos, uma vez os mesmos terem sido detetados em amostras de fluido oral com concentrações até 35,0 e 381,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para JWH-018 e JWH-122, respectivamente [16,19]. No entanto, é sugerido o uso de técnicas de MS em *tandem* (por exemplo, LC/MS-MS) para estudos posteriores, uma vez ser pretendido o aumento de seletividade e sensibilidade.

Tanto quanto nos é possível determinar, esta é a primeira aplicação com ênfase na análise de 5F-cumyl-PINACA e APINACA em fluido oral, assim como dos poucos trabalhos que emprega uma técnica de microextração para o enriquecimento de CSs em fluido oral.

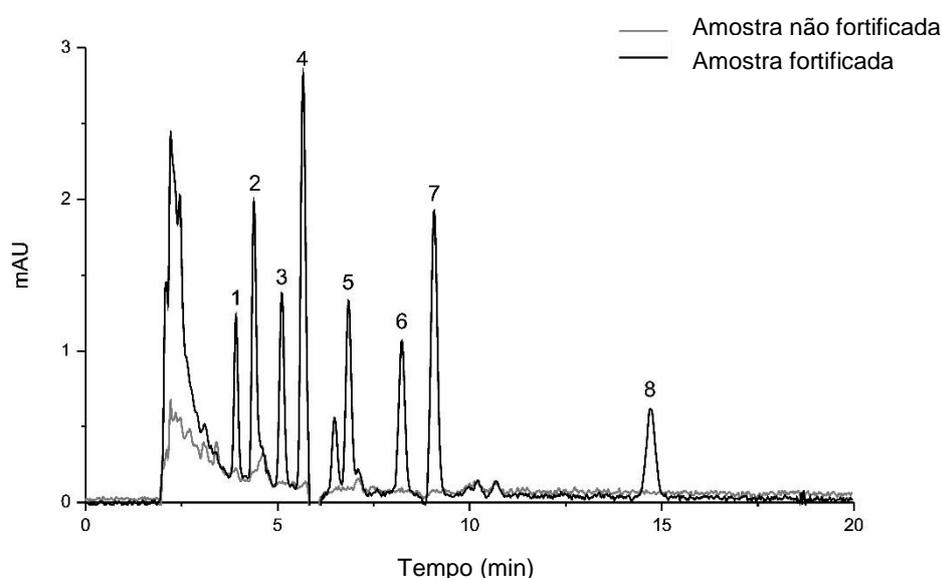


Figura 7.10 – Cromatogramas obtidos de ensaios realizados em amostras de fluido oral fortificadas ($50,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e não fortificadas, obtidas por BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. 1: AM-694; 2: Cumyl-5F-PINACA; 3: MAM-2201; 4: 5F-UR-144; 5: JWH-018; 6: JWH-122; 7: UR-144; 8: APINACA.

7.3 Conclusões

No presente trabalho realizou-se o desenvolvimento, otimização, validação e aplicação de um método inovador para determinação de CSs em fluido oral, com recurso à técnica de BAμE e análise por HPLC-DAD. O método proposto demonstrou seletividade e sensibilidade satisfatórias ao nível vestigial, para além da metodologia ser de fácil manuseamento e de baixo custo, requerendo volume reduzido de amostra.

Para estudos futuros, sugere-se a implementação da metodologia com a finalidade de monitorizar estas e outras substâncias de abuso emergentes numa gama mais alargada de matrizes (ex., sangue e urina) em contexto clínico, forense e de controlo anti-*doping*.

7.4 Referências

- [1] R. Lindigkeit, A. Boehme, I. Eiserloh, M. Luebbecke, M. Wiggermann, L. Ernst, T. Beuerle, *Forensic Sci. Int.* 191 (2009) 58–63.
- [2] I. Vardakou, C. Pistos, C. Spiliopoulou, *Toxicol. Lett.* 197 (2010) 157–162.
- [3] M.A. ElSohly, W. Gul, K.M. Elsohly, T.P. Murphy, V.L. Madgula, S.I. Khan, *J. Anal. Toxicol.* 35 (2011) 487–495.
- [4] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *European Drug Report 2019: Trends and Developments* (2019) Publications Office of the European Union, Luxemburgo
- [5] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *European Drug Report 2018* (2018) Publications Office of the European Union, Luxemburgo
- [6] H. Elmongy, M. Abdel-Rehim, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 83 (2016) 70–79.
- [7] J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. Sci.* 38 (2000) 270–278.
- [8] S.N. Semenov, J.A. Koziel, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 39–51.
- [9] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1348 (2014) 17–26.
- [10] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. B* 969C (2014) 35–41.
- [11] N.R. Neng, A.R. Silva, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7303–7310.
- [12] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 120 (2014) 126–134.
- [13] W.C. Rodrigues, P. Catbagan, S. Rana, G. Wang, C. Moore, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 526–533.
- [14] S. Strano-Rossi, L. Anzillotti, E. Castrignanò, F.S. Romolo, M. Chiarotti, *J. Chromatogr. A* 1258 (2012) 37–42.
- [15] M. Mazzarino, X. de la Torre, F. Botrè, *Anal. Chim. Acta* 837 (2014) 70–82.
- [16] S. Kneisel, M. Speck, B. Moosmann, T.M. Corneillie, N.G. Butlin, V. Auwärter, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 4691–4706.

- [17] S. Kneisel, M. Speck, B. Moosmann, V. Auwärter, *Drug Test. Anal.* 5 (2013) 602–606.
- [18] A. de Castro, B. Piñeiro, E. Lendoiro, A. Cruz, M. López-Rivadulla, *J. Chromatogr. A* 1295 (2013) 99–106.
- [19] C. Coulter, M. Garnier, C. Moore, *J. Anal. Toxicol.* 35 (2011) 424–430.
- [20] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84.

Capítulo 8

HT-BA μ E: Uma Nova Ferramenta Efetiva para a Monitorização de Benzodiazepinas num Elevado Número de Amostras Biológicas

S. M. Ahmad, J. M. F. Nogueira, High throughput bar adsorptive microextraction: A novel cost effective tool for monitoring benzodiazepines in large number of biological samples, *Talanta* 199

(2019) 195–202 [1]

8.1 Considerações gerais

Desde os anos 80 do século passado que os métodos de preparação de amostras mais extensivamente usados têm sido a SPE e a LLE [2]. Contudo, estas abordagens normalmente exigem vários passos analíticos, não sendo de fácil utilização, particularmente se estiver envolvido trabalho de rotina. Neste sentido, as técnicas de microextração têm demonstrado ser mais vantajosas por requererem menor manipulação, baixo volume de amostra e menor uso de solventes orgânicos. Do mesmo modo, técnicas de elevado rendimento, como a 96-blade SPME ou a PALME têm vindo a tentar contornar algumas destas limitações, tornando a preparação de amostra ainda mais simples e com a possibilidade de realizar até 96 microextrações em simultâneo [3,4]. Mesmo assim, para a primeira, são necessários *software* e *hardware* dedicados, tornando-se dispendiosa, sendo justificado apenas para um trabalho de rotina intensivo. Quanto à segunda, é mais dedicada para o enriquecimento de compostos de baixa polaridade ou iónicos. Neste contexto, a BA μ E surge como uma alternativa inovadora que permite, para além de um enriquecimento mais eficaz, a escolha do sorvente mais adequado para cada caso em particular, conduzindo a uma melhor resposta analítica [5,6], incluindo a análise de vários compostos prioritários em matrizes complexas, como são o caso das biológicas [7,8]. Contudo, esta abordagem apresenta ainda diversas etapas de manipulação que poderão ser ainda mais simplificadas. Por outro lado, são necessárias ferramentas analíticas de elevado rendimento sempre que os ensaios envolvam elevado número de amostras, bem como para uma tomada de decisão rápida.

Existe uma preocupação crescente com o consumo crónico e/ou agudo de psicofármacos para finalidade médica ou de outro tipo. Destas, destacam-se as benzodiazepinas (BZDs), que segundo dados do INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.), são as substâncias medicamentosas psicotrópicas mais consumidas em Portugal, sendo igualmente o país com um dos mais elevados consumos das mesmas ao nível da UE [9]. O consumo exacerbado destes fármacos deve-se ao facto de Portugal ser um dos países da UE com maior prevalência em perturbações da ansiedade, sendo estes compostos recomendados para o tratamento das mesmas devido aos seus

efeitos ansiolíticos, sedativos e até hipnóticos [10,11]. A razão destes fármacos serem largamente usados e abusados prende-se com a facilidade de prescrição, a sua baixa toxicidade e grande diversidade de indicações terapêuticas. Contudo, o consumo crónico das mesmas pode levar a habituação e tolerância, assim como dependência física e psíquica, podendo originar síndrome de privação. Outros sintomas de toxicidade do consumo exacerbado destas substâncias, principalmente em associação com opiáceos, barbitúricos ou álcool, são a sonolência, a fala arrastada, o nistagmo, a hipotensão, a ataxia, a depressão respiratória, o coma, ou a paragem cardiorrespiratória, podendo mesmo levar à morte [12,13].

Por estas razões, existe uma necessidade de abordagens analíticas inovadoras que permitam uma análise robusta e eficaz no controlo destas substâncias em matrizes biológicas, como o fluido oral, sangue, plasma, soro ou urina. Contudo, estes psicotrópicos são normalmente detetados nestas matrizes complexas ao nível de traço (< 1 ppm) ou ultratraço (< 1 ppb) [14–16]. Neste sentido, qualquer análise instrumental requererá um passo prévio de preparação de amostra para concentrar os analitos com interesse e minimizar a presença de compostos interferentes.

No presente trabalho é proposta uma nova configuração experimental, a microextração adsortiva em barra de alto rendimento (HT-BA μ E, do inglês *High-Throughput Bar Adsorptive Microextraction*), como ferramenta rápida, mais amigável do utilizador e do ambiente, para a microextração simultânea de até 100 amostras. O processo de enriquecimento é seguido pela retroextração simultânea das mesmas usando μ LD em combinação com análise por HPLC-DAD. A técnica apresentada foi desenvolvida, otimizada, validada e aplicada para a monitorização de oito BZDs (figura 8.1) em matrizes de urina, plasma e soro.

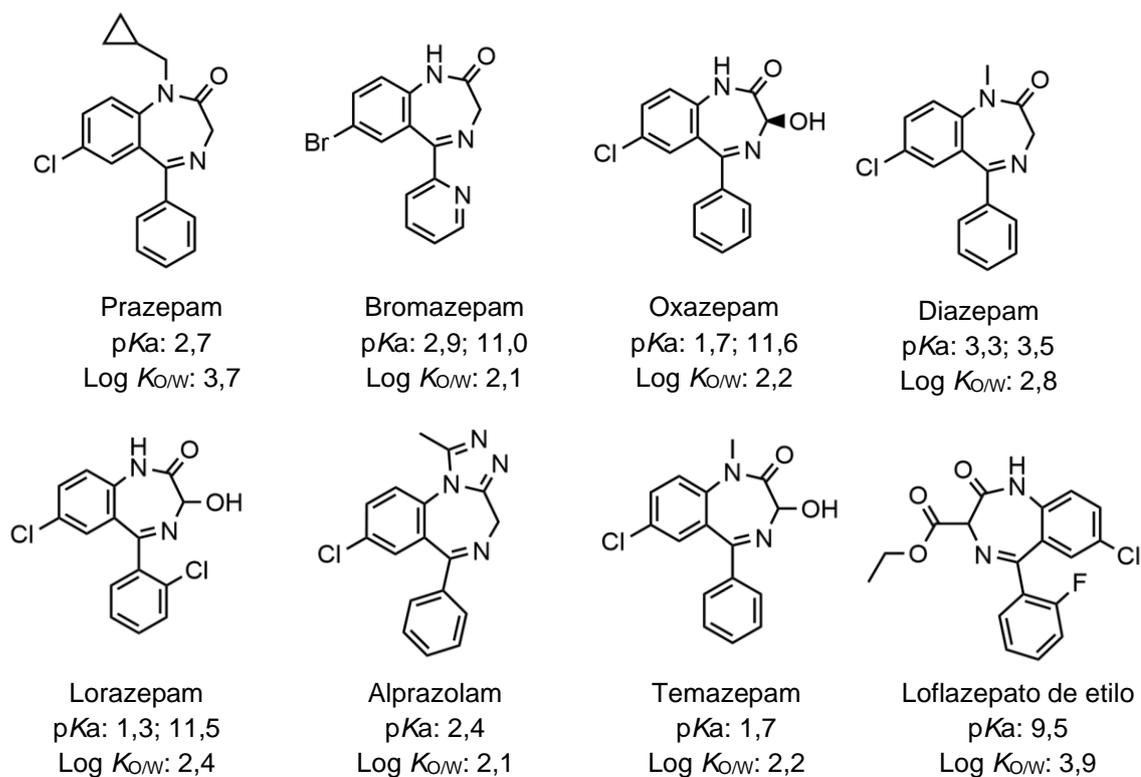


Figura 8.1 – Estruturas químicas, log K_{OW} e pKa das oito BZDs estudadas. Software específico foi usado para prever as propriedades físico-químicas, assim como a estrutura das moléculas: Marvin 6.2.2, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

8.2 Resultados e discussão

8.2.1 Otimização instrumental

O primeiro passo do presente trabalho foi estabelecer as condições instrumentais adequadas para a análise dos compostos alvo. Nesse sentido, foram injetadas soluções de trabalho individuais de cada analito, utilizando 254 nm como comprimento de onda, uma vez maximizar a razão S/N do instrumento para cada composto em estudo. Por forma a promover a melhor separação cromatográfica de todos os oito analitos-alvo, foram realizados diversos estudos tendo em conta a composição do solvente e o gradiente, bem como a temperatura da coluna e o volume de injeção. As condições instrumentais otimizadas de HPLC-DAD, conforme descrito na seção 3.6.1, resultaram numa boa separação para as oito BZDs em tempo analítico conveniente (< 20 min). A calibração instrumental foi realizada utilizando soluções padrão com

concentrações variando entre 60,0 e 10000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A partir dos dados instrumentais obtidos, foram observadas respostas lineares adequadas para os oito compostos em estudo, com $r^2 \geq 0,9997$ e resíduos $\leq 5,6\%$. A sensibilidade instrumental foi igualmente verificada através dos LODs e LOQs, obtidos através da injeção de padrões de calibração diluídos e calculados com um S/N de 3/1 e 10/1, respetivamente. Os LODs foram de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (bromazepam, alprazolam, diazepam e prazepam), 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (oxazepam, lorazepam e loflazepato de etilo) e 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (temazepam). Por outro lado, os LOQs instrumentais obtidos foram 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (bromazepam, alprazolam, diazepam e prazepam), 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (oxazepam, lorazepam e loflazepato de etilo) e 60,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (temazepam). Para avaliar a precisão instrumental, foram realizadas seis injeções consecutivas de uma mistura padrão (1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), resultando em RSD $\leq 1,4\%$.

8.2.2 Implementação de HT-BA μ E

A técnica BA μ E tem diversas vantagens, nomeadamente a simplicidade e a facilidade de utilização. Contudo, apresenta alguns aspetos a melhorar, *i.e.*, o número de ensaios a serem realizados em simultâneo é limitado ao número de pontos numa placa de agitação magnética, assim como requerer vários passos de manipulação até à análise instrumental. Neste sentido, o presente estudo visa o desenvolvimento e implementação de um novo *apparatus* e ciclo analítico por forma a simplificar a metodologia, assim como permitir o enriquecimento e posterior μ LD de até 100 amostras em simultâneo. Para tal, foi adaptada uma caixa de polipropileno de dimensões reduzidas por forma a acomodar até 100 frascos comuns para sistemas cromatográficos e permitir a fixação de dispositivos BA μ E convencionais na tampa deste *apparatus*, tal como descrito na secção 3.6.3.2. Usando esta nova abordagem, foi possível retirar rapidamente todos os dispositivos BA μ E dos frascos de amostragem após microextração sob ultrassons, sendo depois inseridos em *inserts* no mesmo *apparatus* para a respetiva μ LD de forma muito simples, permitindo menor manipulação. A figura 8.2 mostra o ciclo analítico proposto, no qual se observa uma abordagem muito simples, com manipulação muito reduzida, e, ao mesmo tempo, a obtenção de elevado rendimento.

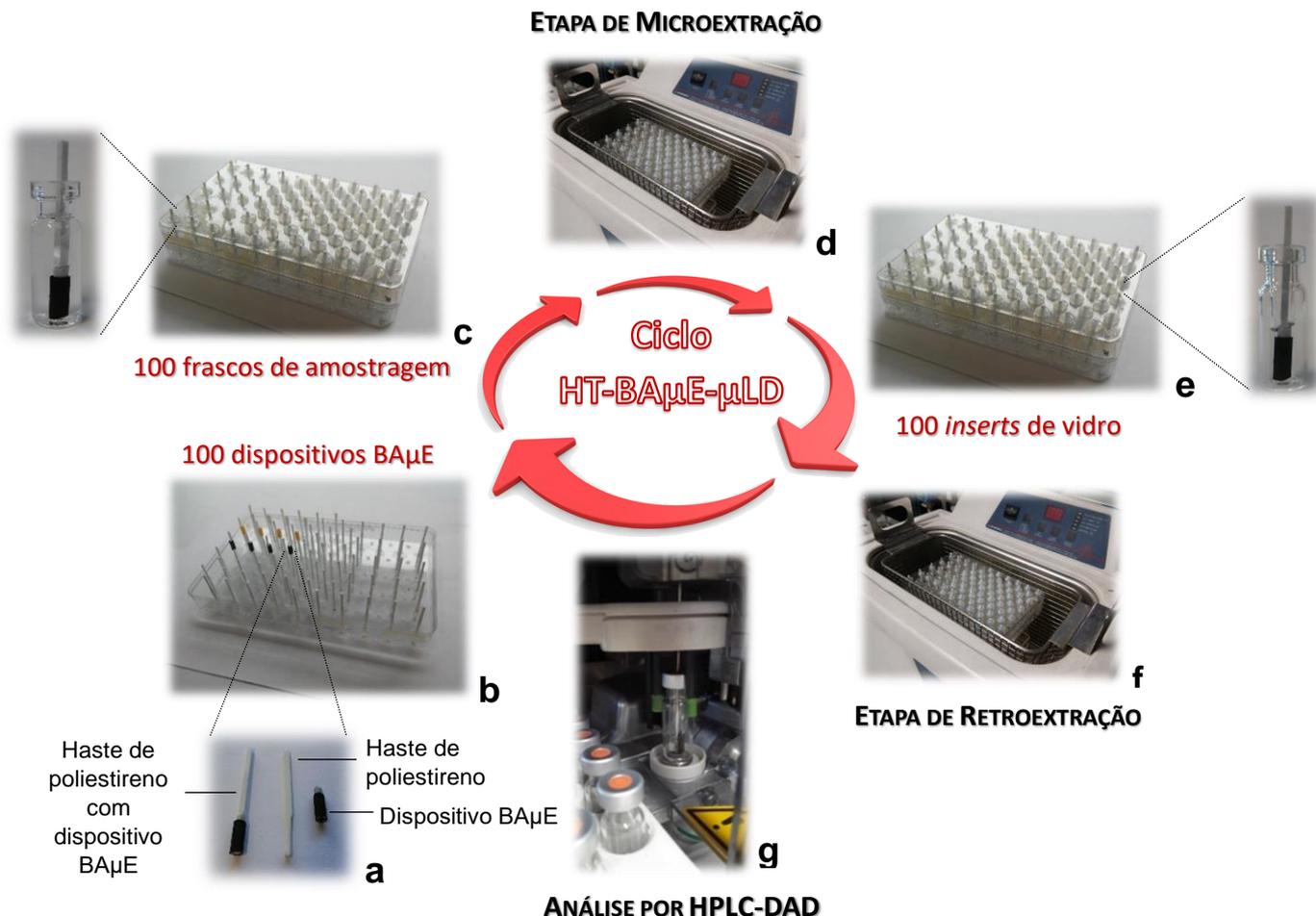


Figura 8.2 – Ciclo HT-BA μ E- μ LD proposto. Barra de poliestireno com ou sem um dispositivo BA μ E na parte inferior (a); O *apparatus* tem a possibilidade de acomodar até 100 dispositivos BA μ E (b); *Apparatus* fechado e contendo 100 frascos de amostragem prontos para a etapa de microextração (c); 100 microextrações simultâneas *via* cavitação em banho ultrassônico (d); *Apparatus* fechado e contendo 100 *inserts* colocados em frascos de vidro para a μ LD (e); 100 μ LD em simultâneo *via* cavitação em banho ultrassônico (f); Frascos fechados e prontos para análise por HPLC-DAD (g). O *apparatus* pode ser reutilizado após lavagem.

8.2.3 Otimização da metodologia

Numa primeira abordagem foram estabelecidas as condições experimentais que poderiam maximizar a resposta para os analitos selecionados usando a abordagem proposta. Foram realizados estudos sistemáticos, utilizando uma estratégia univariada, em amostras de água ultrapura fortificadas

a 300,0 μg L⁻¹, com o objetivo de otimizar vários parâmetros que poderiam influenciar a eficiência de HT-BAμE-μLD. Quanto à etapa de microextração, os parâmetros avaliados foram dez sorventes poliméricos com propriedades químicas distintas para o revestimento de BAμE, o pH (2,0; 5,5; 8,0 e 11,0), a força iônica (% de NaCl em meio aquoso a 5, 10, 15 e 20 %; p/v), a adição de modificador orgânico (% MeOH em meio aquoso a 5, 10, 15 e 20 %; v/v) e tempo de equilíbrio (de 30 a 150 min). No caso da etapa da retroextração, parâmetros como tempo de dessorção (de 15 até 90 minutos) e tipo de solvente (ACN, MeOH e ACN/MeOH, 50/50, v/v, Mix; 100 μL) foram igualmente avaliados, em concordância com trabalhos anteriores [5,17]. Os dados mostraram que dispositivos BAμE revestidos com copolímero de poliestireno e divinilbenzeno (Strata SDB-L) apresentaram, em média, melhores recuperações que os demais sorventes testados (figura 8.3).

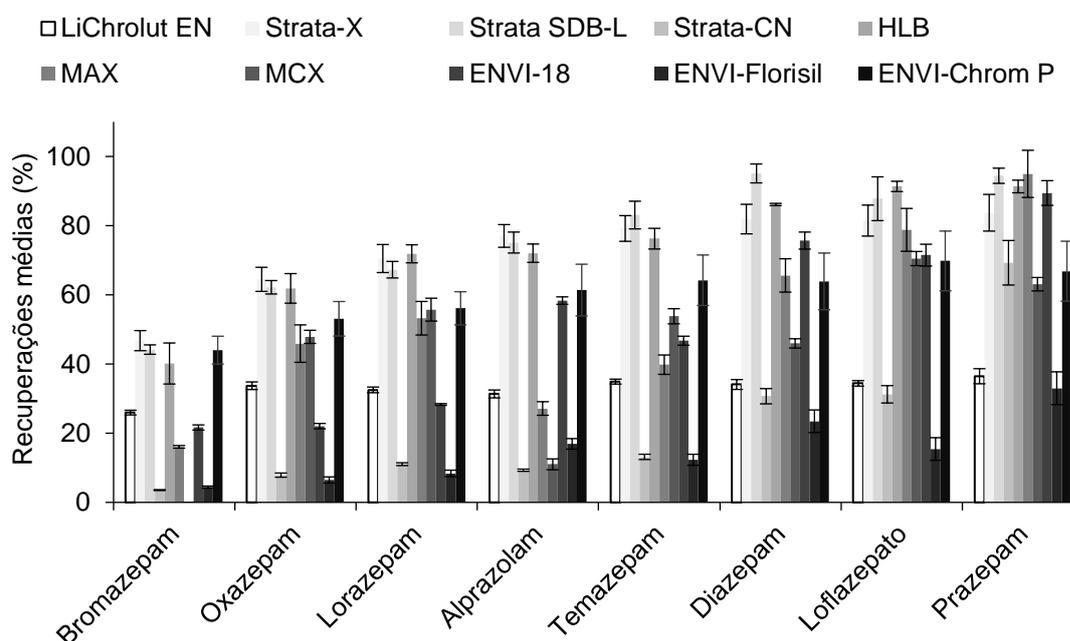


Figura 8.3 – Efeito da seletividade de vários polímeros na microextração das BZDs alvo em meio aquoso, obtido por HT-BAμE-μLD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 2 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μL), 30 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Este resultado era esperado uma vez o Strata SDB-L promover interações do tipo fase reversa, como interações π - π e hidrofóbicas, que normalmente favorecem a retenção de compostos contendo anéis aromáticos e com características semi-polares a não-polares ($\log K_{OW} > 2,0$), como é o caso das oito BZDs em estudo (figura 8.1).

Quanto à etapa de retroextração, os dados indicaram que as recuperações eram favorecidas usando Mix, com tempo de sonicação de 60 min (figura 8.4). Não se verificou melhorias significativas no aumento da sonicação até 90 min.

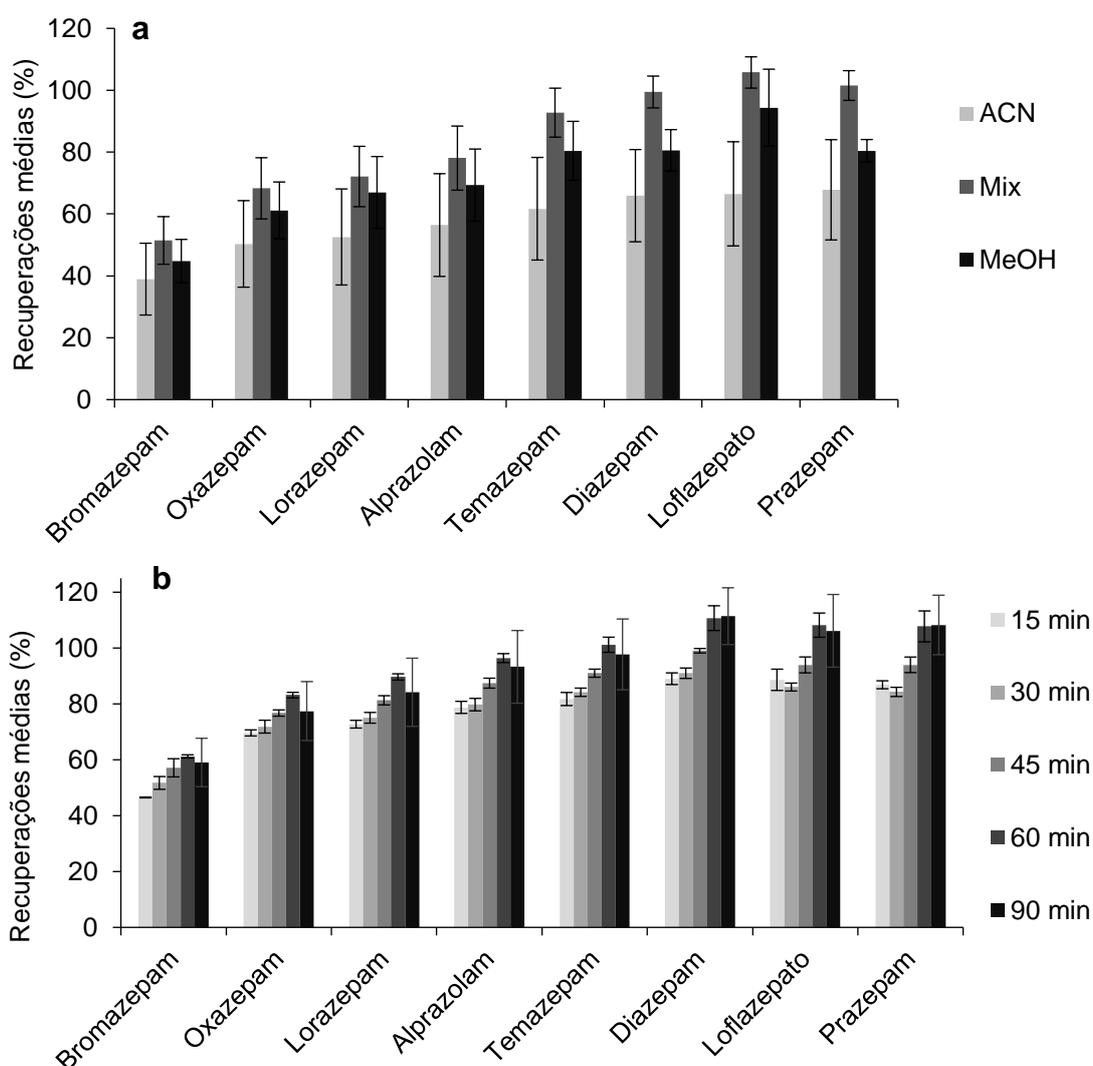


Figura 8.4 – Efeito da variação do solvente (a) e tempo (b) na retroextração dos BZDs alvo em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 2 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, 100 μ L. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Depois de escolhido o melhor sorvente, assim como as condições otimizadas para retroextrair as BZDs alvo, foi verificado como as condições da matriz poderiam influenciar a recuperações destes analitos. Neste sentido, foi variado o pH da matriz, bem como a sua força iônica e a polaridade, tal como descrito anteriormente. Os resultados indicaram que para valores de pH 2,0, as recuperações médias baixavam significativamente para todos os compostos, sendo que se manteve, de uma forma geral, inalterada para valores de pH compreendidas entre 5,5 e 11,0 (figura 8.5). Este resultado era esperado na medida em que a pH 2,0 todas as oito BZDs em estudo se encontrarem ionizadas ou parcialmente ionizadas (figura 8.1), não favorecendo as interações hidrofóbicas com o sorvente Strata SDB-L. Por outro lado, para os restantes valores de pH, estes compostos não se encontravam ionizados ou apenas parcialmente ionizados (figura 8.1), maximizando as interações com a fase.

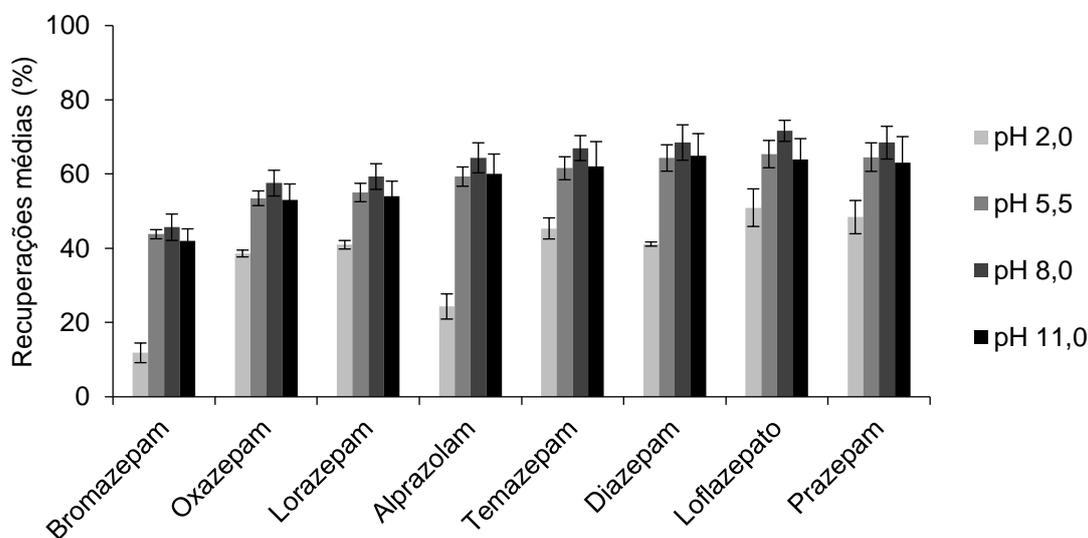


Figura 8.5 – Efeito da variação do pH da matriz no enriquecimento das BZDs alvo em meio aquoso, obtido por HT-BAμE-μLD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 1 h (1000 rpm); retroextração, Mix (100 μL), 60 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

A manipulação da força iônica, bem como da solubilidade da matriz, mostraram que a recuperação diminuía bastante para o primeiro (com adições sucessivas de NaCl) e que se mantinha inalterada para o segundo (com adições sucessivas de MeOH) - figura 8.6. O aumento da força iônica normalmente promove o aumento da eficiência de extração para compostos com polaridade

elevada ($\log K_{OW} < 2,0$). Por outro lado, o aumento da solubilidade da matriz normalmente favorece o enriquecimento de compostos mais apolares ou com baixa polaridade ($\log K_{OW} > 3,5$). Para ambos os casos, e de uma forma geral, tal não se verificou para as BZDs em estudo (figura 8.1).

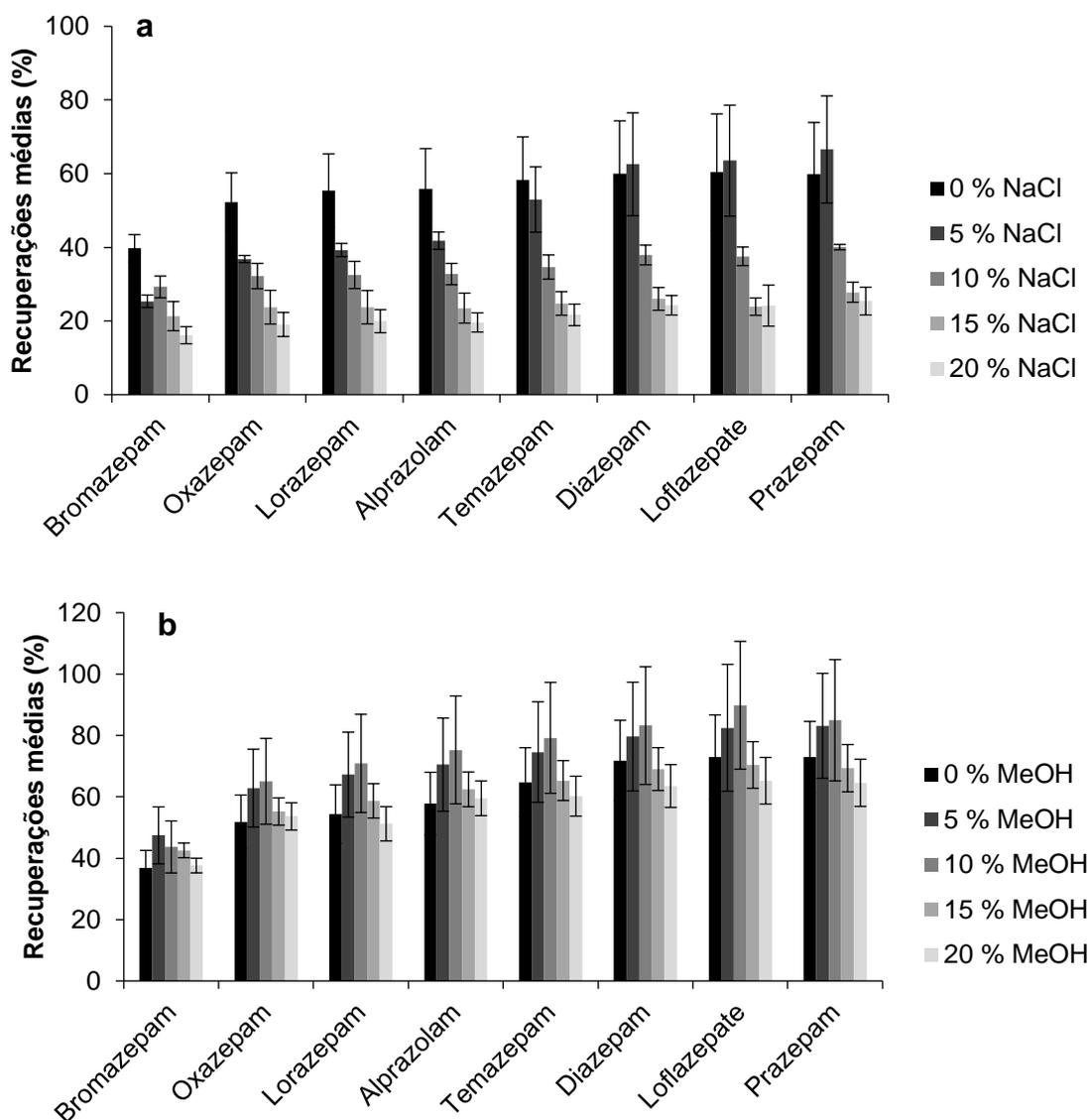


Figura 8.6 – Efeito da variação da força iónica (a) e da polaridade (b) da matriz na microextração das BZDs alvo em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 1 h (1000 rpm), pH 5,5; retroextração, Mix (100 μ L), 60 min sob tratamento ultrassónico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Por fim, testou-se o efeito do tempo de microextração para o enriquecimento das oito BZDs em água ultrapura. Os dados mostraram que 120 min foram suficientes para obter recuperações satisfatórias, não se tendo verificado vantagens recorrendo a 150 min de microextração (figura 8.7).

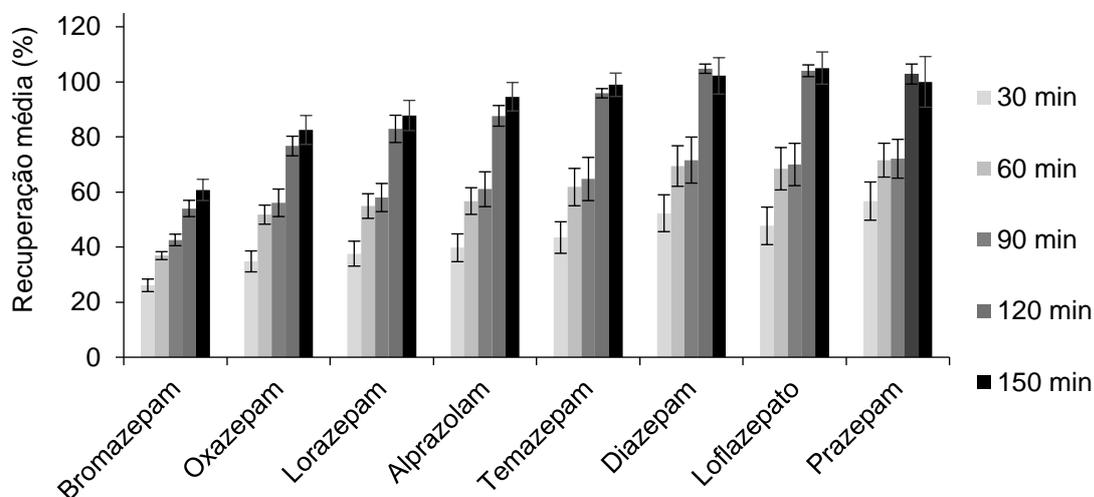


Figura 8.7 – Efeito da variação do tempo de microextração no enriquecimento das BZDs alvo em meio aquoso, obtido por HT-BAμE-μLD/HPLC-DAD. Condições experimentais: microextração, 1000 rpm, pH 5,5; retroextração, Mix (100 μL), 60 min sob tratamento ultrassônico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

8.2.4 Validação do método analítico

Após a otimização, procedeu-se à validação da metodologia proposta, conforme descrito na secção 3.6.5. Os LODs ($S/N \geq 3$) e LOQs ($S/N \geq 10$) obtidos para as oito BZDs variaram entre 2,0-30,0 e 8,0-90,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente, para as matrizes de urina, plasma e soro. Cada curva de calibração apresentou boa linearidade ($r^2 \geq 0,99$; resíduos $\leq 10,5$ %) na gama de 20,0-1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, 50,0-2000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 100,0-2000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as matrizes de urina, plasma e soro, respetivamente. A linearidade foi igualmente estimada empregando o teste “*lack-of-fit*” (intervalo de confiança de 95 %) e aplicado para todos os compostos nas três matrizes estudadas, na qual o F_{calc} foi sempre inferior ao F_{tab} . As recuperações médias para as oito BZDs nas três matrizes para dois níveis de fortificação foram de 36,8 a 104,5 % ($RSD \leq 14,7$ %) (tabela 8.1). O efeito de matriz variou entre 1,8 e 45,9 % (urina), de -7,8 e 8,5 % (plasma) e entre -4,8 e

37,0 % (soro) (tabela 8.2). Neste sentido, a urina foi a matriz que apresentou menos interferentes, seguido do plasma e do soro. Da mesma forma, as recuperações obtidas para as oito BZDs seguiram, de uma forma geral, esta ordem, tendo-se obtido melhores recuperações na urina do que no plasma e no soro. Por outro lado, os valores de precisão variaram entre -14,7 a 14,8 % (urina; $RSD \leq 15,0$ %), entre -14,9 e 14,3 (plasma; $RSD \leq 14,9$ %) e entre -14,7 e 14,6 % (soro; $RSD \leq 14,1$ %) (tabela 8.3). Esses resultados sugerem que a metodologia proposta apresentou precisão e exatidão aceitáveis para a monitorização de BZDs neste tipo de matrizes

Tabela 8.1 – Recuperações médias (\pm RSD %) alcançadas para as oito BZDs, usando dois níveis de fortificação, em urina, plasma e soro, obtidas por HT-BAμE-μLD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

BZD	Urina		Plasma		Soro	
	500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$
Bromazepam	53,9 \pm 10,5	62,8 \pm 8,9	43,3 \pm 2,5	53,8 \pm 14,0	46,9 \pm 14,6	51,6 \pm 9,8
Oxazepam	70,7 \pm 9,1	70,1 \pm 14,2	54,2 \pm 3,3	50,7 \pm 13,8	33,0 \pm 14,0	36,8 \pm 7,0
Lorazepam	75,9 \pm 8,8	73,5 \pm 12,8	61,3 \pm 3,2	65,8 \pm 13,3	36,1 \pm 13,7	39,5 \pm 7,2
Alprazolam	84,5 \pm 8,8	73,1 \pm 7,9	71,9 \pm 3,8	74,4 \pm 14,7	48,6 \pm 13,8	60,1 \pm 9,0
Temazepam	93,7 \pm 7,5	91,3 \pm 8,0	74,4 \pm 4,1	80,8 \pm 11,4	52,2 \pm 13,2	52,8 \pm 13,2
Diazepam	103,8 \pm 5,5	98,8 \pm 5,1	88,5 \pm 4,6	93,5 \pm 9,4	65,1 \pm 14,4	72,6 \pm 5,0
Loflazepato	102,7 \pm 5,6	96,2 \pm 10,5	39,2 \pm 5,0	40,5 \pm 7,9	41,9 \pm 12,4	43,0 \pm 7,6
Prazepam	104,5 \pm 5,4	101,7 \pm 7,7	95,0 \pm 4,3	103,7 \pm 7,2	69,1 \pm 14,2	65,4 \pm 4,8

Tabela 8.2 – Efeito de matriz (%) (\pm RSD %) alcançado para as oito BZDs, usando dois níveis de fortificação, em urina, plasma e soro, obtidas por HT-BAμE-μLD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

BZD	Urina		Plasma		Soro	
	500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$
Bromazepam	3,2 \pm 3,3	12,1 \pm 4,3	6,0 \pm 2,5	-5,4 \pm 8,0	7,9 \pm 4,6	-4,7 \pm 1,6
Oxazepam	4,8 \pm 2,1	8,9 \pm 3,1	8,5 \pm 0,9	8,5 \pm 8,4	11,4 \pm 1,2	15,0 \pm 5,6
Lorazepam	5,4 \pm 2,0	9,0 \pm 4,7	7,1 \pm 0,7	1,4 \pm 11,1	10,9 \pm 3,1	9,9 \pm 2,9
Alprazolam	5,7 \pm 2,6	20,4 \pm 7,0	1,6 \pm 0,5	8,2 \pm 10,7	2,7 \pm 2,7	13,4 \pm 2,0
Temazepam	5,5 \pm 2,5	15,7 \pm 2,5	6,9 \pm 1,0	-1,3 \pm 12,8	9,1 \pm 3,9	7,5 \pm 2,5
Diazepam	15,4 \pm 4,7	45,9 \pm 2,3	5,5 \pm 2,0	4,7 \pm 15,3	7,5 \pm 2,7	16,9 \pm 2,4
Loflazepato	7,1 \pm 3,2	16,5 \pm 5,6	8,4 \pm 1,6	2,3 \pm 8,0	18,1 \pm 2,3	37,2 \pm 1,6
Prazepam	1,8 \pm 2,6	9,9 \pm 2,7	1,5 \pm 1,0	-7,8 \pm 14,7	9,8 \pm 1,9	28,4 \pm 2,9

8. HT-BAμE: ferramenta para a análise de benzodiazepinas em número elevado de amostras

Tabela 8.3 – Valores exatidão (%) intra ($n = 6$) e interdias ($n = 18$), assim como de repetibilidade e precisão intermédia (\pm RSD, %) alcançadas para as oito BZDs em urina, soro e plasma, obtidas por HT-BAμE-μLD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Os níveis de fortificação “LLOQ”, “baixo”, “médio” e “alto” foram de 20,0, 50,0, 100,0 e 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em matrizes de urina, 50,0, 100,0, 200,0 e 1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para matrizes plasma e 100,0, 200,0, 500,0 e 1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para matrizes soro, respetivamente.

BZD	Urina		Plasma		Soro		
	Intradia	Interdia	Intradia	Interdia	Intradia	Interdia	
Bromazepam	LLOQ	0,1 ± 13,9	-6,8 ± 11,0	13,7 ± 3,5	12,9 ± 3,9	-1,0 ± 5,3	8,6 ± 9,0
	Baixo	-3,2 ± 5,3	13,9 ± 7,0	6,0 ± 13,9	-3,8 ± 6,1	14,4 ± 7,5	-13,5 ± 7,1
	Médio	7,7 ± 10,1	-3,3 ± 7,3	1,6 ± 10,0	13,4 ± 10,7	-12,7 ± 6,0	3,6 ± 3,9
	Alto	-1,8 ± 14,7	-11,5 ± 10,9	2,8 ± 2,5	3,5 ± 2,3	1,5 ± 7,6	3,6 ± 4,0
Oxazepam	LLOQ	-14,7 ± 6,9	-4,5 ± 8,8	-10,0 ± 13,9	-14,0 ± 13,3	-11,7 ± 7,5	9,9 ± 1,8
	Baixo	3,3 ± 7,7	6,0 ± 1,2	8,5 ± 14,4	-13,3 ± 13,6	8,8 ± 12,1	10,4 ± 8,8
	Médio	14,4 ± 11,3	1,8 ± 13,4	0,5 ± 5,8	8,7 ± 2,6	9,0 ± 10,4	-14,7 ± 2,8
	Alto	1,8 ± 8,4	-9,7 ± 1,0	6,8 ± 3,2	9,7 ± 4,9	6,6 ± 8,6	-9,3 ± 9,2
Lorazepam	LLOQ	-3,0 ± 4,5	13,3 ± 14,9	13,4 ± 12,9	13,0 ± 12,5	-12,9 ± 11,3	9,5 ± 7,9
	Baixo	4,1 ± 13,0	7,8 ± 1,0	13,5 ± 13,1	-4,2 ± 1,4	1,9 ± 9,9	4,0 ± 13,5
	Médio	5,9 ± 7,3	-7,3 ± 14,7	8,0 ± 13,3	-13,7 ± 14,6	6,7 ± 4,0	3,0 ± 5,1
	Alto	2,2 ± 8,2	14,1 ± 12,8	4,5 ± 3,2	8,3 ± 11,0	4,6 ± 7,8	9,5 ± 3,6
Alprazolam	LLOQ	-5,6 ± 4,3	-6,8 ± 12,8	11,3 ± 11,0	-14,7 ± 6,0	-10,2 ± 14,0	-12,7 ± 9,9
	Baixo	7,2 ± 14,8	6,3 ± 5,4	11,0 ± 6,9	9,8 ± 5,0	5,7 ± 7,5	-11,9 ± 8,0
	Médio	5,4 ± 11,6	-5,0 ± 7,2	11,0 ± 14,7	-13,0 ± 1,6	-13,0 ± 3,1	12,2 ± 13,1
	Alto	3,4 ± 11,7	-3,9 ± 4,8	4,3 ± 4,0	-3,7 ± 7,6	5,2 ± 8,6	-7,5 ± 2,3
Temazepam	LLOQ	3,2 ± 6,2	6,9 ± 13,9	9,1 ± 14,9	13,3 ± 12,4	-4,0 ± 10,8	-12,0 ± 7,0
	Baixo	-2,3 ± 7,9	4,5 ± 13,9	-6,3 ± 5,6	-10,5 ± 6,4	-1,5 ± 4,9	-8,3 ± 14,1
	Médio	12,9 ± 14,5	-12,6 ± 10,3	8,1 ± 11,4	13,0 ± 4,9	14,5 ± 1,9	4,7 ± 14,0
	Alto	11,8 ± 13,3	8,3 ± 11,0	2,7 ± 3,8	-13,8 ± 9,9	4,6 ± 11,8	-2,2 ± 1,3
Diazepam	LLOQ	14,1 ± 7,1	-4,8 ± 13,2	10,3 ± 12,7	-9,9 ± 12,1	4,9 ± 7,6	10,1 ± 6,7
	Baixo	10,5 ± 13,5	-7,2 ± 14,0	10,7 ± 8,9	11,2 ± 12,0	9,9 ± 11,5	-7,6 ± 7,7
	Médio	10,2 ± 10,2	5,3 ± 6,6	6,8 ± 9,4	10,9 ± 1,4	-5,9 ± 10,5	13,1 ± 6,3
	Alto	14,8 ± 11,9	-4,1 ± 12,1	0,1 ± 4,0	1,7 ± 5,2	2,1 ± 13,0	-6,7 ± 1,8
Loflazepato de etilo	LLOQ	-8,7 ± 15,0	-10,5 ± 6,9	-14,0 ± 14,2	13,7 ± 5,0	4,2 ± 13,5	8,3 ± 9,3
	Baixo	6,8 ± 13,7	7,5 ± 10,7	14,3 ± 10,5	7,9 ± 14,0	9,7 ± 10,8	-7,8 ± 11,5
	Médio	8,3 ± 8,2	-5,7 ± 8,1	-1,3 ± 7,9	5,2 ± 6,2	7,2 ± 14,1	14,6 ± 13,0
	Alto	13,5 ± 9,2	3,6 ± 3,3	5,0 ± 4,6	6,0 ± 8,5	9,5 ± 5,8	2,2 ± 1,3
Prazepam	LLOQ	-3,0 ± 11,0	14,3 ± 13,0	-14,9 ± 13,2	2,4 ± 14,1	11,8 ± 6,4	-1,0 ± 7,3
	Baixo	-1,9 ± 7,1	1,3 ± 12,1	10,4 ± 4,7	12,2 ± 5,0	10,9 ± 5,0	-5,0 ± 8,4
	Médio	13,8 ± 11,2	11,5 ± 11,1	9,8 ± 7,2	9,6 ± 3,2	13,2 ± 5,9	-7,9 ± 1,3
	Alto	13,3 ± 10,4	11,2 ± 13,5	-0,8 ± 5,1	12,1 ± 6,4	-1,0 ± 5,4	5,2 ± 7,5

8.2.5 Avaliação da metodologia HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD

Diversos trabalhos têm vindo a ser publicados relacionados com a determinação de BZDs em fluidos biológicos usando LLE ou SPE antes da análise por sistemas instrumentais como LC-UV ou LC-DAD [14,18–22]. Contudo, algumas destas abordagens não são, nem amigas do utilizador, nem do ambiente, uma vez exigirem diversos passos analíticos ou usarem quantidades consideráveis de solventes orgânicos, não tendo em conta os princípios da GAC [23]. Neste sentido, a metodologia proposta é de fácil utilização, uma vez requerer poucos passos analíticos, sendo a transição entre as etapas de sorção-dessorção realizada simultaneamente para até 100 amostras. Isto resulta num tempo total de preparação da amostra de cerca de 2 min com uso de apenas 100 μ L por amostra de um solvente orgânico. Esta melhoria foi conseguida através da introdução de um novo ciclo analítico (figura 8.2), o qual permitiu, de uma forma muito simples, promover a microextração e respetiva μ LD de até 100 amostras num *apparatus* com dimensões muito reduzidas, podendo ser colocado em banhos ultrassónicos convencionais.

As hastes de poliestireno usadas para a inserção dos dispositivos BA μ E foram igualmente avaliadas quanto às suas capacidades sortivas ($n = 6$), tendo sido observados traços negligenciáveis de BZDs. A possibilidade de qualquer contaminação destas barras para ensaios posteriores foi ainda avaliada, através da realização de uma μ LD subsequente, não tendo sido detetado nenhuma BZD ($< LODs$).

Um dos critérios estabelecidos para o sucesso do *apparatus* proposto foi a respetiva reutilização. Embora os dispositivos BA μ E tenham sido concebidos para utilização única, uma vez serem muito fáceis, rápidos e baratos de preparar [17], o *apparatus* proposto pode ser reutilizado (figura 8.2). Contudo, não é possível estimar até quantos ensaios pode ser empregado, embora tivesse sido aplicado para várias centenas de ensaios biológicos sem qualquer perda de desempenho.

Uma das questões que surgiu durante o desenvolvimento do método foi a consistência da eficácia da microextração entre diferentes posições dos frascos de amostragem no *apparatus*. Para avaliar esta situação, foram comparados os sinais das BZDs tendo em conta diferentes posições dos frascos de amostragem

no *apparatus*. Os resultados foram muito satisfatórios, uma vez nenhuma diferença ter sido observada.

Também deve ser enfatizado que o tamanho do *apparatus* é muito conveniente, uma vez encaixar em modelos de banho ultrassónicos convencionais, deixando espaço suficiente para um possível *apparatus* adicional a funcionar em simultâneo.

Em suma, o ciclo HT-BA μ E- μ LD proposto mostra notável robustez para o enriquecimento simultâneo de elevado número de amostras biológicas e tem potencial para ser empregado como ferramenta analítica de decisão rápida.

8.2.6 Comparação com outras técnicas de microextração

No presente trabalho, foi decidido comparar o desempenho da metodologia proposta com outras técnicas de microextração estática já estabelecidas [3,4,24–33]. Para este propósito, foram comparados os LODs, as recuperações e os tempos de preparação da amostra, estando resumidos na tabela 8.4. Como pode ser observado, a metodologia proposta compara-se favoravelmente em termos de recuperação com outras técnicas baseadas em microextração, nomeadamente a SPME [31,33], HF-LPME [24,27,29,30], DLLME [25] e extração dispersiva em fase sólida (SPDE, do inglês *Solid-Phase Dispersive Extraction*) [28]. Por outro lado, quando HT-BA μ E é comparado com outras abordagens de alto rendimento (ex., 96-Blade SPME [4,32] ou PALME [3]), as eficiências de extração são semelhantes ou muito superiores. Em relação aos LODs alcançados pela metodologia desenvolvida, é possível observar sensibilidade comparável ou melhor ao utilizar sistemas instrumentais similares, nomeadamente HF-LPME ou SPME combinadas com deteção por DAD ou UV [27,29,31]. Contudo, a presente metodologia mostrou LODs semelhantes ou superiores quando comparados a abordagens que empregam sistemas instrumentais de espetrometria de massa (MS) [30,33] ou espetrometria de massa em *tandem* (MS/MS) [3,4,25,28,32]. Este facto seria esperado uma vez tratar-se de instrumentação mais seletiva e sensível.

Tabela 8.4 – Comparação dos LODs, recuperações, precisão e tempo de preparação de amostra para as oito BZDs em estudo com outras técnicas de microextração.

Técnica de microextração	Sistema instrumental	Número de BZDs	Matrizes	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Tempo de preparação de amostra	Refs.
96-blade SPME	LC-MS/MS	4	Plasma	0,1-0,3	4,0-12,0	1,7 min/amostra ¹	[4]
		2	Plasma	0,1-0,3 0,2-0,4	5,3-6,7 1,5-1,8	1,5 min/amostra ¹ 2,5 min/amostra ¹	[32]
PALME	UHPLC-MS/MS	20	Sangue	0,1-5,0	> 52,0	0,67 min/amostra ¹	[3]
SPME	GC-MS	1	Plasma	1,0	n.a.	10 min/amostra ⁵	[33]
	HPLC-UV	5	Urina	46,0-750,0	n.a.	185 min/amostra ⁵	[31]
HF-LPME	HPLC-DAD	5	Plasma	3,0	90,0-98,0	5 min/amostra ³	[29]
			Urina	2,0	90,2-94,4		
	HPLC-UV	4	Urina	0,08-0,5	94,5-100,0	< 55 min/amostra ⁴	[24]
DLLME	LC-MS/MS	5	Sangue	n.a.	28,0-38,0	2 min/amostra ²	[27]
			28	Sangue	0,003-4,74	24,7-127,2	9 min/amostra ⁵
SPDE	LC-TOF/MS	9	Soro	1,0-10,0	89,6-110,4	~ 1 min/amostra	[28]
			Urina		88,7-105,5		
Online HF-LPME	HPLC-MS	2	Urina	0,2-0,5	89,0-102,0	50 min/amostra ⁵	[30]
			Plasma	0,3-0,7	n.a.		
HT-BA μ E	HPLC-DAD	8	Urina	2,0-5,0	53,9-104,5	1,8 min/amostra	Este estudo
			Plasma	15,0	39,2-103,7		
			Soro	15,0-30,0	33,0-72,6		

UHPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplado a espectrometria de massa de tripo quadrupolo (do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry); LC-TOF/MS: cromatografia líquida-espetrometria de massa por tempo de voo (do inglês Liquid Chromatography-Time-of-Flight/Mass Spectrometry)

n.a. Informação indisponível

¹ Extração de alto rendimento num sistema de enriquecimento de até 96 amostras em simultâneo

² Extração em paralelo, mas não de alto rendimento (30 ensaios em simultâneo numa placa magnética de várias posições)

³ Extração em paralelo, mas não de alto rendimento (10 ensaios em simultâneo numa placa magnética de várias posições)

⁴ Extração em paralelo, mas não de alto rendimento (número de ensaios em simultâneo não especificado)

⁵ Extração nem em paralelo, nem de alto rendimento

Deve ser enfatizado que a metodologia proposta compara-se favoravelmente ou tem um desempenho melhor que todas as outras abordagens de alto rendimento em termos de tempo de preparação de amostra por minuto [3,4,32]. Quando esta comparação se estende a técnicas de microextração convencionais, em geral, HT-BA μ E apresenta um desempenho ainda superior [25–31].

8.2.7 Aplicação a amostras reais

De modo a demonstrar a aplicabilidade da metodologia proposta, foram analisadas 30 amostras de urina, plasma e soro fornecidas por um laboratório de análises clínicas, por forma a monitorizar a presença das oito BZDs usando a metodologia proposta. Nenhuma informação foi disponibilizada relacionada com o sexo, idade e condições de saúde dos voluntários das amostras, ou se estes estariam a realizar algum tratamento com BZDs. Para além destas, foi igualmente analisada uma amostra de urina fornecida por uma mulher de 60 anos que estava a realizar tratamento com BZD (clorazepato dipotássico, Medipax® 5 mg, duas vezes ao dia). Deve ser enfatizado que as BZDs sofrem extensa biotransformação no corpo humano. O metabolismo das BZDs abrange três vias: hidroxilação, desmetilação e glucuronidação [16]. As reações de biotransformação das 1,4-BZDs como diazepam, prazepam e temazepam são principalmente metabolizadas e excretadas como oxazepam ou oxazepam glucuronídeo. Similarmente, o clorazepato dipotássico é metabolizado em oxazepam através do nordazepam. O oxazepam é o metabolito mais frequentemente encontrado na urina para a maioria das 1,4-BZDs [16]. Por esse motivo, foi necessária uma hidrólise enzimática dos compostos glucuronados em amostras de urina, como descrito na secção 3.6.6.2.

Os resultados mostraram que, para as 90 amostras analisadas, uma de plasma e duas de soro evidenciaram a presença de BZDs. A abordagem proposta detetou a presença de oxazepam e temazepam na amostra de plasma, não tendo sido possível quantificar (< LLOQ). Quanto às amostras de soro, uma acusou a presença de oxazepam (163,6 $\mu\text{g L}^{-1}$) e temazepam (88,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), e a outra, a presença de diazepam (207,9 $\mu\text{g L}^{-1}$). Os valores encontrados são

concordantes com os níveis terapêuticos descritos na literatura para tratamento com BZD (oxazepam: 0,14-0,56 mg L⁻¹; temazepam: pico de concentração compreendido entre 0,3 e 0,9 mg L⁻¹; diazepam: 0,1-2,5 mg L⁻¹) [20,34]. Para além disso, a urina da paciente submetida a tratamento com clorazepato dipotássico mostrou a presença de oxazepam (635,5 μ g L⁻¹), sendo concordante com os níveis encontrados na literatura [35,36]. Este resultado seria de esperar, uma vez oxazepam ser o principal metabolito do clorazepato dipotássico [16]. A figura 10 exemplifica os cromatogramas obtidos a partir de amostra de urina fortificada (500,0 μ g L⁻¹) e de uma amostra de urina positiva a oxazepam.

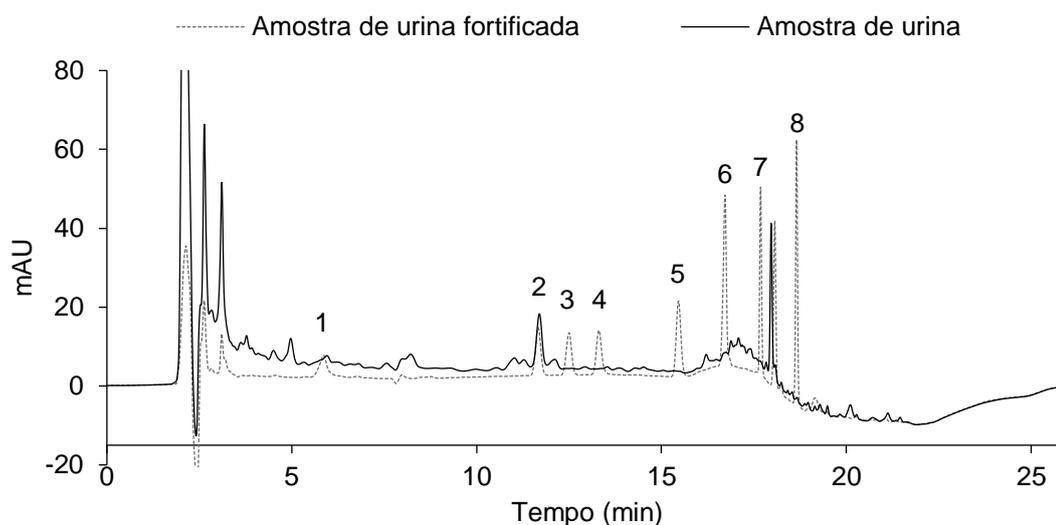


Figura 8.8 – Cromatogramas de obtidos a partir de ensaios realizados em amostra de urina fortificada (500,0 μ g L⁻¹) e real, obtidas por HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. 1 - Bromazepam; 2 - Oxazepam; 3 - Lorazepam; 4 - Alprazolam; 5 - Temazepam; 6 - Diazepam; 7 – Loflazepato de etilo; 8 - Prazepam.

8.3 Conclusões

A abordagem analítica proposta (HT-BA μ E- μ LD/HPLC-DAD) mostrou desempenho e eficácia notáveis, tendo como finalidade a monitorização de oito BZDs em elevado número de amostras biológicas.

O *apparatus* desenvolvido tem a possibilidade de acomodar até 100 frascos de amostragem em simultâneo para as etapas de microextração e de retroextração, resultando num tempo médio de preparação da amostra de apenas 2 minutos por amostra. Isto demonstra que a abordagem proposta é de fácil

utilização, apresenta excelente custo-benefício e tem grande potencial para o trabalho de rotina, sempre que as aplicações exijam uma rápida tomada de decisão.

8.4 Referências

- [1] S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 199 (2019) 195–202.
- [2] S. Mitra, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry* (2009), Nova Jersey, John Wiley & Sons.
- [3] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, M.P. Parmer, S. Pedersen-Bjergaard, *Bioanalysis* 5 (2013) 1377–85.
- [4] F.S. Mirnaghi, Y. Chen, L.M. Sidisky, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 83 (2011) 6018–6025.
- [5] N.R. Neng, A.R. Silva, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7303–7310.
- [6] J.M.F. Nogueira, *Anal. Chim. Acta* 757 (2012) 1–10.
- [7] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1348 (2014) 17–26.
- [8] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. B* 969C (2014) 35–41.
- [9] C. Furtado, Gabinete de Estudos e Projectos do INFARMED, *Psicofármacos: Evolução do consumo em Portugal Continental (2000 – 2012)* (2013) http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/psicofarmacos_relatorio2013+%281%29.pdf/3e52568f-7f90-47c8-9903-d128395c73e5.
- [10] Direção-Geral de Saúde, Direção de Serviços de Informação e Análise, *A Saúde dos Portugueses 2016* (2017) <https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/18278/1/A%20Saúde%20dos%20Portugueses%202016.pdf>.
- [11] Direção-Geral de Saúde, Direção de Serviços de Informação e Análise, *Portugal: Saúde Mental em Números – 2015* (2016) <https://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/portugal-saude-mental-em-numeros-2015-pdf.aspx>.
- [12] E.M. Kaplan, R.L. DuPont, *Curr. Med. Res. Opin.* 21 (2005) 941–950.
- [13] J. Donoghue, M. Lader, *Int. J. Psychiatry Clin. Pract.* 14 (2010) 78–87.
- [14] K. Borges, E. Freire, I. Martins, M. Desiqueira, *Talanta* 78 (2009) 233–241.
- [15] T. Blencowe, K. Vimpari, P. Lillsunde, *J. Anal. Toxicol.* 35 (2011) 349–356.
- [16] K. Persona, K. Madej, P. Knihnicki, W. Piekoszewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 239–264.
- [17] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 120 (2014) 126–134.
- [18] M.N. Uddin, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 31 (2008) 1258–1282.
- [19] V.F. Samanidou, A.P. Pechlivanidou, I.N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 679–687.
- [20] P. Fernández, C. Vázquez, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, I. Álvarez, P. Cabarcos, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 677–685.
- [21] L. Mercolini, R. Mandrioli, M. Amore, M.A. Raggi, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2619–2626.
- [22] M.-R. Rouini, Y.H. Ardakani, K. a Moghaddam, F. Solatani, *Talanta* 75 (2008) 671–676.
- [23] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84.

- [24] Z. Es'haghi, A. Nezhadali, S. Bahar, S. Bohlooli, A. Banaei, J. Chromatogr. B 980 (2015) 55–64.
- [25] M. De Boeck, S. Missotten, W. Dehaen, J. Tytgat, E. Cuypers, Forensic Sci. Int. 274 (2017) 44–54.
- [26] L. Vårdal, G. Wong, Å.M.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, E.L. Øiestad, Anal. Bioanal. Chem. 410 (2018) 4967–4978.
- [27] H.G. Ugland, M. Krogh, L. Reubsaet, J. Chromatogr. B 798 (2003) 127–135.
- [28] K. Saito, Y. Kikuchi, R. Saito, J. Pharm. Biomed. Anal. 100 (2014) 28–32.
- [29] F. Rezaei, Y. Yamini, M. Moradi, B. Daraei, Anal. Chim. Acta 804 (2013) 135–142.
- [30] A. Nazaripour, Y. Yamini, B. Ebrahimpour, J. Fasihi, J. Sep. Sci. 39 (2016) 2595–2603.
- [31] W.M. Mullett, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 74 (2002) 1081–1087.
- [32] F.S. Mirnaghi, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 1261 (2012) 91–98.
- [33] G. Frison, L. Tedeschi, S. Maietti, S.D. Ferrara, Rapid Commun. Mass Spectrom. 15 (2001) 2497–501.
- [34] A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material* (2011) Londres, Pharmaceutical Press.
- [35] S. Dunlop, K. Hayes, P. Leavy, D. Cusack, R. Maguire, J. Chromatogr. B 1064 (2017) 22–27.
- [36] L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, J. Chromatogr. B 616 (1993) 344–348.

Capítulo 9

HT-BA μ E: Aplicação para a Determinação de Nicotina e Cotinina em Amostras de Urina

S. M. Ahmad, J. M. F. Nogueira, High Throughput Bar Adsorptive Microextraction: Simple and effective analytical approach for the determination of nicotine and cotinine in urine samples, *Journal of Chromatography A*, *in revision*, referência CHROMA-S-19-02041.

9.1 Considerações gerais

Nas últimas décadas tem havido preocupação crescente com o consumo crônico e/ou agudo de compostos psicoativos tanto para finalidade médica como recreativa. Destas, destaca-se a nicotina. O consumo de tabaco é a principal causa de morte por cancro em todo o mundo. A nicotina (o principal alcaloide do tabaco) apresenta diversos riscos para a saúde. O seu consumo pode levar a risco acrescido de doenças cardiovasculares, respiratórias e gastrointestinais, incluindo enfarte agudo do miocárdio e doença pulmonar obstrutiva crônica [1]. Pode igualmente levar a diminuição da resposta imunológica, assim como apresentar impactos negativos sobre a saúde reprodutiva. Pode ainda afetar a proliferação celular, o *stress* oxidativo, a apoptose, e levar à mutação do ADN, promovendo o aparecimento de cancro. Afeta também a proliferação tumoral e de metástases, e causar resistência a agentes quimioterapêuticos e radioterapêuticos [2]. Adicionalmente, a exposição passiva ao fumo de tabaco ou a exposição ambiental ao fumo do tabaco (ETS, do inglês *Environmental Tobacco Smoke*) também aumentam o risco de cancro do pulmão e enfarte agudo do miocárdio em não fumadores [3].

A nicotina pode ser absorvida através da pele e do revestimento mucoso da boca e do nariz, ou por inalação nos pulmões por fumadores ativos ou passivos [4]. Uma vez absorvida, a nicotina é rápida e extensivamente metabolizada, principalmente em cotinina (70-80 %) [5]. A cotinina, com um tempo de semivida de 7-40 h, é o biomarcador de referência na urina para a exposição ao fumo do tabaco. A nicotina pode ser encontrada em concentrações muito mais baixas e tem um tempo de semivida muito mais curto: 2 a 3 horas. Como consequência, as concentrações de cotinina na urina dão uma boa indicação da exposição à nicotina nos 3 ou 4 dias anteriores à colheita da amostra [6]. Por exemplo, este biomarcador tem sido usado para determinar se uma pessoa é fumadora, para validar programas de abstinência, assim como para avaliar os níveis e a significância da exposição ao ETS [7].

Por estas razões, há necessidade de abordagens analíticas inovadoras que permitam uma análise robusta e eficaz destas substâncias em matrizes biológicas, como a urina. Contudo, estes compostos são normalmente detetados na urina a nível de traço (< 1 ppm) ou ultratraço (< 1 ppb) [8–15]. Neste sentido,

qualquer análise instrumental requererá um passo prévio de preparação de amostra para concentrar os analitos com interesse e minimizar a presença de compostos interferentes.

As técnicas de preparação de amostras contemporâneas têm-se focado na miniaturização do procedimento analítico, uma vez requererem menor manipulação, baixo volume de amostra e uso negligenciável de solventes orgânicos. Destas, destacam-se a micro-SPE (μ -SPE, do inglês *Micro-Solid Phase Extraction*) [8], a SPME [9,10], a MEPS [11,12], a HF-LPME[13], a DLLME [14] e a SDME [15]. No entanto, muitas destas abordagens não são dedicadas para a análise em rotina, pois continuam a necessitar de muitos passos analíticos e não permitem a preparação de várias amostras em simultâneo. Neste sentido, técnicas de alto rendimento, como a 96-Blade SPME ou a PALME têm vindo a tentar contornar algumas destas limitações, tornando a preparação de amostra muito mais simples e com a possibilidade de realizar até 96 microextrações em simultâneo [16,17]. No entanto, para o primeiro, é comum a ocorrência de efeitos de matriz pronunciados, especialmente quando a análise envolve amostras muito complexas (ex., fluidos biológicos), levando à redução de recuperação dos compostos alvo [18]. Por outro lado, este sistema é muito dispendioso, não sendo possível de adquirir numa boa parte dos laboratórios analíticos. Quanto a PALME, é uma técnica mais indicada para o enriquecimento de compostos iónicos ou com baixa polaridade. Adicionalmente, a quantidade de amostra é bastante limitada (200-300 μ L), podendo ser uma desvantagem para quem empregue sistemas instrumentais menos sensíveis, ex. HPLC-DAD. A membrana usada em PALME pode também apresentar propriedades de adsorção para proteínas (presentes em fluidos biológicos, ex., plasma) e assim aumentar a possibilidade dos analitos com interesse serem adsorvidos nas mesmas, comprometendo as eficiências de extração [19]. Recentemente, a técnica de alto rendimento de microextração em fase líquida suportada por fibra oca e assistida por ultrassons (H-U-HF-LPME, do inglês *High-Throughput Ultrasonication Enhanced Hollow-Fibre Liquid-Phase Microextraction*) foi aplicada para a análise de nicotina [20], tendo permitido o enriquecimento simultâneo de nicotina em até 24 amostras de plasma usando apenas 10 min de tempo de microextração. Contudo, a preparação e manipulação desta técnica é trabalhosa, sendo o número de microextrações possíveis em simultâneo

bastante limitado, fundamentalmente quando está envolvido trabalho de rotina. Neste prespetiva, a técnica introduzida no capítulo anterior, HT-HT-BA μ E [21], tenta contornar algumas destas limitações.

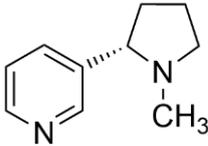
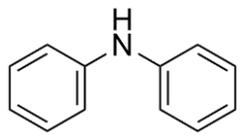
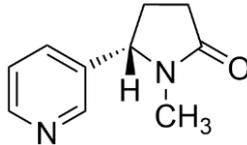
No presente trabalho é proposto o uso da técnica de HT-BA μ E para o processo de enriquecimento e subsequente μ LD de até 100 amostras. Esta técnica foi combinada com a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa operando no modo de monitorização de iões selecionados e com recurso a injeção de grandes volumes (LVI-GC-MS(SIM)) para a análise de cotinina e nicotina em matrizes de urina. A presente metodologia foi otimizada, validada e aplicada para monitorizar níveis destes dois compostos a partir de amostras obtidas da comunidade académica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL).

9.2 Resultados e discussão

9.2.1 Otimização instrumental

Numa primeira abordagem foi avaliada o padrão de fragmentação da nicotina, cotinina e difenilamina (PI), através da análise por GC-MS operando no do modo “*full-scan*”. Com base nas características dos dados espectrais de cada composto e comparando com a literatura, os picos base e os iões quantificadores foram selecionados por forma a alcançar maior seletividade e sensibilidade para operar o sistema instrumental em modo SIM. A monitorização em modo SIM permitiu obter boa sensibilidade e seletividade, em tempo de análise adequado (< 13 min). A fim de alcançar elevada sensibilidade para estudos experimentais posteriores envolvendo matrizes reais, recorreu-se a um injetor PTV, operando no modo “*solvent vent*” e usando LVI na análise por GC-MS(SIM). Neste sentido, foram definidos quantidades de injeção de 10 μ L uma vez volumes superiores levarem a um incremento da linha de base e, como tal, menor relação (S/N) durante a análise vestigial. A tabela 9.1 resume os resultados instrumentais para a separação e identificação dos dois compostos alvo, assim como as estruturas químicas e algumas propriedades físico-químicas dos mesmos.

Tabela 9.1 – Estruturas químicas, log K_{OW} e pK_a , assim como os tempos de retenção (t_R) e iões (m/z) selecionados para a nicotina e a cotinina, obtidos por LVI-GC-MS(SIM), sob condições instrumentais otimizadas.

Composto	Estrutura química	log K_{OW} ¹	pK_a ¹	t_R (min)	Iões (m/z) ²
Nicotina		1,16	2,70; 8,86	7,23	<u>84</u> , 133, 162
Difenilamina		-	-	9,12	83, 168, <u>169</u>
Cotinina		0,21	4,79	9,68	<u>98</u> , 119, 176

¹ Software específico foi usado para prever as propriedades físico-químicas, assim como a estrutura das moléculas: Marvin 6.2.2, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

² Iões de qualificação, incluindo o de quantificação (a sublinhado).

9.2.2 Otimização da metodologia

Numa primeira abordagem, diversos parâmetros foram avaliados por forma a alcançar o melhor desempenho de microextração para a nicotina e cotinina em matrizes aquosas, usando a metodologia HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). Os parâmetros avaliados foram: quatro sorventes poliméricos e três ACs com propriedades químicas distintas para o revestimento da BA μ E; o tempo de dessorção (15 até 90 min) e tipo de solvente (ACN, MeOH e ACN/MeOH, 50/50, v/v, Mix; 100 μ L); força iônica (% de NaCl em meio aquoso a 5, 10, 15 e 20 %; p/v); a adição de modificador orgânico (% MeOH em meio aquoso a 5, 10, 15 e 20 %; v/v); pH (2,0; 5,5; 8,0 e 11,0); e tempo de equilíbrio (30 a 180 min), usando uma abordagem de otimização univariada, em concordância com trabalhos anteriores [22–25].

Os dados mostraram que dispositivos BA μ E revestidos com CN1 apresentaram, em média, melhores recuperações para a cotinina que os demais sorventes testados (figura 9.1). Este resultado era esperado, uma vez a cotinina apresentar características muito polares ($\log K_{OW}$ 0,21; tabela 9.1), e este material mostrar boa seletividade para compostos com este tipo de propriedades físico-químicas, conforme previamente demonstrado [26]. Este facto pode ainda ser explicado pela presença de heteroátomos (ex., oxigénio) à superfície do material, bem como a ocorrência de cargas positivas ou negativas (dependendo do respetivo pH_{PZC} e do pH da matriz), associada à elevada área superficial ($1400 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), que promovem interações eletrostáticas e/ou dispersivas. Adicionalmente, a estrutura carbonada com diversos anéis benzénicos, pode promover interações π - π e hidrofóbicas. Neste caso em particular, CN1 apresenta carga superficial ligeiramente positiva ao pH testado ($pH_{amostra} > pH_{PZC}$), o que sugere promover maior adsorção para a cotinina. Para além disso, ao pH do ensaio (pH 5,5) os analitos alvo estão parcialmente protonados (tabela 9.1), o que pode favorecer as interações eletrostáticas resultantes.

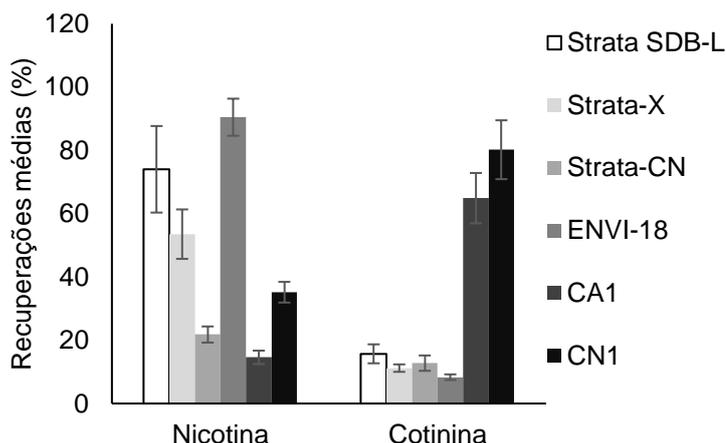


Figura 9.1 – Efeito da seletividade do sorvente para o enriquecimento de nicotina e cotinina em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). Condições experimentais: microextração, 120 min (sonicação), pH 5,5; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob tratamento ultrassónico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Os dados mostram que os sorventes poliméricos, que possibilitam interações do tipo fase reversa, apresentaram melhores resultados para a recuperação de nicotina em matrizes aquosas. O facto deste composto

apresentar menor polaridade que a cotinina ($\log K_{OW}$ 1,16; tabela 9.1), parece favorecer este tipo de interações, nomeadamente hidrofóbicas e/ou π - π . Optou-se por continuar a otimização da presente metodologia com o material CN1, uma vez favorecer a microextração de cotinina, sendo o composto de eleição para a avaliação da exposição ao fumo do tabaco em urina.

Quanto à etapa de retroextração, os dados indicaram que as recuperações são favorecidas usando MeOH com tempo de sonicação de 30 min (figura 9.2a e 9.2b), não sendo verificado vantagens significativas para tempos de sonicação até 90 min.

Depois de selecionado o sorvente mais adequado, bem como as condições ótimas para retroextrair nicotina e cotinina da fase CN1, foi verificado como as condições da matriz poderiam influenciar as recuperações destes analitos. Neste sentido, foi variado o pH da matriz, assim como a força iónica e a polaridade (figura 9.2c, 9.2d e 9.2e, respetivamente), tal como descrito anteriormente. Os resultados indicaram que valores de pH 11,0 mostraram um melhor compromisso para as eficiências de extração, tanto para a cotinina como para a nicotina. Nesse valor específico de pH, estes compostos não se encontram ionizados, o que pode favorecer as interações hidrofóbicas e π - π com a fase CN1. A manipulação da força iónica, assim como da solubilidade da matriz, mostrou que a recuperação diminui bastante para o primeiro (com adições sucessivas de NaCl) e se mantinha parcialmente inalterada para o segundo (com adições sucessivas de MeOH). Estes resultados podem ser explicados pelo facto do aumento da solubilidade na matriz normalmente favorecer o enriquecimento de compostos mais apolares ou com baixa polaridade ($\log K_{OW} > 3,5$). Por outro lado, e embora o aumento da força iónica normalmente promover o aumento da eficiência de extração para compostos com polaridade elevada ($\log K_{OW} < 2,0$), o inverso também pode acontecer, uma vez os iões presentes em solução poderem competir pelos microporos presentes no AC e, desta forma reduzir a área disponível para a adsorção dos analitos alvo. Por outro lado, o aumento da força iónica leva igualmente ao aumento da viscosidade da solução, podendo desta forma diminuir a cinética de extração e levar à diminuição da recuperação dos compostos em meio aquoso.

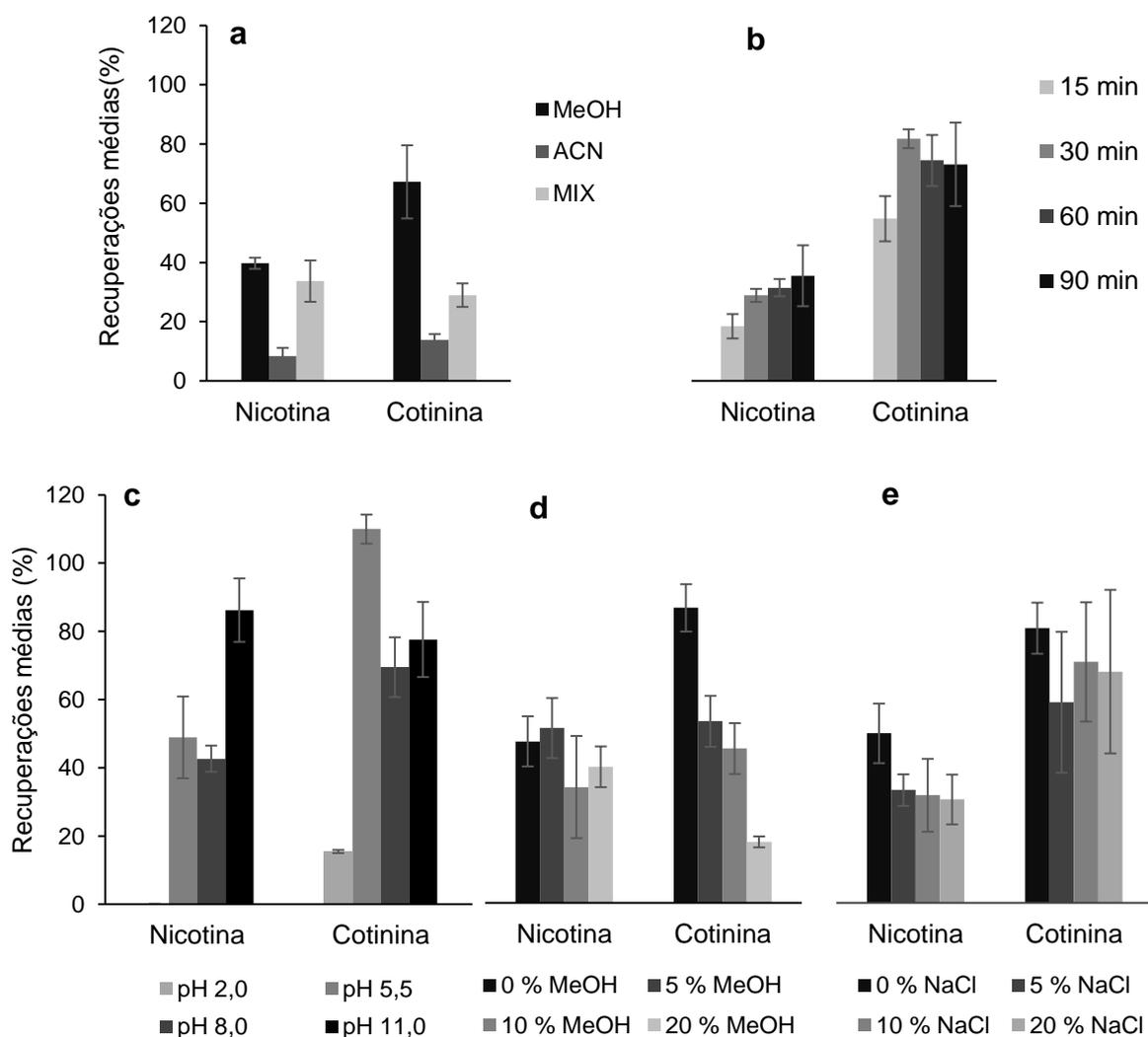


Figura 9.2 – Efeito do solvente (a) e tempo (b) de retroextração, assim como do pH (c), da adição de modificador orgânico (d) e da força iónica (e) da matriz para o enriquecimento de nicotina e cotinina em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Por fim, testou-se o efeito do tempo de microextração para o enriquecimento de cotinina e nicotina em água ultrapura. Os dados mostraram que 150 min foi suficiente para obter recuperações satisfatórias, verificando-se um claro decréscimo para 180 min de microextração (figura 9.3). Este resultado foi inesperado, uma vez não ser usual ocorrer a perda de recuperação por BA μ E revestido com ACs para maiores tempos de microextração [27]. Contudo, este facto pode ser atribuído ao fenómeno de partição, que é inerentemente de equilíbrio, ocorrendo entre as diferentes fases em solução. Os fenómenos de adsorção e de dessorção são fundamentalmente interações fracas, sendo que

depois dos 150 min de microextração, parecer que o equilíbrio reverte para a fase aquosa e não para a fase sorvente. Adicionalmente, fenómenos de difusão podem explicar a perda de recuperação depois dos 150 min. Ou seja, como a concentração dos analitos no AC aos 150 min é superior à fase aquosa, poderá ocorrer a respetiva difusão para esta fase para tempos de microextração superiores.

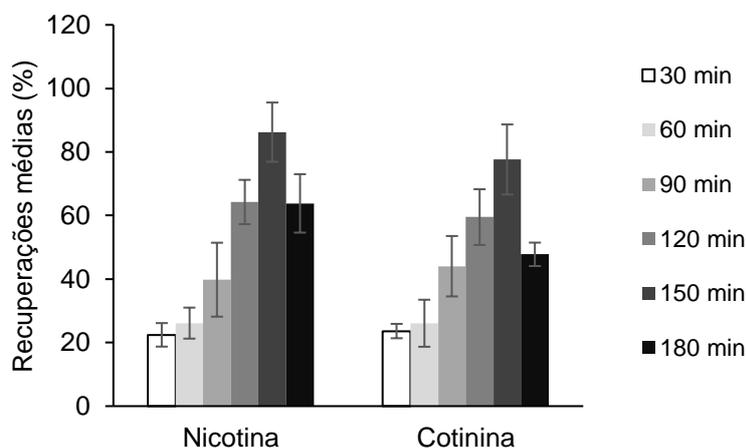


Figura 9.3 – Efeito do tempo de microextração para o enriquecimento de cotinina e nicotina em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). Condições experimentais: microextração, sonicação, pH 11,0; retroextração, MeOH (100 μ L), 30 min sob tratamento ultrassónico. As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

9.2.3 Validação do método analítico

Após a otimização, procedeu-se à validação da metodologia proposta, conforme descrito na secção 3.6.5. O LOD ($S/N \geq 3$) e o LOQ ($S/N \geq 10$) obtidos foram de 5,0 e 15,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, para a nicotina e a cotinina, respetivamente. Cada curva de calibração obtida apresentou boa linearidade ($r^2 \geq 0,99$; $RR \leq 10,5\%$) na gama compreendida entre 20,0 e 2000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. As recuperações médias e os efeitos de matriz, com níveis de fortificação de 600,0 e 1200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, foram entre 53,9-67,5 % ($RSD \leq 13,6\%$) e 5,2-14,9 % ($RSD \leq 13,5\%$), respetivamente. A exatidão e precisão variaram entre -11,6 a 13,2 % e -7,2 a 14,8 %, respetivamente, para a cotinina e a nicotina. A tabela 9.2 resume os dados de validação obtidos para estes dois compostos em matrizes de urina. Os resultados sugerem que a metodologia HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM)

preenche os requisitos preestabelecidos para a monitorização de nicotina e cotinina em amostras de urina.

Tabela 9.2 – Valores exatidão (%) intra ($n = 6$) e interdias ($n = 18$), assim como de repetibilidade e precisão intermédia (\pm RSD, %), eficiências de extração ($\% \pm$ RSD, %), efeitos de matriz ($\% \pm$ RSD, %), curvas de calibração e coeficientes de determinação (r^2) para análise de cotinina e nicotina em matrizes de urina, obtidas por BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas, Os valores de fortificação “LLOQ”, “baixo”, “médio” e “alto” são, respetivamente, 20,0, 60,0, 600,0 e 1200,0 μ g L $^{-1}$.

Analito	Fortificação	Ensaio	Ensaio	Eficiências de extração (%)	Efeitos de matriz (%)	Curvas de calibração	r^2
		intradia	interdias				
		(% \pm RSD, %)	(% \pm RSD, %)				
Nicotina	LLOQ	13,2 \pm 10,1	5,4 \pm 14,8				
	Baixo	-11,6 \pm 11,1	-5,6 \pm 11,6			y = 0,0015 x + 0,2853	0,9991
	Médio	4,5 \pm 9,9	8,9 \pm 7,2	61,7 \pm 13,6	10,9 \pm 13,5		
	Alto	-5,7 \pm 7,2	11,1 \pm 9,8	67,5 \pm 9,5	14,9 \pm 9,9		
Cotinina	LLOQ	-1,8 \pm 14,5	3,5 \pm 14,6				
	Baixo	1,7 \pm 13,7	6,3 \pm 12,0			y = 0,0004 x + 0,0258	0,9992
	Médio	-3,6 \pm 10,6	6,9 \pm 7,7	53,9 \pm 6,6	7,7 \pm 3,5		
	Alto	7,3 \pm 9,7	4,8 \pm 10,9	57,8 \pm 12,0	5,2 \pm 7,0		

9.2.4 Comparação com outras técnicas de microextração

A tabela 9.3 compara a sensibilidade, recuperação, volume de amostra e tempo de preparação da amostra da metodologia proposta com outras técnicas de microextração, *i.e.*, SPME por imersão direta (DI-SPME), DI-SPME auxiliada por potenciais elétricos (EE-DI-SPME, do inglês *Electroenhanced Direct Immersion Solid-Phase Microextraction*) [9], SPME por *headspace* (HS-SPME) [10], μ -SPE à base de óxido de grafeno (GO-D- μ -SPE, do inglês *Graphene Oxide-Based μ -SPE*) [8], SDME [15], DLLME [14], HF-LPME [13], assim como MEPS [11,12], para a determinação de nicotina e cotinina em amostras de urina. É possível observar que a abordagem proposta apresenta sensibilidade semelhante à maioria das técnicas comparadas. Por outro lado, quando temos

em conta as eficiências de extração absolutas, HT-BA μ E- μ LD apresenta desempenho similar ou muito melhor, utilizando uma pequena quantidade de amostra. Em termos de tempo de preparação da amostra, deve-se notar que a metodologia proposta é muito mais rápida do que os restantes métodos.

Tanto quanto nos é possível determinar, este é o primeiro trabalho que propõe uma técnica de microextração baseada em alto rendimento para a determinação de nicotina e cotinina em matrizes de urina.

Tabela 9.3 – Comparação da metodologia proposta com outras abordagens analíticas já publicadas, para a determinação de cotinina e nicotina em matrizes de urina.

Técnica de microextração	Sistema instrumental	LODs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperações (%)	Volume de amostra (mL)	Tempo de preparação de amostra (min/amostra)	Refs.
DI-SPME	GC-FID	0,3	9,7	5	27	[9]
EE-DI-SPME		10,0	12,7		12	
HS-SPME		20,0	91,5-109,5 ¹	2	12	[10]
GO-D- μ -SPE		1,5	88,7-109,7 ¹	1	14	[8]
SDME		370-430	73,5-100,9	0,1	30	[15]
DLLME	HPLC-UV	2,0	60,3-63,5	15	11	[14]
HF-LPME		50,0	36,0	25	20	[13]
MEPS	GC-MS	0,8	60,0	0,25	6,8 ²	[12]
		0,25-20,0	5,4-37,3	0,5	n.a.	[11]
HT-BA μ E	LVI-GC-MS(SIM)	5,0	53,9-67,5	0,5	1,8	Este trabalho

n.a. Informação indisponível

¹ Recuperação relativa

² 20 ciclos de 50 μL e 1 ciclo de 20 μL a um fluxo de 2,5 $\mu\text{L s}^{-1}$

9.2.5 Aplicação a amostras reais

Após a validação da metodologia analítica, o método proposto foi aplicado para a determinação de nicotina e cotinina em amostras de urina fornecidas por alunos e funcionários da FCUL, divididos pelos grupos #1, #2 e #3 (ver secção 3.5). As amostras foram tratadas seguindo o protocolo descrito na secção 3.6.6.2, sendo as concentrações dos analitos calculadas a partir das curvas de calibração validadas. Convém enfatizar que não houve a necessidade de sujeitar

as amostras de urina a um passo prévio de hidrólise, uma vez 8-10 % de nicotina e 10-15 % de cotinina serem excretados inalterados [6]. A figura 9.4 exemplifica um cromatograma obtido a partir de um ensaio realizado numa amostra de urina pertencente a um indivíduo fumador, obtido por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas, no qual é notório uma boa seletividade e sensibilidade.

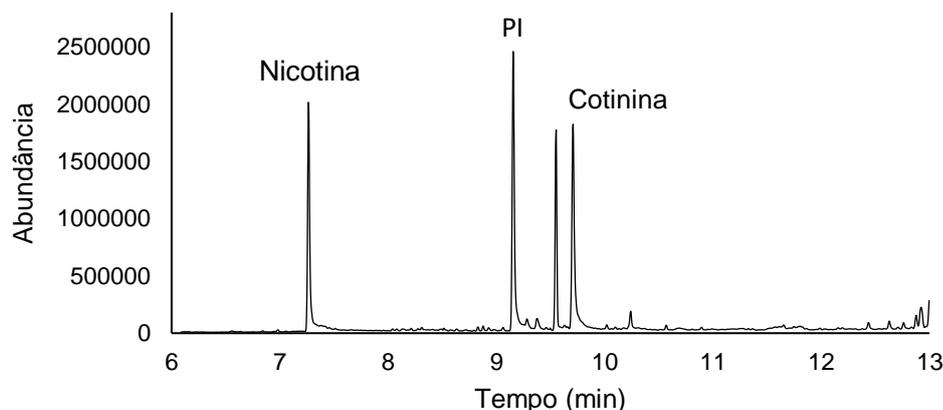


Figura 9.4 – Fragmentograma obtido a partir de ensaio realizado em amostra de urina real de um voluntário fumador, obtida por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

A tabela 9.4 resume os níveis de nicotina e/ou cotinina obtidos nas amostras positivas de urina dos indivíduos analisados. Tal como esperado, não foi detetada nicotina e cotinina no grupo #1, uma vez ser composto por não fumadores e pessoas não sujeitas a ETS pelo menos uma semana antes da amostragem. Contudo, ambos os compostos foram detetados no grupo #2 nas gamas de $< \text{LLOQ}-77,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e $< \text{LLOQ}-127,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para a nicotina e a cotinina, respetivamente. Este resultado era igualmente esperado, uma vez os indivíduos pertencentes ao grupo #2 apresentarem concentrações dos analitos alvo compreendidas entre $0,9$ e $890,0 \mu\text{g L}^{-1}$ [14,28–30]. Finalmente, foram detetadas nicotina e cotinina no grupo #3 nas gamas de $124,4-889,8 \mu\text{g L}^{-1}$ e $179,3-2612,6 \mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente. Este resultado era igualmente previsível, uma vez indivíduos fumadores apresentarem concentrações de ambos os compostos na urina compreendidas entre $1,0$ e $3550,0 \mu\text{g L}^{-1}$ [14,28–30].

Tabela 9.4 – Resultados obtidos para as amostras positivas de urina para nicotina e/ou cotinina, com ênfase no intervalo de tempo entre fumar (ou a exposição a ETS) e a amostragem. Não são apresentados valores para os voluntários do grupo #1, pois não foi detetado nenhum dos compostos alvo nas mesmas (< LOD).

Grupo	Voluntário	Nicotina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Cotinina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tempo entre fumar (ou exposição a ETS) antes da amostragem (h)
#2	1	62,1	36,1	48
	2	53,6	25,0	15
	3	42,3	< LLOQ	24
	4	64,1	26,8	24
	5	75,0	25,5	24
	6	54,7	88,5	12
	7	25,4	23,6	24
	8	46,5	< LLOQ	216
	9	40,7	127,0	120
	10	< LLOQ	30,2	3
	11	62,5	120,5	8
	12	77,1	85,7	5
	13	23,6	31,2	48
#3	14	227,6	179,3	2
	15	889,8	1422,1	8
	16	412,3	2612,6 *	0,5
	17	124,4	228,0	24
	18	170,0	318,1	1
	19	780,5	657,6	9

* Valor calculado por extrapolação.

Conforme pode ser observado na figura 9.5, os valores médios de nicotina e cotinina são estatisticamente diferentes entre os grupos #2 e #3 (teste *t* de Student, $p < 0,1$), o que demonstra claramente diferentes hábitos tabágicos ou de exposição a ETS.

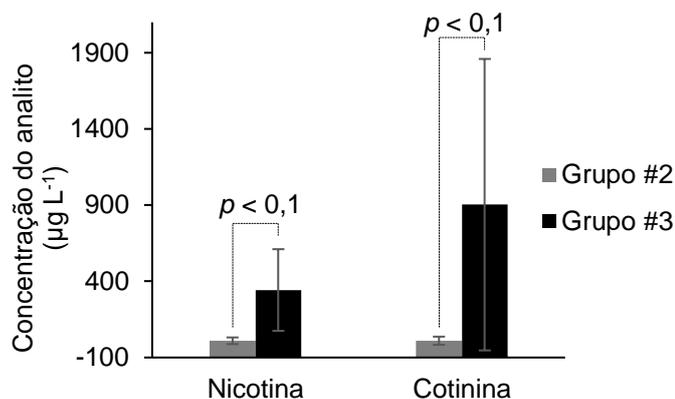


Figura 9.5 – Teste *t* de *Student* realizado com base nos valores médios de nicotina e cotinina apresentados nas amostras de urina dos grupos #2 e #3. As barras de erro representam o desvio padrão.

9.3 Conclusões

O ciclo analítico HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM) proposto foi otimizado, validado e aplicado com sucesso na determinação de nicotina e cotinina em amostras de urina.

Esta abordagem tem a possibilidade de realizar até 100 microextrações em simultâneo e subsequentes retroextrações num único *apparatus*, resultando num tempo médio de preparação de 1,8 min por amostra. Esta abordagem demonstra notável eficácia, em particular para a análise em rotina de um elevado número de amostras.

Das 86 amostras analisadas, 67 (77,9 %) não apresentaram nenhum traço de nicotina ou cotinina (< LLOQ), o que parece indiciar a ausência de exposição a ETS. Destes 67 ensaios, 51 pertenciam ao grupo #2, os quais declararam que provavelmente tinham sido expostos a ETS menos de uma semana antes da colheita das amostras. Esses resultados sugerem que a maioria dos indivíduos amostrados não foi exposta a ETS (pelo menos durante os meses de amostragem). Embora o presente trabalho demonstre dados interessantes, é necessário trabalho adicional para compreender melhor a exposição dos membros da FCUL ao ETS.

9.4 Referências

- [1] World Health Organization, *Gender, Women, and the Tobacco Epidemic* (2010) Manila, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- [2] P. Chaturvedi, A. Mishra, S. Datta, S. Sinukumar, P. Joshi, A. Garg, *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* 36 (2015) 24–31.
- [3] N. Benowitz, *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 2295–2303.
- [4] V.B. Yerger, R.E. Malone, *Nicotine Tob. Res.* 8 (2006) 487–498.
- [5] I. Stolerman, J. Rose, *J. Psychopharmacol.* 6 (1992) 545–546.
- [6] J. Hukkanen, P. Jacob, N.L. Benowitz, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 79–115.
- [7] Committee on Passive Smoking, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council, *Environmental Tobacco Smoke: Measuring exposures and assessing health effects* (1986) Washington, D.C, National Academic Press.
- [8] S. Mahpishanian, H. Sereshti, *Talanta* 130 (2014) 71–77.
- [9] S. Abdolhosseini, A.R. Ghiasvand, N. Heidari, *Molecules* 23 (2018).
- [10] S. Abdolhosseini, A. Ghiasvand, N. Heidari, *J. Chromatogr. B* 1061–1062 (2017) 5–10.
- [11] M. Iwai, T. Ogawa, H. Hattori, K. Zaitso, A. Ishii, O. Suzuki, H. Seno, *Nagoya J. Med. Sci.* 75 (2013) 255–261.
- [12] F. Lafay, E. Vulliet, M.M. Flament-Waton, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 937–941.
- [13] H. Lin, H. Yan, H. Lin, M. Luo, *Proc. - 2010 3rd Int. Conf. Biomed. Eng. Informatics, BMEI 2010.* 5 (2010) 2038–2040, Eds W. Yu, M. Zhang, L. Wang, Y. Song, Yantai, China.
- [14] X. Wang, Y. Wang, X. Zou, Y. Cao, *Anal. Methods* 6 (2014) 2384.
- [15] F. Kardani, A. Daneshfar, R. Sahrai, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 2857–2862.
- [16] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, M.P. Parmer, S. Pedersen-Bjergaard, *Bioanalysis* 5 (2013) 1377–85.
- [17] F.S. Mirnaghi, Y. Chen, L.M. Sidisky, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 83 (2011) 6018–6025.
- [18] F.S. Mirnaghi, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 1261 (2012) 91–98.
- [19] A. Gjelstad, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 25–31.
- [20] X. Liu, S. Liang, J. Pan, Y. Guo, H. Luo, Q. Zhao, S. Guan, *J. Chromatogr. Sci.* 52 (2014) 553–558.
- [21] S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 199 (2019).
- [22] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. B* 1008 (2016) 115–24.
- [23] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 120 (2014) 126–134.
- [24] N.R. Neng, A.R. Silva, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7303–7310.
- [25] N.R. Neng, S.M. Ahmad, H. Gaspar, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 144 (2015) 105–109.
- [26] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 120 (2014) 126–134.
- [27] N.R. Neng, A.R. Silva, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7303–7310.
- [28] A.M. Massadeh, A.A. Gharaibeh, K.W. Omari, *J. Chromatogr. Sci.* 47 (2009) 170–177.
- [29] C.N. Man, L.H. Gam, S. Ismail, R. Lajis, R. Awang, *J. Chromatogr. B* 844 (2006) 322–327.
- [30] M. Hariharan, T. VanNoord, *Clin. Chem.* 37 (1991) 1276–1280.

Capítulo 10

HT-BA μ E: Abordagem Rápida para a Determinação de Cetamina e Norcetamina em Amostras de Urina

S. M. Ahmad, J. M. F. Nogueira, Fast High Throughput Bar Adsorptive Microextraction (HT-BA μ E) for the Determination of Ketamine and Norketamine in Urine Samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *in preparation*.

10.1 Considerações gerais

A cetamina (KET) foi desenvolvida em 1962 devido à procura de uma alternativa menos problemática para a fenciclidina, um anestésico que ganhou notoriedade por induzir alucinações e psicose. Devido à sua rápida ação e curta duração, associado a uma fraca depressão cardiorrespiratória em comparação com outros anestésicos gerais, assim como a possibilidade de inalação para manter o estado anestésico, a KET tornou-se um medicamento útil para procedimentos cirúrgicos de curta duração em medicina veterinária ou humana, particularmente em crianças [1]. A sua principal desvantagem prende-se com o seu potencial para causar alucinações vívidas, semelhantes às descritas para o consumo de LSD [2]. Por esta razão, foi inicialmente abusada por pessoal médico e gradualmente se tornou popular entre os jovens em discotecas e em “raves” [3]. De facto, a quantidade total de KET apreendida em todo o mundo tem vindo a aumentar de uma média anual de 3 toneladas, no período compreendido entre 1998 a 2008, para 10 toneladas entre 2009 a 2014 [4]. Em humanos, a KET é metabolizada no fígado pelo sistema do citocromo P450. O CYP3A4 é a principal enzima responsável pela *N*-desmetilação da KET para formar norcetamina (NKET). NKET é então hidroxilada, conjugada e excretada na urina [5]. Estudos de excreção urinária de KET indicam que, ao longo de um período de 72 h, pouca substância inalterada e NKET estão presentes (2,3 % e 1,6 %, respetivamente). A maioria dos compostos excretados (80 %) são conjugados de metabolitos hidroxilados de KET [6]. A KET (29-1410 $\mu\text{g L}^{-1}$) e a NKET (até 1559 $\mu\text{g L}^{-1}$) já foram detetadas em urinas de crianças hospitalizadas depois de serem tratadas com KET, até 2 ou 14 dias depois da amostragem, respetivamente.[7]. Num grupo de supostos consumidores recreativos de KET, as concentrações de KET e NKET na urina encontradas estavam compreendidas entre 6 e 7744 $\mu\text{g L}^{-1}$ e entre 7 e 7986 $\mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente [8].

Diversos métodos analíticos encontram-se descritos na literatura para a determinação de KET ou NKET em amostras de urina, principalmente com recurso a HPLC-UV [9], GC-FID [10], MS [3,7,11], MS/MS [12], ou mesmo LC acoplada a MS [7,8] ou MS/MS [13,14]. As técnicas de preparação de amostras usadas em combinação com estes sistemas cromatográficos incluem LLE [8] ou SPE [7,14,15]. Também é possível encontrar trabalhos que recorram a técnicas

miniaturizadas como a SPME [16], SBSE [9], HF-LPME [3,10] ou MEPS [12]. Contudo, a preparação e manipulação destas técnicas é trabalhosa, assim como é limitador o número de microextrações possíveis de serem realizadas em simultâneo, particularmente quando está envolvido trabalho de rotina. A fim de superar algumas destas limitações, foi introduzida a técnica HT-BA μ E [17], como uma abordagem alternativa para a microextração simultânea de até 100 amostra, tal como descrito nos capítulos anteriores.

No presente trabalho é proposto o uso de HT-BA μ E para o processo de enriquecimento e subsequente μ LD de até 100 amostras em combinação LVI-GC-MS(SIM) para a determinação de KET e NKET em matrizes de urina. Nos dois trabalhos anteriores, a etapa de microextração por HT-BA μ E foi realizada por sonicação, tendo sido usado um banho ultrassónico com capacidade de produzir apenas uma frequência (42 kHz, 100 W), não sendo possível incrementá-la por forma a obter (provavelmente) cinéticas de extração mais favoráveis. Desta forma, decidiu-se usar um agitador orbital de reduzidas dimensões, capaz de atingir até 2400 rpm por forma a acelerar o processo de microextração. Contudo, a etapa de retroextração, tal como nos trabalhos anteriores, foi realizada por sonicação.

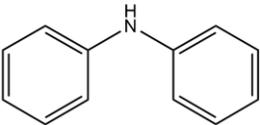
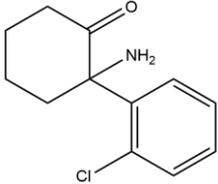
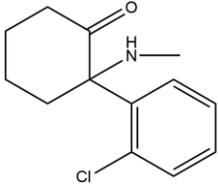
10.2 Resultados e discussão

10.2.1 Otimização instrumental

Numa primeira abordagem foi avaliada o padrão de fragmentação de KET, NKET e de difenilamina (PI), através da análise de uma mistura padrão por GC-MS operando do modo “*full-scan*”. Com base nas características dos dados espectrais de cada composto e comparando com a literatura, os picos base e as iões de qualificação foram seleccionados por forma a alcançar maior seletividade e sensibilidade para operar o sistema instrumental em modo SIM. Foi ainda possível obter um tempo de análise adequado (< 11,5 min). A fim de alcançar alta sensibilidade para estudos experimentais posteriores envolvendo matrizes reais, um injetor PTV, operando no modo “*solvent vent*” e usando LVI, foi empregado para análise através de GC-MS(SIM). Neste sentido, o volume de

injeção foi fixado nos 10 μ L, uma vez volumes superiores levarem a um incremento da linha de base e conseqüentemente a menor S/N durante a análise vestigial. A tabela 10.1 resume os resultados instrumentais para a separação e identificação dos compostos alvo, assim como as estruturas químicas e algumas propriedades físico-químicas dos mesmos.

Tabela 10.1 – Estruturas químicas, $\log K_{OW}$ e pK_a , assim como os tempos de retenção (t_R) e iões (m/z) selecionados para a KET and NKET obtidos por LVI-GC-MS(SIM), sob condições instrumentais otimizadas.

Composto	Estrutura química	$\log K_{OW}$ ¹	pK_a ¹	t_R (min)	Iões (m/z) ²
Difenilamina		-	-	5.42	83, 168, <u>169</u>
NKET		2.91	7.48	6.73	<u>166</u> , 168, 195
KET		3.35	7.45	6.97	<u>180</u> , 182, 209

¹ Software específico foi usado para prever as propriedades físico-químicas, assim como a estrutura das moléculas: Marvin 6.2.2, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

² Iões de qualificação, incluindo o de quantificação (a sublinhado).

10.2.2 Otimização da metodologia

Por forma a maximizar as eficiências de extração para KET e NKET em meio aquoso, diferentes parâmetros que pudessem afetar o procedimento HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM) foram avaliados e otimizados. Estes incluíram a seletividade da fase sorvente (6 fases poliméricas), o solvente (MeOH, ACN e MeOH/ACN, 1/1, v/v, Mix; 100 μ L) e o tempo (de 5 a 60 min) de retroextração, bem como o pH (de 2,0 a 11,0), a força iónica (teor de sal, NaCl, de 0 a 20 %, p/v) e a polaridade (modificador orgânico, MeOH, de 0 a 20 %, v/v) da matriz.

Foram ainda avaliados a velocidade de agitação (de 600 a 2200 rpm) e o tempo de microextração (5 a 120 min), à semelhança de trabalhos anteriores [17,18].

A figura 10.1 apresenta todos os dados dos ensaios de otimização efetuados. Os resultados demonstram claramente que Strata-X apresentou as melhores eficiências de extração para KET e NKET do que as outras fases sorventes testadas (figura 10.1a). Este resultado era esperado uma vez este polímero promover mecanismos do tipo de fase reversa, nomeadamente interações π - π e hidrofóbicas, que normalmente favorecem a retenção de compostos apolares através de seus grupos fenilo e poliestireno, bem como interações dipolo-dipolo, o que usualmente favorece a retenção de analitos mais polares através dos seus grupos pirrolidona (tabela 3.2) [19,20]. Em geral, este tipo de sorventes apresentam maior seletividade para compostos semipolares a apolares ($\log K_{OW} > 2,5$). De acordo as suas estruturas químicas e polaridade (tabela 10.1), NKET e KET apresentam grupos apolares (fenilo) e polares (cetona), resultando em características semipolares a apolares ($\log K_{OW}$ de 2,91 e 3,35, repetivamente), o que pode favorecer a retenção por Strata-X.

A partir dos ensaios de otimização da retroextração, é possível observar que não ocorreu nenhum ganho significativo ao empregar MeOH, ACN ou Mix para dessorver KET e NKET da fase sorvente Strata-X (figura 10.1b). Por outro lado, as condições ótimas para a μ LD foram obtidas usando apenas 15 min de tempo de sonicação (figura 10.1c).

O pH da matriz desempenha geralmente um papel importante no processo de microextração, onde normalmente a forma não ionizada dos compostos alvo parece promover maiores recuperação em meios aquosos, pois favorece interações do tipo fase reversa com as fases sorventes [17,18]. KET e NKET apresentam características de bases fracas (tabela 10.1), estando totalmente não ionizado a pH $> 9,5$. Por esta razão, as eficiências de extração foram maximizados usando o ensaio a pH mais elevado (pH 11,0) - figura 10.1d.

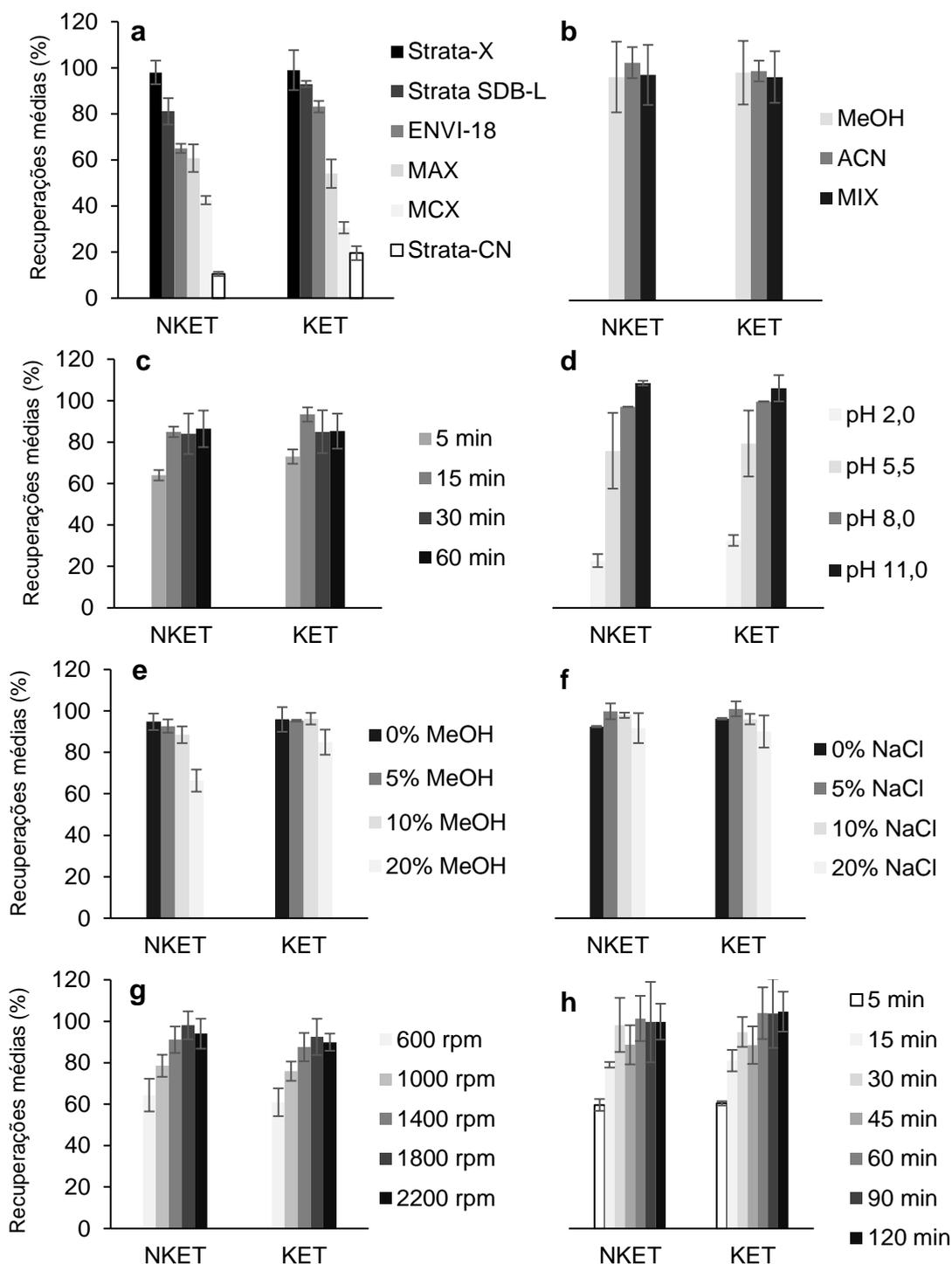


Figura 10.1 – Efeito da seletividade da fase polimérica (a), do solvente (b) e tempo (c) de μ LD, assim como do pH (d), polaridade (e) e força iônica (f) da matriz, da velocidade de agitação (g) e do tempo de microextração (h) para o enriquecimento de KET e NKET em meio aquoso, obtido por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). As barras de erro representam o desvio-padrão de três replicados.

Os ensaios de manipulação da solubilidade (figura 10.1e), bem como da força iónica (figura 10.1f) da matriz, mostraram que a recuperação diminuía significativamente para o primeiro (particularmente com 20 % de MeOH, v/v) e que permanecia parcialmente inalterada para o segundo (com sucessivas adições de NaCl). Estes resultados podem ser explicados pelo facto do aumento da solubilidade da matriz normalmente favorecer o enriquecimento de compostos mais apolares ou de polaridade muito baixa ($\log K_{OW} > 3,5$) e, o aumento a força iónica, normalmente favorecer a eficiência de extração para compostos com elevada polaridade ($\log K_{OW} < 2,0$) [17]. Como NKET e KET apresentam características semi-polares a apolares ($\log K_{OW}$ de 2,91 e 3,35, respetivamente), seria de esperar que sucessivas adições de NaCl ou MeOH provavelmente comprometeriam o processo de microextração.

Finalmente, foram ensaiados o efeito da velocidade de agitação (figura 10.1g) e do tempo de microextração (figura 10.1h) para o enriquecimento de KET e NKET em meio aquoso. Nos trabalhos envolvendo a análise de BZDs (capítulo 8) e de nicotina (capítulo 9) foi usado um banho ultrassónico para promover a microextração dos compostos alvo. Este instrumento tinha a capacidade de emitir apenas uma frequência (42 kHz, 100 W), não sendo possível incrementá-la por forma a obter (provavelmente) cinéticas de extração mais favoráveis. Por essa razão, decidiu-se empregar um agitador orbital de reduzidas dimensões capaz de atingir até 2400 rpm, por forma a acelerar o processo de microextração. Os dados mostram que 1800 rpm é o valor ideal para microextração dos compostos alvo, usando apenas 30 min de tempo de enriquecimento, não havendo melhorias significativas com velocidades de agitação ou tempo de microextração superiores.

10.2.3 Validação do método analítico

A metodologia proposta foi validada seguindo os parâmetros de acordo com a seção 3.6.5, incluindo a seletividade, a linearidade, a sensibilidade, a exatidão, a precisão, a recuperação e os efeitos de matriz. A tabela 10.2 mostra a maioria dos resultados para os ensaios de validação. A seletividade foi avaliada pela verificação da ausência de picos interferentes nos tempos de retenção dos

compostos alvo empregando amostras de urina em branco ($n = 10$). Cada curva de calibração mostrou boa linearidade ($r^2 \geq 0,999$; $RR \leq 9,7\%$) na gama de 5,0 a 1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A linearidade de ambas curvas de calibração foi igualmente estimada (F_{calc}) usando o teste “*lack-of-fit*” (com intervalo de confiança de 95 %), tendo os valores obtidos estado sempre abaixo do F_{tab} . Como pode ser observado, as recuperações médias e os efeitos de matriz, utilizando matrizes de urina em quatro níveis de pico, forem de 84,9 a 105,0 % ($RSD \leq 9,2\%$) e entre -9,1 a 9,0 % ($RSD \leq 14,1\%$), respetivamente. Os valores da exatidão variaram entre -12,8 a 10,0 % ($RSD \leq 10,1\%$) e -14,5 a 12,1 % ($RSD \leq 12,6\%$) para KET e NKET, respetivamente. Estes resultados mostram que a abordagem analítica desenvolvida é adequada para a análise de KET e NKET em matrizes de urina.

Tabela 10.2 – Valores exatidão (%) intra ($n = 6$) e interdias ($n = 18$), assim como de repetibilidade e precisão intermédia ($\pm RSD$, %), recuperações médias ($\% \pm RSD$, %) e os efeitos de matriz ($\% \pm RSD$, %) usando quatro níveis de fortificação, assim como as curvas de calibração e os r^2 , para análise de KET e NKET em matrizes de urina, obtidas por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

Parâmetro	KET	NKET
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)		1,0
LLOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)		5,0
Gama linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,0 to 1000,0	
Curva de calibração ($n = 10$)	$y = 0,0032 x + 0,0066$	$y = 0,0032 x + 0,029$
r^2	0,9990	0,9970
Ensaio intradia ($n = 6$)		
5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	-12,8 \pm 7,6	12,5 \pm 11,9
50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	-12,6 \pm 6,6	1,2 \pm 5,5
200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	-12,1 \pm 8,5	11,0 \pm 6,8
1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	-5,2 \pm 3,2	-1,4 \pm 4,5
Ensaio interdias ($n = 18$)		
5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	10,0 \pm 5,7	2,0 \pm 12,6
50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	4,4 \pm 10,1	12,1 \pm 11,8
200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	-5,3 \pm 8,7	-10,2 \pm 12,3
1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,9 \pm 6,9	-14,5 \pm 6,1
Recuperações médias ($n = 6$)		
5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	105,0 \pm 9,2	103,1 \pm 5,8
50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	97,8 \pm 7,9	89,8 \pm 4,7
200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	96,6 \pm 7,2	88,1 \pm 8,5
1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	96,5 \pm 4,0	84,9 \pm 3,4
Efeito de matriz ($n = 6$)		
5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	-4,4 \pm 6,1	8,4 \pm 6,3
50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	4,9 \pm 2,9	-4,6 \pm 10,4
200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	9,0 \pm 1,5	2,5 \pm 14,1
1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	-2,5 \pm 6,2	-9,1 \pm 5,6

10.2.4 Figuras de mérito

Na tabela 10.3 é comparado os LODs, a gama linear, a exatidão, a precisão, os níveis de recuperação, o volume da amostra e o tempo de preparação da amostra obtidos pela metodologia proposta e por outras abordagens baseadas em microextração.

Tabela 10.3 – Comparação do método proposto com outras técnicas de microextração já publicadas, para a determinação de KET e NKET em amostras de urina.

Técnica de microextração	HF-LPME	MEPS	SBSE	SPME	HF-LPME	HT-BA μ E
Sistema instrumental	GC-MS	GC-MS/MS	HPLC-UV	GC-MS	GC-FID	LVI-GC-MS
LODs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,1-0,25	5	2,3-9,1	100	8	1,0
Gama linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,5-50,0	10-250	30-3000	100-15000	3-350	5,0-1000,0
Exatidão (%)	88,3-108	91,4-105,6	n.a.	105,9-113,6	75,2-119,3	85,5-112,1
Precisão (%)	$\leq 10,1$	$\leq 9,2$	$\leq 8,9$	$\leq 14,8$	$\leq 8,9$	$\leq 12,6$
Recuperação (%)	85,2-101	72,5-100,7	90,8	n.a.	n.a.	84,9-105,0
Volume de amostra (mL)	2	0,25	3	1	3	0,5
Tempo de preparação de amostra (min/amostra)	60 ^a	7,42 ^b	40 ^c	21 ^d	20 ^c	0,45
Referência	[3]	[12]	[9]	[16]	[10]	Este estudo

n.a. Informação indisponível

^a Vortex por multi-tubo. Número de microextrações em simultâneo indisponível

^b 8 ciclos de 500 μL , 1 ciclo de 250 μL e 2 ciclos de 100 μL a um fluxo de 10,0 $\mu\text{L s}^{-1}$

^c Agitador magnético. Número de microextrações em simultâneo indisponível

^d Sistema LEAP CombiPAL. Número de microextrações em simultâneo indisponível

Conforme pode ser observado, o trabalho desenvolvido apresenta melhor sensibilidade do que a maioria dos métodos mencionados, mesmo quando comparado com metodologias que recorram a sistemas GC-MS/MS [12]. Os LODs obtidos são apenas superiores quando comparados com trabalhos que empregam maiores quantidades de volume de amostra [3]. A exatidão, a precisão e as recuperações alcançadas comparam-se favoravelmente com as

descritas na tabela 10.3, exceto para um trabalho que empregou MEPS em combinação com GC-MS/MS [12]. A abordagem analítica proposta emprega quantidades muito menores de amostra quando comparada com as demais abordagens. Finalmente, HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), que recorre a configuração de alto rendimento, apresenta tempos de sorção/dessorção das amostra muito mais rápidos do que as outras metodologias baseadas em microextração.

A figura 10.2 exemplifica traçados de corrente iônica de ensaios realizados em amostras de urina fortificadas e não fortificadas, obtidas por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas, na qual boa seletividade e sensibilidade são observadas, sem a ocorrência de interferentes endógenos nos tempos de retenção dos compostos alvo, incluindo o PI.

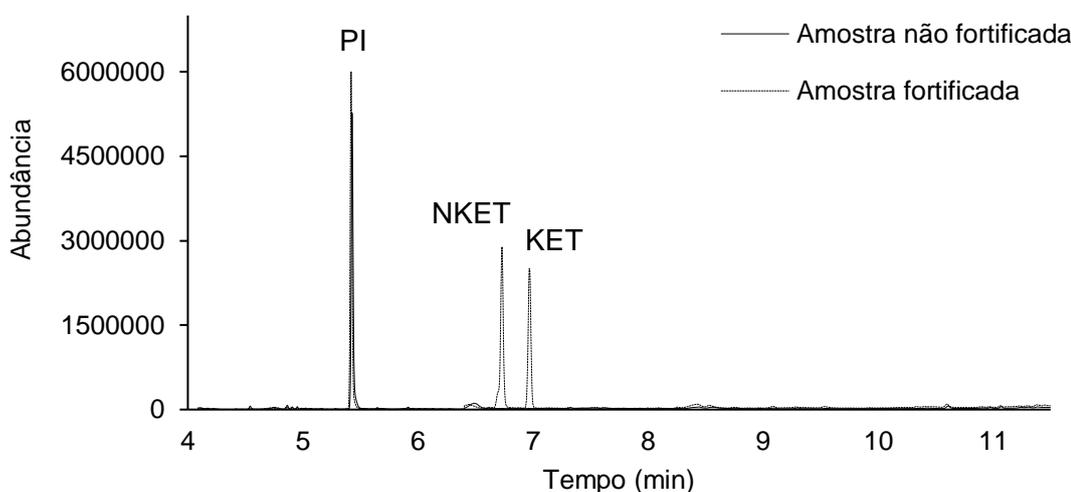


Figura 10.2 – Fragmentogramas obtidos a partir de ensaios realizados em amostras de urina fortificadas ($125,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e não fortificadas, obtidas por HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

Embora a metodologia desenvolvida tenha sido totalmente validada para o intervalo linear de $5,0$ a $1000,0 \mu\text{g L}^{-1}$, tanto KET como NKET não foram detetadas ($< \text{LOD}$) nas amostras analisadas fornecidas pela Clínica Joaquim Chaves Saúde (50 amostras de urina). Contudo, a metodologia proposta é adequada para a análise destes compostos, uma vez KET ($29\text{-}1410 \mu\text{g L}^{-1}$) e NKET (até $1559 \mu\text{g L}^{-1}$) terem sido detetadas até 2 e 14 dias, respectivamente,

em amostras de urina provenientes de crianças hospitalizadas depois de serem administradas com KET [7]. Em grupos de presumíveis consumidores recreativos de KET, as concentrações de KET e NKET na urina foram quantificadas, respetivamente, nas gamas de 6-7744 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 7-7986 $\mu\text{g L}^{-1}$ [8], 7,3-87,3 e 5,3-5805 $\mu\text{g L}^{-1}$ [3], 5,07-23031 e 5,87-8341 $\mu\text{g L}^{-1}$ [14].

10.3 Conclusões

A metodologia apresentada (HT-BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM)) foi totalmente otimizada e validada para monitorizar KET e NKET em matrizes de urina. O ciclo analítico proposto permitiu obter um desempenho analítico adequado sob condições experimentais otimizadas, incluindo excelentes níveis de recuperação, baixos efeitos de matriz, assim como boas precisões, exatidões, seletividade, sensibilidade e gamas lineares adequadas. Adicionalmente, a metodologia é uma abordagem amiga do ambiente, efetiva e de baixo custo, empregando apenas 100 μL de solvente de retroextração e 0,45 min de tempo de preparação por amostra.

Segundo a literatura, este é o primeiro trabalho que emprega uma abordagem de microextração baseada em alto rendimento para o enriquecimento e subsequente dessorção de KET e NKET em amostras de urina.

10.4 Referências

- [1] R.J. Dinis-Oliveira, *Forensic Sci. Res.* 2 (2017) 2–10.
- [2] M.J. Kuhar, H.Liddle, *Drugs of Abuse* (2012) Kuala Lumpur, Marshall Cavendish Corporation.
- [3] A.V. de Bairros, R. Lanaro, R.M. de Almeida, M. Yonamine, *Forensic Sci. Int.* 243 (2014) 47–54.
- [4] United Nations Office on Drugs and Crime, *World Drug Report 2016*, Nova Iorque.
- [5] J.A. Clements, W.S. Nimmo, *Br. J. Anaesth.* 53 (1981) 27–30.
- [6] S.B. Karch, O.H. Drummer, *Pathology of Drug Abuse* (2016) Boca Raton, CRC Press.
- [7] P. Adamowicz, M. Kala, *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005) 376–382.
- [8] K.A. Moore, J. Sklerov, B. Levine, A.J. Jacobs, *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 583–588.
- [9] L. Lan, B. Hu, C. Yu, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7003–7009.

- [10] J. Xiong, J. Chen, M. He, B. Hu, *Talanta* 82 (2010) 969–975.
- [11] P.S. Cheng, C.Y. Fu, C.H. Lee, C. Liu, C.S. Chien, *J. Chromatogr. B* 852 (2007) 443–449.
- [12] I. Moreno, M. Barroso, A. Martinho, A. Cruz, E. Gallardo, *J. Chromatogr. B* 1004 (2015) 67–78.
- [13] M. Hasan, R. Hofstetter, G.M. Fassauer, A. Link, W. Siegmund, S. Oswald, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 139 (2017) 87–97.
- [14] C.A. Yang, H.C. Liu, D.L. Lin, R.H. Liu, Y.Z. Hsieh, S.P. Wu, *J. Anal. Toxicol.* 41 (2017) 679–687.
- [15] B. Anilanmert, F. Çavuş, I. Narin, S. Cengiz, Ş. Sertler, A.A. Özdemir, M. Açikkol, *J. Chromatogr. B* 1022 (2016) 230–241.
- [16] S.D. Brown, D.J. Rhodes, B.J. Pritchard, *Forensic Sci. Int.* 171 (2007) 142–150.
- [17] S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 199 (2019) 195–202.
- [18] F. Abujaber, S.M. Ahmad, N.R. Neng, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, F.J. Guzmán Bernardo, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1600 (2019) 17–22.
- [19] S.M. Ahmad, A.H. Ide, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 97 (2017) 484–498.
- [20] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 153 (2018) 126–134.

Capítulo 11

Outros Trabalhos em Colaboração

11.1 Considerações gerais

Os capítulos anteriores (4-10) foram dedicados à melhoria, inovação e aplicação da técnica de BAμE, nomeadamente na análise de contaminantes em matrizes ambientais e substâncias de abuso em amostras biológicas. Contudo, ao longo da presente dissertação, foi igualmente possível colaborar em outros estudos científicos, nomeadamente em projetos de licenciatura, mestrado e doutoramento. O presente capítulo tem assim o propósito de descrever estes estudos de forma sucinta.

11.2 Determinação de carbazol em amostras de gasóleo por ACs derivados da pirólise da casca do arroz [1]

Nos últimos anos tem havido um crescente interesse no uso de resíduos biológicos de baixo custo e abundantemente disponíveis como precursores de materiais de carbono. Na verdade, qualquer material com elevado teor de carbono pode ser usado como matéria-prima para a preparação de ACs [2]. É o caso dos resíduos sólidos agrícolas [3], como o pedúnculo de algodão [4], casca de arroz [5], cortiça [6], madeira [7], entre muitos outros.

A ativação química é um método amplamente utilizado para obter ACs com áreas superficiais e quantidades de microporos elevadas, sendo geralmente realizada com recurso a NaOH/KOH [8], H₃PO₄ [9] ou ZnCl₂ [10]. O K₂CO₃ é igualmente uma alternativa ao KOH, uma vez ser um agente ativador mais amigo do ambiente, não ser tóxico (sendo usado como aditivo alimentar), ser facilmente removido por lavagem com água e apresentar fraca corrosão, permitindo assim boas condições de operação.

Os ACs apresentam excelente desempenho na remoção de azoto e enxofre de diversas matrizes [11]. A importância deste processo resulta no facto de que, embora os compostos de azoto estejam presentes a baixas concentrações, estes desempenham um papel importante na qualidade dos derivados de petróleo. Compostos azotados não básicos (ex., carbazol) são responsáveis por cerca de 70 % da quantidade de compostos azotados em

derivados de petróleo, sendo um dos principais componentes azotados deste produto [12].

O presente trabalho consistiu na produção e caracterização de ACs derivados da pirólise de casca de arroz com origem brasileira recorrendo a ativação química com K_2CO_3 , tendo sido realizado no Laboratório de Cromatografia Gasosa Bidimensional do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (Aracaju, SE, Brasil). Os ACs preparados e caracterizados foram posteriormente usados como fase sorvente em BA μ E por forma a microextrair carbazol em amostras de gasóleo. Depois do processo de microextração (1 h; 750 rpm), o carbazol foi retroextraído com 200 μ L de MeOH/ACN (1/1, v/v; 30 min de sonicação), seguido da evaporação com suave corrente de N_2 e reconstituição com diclorometano. A análise foi realizada com recurso a cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massa (GC \times GC-MS).

Os resultados obtidos indicaram que foram obtidos ACs com elevada área superficial ($1850 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e porosidade ($0,83 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$). Estas propriedades permitiram obter eficiências de microextração de 91,0 % para carbazol. Ao empregar o SAM, foi possível obter $r^2 > 0,9984$ na gama compreendida entre 0,0125 e 0,100 mg L^{-1} . Os LOD e o LOQ obtidos foram de 0,45 e 1,37 $\mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente.

A figura 11.1 mostra um diagrama bidimensional de uma amostra de gasóleo fortificada com carbazol ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) e obtida pela metodologia proposta sob condições experimentais otimizadas. As condições instrumentais encontram-se descritas no anexo IV.

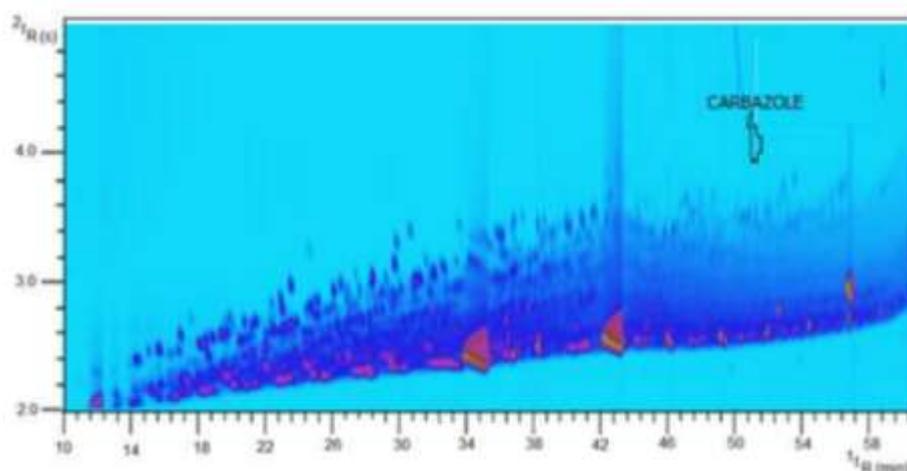


Figura 11.1 – Cromatograma bidimensional de uma amostra de gasóleo fortificada com carbazol ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), obtido por BA μ E(AC)- μ LD/GC \times GC-MS. Adaptado de [1].

11.3 Determinação de OCPs em matrizes de chá e tabaco [13]

Os pesticidas organoclorados (OCPs, do inglês *Organochlorine Pesticides*) foram amplamente utilizados entre 1940 e 1960 na agricultura e no controlo de pragas de mosquitos. Compostos representativos neste grupo incluem o metoxicloro, dieldrina, clordano, toxafeno, mirex, kepone, lindano, 4,4'-diclorodifeniltricloroetano (DDT) e hexacloroeto de benzeno, entre outros [14]. Muitos OCPs são extremamente persistentes no meio ambiente e em organismos vivos, apresentando claras evidências de desregulação endócrina, para além de serem potenciais agentes carcinogénicos [15]. Por esta razão, os OCPs foram banidos na América do Norte, na Austrália, no Brasil e na UE, sendo ainda usadas em outras regiões, nomeadamente na Índia, China e Indonésia [16]. Neste sentido, toda a informação relativa à concentração e destino destes poluentes no meio ambiente e em produtos agrícolas continua a ser pertinente, sendo necessário desenvolver novas metodologias analíticas para a monitorização vestigial rápida, sensível e seletiva de OCPs em matrizes complexas, nomeadamente em produtos de origem vegetal (ex., tabaco e chá).

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização, validação e aplicação da BA μ E seguida de μ LD e análise por LVI-GC-MS(SIM) na determinação de vinte OCPs em amostras de chá e tabaco. As condições instrumentais encontram-se descritas no anexo IV.

A metodologia otimizada (microextração: BA μ E(Strata-X), 16 h (1300 rpm), pH 5,5); retroextração: ACN/MeOH (1/1, v/v; 100 μ L), 60 min sob sonicação) permitiu obter recuperações compreendidas entre 14,0 e 95,1 % tendo o método evidenciado excelente linearidade ($r^2 > 0,99$) na gama de trabalho compreendida entre 0,5 e 100,0 μ g L⁻¹. Foi igualmente obtida boa precisão (RSD \leq 13,2 %) e alcançado LODs compreendidos entre 0,10 e 0,15 μ g L⁻¹ e LOQs compreendidos entre 0,40 e 0,50 μ g L⁻¹ para os OCPs estudados. A tabela 11.1 resume alguns dos resultados obtidos para os vinte OCPs em estudo pela metodologia proposta.

11. Outros trabalhos em colaboração

Tabela 11.1 – Valores de r^2 , gamas lineares, valores de repetibilidade e precisão intermédia, expressos como RSDs das recuperações a vários níveis de fortificação, para os vinte OCPs, obtidos por BAμE(Strata-X)-μLD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

OCPs	r^2 ^a	Recuperação (%) ± RSD (%)			
		Repetibilidade			Precisão intermédia
		0,5 μg L ⁻¹ (n = 6)	2,0 μg L ⁻¹ (n = 6)	10,0 μg L ⁻¹ (n = 6)	2,0 μg L ⁻¹ (n = 18)
α-hexaclorociclohexano ^b (α-HCH)	0,9982	82,6 ± 0,9	94,2 ± 6,0	87,2 ± 2,4	75,5 ± 7,2
γ-hexaclorociclohexano ^b (γ-HCH)	0,9993	92,1 ± 1,0	102,7 ± 7,0	94,3 ± 0,5	92,7 ± 3,3
β-hexaclorociclohexano ^b (β-HCH)	0,9986	78,5 ± 1,6	80,8 ± 5,9	86,4 ± 1,6	83,6 ± 4,8
δ-hexaclorociclohexano ^b (δ-HCH)	0,9984	86,7 ± 6,4	56,9 ± 4,6	84,3 ± 1,3	86,8 ± 6,5
Heptacloro ^b (HCL)	0,9992	29,8 ± 0,4	34,6 ± 5,7	20,2 ± 3,7	24,7 ± 10,4
Aldrina ^b (ALD)	0,9959	21,4 ± 4,5	14,0 ± 5,6	19,4 ± 2,6	13,4 ± 4,9
Heptacloro epóxico ^b (HCE)	0,9972	67,5 ± 2,4	79,6 ± 1,4	76,2 ± 0,7	79,8 ± 6,2
Cis-Clordano ^b (α-CLD)	0,9963	43,9 ± 4,9	50,7 ± 2,5	48,3 ± 2,3	57,2 ± 12,1
α-Endosulfan ^c (α-EDS)	0,9963	40,2 ± 0,9	47,8 ± 6,5	48,1 ± 0,9	52,1 ± 7,9
Trans-Clordano ^b (β-CLD)	0,9947	55,8 ± 0,6	66,5 ± 4,4	50,7 ± 0,2	61,4 ± 7,9
4,4'-Diclorodifenildicloroetileno ^b (DDE)	0,9989	25,6 ± 1,3	30,8 ± 0,1	20,6 ± 5,2	31,4 ± 7,6
Dieldrina ^b (DIE)	0,9961	79,0 ± 0,7	76,8 ± 0,9	69,6 ± 0,8	81,0 ± 5,8
Endrina ^c (END)	0,9984	85,6 ± 2,1	95,1 ± 3,2	78,9 ± 6,4	94,2 ± 3,7
β-Endosulfan (β-EDS)	0,9943	55,8 ± 0,6	66,5 ± 5,1	56,3 ± 0,9	69,7 ± 11,0
4,4'-Diclorodifenildicloroetano ^b (DDD)	0,9963	59,9 ± 0,6	68,8 ± 8,9	51,7 ± 0,4	59,2 ± 13,3
Aldeído de endrina (ENDA)	0,9986	91,7 ± 2,4	93,7 ± 2,6	83,7 ± 6,1	83,1 ± 10,1
Sulfato de endosulfan ^c (ESS)	0,9951	60,2 ± 1,0	56,7 ± 9,8	48,2 ± 12,9	54,0 ± 13,2
4,4'-diclorodifeniltricloroetano ^b (DDT)	0,9901	71,1 ± 0,4	77,3 ± 3,5	77,7 ± 0,1	72,9 ± 9,3
Cetona de endrina ^c (ENDK)	0,9920	93,7 ± 2,6	91,7 ± 2,4	84,7 ± 4,2	85,6 ± 8,6
Metoxicloro ^b (MCL)	0,9940	80,3 ± 1,1	90,1 ± 2,8	79,7 ± 1,2	94,8 ± 4,5

^a Dez níveis de fortificação (de 0,5 a 100,0 μg L⁻¹)

^b LOD e LOQ de 0,10 e 0,40 μg L⁻¹, respetivamente

^c LOD e LOQ de 0,15 e 0,50 μg L⁻¹, respetivamente

A figura 11.2 exemplifica fragmentogramas relativos a amostras de água ultrapura (a), de chá preto (b) e de tabaco (c) fortificadas a $80,0 \mu\text{g L}^{-1}$, obtidos por BA μ E(Strata-X)- μ LD/GC-MS(SIM) em condições experimentais otimizadas.

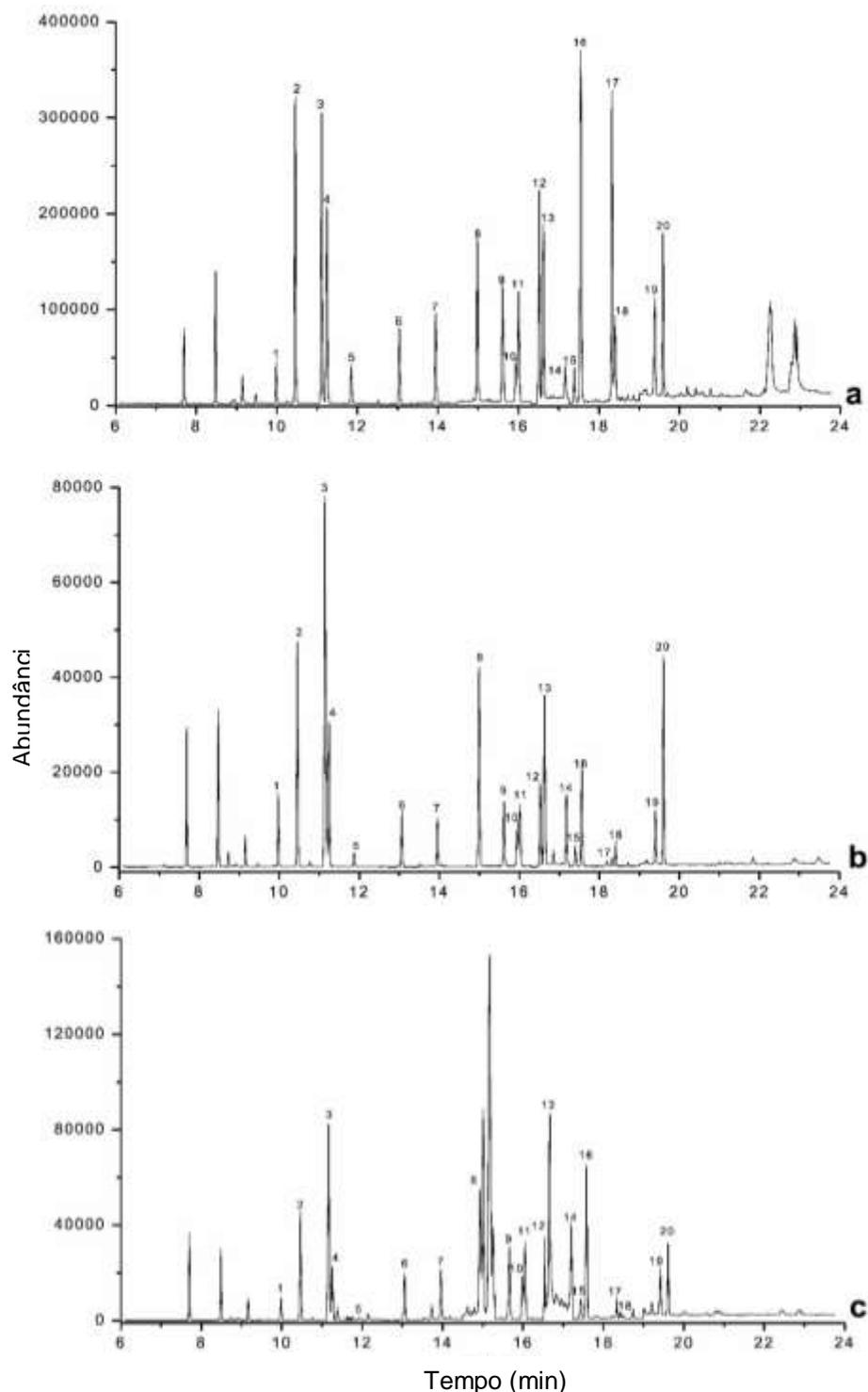


Figura 11.2 – Fragmentogramas de ensaios realizados em água ultrapura (a), chá preto (b) e tabaco (c) fortificadas a $80,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para todos os OCPs em estudo, obtidos por BA μ E(Strata-X)- μ LD/GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. 1: α -HCH; 2: γ -HCH; 3: β -HCH; 4: δ -HCH; 5: HCL; 6: ALD; 7: HCE; 8: α -CLD; 9: α -EDS; 10: β -CLD; 11: DDE; 12: DIE; 13: END; 14: β -EDS; 15: DDD; 16: ENDA; 17: ESS; 18: DDT; 19: ENDK; 20: MCL. Adaptado de [13].

Os resultados foram obtidos através da metodologia proposta aplicada a amostras de chá preto e tabaco com recurso ao SAM usando quatro níveis de fortificação (1,0 a 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Embora o método tenha apresentado bom desempenho analítico ($r^2 \geq 0,99$), nenhum dos OCPs foi detetado nas amostras analisadas ($< \text{LODs}$). Contudo, a metodologia pode ser aplicada na análise vestigial dos vinte OCPs, uma vez β - e γ -HCH já terem sido detetadas neste tipo de amostras na gama entre 1,0 e 9,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ [17,18].

11.4 Determinação de irgarol em águas de estuário [19]

Compostos triazínicos biologicamente ativos têm sido amplamente utilizados como herbicidas nas últimas cinco décadas [20]. Contudo, devido à sua alta toxicidade apresentada e à sua persistência no meio ambiente, tem havido preocupação crescente dos seus efeitos na saúde pública [21]. Nos últimos anos, uma nova metiltio-triazina (2-metil-tiol-4-tert-butilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina; irgarol-1051) tem sido usada como biocida em tintas para veículos marinhos (ex., navios), a fim de substituir compostos muito tóxicos à base de organotina. Neste sentido, têm sido realizados esforços por forma a avaliar o impacto do irgarol em ecossistemas marinhos, uma vez ter sido detetado, com alguma frequência, em várias matrizes ambientais, principalmente em estuários [22]. Assim, novos métodos analíticos sensíveis são necessários para a determinação vestigial de irgarol em matrizes aquosas ambientais.

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização, validação e aplicação da BA μ E seguida de μ LD e análise por LVI-GC-MS(SIM) para a determinação vestigial de irgarol em matrizes aquosas estuarinas. As condições instrumentais encontram-se descritas no anexo IV.

A metodologia otimizada (microextração: BA μ E(AC), 16 h (1000 rpm), pH 5,5, 5 % MeOH, 15 % NaCl); retroextração: ACN/MeOH (1/1, v/v; 200 μL), 30 min sob sonicação) permitiu obter recuperações médias de $74,5 \pm 8,6$ % tendo o método evidenciado excelente linearidade (r^2 de 0,9982) na gama de trabalho compreendida entre 0,2 e 16,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foi igualmente obtida boa precisão (RSD $\leq 12,0$ %), tendo-se alcançado LOD e LOQ de 16,0 e 0,53 ng L^{-1} , respetivamente.

Por forma a comprovar a aplicabilidade da metodologia proposta, foi aplicada a matrizes de água de estuário do rio Tejo (Lisboa) e da baía do Seixal (Seixal). Estes locais foram escolhidos por apresentarem elevado tráfego marítimo na região de Lisboa, assim como algumas docas para reparação ou atracagem naval. Foi aplicado o SAM usando quatro níveis de fortificação (2,0 a 14,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), tendo sido obtido bom desempenho analítico ($r^2 > 0,9956$). Contudo, não foi detetado irgarol nas amostras analisadas ($< \text{LODs}$).

A figura 11.3 exemplifica um traçado de corrente iónica relativo à amostra do rio Tejo fortificada a 14,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e obtido por BA μ E(AC)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM).

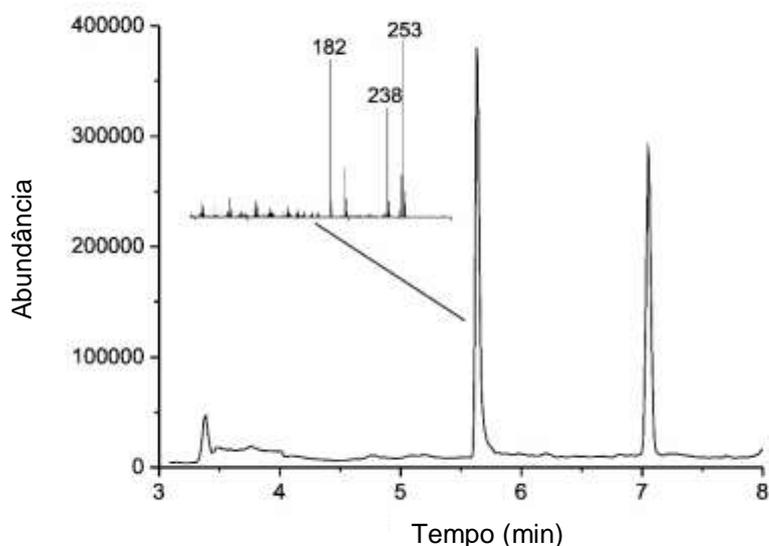


Figura 11.3 – Traçado de corrente iónica de um ensaio realizado numa amostra de água do rio Tejo fortificada a 14,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, assim como o espetro de massa do irgarol (indicando os três iões mais abundantes), obtido por BA μ E(AC)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. Adaptado de [19].

11.5 Monitorização de catinonas sintéticas em fluido oral [23]

A catinona é o principal composto ativo presente na planta da *Catha edulis* (Khat). O uso desta planta, devido aos seus efeitos estimulantes similares à anfetamina e à metanfetamina, remonta a centenas de anos, sendo ainda amplamente consumida, principalmente na África Oriental e na Península Arábica [24]. As catinonas sintéticas pretendem mimetizar estes efeitos. Desde

sua primeira aparição no mercado de drogas em meados do ano 2000, diversas catinonas sintéticas foram já identificadas, ex., 4-metilmecatinona (mefedrona), 3,4-metilenodioxipirovalerona, 3,4-metilenodioxipirovalerona (MDPV), α -pirrolidinopentiofenona (α -PVP), 3,4-metilenodioxi- α -pirrolidinopropiofenona (MDPPP), metilona, butilona, 4-metiletatcinona, 4-fluorometacatinona, α -pirrolidinopentiofenona (α -PVT) e 4'-metilenodioxi- α -pirrolidinobutiofenona (MDPBP), entre muitas outras [25]. As apreensões globais de catinonas sintéticas têm aumentado consecutivamente desde que foram relatadas pela primeira vez. Além disso, vários efeitos tóxicos estão associados ao seu consumo, incluindo náuseas, alucinações, tensão alta e, até a morte [26]. Por estas razões, existe a necessidade de desenvolver metodologias analíticas que permitam o rastreio em muitos tipos de matrizes biológicas, fundamentalmente através de abordagens não invasivas (ex., fluidos orais). Outras vantagens do uso desta matriz biológica como meio de análise são o rápido tempo de amostragem, difícil adulteração, apresentar um risco mínimo ou inexistente para a saúde e representar a fração livre de um composto [27]. Por outro lado, fluidos orais podem ser usados para detetar e confirmar a presença de catinonas sintéticas, uma vez MDPV e α -PVP terem sido detetados nas gamas compreendidas entre 20,5 e 831,7 e entre 81,9 e 935,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente [28].

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização, validação e aplicação da BA μ E seguida de μ LD e análise por GC-MS(SIM) para rastrear níveis de α -PVP, α -PVT e MDPV em fluidos orais. As condições instrumentais encontram-se descritas no anexo IV.

A metodologia otimizada (microextração: BA μ E(Strata-X), 16 h (750 rpm), pH 5,5); retroextração: ACN/MeOH (1/1, v/v; 100 μL), 45 min sob sonicação) permitiu obter recuperações médias de 43,1 (\pm 13,2 %), 63,7 (\pm 10,8 %) e 52,3 (\pm 13,6 %) para α -PVP, α -PVT e MDPV, respetivamente. Os LODs em matriz real foram de 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as três catinonas sintéticas em estudo. Como o presente trabalho apresentou degradação térmica considerável, este foi dedicado à análise qualitativa, por forma a detetar e confirmar a presença de catinonas sintéticas em matrizes de fluido oral.

A figura 11.4 reproduz fragmentogramas de amostras de fluido oral e após fortificação (500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), obtidos pela metodologia proposta.

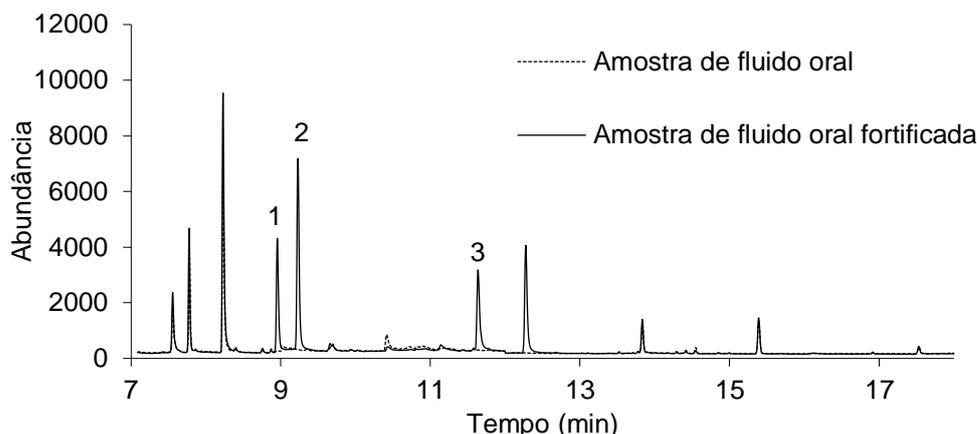


Figura 11.4 – Fragmentogramas de ensaios realizados em amostras de fluido oral e após fortificação ($500,0 \mu\text{g L}^{-1}$), obtidos por BA μ E(Strata-X)- μ LD/GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. 1: α -PVP; 2: α -PVT; 3: MDPV.

11.6 Determinação de farmacêuticos em matrizes reais [29]

Nos últimos anos, os produtos farmacêuticos têm vindo a ser comumente detetados no meio ambiente, tendo-se tornado um problema de saúde pública [30,31]. Estes compostos são libertados no meio ambiente nas suas formas originais ou metabolizadas, provenientes de resíduos urbanos, ETARs, hospitais, unidades industriais e atividades veterinárias. Os fármacos possuem características de polaridade muito variada, permitindo facilmente a sua entrada no meio aquático, levando à conseqüente contaminação [32].

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização, validação e aplicação da BA μ E seguida de μ LD e análise por HPLC-DAD para a determinação de seis farmacêuticos (furosemida, FUR; mebeverina, MEB; cetoprofeno, KET; naproxeno, NAP; diclofenac, DCF; e ácido mefenâmico, MFA) em matrizes de água e urina. As condições instrumentais encontram-se descritas no anexo IV.

A metodologia otimizada (microextração: BA μ E (HLB), 16 h (1250 rpm), pH 2,0; retroextração: ACN/MeOH (1/1, v/v; 100 μ L), 60 min sob sonicação) permitiu obter recuperações médias compreendidas entre 90,0 e 103,0 % tendo o método evidenciado excelente linearidade ($r^2 \geq 0,9983$) na gama de trabalho compreendida entre 0,1, 0,2 ou 0,4 e 24,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foi ainda obtida boa precisão ($\text{RSD} \leq 10,4 \%$) e alcançados LODs compreendidos entre 25,0 e 120,0 ng L^{-1} e LOQs entre 83,0 e 400,0 ng L^{-1} . A tabela 11.2 resume os dados relativamente à

Tabela 11.2 – Valores de recuperação obtidos de ensaios de repetibilidade e precisão intermédia, assim como de LODs, LOQs, gamas e r^2 para os seis farmacêuticos em estudo, obtidos por (BAμE(Strata-X)-μLD/HPLC-DAD), sob condições experimentais otimizadas.

Farmacêuticos	Recuperação (% , ± RSD, %)						Gama linear (μg L ⁻¹)	LOQs (ng L ⁻¹)	LODs (ng L ⁻¹)	r^2
	Intradia (n = 3)		Interdias (n = 9)		Interdias (n = 9)					
	0,4 μg L ⁻¹	1,0 μg L ⁻¹	8,0 μg L ⁻¹	16,0 μg L ⁻¹	4,0 μg L ⁻¹	4,0 μg L ⁻¹				
FUR	97,3 ± 5,0	96,4 ± 7,4	90,8 ± 4,4	92,8 ± 5,8	92,0 ± 7,9	30,0	100,0	30,0	0,1-24,0	0,9997
MEB	94,7 ± 6,9	100,7 ± 5,5	93,3 ± 5,7	94,3 ± 5,6	93,4 ± 10,0	60,0	200,0	60,0	0,2-24,0	0,9987
KET	101,0 ± 7,3	103,0 ± 9,2	98,9 ± 6,9	99,8 ± 6,4	95,7 ± 9,6	50,0	165,0	50,0	0,2-24,0	0,9984
NAP	96,2 ± 5,7	96,4 ± 3,2	100,4 ± 2,7	98,8 ± 2,4	99,8 ± 3,2	25,0	83,0	25,0	0,1-24,0	0,9983
DCF	93,3 ± 10,1	94,4 ± 5,9	93,8 ± 2,1	99,3 ± 10,0	97,2 ± 8,4	100,0	330,0	100,0	0,4-24,0	0,9988
MEF	102,3 ± 10,4	91,6 ± 7,4	90,0 ± 5,2	93,3 ± 2,3	90,3 ± 6,4	120,0	400,0	120,0	0,4-24,0	0,9985

validação da metodologia.

O método desenvolvido foi aplicado a matrizes aquosas, incluindo amostras de águas provenientes de rio, subterrânea, estuarina, mar e ETARs (entrada, #1, e saída da estação, #2). Foi aplicado o SAM usando quatro níveis de fortificação (4,0 a 16,0 μg L⁻¹), tendo sido obtido bom desempenho analítico ($r^2 \geq 0,9930$). Nas amostras de água de rio e subterrânea, nenhum dos farmacêuticos foi detetado (< LODs). Contudo, NAP encontrava-se presente nas amostras de água estuarina (0,11 ± 0,01 μg L⁻¹) e da ETAR #1 (2,00 ± 0,30 μg L⁻¹), assim como FUR na amostra de água do mar (2,30 ± 0,10 μg L⁻¹). A mesma abordagem foi igualmente aplicada a três amostras de urina. A primeira provinha de um voluntário que não tinha consumido nenhum dos farmacêuticos em estudo (U₀). As restantes provinham de voluntários a quem tinham sido administrado diclofenac na forma de comprimido (U₁) ou

na forma de creme (U_2). Conforme esperado, nenhum dos farmacêuticos em estudo foram detetados na amostra (U_0). Por outro lado, foi possível quantificar DCF nas amostras U_1 e U_2 com níveis de $177,30 \pm 3,00 \mu\text{g L}^{-1}$ e $57,30 \pm 1,00 \mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente.

A figura 11.5b exemplifica cromatogramas parciais sobrepostos das amostras de água de mar (figura 11.5b1), ETAR #1 (figura 11.5b2) e urina U_1 (figura 11.5b3), obtidos pela presente metodologia sob condições experimentais otimizadas, na qual é observada a ocorrência vestigial de FUR, NAP e DCF respetivamente.

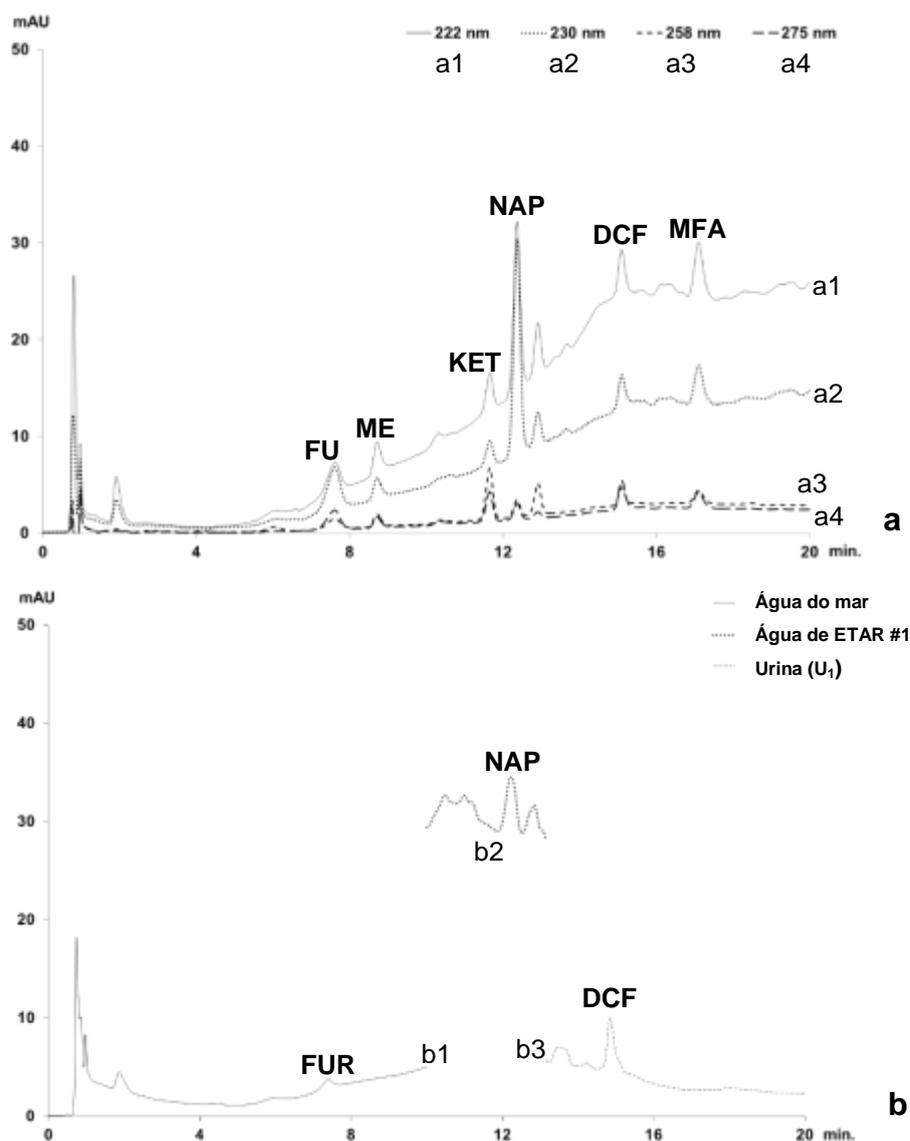


Figura 11.5 – Cromatogramas obtidos de ensaios realizados em água ultrapura fortificada a $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) a diferentes comprimentos de onda, assim como cromatogramas parciais obtidos de ensaios realizados em amostra de água do mar, de ETAR #1 e de urina U_1 (b), por BA μ E(Strata-X)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas. Adaptado de [29].

11.7 Determinação de antibióticos sulfonamidas em matrizes reais [33]

A presença de PPCPs no meio ambiente é uma questão ecológica emergente derivado do intenso uso em medicina humana e veterinária. Os antibióticos são uma classe importante de fármacos e, devido ao consumo excessivo nas últimas décadas, assim como à eliminação de drogas não utilizadas, podem ser detetados a nível vestigial em diversas matrizes ambientais, nomeadamente águas superficiais [34], da torneira [35] e residuais [36]. A sua libertação no meio ambiente através das descargas das ETARs, pode levar ao aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos, prejudicando a eficácia dos tratamentos antimicrobianos e causar problemas de saúde pública. Os genes resistentes aos antibióticos presentes no ambiente podem ser transferidos para os seres humanos através de redes de abastecimento de água e de alimentos, contribuindo para a respetiva proliferação [37]. As sulfonamidas são uma classe de antibióticos sintéticos que contêm o grupo sulfonamida e são atualmente os antimicrobianos mais empregada na medicina humana, sendo a segunda classe mais utilizada em medicina veterinária na UE [38].

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização, validação e aplicação da BA μ E seguida de μ LD e análise por HPLC-DAD para a determinação de três sulfonamidas (sulfametoxazol, SMX; sulfatiazol, STZ; e sulfadimetoxina, SDM) e trimetoprim (TMP, um antibiótico usualmente administrado com sulfonaminas) em matrizes aquosas. As condições instrumentais encontram-se descritas no anexo IV.

A metodologia otimizada (microextração: BA μ E(LiChrolut EN), 16 h (750 rpm), pH 5,5; retroextração: ACN/MeOH (1/1, v/v; 100 μ L), 15 min sob sonicação) permitiu obter recuperações compreendidas entre 63,8 e 84,2 %, tendo o método evidenciado excelente linearidade ($r^2 \geq 0,9958$) na gama de trabalho compreendida entre 0,16 e 8,0 μ g L⁻¹. Foi igualmente obtida boa precisão (RSD $\leq 15,2$ %) e alcançados LODs compreendidos entre 0,08 e 0,16 μ g L⁻¹ e LOQs compreendidos entre 0,16 e 0,53 μ g L⁻¹. A tabela 11.3 resume os dados da validação da metodologia proposta.

Tabela 11.3 – Recuperações médias, LODs, LOQs, gamas lineares e valores de r^2 obtidos para os quatro antibióticos em estudo, por BA μ E(LiChrolut EN)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

Antibiótico	Recuperação (% \pm RSD)	LODs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQs ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Gama linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2
STZ	70,8 \pm 2,9	0,08	0,26	0,16 - 8,0	0,9966
TMP	63,8 \pm 1,5	0,16	0,53	0,16 - 8,0	0,9965
SMX	81,2 \pm 2,5	0,08	0,26	0,16 - 8,0	0,9958
SDM	84,2 \pm 1,9	0,08	0,26	0,16 - 8,0	0,9977

A metodologia proposta foi aplicada a matrizes de águas da torneira, estuarinas e de ETARs. Foi aplicado o SAM usando quatro níveis de fortificação (0,8 a 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), tendo sido obtido bom desempenho analítico ($r^2 > 0,9869$). Contudo, nenhum dos antibióticos estudados foram detetados nas amostras estudadas ($<$ LODs).

A figura 11.6 exemplifica cromatogramas de ensaios realizados em águas ultrapura e da torneira fortificadas a 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, na qual é possível observar boa sensibilidade e seletividade.

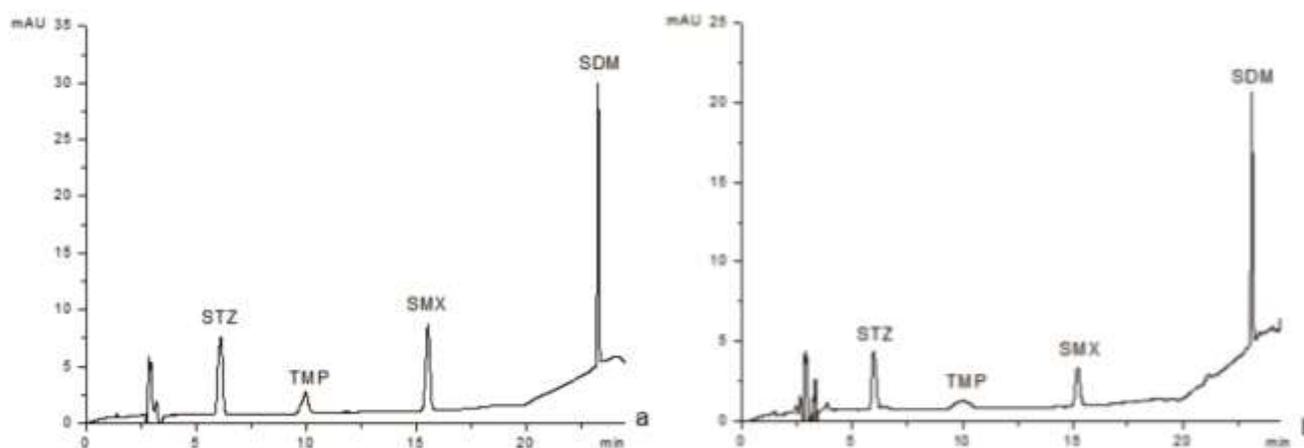


Figura 11.6 – Cromatogramas obtidos de ensaios realizados por BA μ E(LiChrolut EN)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas, a amostras de água ultrapura (a) e de água da torneira (b) fortificadas a 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Adaptado de [33].

11.8 Nanotubos de carbono como nova fase sorvente para BA μ E [39]

Os nanotubos de carbono (CNTs, do inglês *Carbon Nanotubes*) e, particularmente os nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWCNTs, do inglês *Multi-Walled Carbon Nanotubes*) têm vindo a ser introduzidos como novos nanomateriais, possuindo propriedades sorventes interessantes devido às suas elevadas razões área superficial/volume. O mecanismo de adsorção entre MWCNT e compostos orgânicos é principalmente atribuído a interações π - π entre as folhas de grafeno e os anéis aromáticos presentes nos compostos alvo. Podem igualmente ocorrer ligações de hidrogénio, bem como interações electrostáticas e hidrofóbicas, derivados da presença de vários grupos funcionais (ex., -COOH, -OH, -C=O) [40]. Por outro lado, estes materiais apresentam boa resistência mecânica, uma química superficial favorável, com elevado hidrofobicidade e excelente porosidade, o que facilita fenómenos de difusão e de adsorção, tornando-os altamente efetivas para uma ampla gama de aplicações [41].

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização, validação e aplicação da BA μ E revestida com MWCNTs seguida de μ LD e análise por HPLC-DAD para a determinação de quatro farmacêuticos modelo (cetoprofeno, KET; diclofenac, DCF; ácido mefenâmico, MFA; e gemfibrozil, GFB) em matrizes de água. As condições instrumentais encontram-se descritas no anexo IV.

A metodologia otimizada (microextração: BA μ E(MWCNTs), 3 h (1000 rpm), pH 2,0; retroextração: MeOH (100 μ L), 30 min sob sonicação) e posteriormente aplicada a matrizes reais (água potável, de mar, de lago e de ETAR), permitiu obter recuperações médias compreendidas entre 70,2 e 117,3 % usando três níveis de fortificação, tendo o método evidenciado excelente linearidade ($r^2 \geq 0,9914$) na gama de trabalho compreendida entre 0,35 e 1000,0 μ g L⁻¹. Foi igualmente obtido bons valores para os ensaios de repetibilidade e precisão intermédia (RSD $\leq 9,7$ %) e ainda alcançados LODs compreendidos entre 0,02 e 0,05 μ g L⁻¹ e LOQs compreendidos entre 0,08 e 0,16 μ g L⁻¹. A tabela 11.4 resume os dados das recuperações para diferentes níveis de fortificação obtidas nas diferentes matrizes analisadas.

A figura 11.7 exemplifica cromatogramas obtidos de ensaios em água de ETAR fortificadas a 5,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, assim como sem fortificação, usando BA μ E(MWCNT)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

Tabela 11.4 – Recuperações médias ($\%, \pm$ RSD) a três níveis de fortificação ($n = 4$), assim como valores de r^2 , obtidas para as amostras reais usando BA μ E(MWCNT)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

	r^2	5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	300,0 $\mu\text{g L}^{-1}$
Água potável				
KET	0,9995	84,7 \pm 4,7	92,4 \pm 3,1	87,2 \pm 4,3
DCF	0,9975	82,7 \pm 2,7	101,1 \pm 0,9	98,2 \pm 0,9
MFA	0,9997	89,7 \pm 6,8	112,1 \pm 4,1	117,3 \pm 2,9
GFB	0,9966	70,4 \pm 0,7	97,6 \pm 0,3	89,7 \pm 4,8
Água do mar				
KET	0,9988	77,2 \pm 0,7	84,9 \pm 0,5	86,7 \pm 0,8
DCF	0,9914	117,2 \pm 4,4	84,2 \pm 6,6	107,8 \pm 0,2
MFA	0,9976	76,6 \pm 5,2	104,4 \pm 1,3	83,5 \pm 2,7
GFB	0,9976	72,0 \pm 3,1	101,6 \pm 2,1	94,0 \pm 0,7
Água de lago				
KET	0,9959	81,0 \pm 1,9	88,9 \pm 0,8	94,8 \pm 3,7
DCF	0,9920	115,7 \pm 2,2	84,2 \pm 6,6	105,5 \pm 1,5
MFA	0,9951	73,8 \pm 3,8	89,6 \pm 2,7	90,6 \pm 5,5
GFB	0,9909	70,2 \pm 4,5	98,2 \pm 0,7	86,5 \pm 0,3
Água de ETAR				
KET	0,9994	76,2 \pm 1,5	77,7 \pm 0,2	87,1 \pm 5,5
DCF	0,9987	75,9 \pm 4,7	83,5 \pm 0,6	94,4 \pm 4,7
MFA	0,9991	86,5 \pm 1,2	105,0 \pm 1,8	108,0 \pm 3,4
GFB	0,9973	73,3 \pm 1,6	77,3 \pm 3,8	86,8 \pm 4,3

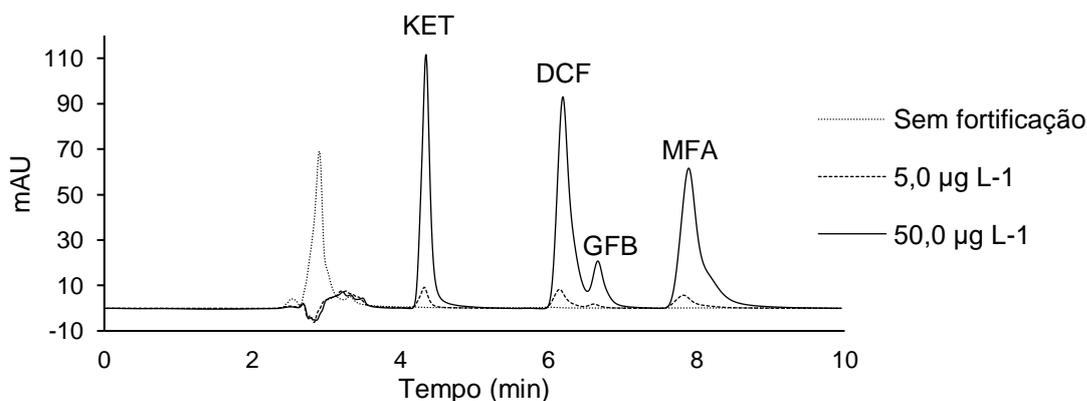


Figura 11.7 – Cromatogramas obtidos de ensaios realizados em amostras de água de ETAR fortificadas a 5,0 e 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, assim como sem fortificação, usando BA μ E(MWCNT)- μ LD/HPLC-DAD, sob condições experimentais otimizadas.

11.9 Determinação de antidepressivos tricíclicos em matrizes de urina [42]

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a depressão é uma doença mental comum e uma das maiores causadoras de incapacidade em todo o mundo. Estima-se que a nível mundial 300 milhões de pessoas sejam afetadas por esta doença, com maior incidência nas mulheres do que nos homens. Os antidepressivos podem ser eficazes no tratamento de depressão moderada a severa, não sendo contudo a primeira fase de tratamento. Esta inclui terapias, como terapia cognitivo comportamental ou psicoterapia. As duas formas de tratamento podem também ser combinadas. O tratamento depende do paciente, assim como do tipo e da causa da depressão [43]. Os antidepressivos permitem que pessoas com depressão consigam viver vidas praticamente normais, sem quaisquer restrições. Uma classe significativa destes fármacos são os antidepressivos tricíclicos (TCAs, do inglês *Tricyclic Antidepressants*). Contudo, possuem uma estreita gama terapêutica (concentrações plasmáticas compreendidas entre os 50 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$). Por outro lado, os efeitos tóxicos dos TCAs, *i.e.*, sintomas como alta temperatura corporal, visão enevoada, pupilas dilatadas, sono, confusão, convulsões, ritmo cardíaco acelerado e paragem cardíaca, podem ser observados quando a concentração no plasma excede 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, podendo a morte surgir quando ocorrem concentrações acima de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ [44–46]. Neste sentido, a monitorização destes compostos é muito relevante, dado que pode ajudar no controlo efetivo da farmacoterapia e da intoxicação por fármacos, na farmacologia clínica e na ciência forense.

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização, validação e aplicação de dispositivos ngBA μ E seguida de μ LD e análise por LVI-GC-MS(SIM) para a determinação de cloridrato de amitriptilina (AMT), cloridrato de mianserina (MIA), trimipramina (TRI), cloridrato de imipramina (IMP), mirtazapina (MIR) e cloridrato de dosulepina (DOT) em amostras de urina. As condições instrumentais encontram-se descritas no anexo IV.

A metodologia otimizada (microextração: BA μ E(ENVI-18), 16 h (990 rpm), pH 12,0, 5 % NaCl (p/v); retroextração: ACN/MeOH (1/1, v/v; 100 μL), 30 min sob sonicação) permitiu obter recuperações médias compreendidas entre 92,3 e 111,5 % para dois níveis de fortificação. A gama de trabalho foi compreendida entre 10,0 e 1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, tendo sido obtido bons valores de precisão ($\text{RSD} \leq$

20,3 %) e exatidão ($RE \leq \pm 20,4 \%$). Os LODs alcançados foram entre 0,2 e 1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$. A tabela 11.5 resume os dados de precisão e exatidão intra e interdias a quatro níveis de fortificação, obtidos pela metodologia proposta.

Tabela 11.5 – Valores exatidão (%) intra ($n = 6$) e interdias ($n = 18$), assim como de repetibilidade e precisão intermédia (\pm RSD, %) usando quatro níveis de fortificação, obtidos por BA μ E(ENVI-18)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas.

TCA	Fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intra-dia			Inter-dia		
		Exatidão (%)	\pm	Precisão (RSD, %)	Exatidão (%)	\pm	Precisão (RSD, %)
AMT	10,0	5,1	\pm	8,2	20,4	\pm	15,5
	50,0	-5,5	\pm	4,6	-5,0	\pm	8,9
	500,0	17	\pm	4,8	2,9	\pm	12,2
	1000,0	4,8	\pm	8,7	-4,4	\pm	11,8
MIA	10,0	-6,6	\pm	4,3	-2,8	\pm	16,7
	50,0	-0,5	\pm	11,1	0,1	\pm	13,2
	500,0	4,8	\pm	8,6	1,9	\pm	11,8
	1000,0	-0,1	\pm	8,9	2,5	\pm	13,2
TRI	10,0	0,9	\pm	6,8	13,1	\pm	18,1
	50,0	-1,7	\pm	6,1	11,0	\pm	13,8
	500,0	5,7	\pm	4,8	13,	\pm	9,2
	1000,0	-4,1	\pm	13,3	5,8	\pm	11,7
IMP	10,0	-8,4	\pm	9,6	9,9	\pm	20,2
	50,0	6,7	\pm	12,8	0,9	\pm	15,4
	500,0	-1,2	\pm	6,3	14,1	\pm	15,4
	1000,0	-0,5	\pm	11,2	13,4	\pm	15,5
MIR	10,0	1,3	\pm	15,1	15,9	\pm	19,9
	50,0	13,3	\pm	0,9	14,5	\pm	2,1
	500,0	6,5	\pm	6,0	12,9	\pm	12,1
	1000,0	-0,2	\pm	7,3	11,1	\pm	13,8
DOT	10,0	8,1	\pm	0,4	14,1	\pm	9,4
	50,0	14,2	\pm	2,5	1,0	\pm	13,5
	500,0	-8,2	\pm	10,3	-0,9	\pm	16,8
	1000,0	-2,0	\pm	7,2	-8,2	\pm	10,1

A metodologia otimizada foi posteriormente aplicada a 52 amostras de urina provenientes de uma empresa de análises clínicas, tendo AMT sido detetada numa das amostras ($158,9 \mu\text{g L}^{-1}$). A figura 11.8 mostra traçados de

corrente iónica de amostras de urina controlo fortificadas a $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$, assim como de uma amostra de urina real, obtidos pela metodologia otimizada.

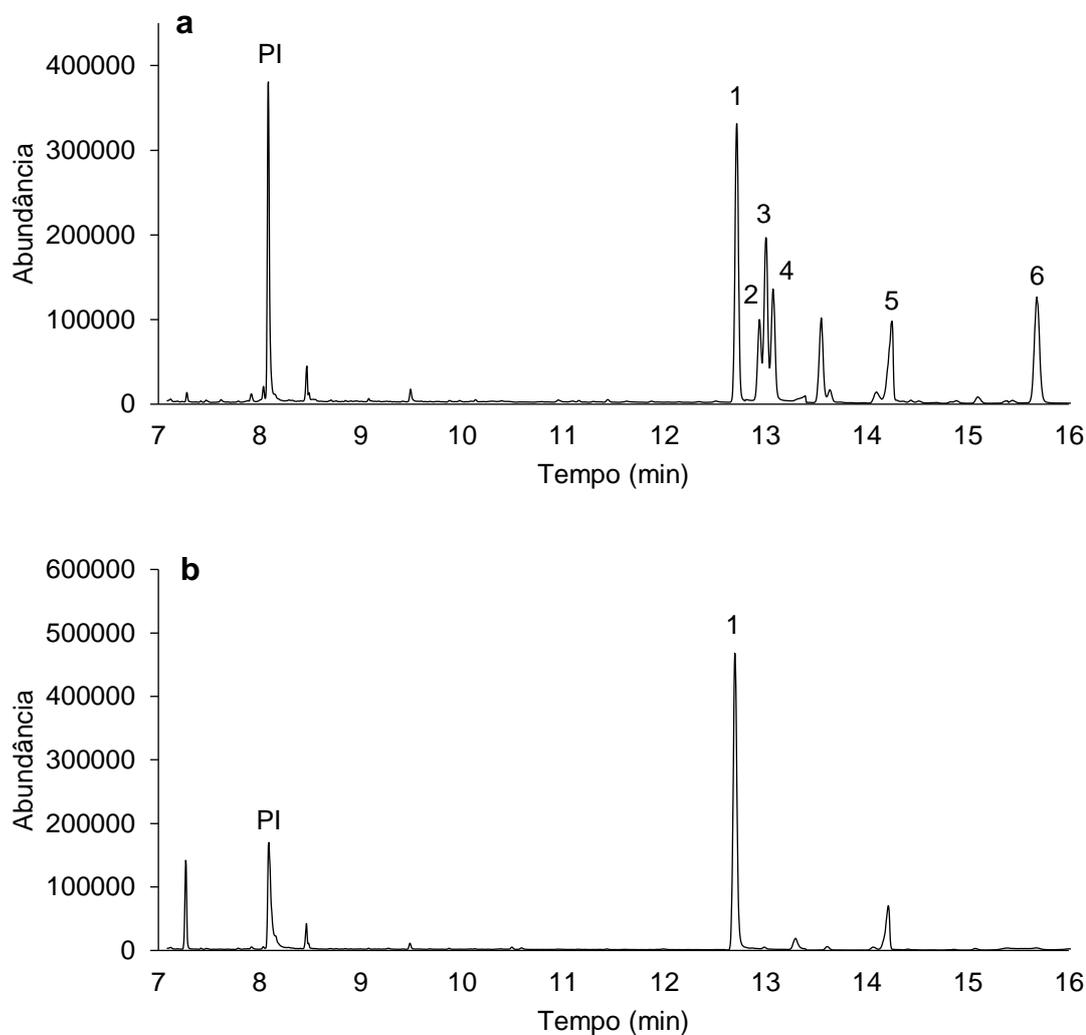


Figura 11.8 – Traçados de corrente iónica de uma amostra de urina controlo fortificada a $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (a) e de uma amostra de urina real (b), obtidos por BA μ E(ENVI-18)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), sob condições experimentais otimizadas. Adaptado de [42].

11.10 Conclusões

As abordagens analíticas propostas tendo por base a técnica BA μ E têm vindo a demonstrar bom desempenho para a análise, tanto de contaminantes emergentes, como de fármacos e substâncias de abuso.

Fica assim demonstrado que as metodologias por BA μ E apresentam elevada eficácia e robustez, mesmo quando usada por diferentes operadores e

em diversas aplicações, nomeadamente para a análise vestigial de diferentes classes de compostos (com propriedades físico-químicas distintas) principalmente em matrizes aquosas, mas também em matrizes orgânicas (ex., diesel). Por outro lado, é claramente comprovado a enorme abrangência da técnica BAµE, podendo ser aplicada em combinação com os mais variados sistemas instrumentais, incluindo HPLC, GC e GC×GC.

11.11 Referências

- [1] E. Lazzari, S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, G.P.S. Maciel, A.P. Carvalho, E.B. Caramão, T. Bjerk, *Int. J. Eng. Res. Sci.* 3 (2017) 46–57.
- [2] S. Nanda, A.K. Dalai, F. Berruti, J.A. Kozinski, *Waste and Biomass Valorization* 7 (2016) 201–235.
- [3] W. Kwapinski, C.M.P. Byrne, E. Kryachko, P. Wolfram, C. Adley, J.J. Leahy, E.H. Novotny, M.H.B. Hayes, *Waste and Biomass Valorization* 1 (2010) 177–189.
- [4] H. Deng, G. Li, H. Yang, J. Tang, J. Tang, *Chem. Eng. J.* 163 (2010) 373–381.
- [5] S. Lv, X. Chen, Y. Ye, S. Yin, J. Cheng, M. Xia, *J. Hazard. Mater.* 171 (2009) 634–639.
- [6] N.R. Neng, A.S. Mestre, A.P. Carvalho, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6263–6270.
- [7] T. Wang, S. Tan, C. Liang, *Carbon N. Y.* 47 (2009) 1880–1883.
- [8] D. An, Y. Guo, B. Zou, Y. Zhu, Z. Wang, *Biomass and Bioenergy*. 35 (2011) 1227–1234.
- [9] T. Budinova, E. Ekinci, F. Yardim, A. Grimm, E. Björnbom, V. Minkova, M. Goranova, *Fuel Process. Technol.* 87 (2006) 899–905.
- [10] X.F. Li, Y. Zuo, Y. Zhang, Y. Fu, Q.X. Guo, *Fuel*. 113 (2013) 435–442.
- [11] M. Almarri, X. Ma, C. Song, *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (2009) 951–960.
- [12] G.C. Laredo, E. Altamirano, J.A. De los Reyes, *Appl. Catal. A Gen.* 243 (2003) 207–214.
- [13] S.M. Ahmad, M.I. Gomes, A.H. Ide, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 00 (2019) 1–15.
- [14] U. Ali, J.H. Syed, R.N. Malik, A. Katsoyiannis, J. Li, G. Zhang, K.C. Jones, *Sci. Total Environ.* 476–477 (2014) 705–17.
- [15] M. León-Olea, C.J. Martyniuk, E.F. Orlando, M.A. Ottinger, C.S. Rosenfeld, J.T. Wolstenholme, V.L. Trudeau, *Gen. Comp. Endocrinol.* 203 (2014) 158–73.
- [16] G.L. Brun, R.M. MacDonald, J. Verge, J. Aubé, *Chemosphere*. 71 (2008) 314–27.
- [17] D. Liu, S. Min, *J. Chromatogr. A* 1235 (2012) 166–173.
- [18] Y.B. Pakade, R. Sharma, G. Nadda, D.K. Tewary, *Int. J. Food Prop.* 16 (2013) 745–755.
- [19] B.B. Calado, S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. Sci.* 54 (2016) 1453–1459.
- [20] J.E. Gittens, T.J. Smith, R. Suleiman, R. Akid, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1738–1753.
- [21] E. Almeida, T.C. Diamantino, O. de Sousa, *Prog. Org. Coatings*. 59 (2007) 2–20.
- [22] I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, *Environ. Int.* 30 (2004) 235–248.
- [23] A.M. Segurado, *Análise Vestigial de Substâncias de Abuso*, Tese de Mestrado em

- Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2016.
- [24] A. El-Menyar, A. Mekkodathil, H. Al-Thani, A. Al-Motarreb, *Oman Med. J.* 30 (2015) 77–82.
- [25] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *European Drug Report 2019: Trends and Developments* (2019) Publications Office of the European Union, Luxemburgo.
- [26] M. Capriola, *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* 5 (2013) 109–115.
- [27] H. Elmongy, M. Abdel-Rehim, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 83 (2016) 70–79.
- [28] P. Amaratunga, B.L. Lemberg, D. Lemberg, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 622–628.
- [29] C. Almeida, S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 2093–2106.
- [30] W.W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 603–18.
- [31] D. Fatta, A. Achilleos, A. Nikolaou, S. Meriç, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 515–533.
- [32] A. Agüera, M.J. Martínez Bueno, A.R. Fernández-Alba, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 3496–3515.
- [33] A.H. Ide, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 593–599.
- [34] M. Petrović, B. Škrbić, J. Živančev, L. Ferrando-Climent, D. Barcelo, *Sci. Total Environ.* 468–469 (2014) 415–428.
- [35] Y. Valcárcel, S.G. Alonso, J.L. Rodríguez-Gil, A. Castaño, J.C. Montero, J.J. Criado-Alvarez, I.J. Mirón, M. Catalá, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 1396–1412.
- [36] J. Xu, Y. Xu, H. Wang, C. Guo, H. Qiu, Y. He, Y. Zhang, X. Li, W. Meng, *Chemosphere* 119 (2015) 1379–1385.
- [37] M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 173–188.
- [38] M.J. García-Galán, M. Silvia Díaz-Cruz, D. Barceló, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 1008–1022.
- [39] F. Abujaber, S.M. Ahmad, N.R. Neng, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, F.J. Guzmán Bernardo, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1600 (2019) 17–22.
- [40] M. Trojanowicz, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 480–489.
- [41] Z.A. AlOthman, S.M. Wabaidur, *Arab. J. Chem.* 12 (2019) 633–651.
- [42] M.N. Oliveira, Desenvolvimento de um Método Analítico Baseado na Técnica de Microextração Adsorptiva em Barra (BA μ E) para a Determinação de Antidepressivos Tricíclicos em Matrizes Biológicas, Tese de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2019..
- [43] P. Lovatt, *Nurse Prescr.* 9 (2014) 38–41.
- [44] A. Mohebbi, S. Yaripour, M.A. Farajzadeh, M.R. Afshar Mogaddam, *J. Chromatogr. A* 1571 (2018) 84–93.
- [45] M.G. Santos, I.M.C. Tavares, A.F. Barbosa, J. Bettini, E.C. Figueiredo, *Talanta* 163 (2017) 8–16.
- [46] M. Safari, M. Shahlaei, Y. Yamini, M. Shakorian, E. Arkan, *Anal. Chim. Acta* 1034 (2018) 204–213.

Capítulo 12

Conclusões Finais e Perspetivas Futuras

12.1 Conclusões finais

A presente dissertação propõe o desenvolvimento, otimização, validação e aplicação de metodologias inovadoras baseadas em BA μ E para a determinação vestigial de contaminantes e substâncias de abuso emergentes em matrizes ambientais e biológicas.

Numa primeira fase, ficou demonstrado o grande potencial analítico da técnica BA μ E com recurso a misturas de fases sorventes para revestimento dos dispositivos, seguida de μ LD e análise por CE-DAD, na determinação vestigial de anti-inflamatórios não esteroides (ácido salicílico, ácido mefenâmico, diclofenac e naproxeno) em matrizes ambientais e biológicas (urina). A metodologia proposta demonstrou bom desempenho analítico e grande potencial para incrementar a sensibilidade e seletividade de outras classes de compostos prioritários.

Posteriormente, a técnica BA μ E foi igualmente aplicada na determinação de micropoluentes orgânicos (diclofenac, 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, carbamazepina e triclosan) em matrizes ambientais, em combinação com μ LD e análise por HPLC-DAD. A abordagem desenvolvida mostrou ser uma alternativa analítica a outras técnicas bem estabelecidas baseadas em microextração estática.

Foi igualmente proposta e desenvolvida uma metodologia analítica para a determinação de compostos farmacêuticos (sulfametoxazol, triclosan, carbamazepina, diclofenac, ácido mefenâmico, 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, estrona, gemfibrozil e ácido clofíbrico) em matrizes ambientais. Neste sentido, foram preparados, caracterizados e usados materiais à base de hidratos de carbono (*i.e.*, hidrocarbonizados porosos), como fases inovadoras para revestimento dos dispositivos BA μ E, seguido de μ LD e análise por HPLC-DAD. Uma vez mais, a técnica mostrou grande robustez e versatilidade, tendo as novas fases evidenciado grande potencial para aplicações futuras.

Não obstante a importância da análise de contaminantes emergentes em matrizes ambientais, existe igualmente elevada relevância na determinação de substâncias de abuso em matrizes biológicas. Neste contexto, os desenvolvimentos que se seguiram foram dedicadas à aplicação da BA μ E em matrizes de urina, plasma, soro e fluido oral.

Inicialmente foi proposta, desenvolvida e validada uma metodologia analítica para a determinação de canabinóides sintéticos (AM-694, 5F-cumyl-PINACA, MAM-2201, 5F-UR-144, JWH-018, JWH-122, UR-144 e APINACA) em matrizes de fluido oral. A etapa de microextração foi seguida de μ LD e análise por HPLC-DAD. Aquando do enriquecimento, ao invés de ser usado 25 mL de amostra, diminuiu-se este volume para 10 mL, tendo sido observado um incremento, quer da eficiência, quer da cinética de equilíbrio, uma vez terem sido obtidos níveis de recuperação consideráveis (> 80 %) para todos os compostos alvo em apenas 3 h de tempo de microextração. A abordagem proposta apresentou igualmente bom desempenho analítico, sendo ainda das poucas metodologias baseadas em microextração para análise de canabinóides sintéticos em fluido oral.

A técnica BA μ E, para além de evidenciar inúmeras vantagens, apresenta contudo algumas limitações, particularmente no número de passos analíticos envolvidos, na cinética de microextração, bem como na quantidade limitada de amostras que podem ser preparadas em simultâneo. Estes fatores são muito pertinentes, particularmente em caso da necessidade da análise de um elevado número de amostras em ambiente de rotina. Neste sentido, foi introduzido uma nova configuração experimental, a HT-BA μ E. O *apparatus* proposto apresenta tamanho reduzido, sendo amigo do utilizador e do ambiente, permitindo a microextração e subsequente retroextração de até 100 amostras em simultâneo recorrendo a banho ultrassónico, tanto para a etapa de enriquecimento da amostra, como para a posterior etapa de μ LD. Ao se recorrer a frascos de amostragem convencionais para sistemas cromatográficos automatizados, foi possível realizar a microextração, retroextração e a consequente combinação com HPLC e/ou GC de forma simples e eficaz. Este novo ciclo analítico foi inicialmente aplicado e testado na determinação de benzodiazepinas (prazepam, bromazepam, oxazepam, lorazepam, diazepam, alprazolam, temazepam e loflazepato de etilo) em amostras de urina, soro e plasma. A fase de microextração foi seguida de μ LD e análise por HPLC-DAD. Esta técnica foi posteriormente aplicada na análise de nicotina e cotinina em amostras de urina, seguida de μ LD e análise por LVI-GC-MS(SIM), resultando num tempo de preparação de amostra de apenas ~ 2 min/amostra. Estas novas abordagens analíticas provaram ser de fácil utilização, apresentaram custo-benefício muito

vantajoso e grande potencial para o trabalho de rotina, sempre que as aplicações exijam tomadas de decisão rápidas.

Embora o ciclo analítico HT-BA μ E- μ LD apresentasse desempenho analítico satisfatório, eram ainda necessários até 150 min de microextração para maximizar a recuperação dos compostos alvo. Por forma a reduzir ainda mais o tempo necessário para alcançar o equilíbrio, foi utilizado um agitador orbital com capacidade de operação até 2200 rpm, no sentido de incrementar a cinética de microextração. Esta nova modificação foi aplicada na análise de cetamina e norcetamina em amostras de urina, seguida de μ LD em banho ultrassónico e análise por LVI-GC-MS(SIM). Os dados obtidos mostraram uma diminuição substancial no tempo de microextração (apenas 30 min) usando velocidades de agitação elevadas (1800 rpm). Com esta melhoria, a metodologia proposta resultou num tempo de preparação ainda menor (apenas 0,45 min/amostra), demonstrando o elevado rendimento da abordagem analítica desenvolvida.

Durante a presente dissertação, foi igualmente possível realizar diversos estudos científicos em colaboração com investigadores dedicados a projetos de licenciatura, mestrado e doutoramento. Estes trabalhos envolveram o desenvolvimento, otimização, validação e aplicação de metodologias baseadas em BA μ E na análise de várias classes de compostos em diversos tipos de matrizes, em combinação com diferentes sistemas instrumentais. Os resultados indicaram que todos os trabalhos se pautaram por resultados analíticos significativos, demonstrando de forma inequívoca, a notável abrangência, versatilidade, eficácia e robustez da técnica BA μ E.

Em suma, as metodologias propostas e desenvolvidas na presente dissertação mostraram ser de fácil manuseamento, amigas do utilizador e do ambiente, assim como de inequívoco custo-benefício, sem nunca negligenciar o desempenho analítico. Por outro lado, o *apparatus* HT-BA μ E provou ser uma abordagem analítica rápida e conveniente, em particular para a análise em rotina de um elevado número de amostras.

Por fim, os métodos propostos, para além de validados, demonstraram ser alternativas analíticas fiáveis na determinação vestigial de contaminantes e substâncias de abuso emergentes em matrizes ambientais e biológicas, tendo sido nitidamente alcançados todos os objetivos inicialmente propostos.

12.2 Perspetivas futuras

Como perspectivas futuras, propõe-se a aplicação das abordagens analíticas desenvolvidas a outras classes de contaminantes e substâncias de abuso emergentes nas mais diversas matrizes ambientais e biológicas.

Sugere-se a preparação e aplicação de novos sorventes, incluindo as fases à base de hidrocarbonizados porosos, líquidos iónicos, MWCNTs, materiais magnéticos, zeólitos, etc. para revestimento em BA μ E, por forma a incrementar ainda mais a seletividade e/ou a sensibilidade em contexto vestigial.

Para trabalhos futuros, propõe-se ainda, a miniaturização do dispositivo BA μ E por forma a aumentar os fatores de concentração; a manipulação da temperatura no sentido de incrementar a eficiência e a cinética de extração; a aplicação da técnica no modo *headspace* por forma a extrair seletivamente compostos voláteis/semivoláteis, diminuindo eventuais efeitos de matriz; assim como a combinação com outras técnicas de microextração, nomeadamente a DLLME, para incrementar a sensibilidade e a seletividade da metodologia, em particular na análise de matrizes com elevada complexidade (ex., amostras biológicas). Propõe-se igualmente o aumento da razão fase sorvente/amostra por forma a melhorar as eficiências e cinéticas de extração, bem como a realização da otimização experimental com recurso a abordagens multivariadas, no sentido de avaliar, com maior detalhe, eventuais interações conjuntas entre os diferentes parâmetros avaliados.

Por último, a combinação das técnicas propostas com sistemas hifenados e/ou *Tandem*, ou mesmo com instrumentação de alta resolução, é uma possibilidade que deve igualmente ser equacionada, no sentido de aumentar ainda mais a seletividade e a sensibilidade, fundamentalmente na determinação vestigial de analitos desconhecidos em matrizes que evidenciem elevada complexidade.

Anexos

Anexo I - Técnicas de separação

De modo a ser possível a identificação dos componentes de uma mistura (complexa), é necessário realizar a separação dos mesmos, particularmente com recurso a técnicas de separação como as cromatografias ou a eletroforese capilar. Estas têm vindo a ter grande aplicação em diversas áreas da ciência.

A.I.1 Técnicas cromatográficas

A.I.1.1 Aspetos históricos

O termo “cromatografia” foi introduzido e utilizado pela primeira vez pelo botânico russo Mikhail S. Tswett em 1906 no jornal da sociedade alemã de botânica. M.S. Tswett aplicou a técnica para separar diversos pigmentos de plantas, principalmente clorofilas e xantofilas, através da passagem de soluções numa coluna de vidro empacotada com carbonato de sódio. As espécies separadas apareciam como bandas coradas na coluna resultando assim o termo “*cromatografia*” escolhido para o método (do grego “*chroma*” que significa cor e “*graphein*” que significa escrita) [1–3].

As técnicas cromatográficas têm-se imposto como as principais técnicas de separação devido à grande necessidade dos cientistas terem métodos capazes de caracterizar diversos tipos de misturas complexas. A importância destas técnicas foi reconhecida pela atribuição do prémio Nobel da Química à dupla A.J.P. Martin e R.L.M. Synge em 1952, pelo desenvolvimento teórico da cromatografia de partição. Desde então, a cromatografia tem tido um papel decisivo nas diversas descobertas científicas. Com o intenso avanço tecnológico em instrumentação para cromatografia em fase gasosa (GC) e cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC), estas técnicas apresentam elevado potencial ao nível das separações finas. Estas encontram-se sob constante desenvolvimento, sendo técnicas utilizadas em rotina em diversas áreas, como química, biologia, medicina, farmacêutica, ambiental, controlo de qualidade, entre outras.

A.I.1.2 Descrição geral e conceitos teóricos

Por forma a compreender o método cromatográfico é necessário ter em conta uma série de conceitos básicos. Dado que existem atualmente dezenas de manuais que descrevem os conceitos de cromatografia de forma exaustiva, nesta secção será apresentado de forma resumida alguns dos aspetos teóricos considerados mais relevantes [4–7].

A cromatografia engloba um conjunto de métodos de separação nos quais os componentes duma mistura se distribuem entre duas fases, uma fase estacionária sólida ou líquida (fixada numa coluna ou numa superfície sólida) através da qual é percorrida por uma fase móvel, que pode ser líquida, gasosa ou um fluido supercrítico.

A separação resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel, ocasionadas pelas diferentes interações com a fase estacionária, promovendo distribuições diferenciadas no equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. As concentrações relativas de um componente na fase estacionária (c_S) e na fase móvel (c_M) relacionam-se através do coeficiente de distribuição (K), dado pela equação (A.I.1.1):

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad (\text{A.I.1.1})$$

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

Considerando uma mistura de dois componentes, a separação numa coluna só se efetuará se forem diferencialmente retidos pela fase estacionária, sendo necessários volumes diferentes de fase móvel para eluir cada componente individualmente.

Um composto não retido será eluído no tempo morto (t_M), enquanto um composto retido eluirá posteriormente, atravessando a coluna num tempo de retenção (t_R) superior, sendo o tempo de retenção ajustado (t_E) o tempo que o composto despende na fase estacionária (figura A.I.1.1).

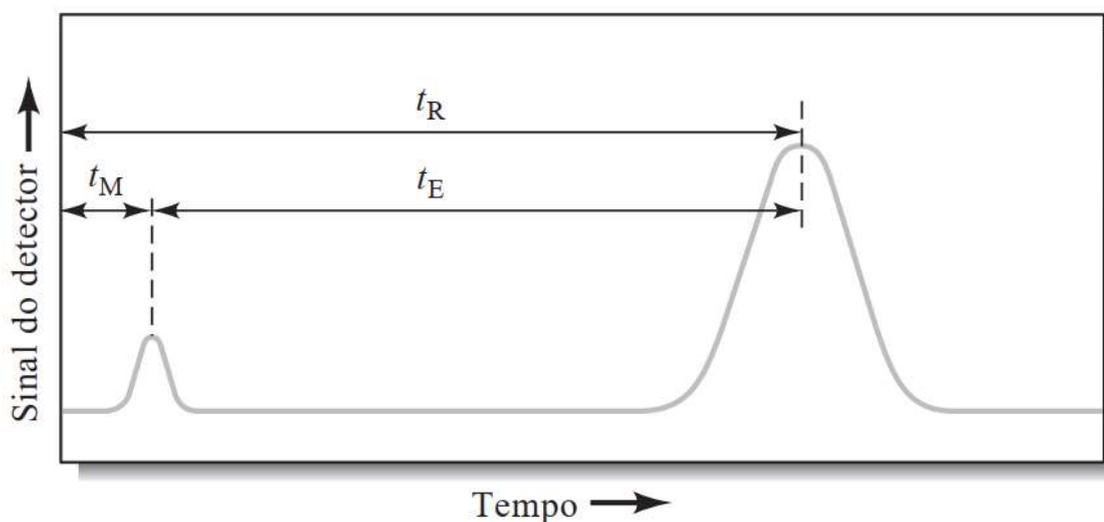


Figura A.I.1.1 – Ilustração do tempo morto (t_M), de retenção ajustado (t_E) e do tempo de retenção (t_R) num cromatograma típico. Adaptado de [8].

Uma medida do grau de retenção é designada por fator de capacidade (k') que pode ser calculado a partir da equação (A.I.1.2), desde que a velocidade de fluxo se mantenha constante:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (\text{A.I.1.2})$$

A separação de dois compostos adjacentes pode exprimir-se através do fator de separação ou de seletividade (α), que está relacionado com a fase estacionária e condições de operação, traduzindo-se pela razão entre os fatores de capacidade de dois compostos adjacentes, equação (A.I.1.3):

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (\text{A.I.1.3})$$

Sendo a cromatografia um fenômeno de transferência de massa, a eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser expressa pelo número de pratos teóricos (N), e correspondente altura equivalente (H), grandeza que exprime o número de equilíbrios que ocorrem durante a separação, sendo tanto maior quanto maior for N , e que pode ser calculada pela equação (A.I.1.4), em que W é a largura da base de um pico simétrico:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (\text{A.I.1.4})$$

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

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

$$H = A + \frac{B}{u_x} + C u_x \quad (\text{A.I.1.5})$$

Na equação A.I.1.5, o termo A está relacionado com as diferentes vias migratórias que um analito pode percorrer ao atravessar o empacotamento da fase estacionária, sendo significativo quando se usam colunas empacotadas e desprezível quando se usam colunas capilares abertas. A razão B/u_x resulta da difusão molecular longitudinal, ou seja, da dispersão do soluto ao longo do comprimento da coluna – maioritariamente por difusão na fase móvel, sendo inversamente proporcional à velocidade linear. O termo $C u_x$ consiste no tempo necessário para o equilíbrio eluição/retenção do soluto entre as fases móvel e a estacionária, sendo diretamente proporcional à velocidade linear ou ao fluxo.

O objetivo das aplicações cromatográficas consiste em separar todos os componentes de uma dada mistura, sendo a medida de separação entre dois compostos designada por resolução (R_S). Desta forma, pode recorrer-se a uma expressão que exprime a R_S em termos dos três fatores fundamentais, ou seja, seletividade (α), fator de capacidade (k') e eficiência (N), como é ilustrado na equação (A.I.1.6):

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \times \left(\frac{k'_B}{k'_B+1} \right) \quad (\text{A.I.1.6})$$

Para qualquer pico com formato gaussiano ocorre separação completa ou resolução entre eventuais picos adjacentes sempre que R_S seja superior ou igual a 1,5.

Genericamente, as técnicas cromatográficas podem ser classificadas relativamente à forma física pelo qual as fases móvel e estacionária entram em contacto. Isto é, numa forma planar, no qual a fase móvel é mantida num prato ou numa folha de papel e a fase móvel move-se pela fase estacionária por capilaridade ou gravidade, ou em coluna, no qual a fase móvel é mantida num tubo estreito pelo qual a fase móvel é forçada a passar sob pressão. No entanto, outra classificação é possível, tendo em consideração três critérios, nomeadamente a natureza física da fase móvel, o suporte da fase estacionária e a natureza do mecanismo de separação (figura A.I.1.2).

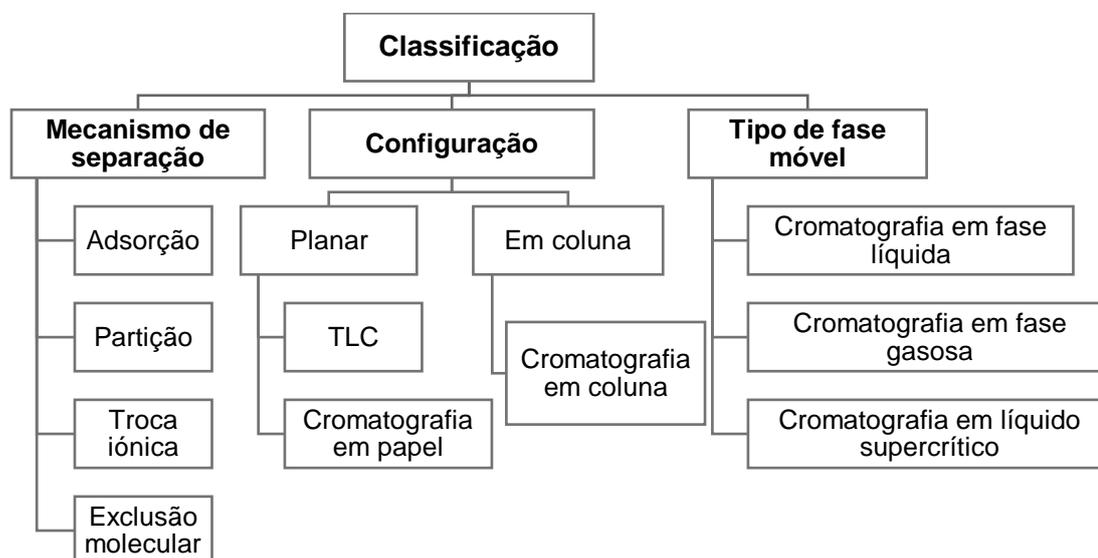


Figura A.I.1.2 – Classificação dos principais métodos cromatográficos.

A.I.1.3 Cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC)

Na cromatografia em fase líquida em coluna clássica, o movimento da fase móvel ocorre por ação da gravidade, sendo a separação lenta. No entanto, com recurso à moderna instrumentação cromatográfica, a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC) permite alcançar melhor resolução para além da maior rapidez associada.

Os componentes básicos de um sistema de HPLC são constituídos por uma bomba que propulsiona o eluente proveniente de reservatórios, um sistema de injeção para a introdução da amostra, uma coluna para separação e um detetor que permite registar a separação, controlados com recurso a *software*, permitindo análise qualitativa e quantitativa dos analitos em estudo.

A figura A.I.1.3 ilustra um esquema de um sistema de HPLC convencional. Utilizam-se ainda diversas vezes, como acessórios, coletores de frações, dispositivos para condicionamento da coluna, entre outros.

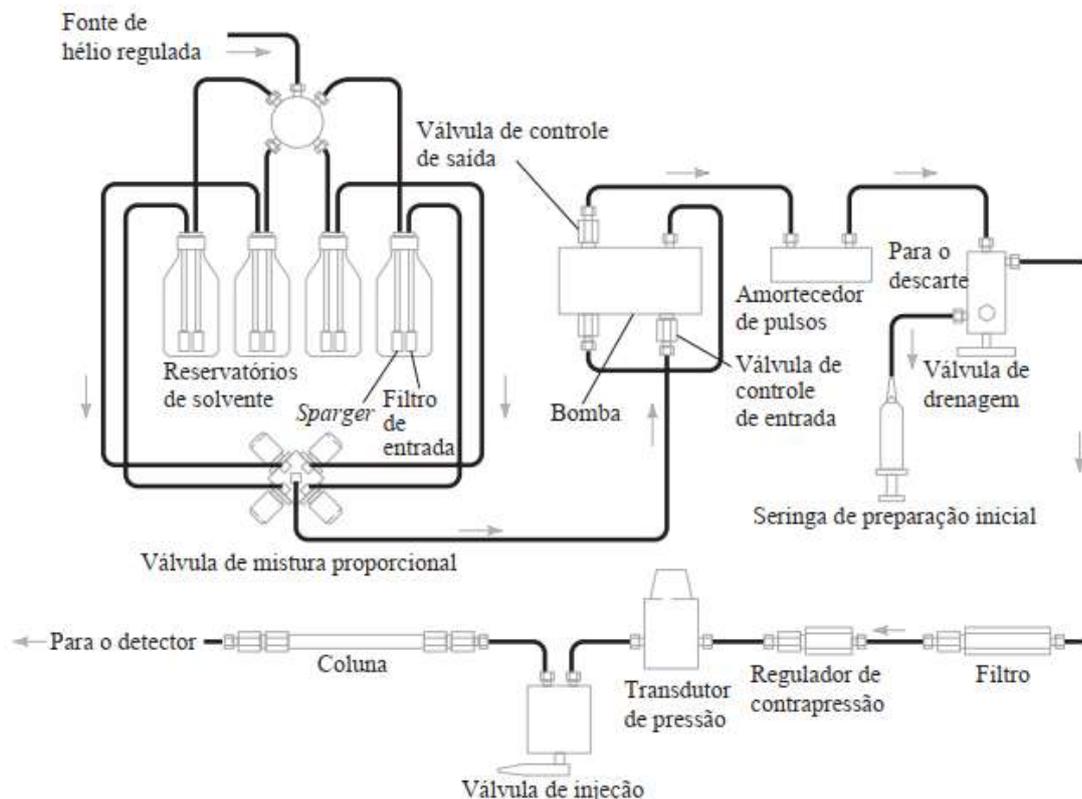


Figura A.I.1.3 – Diagrama de blocos mostrando alguns dos componentes típicos de um sistema para HPLC. Adaptado de [8].

Em HPLC, o(s) reservatório(s) para a fase móvel devem ser o mais inertes possíveis, equipados com um sistema que permita desgaseificar a fase móvel, uma vez que a análise pode ser prejudicada pela presença de gases dissolvidos.

As análises cromatográficas por HPLC podem ser efetuadas mantendo a composição da fase móvel constante ou variável, designando-se por eluição isocrática ou por gradiente, respetivamente. A fase móvel é impulsionada por uma bomba, sendo as recíprocas as mais vulgares, podendo o sistema de funcionamento ser isocrático, binário ou quaternário.

No sistema de injeção, a amostra é introduzida com o auxílio de uma seringa convencional e válvulas especiais que permitem grande precisão e exatidão. Existem dois modos de injeção, o modo de injeção “*stop-flow*” e o modo de injeção que consiste no sistema de “*loop*”, mais vulgarmente usado, encontrando-se na atualidade automatizado.

É nas colunas cromatográficas que é efetuada a separação dos analitos da amostra. As colunas utilizadas em HPLC são vulgarmente em aço inoxidável contendo um enchimento com partículas de diâmetro compreendido entre 3 e 5 μm . As colunas analíticas têm usualmente cerca de 5 a 25 cm em comprimento e 3 a 5 mm de diâmetro interno. Dependendo do tipo de análise ou amostras a estudar, são por vezes usadas pré-colunas colocadas à entrada da coluna analítica, que têm como finalidade aumentar o tempo de vida da mesma, retendo eventuais impurezas. Consoante a polaridade das partículas usadas no enchimento das colunas, estas podem ser classificadas em fase normal para um enchimento com partículas de características mais polares, e em fase reversa, para partículas com características apolares, sendo as últimas as mais vulgarmente usadas e, na sua grande maioria, constituídas por metilo, octilo e octadecilsílica, assim como de fenilo-hexilo.

Os compostos separados na coluna cromatográfica são posteriormente detetados por um dispositivo adequado. Há uma grande variedade de sistemas de deteção que se baseiam tanto em propriedades físicas como nas propriedades químicas dos solutos, podendo ainda basear-se na variação das propriedades físicas da fase móvel como é, por exemplo, o índice de refração. Um dos detetores mais comuns em HPLC é o ultravioleta/visível (UV/Vis), podendo operar com comprimento de onda variável ou múltiplo. Ultimamente, o recurso a detetores por rede de díodos (DAD), cujo princípio de funcionamento

permite o varrimento espectral em simultâneo, obtendo-se vantagens qualitativas, em particular para identificação. Outros detetores muito usados são a fluorescência, eletroquímico, condutividade e, na atualidade, o acoplamento a MS.

A.I.1.4 Cromatografia em fase gasosa (GC)

Em cromatografia de fase gasosa (GC), a fase móvel consiste num gás inerte que transporta a amostra através da coluna contendo a fase estacionária sem interagir com a mesma, sendo os gases normalmente utilizados o hélio, o azoto e o hidrogénio. Um sistema de GC é basicamente constituído por um injetor, uma coluna cromatográfica inserida num forno e um detetor, controlados por *software* adequado. A figura A.I.1.4 ilustra um esquema simplificado dos componentes de um sistema de GC.

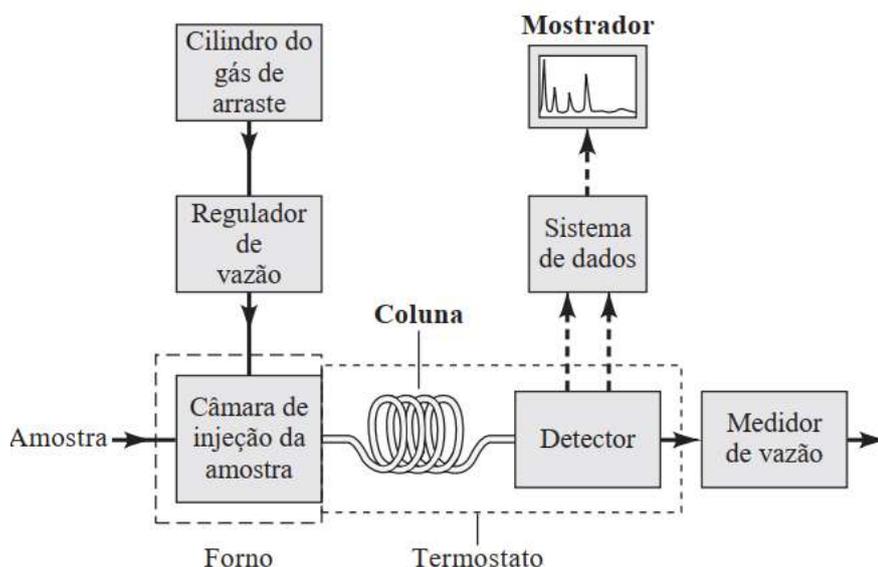


Figura A.I.1.4 – Diagrama de blocos de um GC convencional. Adaptado de [8].

Para a introdução da amostra em GC existem diferentes tipos de sistemas de injeção. Numa injeção típica, a amostra líquida, ao ser introduzida no injetor, é vaporizada e misturada com o gás de arraste, empurrando os componentes da

mistura para a coluna. Entre os modos de injeção, os mais usados são os sistemas por temperatura constante (isotérmica), com (*split*) ou sem (*splitless*) repartição da amostra e o modo de vaporização com temperatura programada (PTV, do inglês *Programmed Temperature Vaporization*). No modo *split*, por intermédio dum sistema de válvulas, somente uma parte da amostra é introduzida na coluna, sendo a divisão da amostra determinada por meio da relação entre a quantidade de gás de arraste que deixa o injetor pela válvula de *split* e o fluxo na coluna (razão de *split*). No modo *splitless* praticamente toda a amostra injetada é arrastada para a coluna, tornando-a apropriada para análise vestigial de amostras complexas. O volume de injeção usado no injetor *split/splitless* é normalmente compreendido entre 0,2 e 2,0 μL . Por outro lado, o modo de injeção PTV oferece uma maior sensibilidade analítica devido à possibilidade de injeção de grandes volumes (LVI, do inglês *Large Volume Injection*) de amostra (geralmente até 100 μL), sendo uma ferramenta importante em análise vestigial. Na injeção no modo PTV, a amostra é introduzida no injetor frio (normalmente 10-40 °C, abaixo do ponto de ebulição do solvente), sendo o arrefecimento realizado por ar comprimido ou azoto líquido. Após a injeção e evaporação do solvente, a câmara do injetor é subitamente aquecida a temperaturas elevadas e os analitos da amostra transferidos quantitativamente para a coluna, na qual ocorre a separação dos componentes da amostra.

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

utilizado é com rampas de temperatura, no qual ocorre aumento térmico progressivo constante ou a diferentes velocidades e tempos distintos com possibilidade de etapas isotérmicas no início, meio ou no fim da análise.

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

A.I.1.5 Cromatografia em fase gasosa-espetrometria de massa (GC-MS)

A cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) é uma das técnicas hífenadas mais utilizadas quer em estudos qualitativos quer quantitativos de compostos presentes numa grande diversidade de matrizes. Neste sistema, a amostra é introduzida no injetor de um GC, que após a separação dos constituintes na coluna, entram na câmara de ionização onde são bombardeados por um feixe de elétrons, ocorrendo a sua ionização e posterior fragmentação. O conjunto de iões previamente formados é desviado e acelerado na direção do analisador de massa por ação de um campo elétrico, onde são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z). Os analisadores de massa mais comuns são a armadilha de iões (“*ion trap*”), o quadrupólo e o tempo de voo. Os iões separados são transferidos para o detetor, genericamente um multiplicador de elétrons que apresenta um tempo de resposta rápido (da ordem dos nanossegundos), capaz de adquirir elevadas correntes, utilizando uma tensão de aceleração a fim de transformar a corrente iónica numa corrente eletrônica suscetível de ser medida, originando um gráfico (espectro) da abundância em função da m/z . Na figura A.I.1.5 encontra-se representado o processo de fragmentação, de separação e de deteção de um espectrómetro de massa com recurso a quadrupolo. A grande vantagem da utilização do acoplamento da MS a um sistema cromatográfico reside na sua capacidade em responder a todos os compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis. Quando

opera no modo de varrimento contínuo (“*full-scan*”) permite a identificação de compostos em amostras desconhecidas com recurso a bibliotecas espectrais de referência (ex., NIST e Wiley Mass Spectral Library, etc.). Quando o objetivo reside na quantificação vestigial de compostos alvo, o modo de monitorização de iões selecionados (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring mode*), permite elevada sensibilidade e seletividade, tornando-se numa ferramenta analítica muito poderosa.

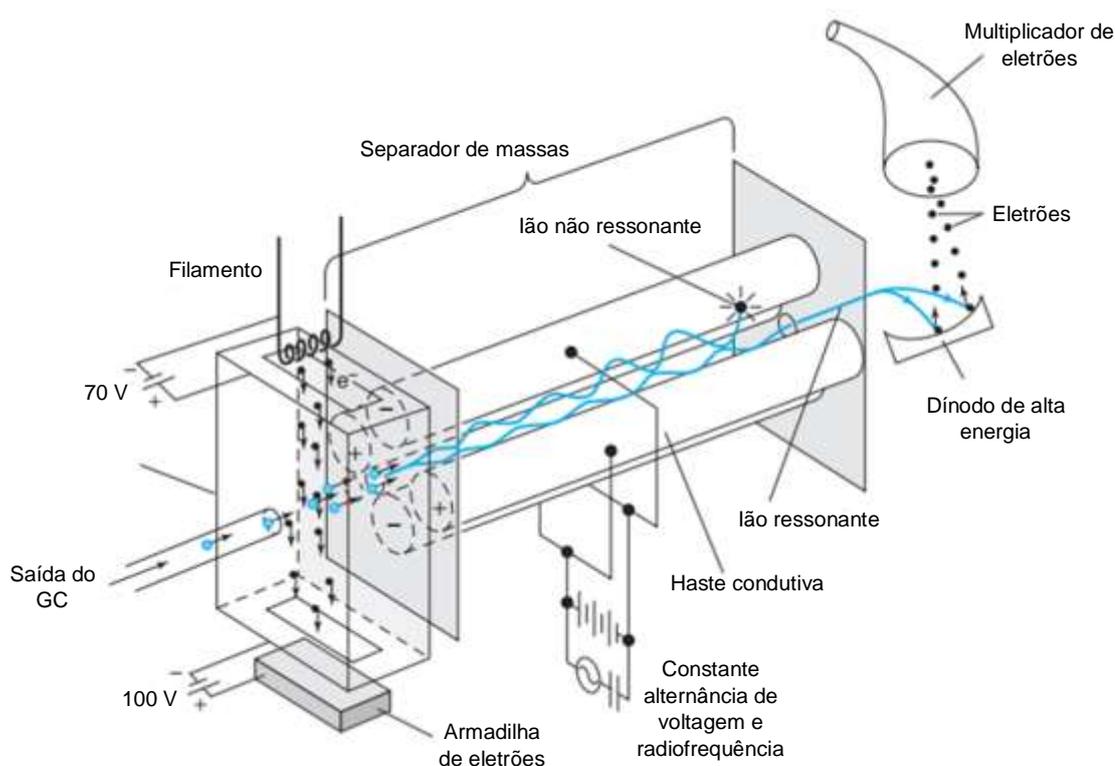


Figura A.I.1.5 – Representação esquemática de um quadrupolo usado habitualmente em hifenação a GC. Adaptado de [5].

A.I.2 Eletroforese capilar (CE)

As separações eletroforéticas são baseadas nas diferenças de velocidade segundo as quais as espécies com carga migram num campo elétrico. A técnica foi introduzida na década de 1930 pelo químico biofísico sueco A. Tiselius, tendo sido galardoado com o Prêmio Nobel em 1948 por seu trabalho em eletroforese e “descobertas sobre a natureza complexa das proteínas séricas”. No entanto, o grande avanço apenas aconteceu em 1981 por J. W. Jorgenson, na qual

capilares de vidro foram aplicadas pela primeira vez em eletroforese, originando o nome que agora a técnica é conhecida: eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*).

Na figura A.I.2.1 encontra-se uma representação esquemática de um sistema convencional de CE. Neste, um capilar de sílica fundida preenchido com um tampão, tipicamente com um diâmetro interno entre 10 e 100 μm e com comprimento de 40 a 100 cm, é estendido entre dois reservatórios com tampão que também contêm elétrodos de platina. A introdução da amostra é realizada em uma das extremidades e a detecção na outra. Um potencial de 5 a 30 kV é aplicado entre os elétrodos. A polaridade desta alta voltagem pode ocorrer como indicado na figura A.2.1 ou ser invertida para possibilitar uma separação rápida de aniões.

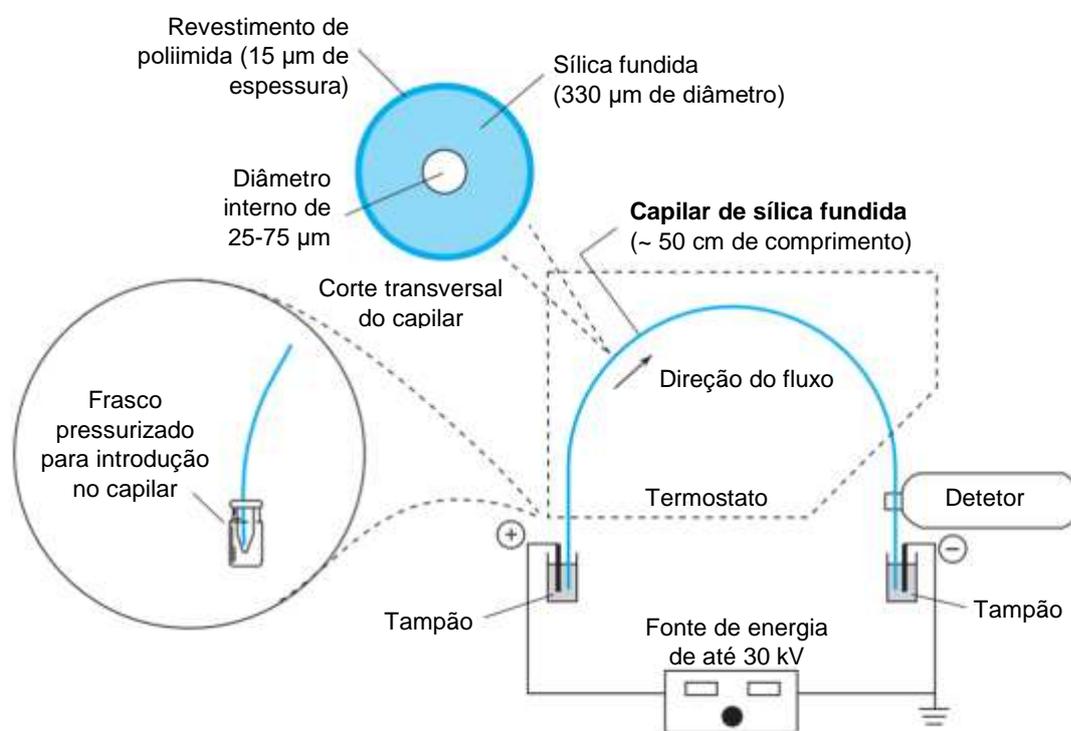


Figura A.I.2.1 – Aparelho convencional de CE. Adaptado de [5].

A introdução da amostra é frequentemente realizada sob pressão ou vácuo (injeção hidrodinâmica), na qual uma extremidade do capilar é inserida num frasco contendo a amostra. A introdução da amostra ocorre através de uma

diferença de pressão, sendo provocada pela aplicação de vácuo ou de pressão no frasco da amostra. O tempo de injeção é de poucos segundos e a diferença de pressão deve ser da ordem dos mbar. Os volumes de injeção em CE são muito pequenos, entre os 5 e 50 nL, sendo que volumes superiores podem originar distorção do pico e perda de resolução.

A migração dos componentes de uma mistura é induzida pela aplicação de uma diferença de potencial nos extremos do capilar. As espécies presentes na amostra ao passarem no detetor originam um sinal em função do tempo, sendo denominado por eletroferograma. A migração eletroforética é sempre acompanhada por um fluxo eletroosmótico (EOF, do inglês *Electroosmotic Flow*) de determinada amplitude, e que contribui de forma passiva para o transporte das espécies da amostra, não ajudando na sua separação. Ao contrário das separações cromatográficas, em CE não existe fase estacionária, sendo que os termos A e Cu_x (equação A.1.5) não poderão ser aplicadas. Por essa razão, em CE a dispersão de banda de banda é muito reduzida ocorrendo apenas (sob condições ideais) devido a difusão longitudinal, sendo possível obter em rotina 50000-500000 pratos teóricos [5].

A separação em CE depende da velocidade de um ião (v_{EF}) quando sujeito a um campo magnético (E):

$$v_{EF} = \mu_e E = \mu_e \frac{V}{L} \quad (\text{A.1.2.1})$$

em que V é a voltagem aplicada, L o comprimento da coluna e μ_e , a mobilidade eletroforética. Este termo pode ser calculado da seguinte forma:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (\text{A.1.2.2})$$

em que q é o número de carga, η a viscosidade da solução e r o raio do ião. Desta forma, a μ_e está relacionada pela razão massa/carga dos compostos. Um ião menor irá migrar mais rapidamente do que um ião maior com a mesma carga, enquanto no caso de dois iões do mesmo tamanho, irá migrar mais rapidamente o que tiver maior número de carga.

Uma característica particular da eletroforese capilar consiste no EOF. Quando uma alta voltagem é aplicada por meio de um capilar de sílica fundida contendo uma solução tampão, um EOF é geralmente produzido, causando uma migração do tampão em direção ao cátodo. O EOF é produzido devido à dupla camada elétrica que é formada na interface sílica/solução. A valores de pH maiores que 3, a parede interna do capilar de sílica encontra-se carregada negativamente em virtude da ionização dos grupos silanol (Si-OH) à sua superfície. Os cátions do tampão agregam-se numa dupla camada elétrica adjacente à superfície negativa do capilar de sílica. Os cátions na camada difusa externa à dupla camada são atraídos para o cátodo e uma vez que estão solvatados arrastam o solvente com eles. Desta forma, mesmo que os analitos migrem de acordo com as suas cargas, o EOF é normalmente suficiente para arrastar todas as espécies positivas, neutras e negativas para a extremidade do capilar, permitindo a separação e detecção de todas as espécies em solução.

Ao contrário do que acontece em separações cromatográficas, na qual a aplicação de pressão para fazer correr a fase móvel origina um fluxo parabólico, em CE, o EOF cria um fluxo uniforme e planar, diminuindo a largura das bandas e aumentando a eficiência do processo (figura A.I.2.2).

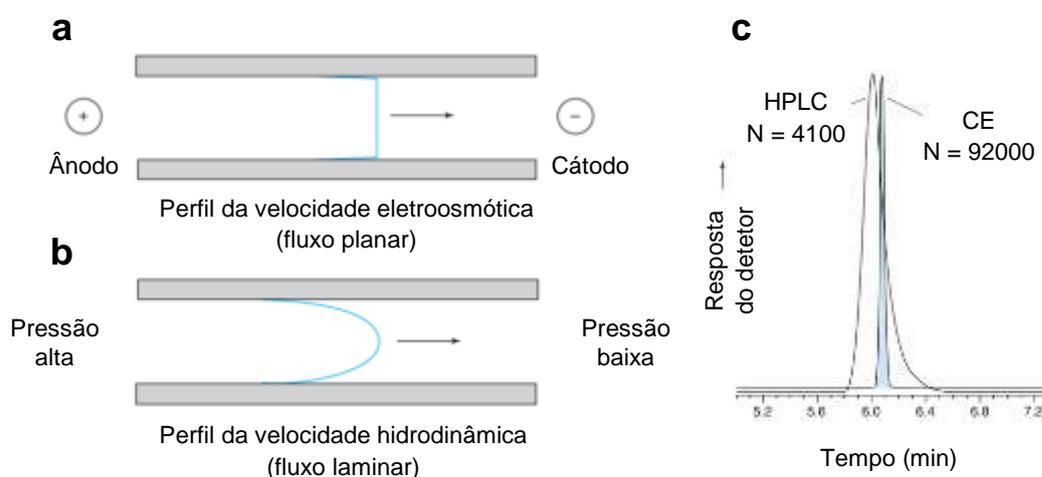


Figura A.I.2.2 – Representação do perfil do EOF (a) e do fluxo induzido por pressão (b), assim como as diferenças de eficiência resultante dos mesmos. Adaptado de [5].

Os detetores usados em CE são similares àqueles descritos para HPLC, nomeadamente de fluorescência, eletroquímico, de condutividade e, na atualidade, o acoplamento a MS, assim como de detetores mais clássicos como o UV/Vis e o DAD. Neste último, o percurso ótico dos capilares para CE é muito estreito, levando à diminuição da sensibilidade. Por forma a contornar esta limitação foi desenvolvido modificações e dispositivos para estender o percurso ótico, através da utilização de células em Z ou de capilares com bolha (figura A.I.2.3).

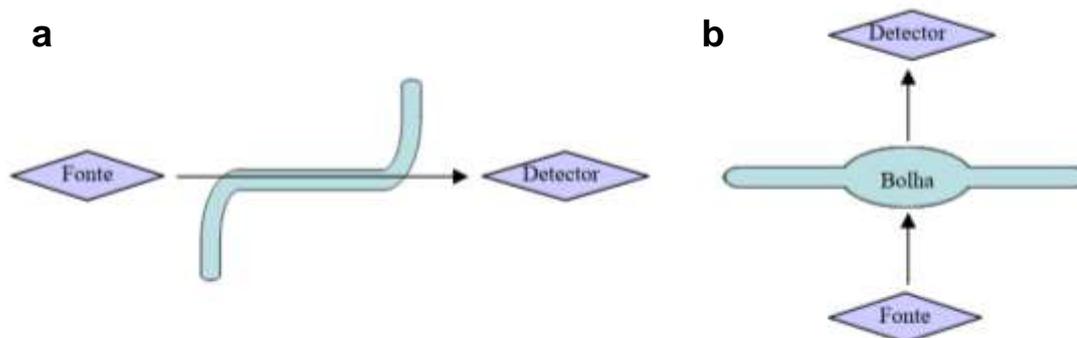


Figura A.I.2.3 – Dois tipos de células utilizadas para aumentar a sensibilidade da detecção por UV/VIS ou DAD: células em Z (a) e capilares com bolha (b). Adaptado de [9].

A.I.3 Referências

- [1] J.M.F. Nogueira, Soc. Port. Qui. (2006) 51–56.
- [2] L.S. Ettre, *Chapters in the Evolution of Chromatography* (2003), Londres, Imperial College Press.
- [3] L.S. Ettre, *Chromatographia*. 51 (2000) 7–17.
- [4] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis* (2007) Belmont, Thomson Brooks/Cole.
- [5] D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis* (2015) Nova Iorque, W. H. Freeman and Company.
- [6] K. Dettmer-Wilde, W. Engewald, *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference* (2014) Berlin, Springer.
- [7] S. Fanali, P. Haddad, C. Poole, P. Schoenmakers, D. Lloyd, *Liquid Chromatography - Fundamentals and Instrumentation* (2013) Amesterdão, Elsevier.
- [8] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, D.M. West, *Fundamentos de Química Analítica* (2006) Boston, Thomson Learning.
- [9] R.C.P. Sequeiros, *Aplicação de novas metodologias analíticas no estudo de compostos fenólicos em matrizes alimentares*, Tese de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

Anexo II – Preparação e caracterização dos HCs, assim como de CN1 e R

Os hidrocarbonizados porosos à base de glucose (HC-Glc), frutose (HC-Fru) e sacarose (HC-Suc) foram preparados e caracterizados pelo grupo de Adsorção e Materiais Adsorventes do Centro de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (CQB/FCUL). Este grupo também caracterizou os ACs comerciais CN1 e R.

A.II.1 Síntese dos hidrocarbonizados porosos

A síntese dos HCs foi baseada no procedimento relatado por Fechler *et al.* para glicose como fonte de carbono para a produção de materiais nanoestruturados com capacidade adsorvente [1]. Resumidamente, 11 g de mistura eutéctica salina de LiCl/ZnCl₂ (23 % molar LiCl) foram moídos e homogeneizados num almofariz de ágata, sendo depois adicionados 4,5 g de hidrato de carbono (glucose, frutose ou sacarose). Esta mistura foi depois moída até ser obtida uma solução homogénea, sendo depois transferida para uma autoclave de aço inoxidável (35 cm³). Após a adição de 2,3 mL de água ultrapura, a autoclave foi fechada, agitada vigorosamente e colocada numa estufa (Medline Scientific Limited, modelo ON-02G, Reino Unido) pré-aquecida a 180 °C. O tratamento hidrotérmico foi realizado durante 17 h, sendo depois a arrefecida até à temperatura ambiente. Os HCs foram lavados com água ultrapura até não ser possível detetar aniões de cloro (*i.e.* não ocorrer precipitação com a adição de AgCl). Após a lavagem, as amostras foram secadas à pressão atmosférica, moídas e peneiradas por forma a obter partículas com dimensões < 0,297 mm, sendo armazenadas em frascos de vidro à temperatura ambiente.

A.II.2 Caracterização dos materiais de carbono

A.II.2.1 Caracterização textural

As propriedades texturais dos HCs e dos ACs comerciais foram caracterizadas por adsorção de N₂ a -196 °C num equipamento volumétrico automático (Micromeritics, ASAP 2010, Estados Unidos da América). Antes dos ensaios de adsorção-desorção de N₂, as amostras (60-100 mg) foram degaseificadas a 120 °C durante a noite (~ 17 h) sob vácuo (pressão < 10⁻² Pa), por forma a remover os gases ou vapores que se encontrassem adsorvidos à superfície dos mesmos. A área superficial aparente (A_{BET}) foi estimada a partir dos dados de adsorção de N₂ na gama p/p^0 do gráfico BET que assegura interceção positiva na ordenada do eixo BET ($C > 0$) e que n_{ads} ($1-p/p^0$) aumenta continuamente com p/p^0 [2,3], figura A.II.2.1.

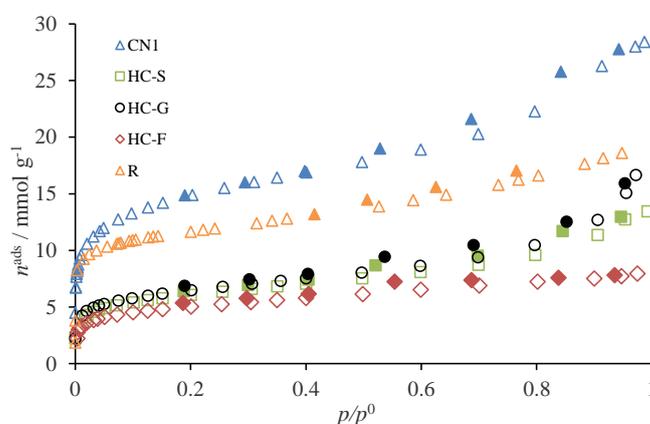


Figura A.II.2.1 – Isotérmicas de adsorção de N₂ a -196 °C dos HCs e ACs comerciais.

O volume total de poros (V_{total}) foi quantificado com a regra de Gurvich [4]. O volume de microporos (V_{micro}) foi calculado com o método α_s tomando como referência os resultados de isotérmica relatada por Rodríguez-Reinoso *et al.* [5]. O volume mesoporoso (V_{meso}) corresponde à diferença $V_{\text{total}} - V_{\text{micro}}$. A distribuição de tamanho de poro na faixa de micro-mesoporos foi calculada a partir dos dados de adsorção de N₂ usando o modelo 2D-LNDFT-HS [6], figuras A.II.2.2a e b.

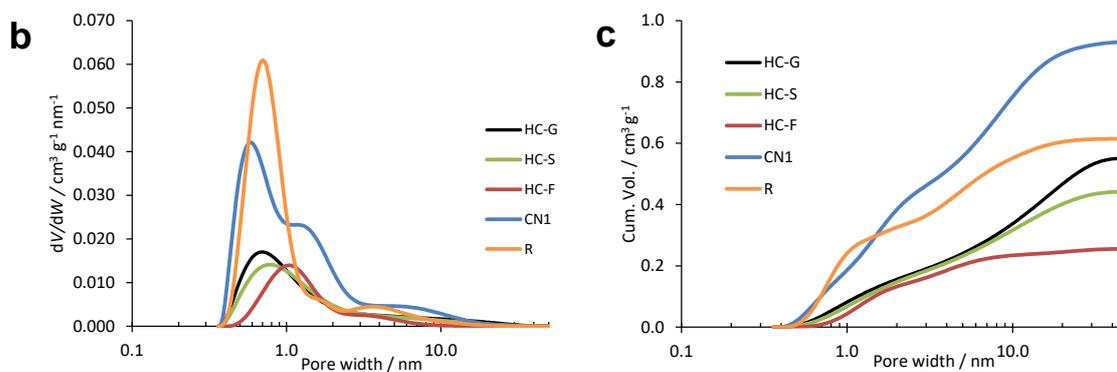
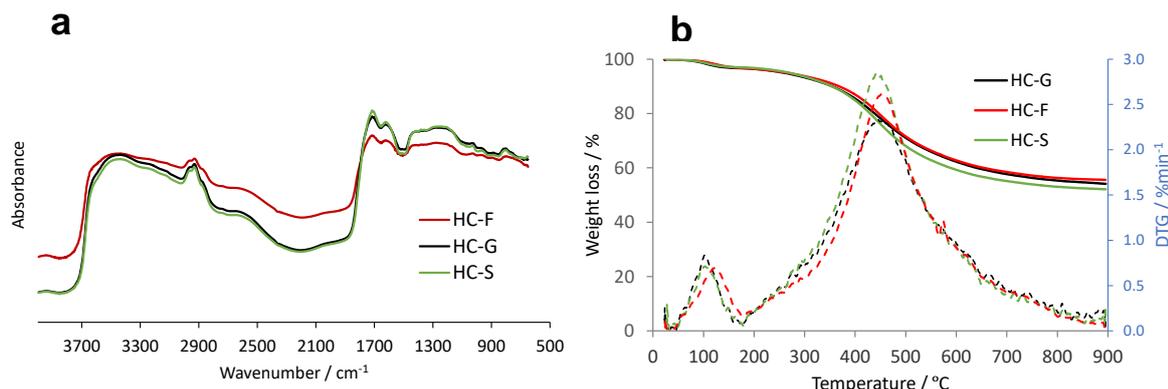


Figura A.II.2.2 – Distribuições diferenciais (b) e cumulativas (c) de tamanho de poros obtidas do método 2D-NLDFT-HS aplicado às isotérmicas de adsorção de N_2 dos HCs e ACs comerciais.

A.II.2.2 Caracterização química

As propriedades químicas da superfície dos HCs e dos ACs comerciais foram avaliadas através da determinação do pH_{PZC} , por titulação mássica reversa [7] empregando um medidor de pH Symphony SP70P (Estados Unidos da América). Os espectros de infravermelhos de transformada de Fourier (DRIFT) por reflectância difusa dos HCs foram registrados num espectrómetro Nicolet Magma-IR560 (Estados Unidos da América) equipado com um detetor de telureto de mercúrio e cádmio de alta sensibilidade (MCT-A) que opera à temperatura criogénica. Cada espectro foi obtido usando as amostras em pó sem adição de KBr e corresponde ao acumular de 256 varreduras, registrados com uma resolução de 2 cm^{-1} na gama de 4000 a 650 cm^{-1} . A análise térmica (Setaram Labsys) foi realizada usando 15 mg de amostra sob fluxo de azoto a 50 mL min^{-1} até a temperatura final de $900 \text{ }^\circ\text{C}$ (a um ritmo de $15 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$). O teor de cinzas do carvão poroso derivado da glucose foi determinado no mesmo equipamento após exposição da amostra ao ar a $600 \text{ }^\circ\text{C}$ (50 mL min^{-1}) por 3 h (massa constante). Na figura A.II.2.3 encontra-se representado os resultados das análises por DRIFT e térmica para os três HCs.



A.II.2.3 – Espectros DRIFT (a) e perfis termogravimétricos (TG) e curvas derivadas (DTG) (b) dos três HCs.

A.II.2.3 Caracterização morfológica

A morfologia dos HCs foi avaliada por microscopia eletrônica de varrimento empregando um aparelho Zeiss Supra 55 VP (Alemanha) usando uma voltagem de aceleração de 5 kV e utilizando as amostras em pó revestidas com irídio.

A.3 Referências

- [1] N. Fechler, S.A. Wohlgemuth, P. Jäker, M. Antonietti, J. Mater. Chem. A 1 (2013) 9418–9421.
- [2] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, Pure Appl. Chem. 87 (2015) 1051–1069.
- [3] J. Rouquerol, P. Llewellyn, F. Rouquerol, Stud. Surf. Sci. Catal. 160 (2007) 49–56.
- [4] F. Rouquerol, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, P. Llewellyn, G. Maurin, *Adsorption by Powders and Porous Solids: Principles, Methodology and Applications* (2014) Amerterdão, Elsevier.
- [5] F. Rodriguez-Reinoso, J.M. Martin-Martinez, C. Prado-Burguete, B. McEnaney, J. Phys. Chem. 91 (1987) 515–516.
- [6] J. Jagiello, J.P. Olivier, Carbon N. Y. 55 (2013) 70–80.
- [7] J.S. Noh, J.A. Schwarz, J. Colloid Interface Sci. 130 (1989) 157–164.

Anexo III – Cálculos realizados para comparar o efeito de cada parâmetro testado para a otimização das metodologias propostas

Por forma a maximizar as eficiências das metodologias desenvolvidas, recorreu-se a uma estratégia de otimização univariada. Esta servia para comparar as recuperações obtidas por cada ensaio para se obter a melhor resposta analítica.

Para os trabalhos que envolveram o uso de padrão interno, *i.e.*, determinação de anti-inflamatórios não esteroides por CE-DAD, assim como análise de nicotina (e cotinina) e cetamina (e norcetamina) por LVI-GC-MS(SIM), recorreu-se ao seguinte cálculo de recuperação através da seguinte expressão:

$$\text{Recuperação} = \frac{\frac{S_A}{S_{API}}}{\frac{S_S}{S_{SPI}}} \times 100 \quad (\text{A.III.1})$$

onde S_A e S_{API} representam, respetivamente, o sinal do composto e do PI na amostra. S_S e S_{SPI} representam, respetivamente, o sinal do composto e do PI na solução padrão usada para fortificação.

Para os restantes trabalhos recorreu-se ao seguinte cálculo de recuperação através da seguinte expressão:

$$\text{Recuperação} = \frac{S_A}{S_S} \times 100 \quad (\text{A.III.2})$$

Por forma a averiguar a dispersão dos resultados, foi calculado e comparado o desvio padrão (σ) e o desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) dos vários conjuntos de replicados, pelas seguintes expressões:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \times 100 \quad (\text{A.III.3})$$

$$\text{RSD} = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{A.III.4})$$

onde x_i , \bar{x} , e n , representam os valores individuais, assim como a média e o número dos valores dos replicados, respetivamente.

Anexo IV – Condições instrumentais empregadas para outros trabalhos em colaboração (capítulo 11)

A.IV.1 GC×GC-MS

O sistema GC×GC-MS consistiu num cromatógrafo Shimadzu QP2010 Ultra (Shimadzu, Japão) equipado com um modulador criogénico ZX1-GC×GC (ZOEX Corporation, Estados Unidos da América). Este modulador utilizava azoto líquido (Linde Gases, Brasil) para o jato frio e azoto gasoso para o jato quente. Uma coluna apolar DB-5 (5 % de grupos fenilo numa fase estacionária de PDMS, com 60 m x 0,25 mm Ø x 25 mm de espessura de filme, Ohio Valley Specialty Company, Estados Unidos da América) foi usada na primeira dimensão. Uma coluna mais polar DB-17 (50 % dos grupos fenilo em uma fase estacionária de PDMS, com 2,15 m x 0,18 mm x 0,18 µm de espessura de filme, J & W Scientific, Agilent Technologies, Estados Unidos da América) foi usada na segunda dimensão. Diferentes programas de temperatura, períodos de modulação e fluxos de coluna foram testados. Um injetor *split/splitless* convencional foi usado a 280 °C, com um volume de injeção de 1,0 µL no modo *splitless*. O programa de GC iniciou-se a uma temperatura 70 °C (mantido por 2 min). De seguida o forno foi aquecida até aos 200 °C (3 °C min⁻¹) e depois até 280 °C (5 °C min⁻¹) e mantida por 3 min. O gás de arraste foi o hélio sob fluxo constante de 0,86 mL min⁻¹. A interface e a fonte de ionização foram mantidas a 280 °C e o fluxo total foi de 21,1 mL min⁻¹. As condições do espectrómetro de massa foram: energia de 0,83 kV e varrimento contínuo entre 45 a 300 Da, correspondendo a uma frequência de 73,3 Hz. Um período de modulação foi de 4 s e tempo de jato quente foi ajustado para 300 ms. O processamento de dados por GC×GC-MS foi realizado via o *software* GC Image 2.2b1 (ZOEX Corporation), sendo a biblioteca NIST-05 empregada para identificar carbazol com similaridade de pelo menos 90 %, sendo confirmado pelo tempo de retenção do padrão analítico.

A.IV.2 HPLC-DAD

O sistema de HPLC-DAD era constituído por um desgaseificador (G1322A), uma bomba quaternária (G1311A), um amostrador automático (G1313A), um compartimento da coluna termostaticado (G1316A) e um DAD (G1315B). O registo de dados e controlo instrumental foram efetuados a partir do *software* LC3D ChemStation (versão Rev.A.10.02.1757; Agilent Technologies). As separações cromatográficas foram efetuadas em colunas Kinetex C18 ou Kinetex hexil-fenil (ambas com 150 × 4,6 mm, 2,6 µm de tamanho de partícula; Phenomenex, Estados Unidos da América), ou ainda em colunas Mediterranea Sea-18 (150 × 2,1 mm, 5 µm de tamanho de partícula; Teknokroma, Espanha). As restantes condições instrumentais para cada estudo em colaboração descritas no capítulo 11 que empregaram HPLC-DAD encontram-se descritas na tabela A.IV.2.1

Tabela A.IV.2.1 – Condições experimentais utilizadas para análise por HPLC-DAD para cada estudo em colaboração.

Estudo em colaboração	Volume de injeção (µL)	Fluxo (mL min ⁻¹)	Composição da fase móvel	Comprimento de onda (λ _{max} , nm)
Capítulo 11.6 ^a	10	0,5	Eluente A: H ₂ O com 0,1 % de H ₃ PO ₄ Eluente B: MeOH 0-2 min: 40 % B 2-13 min: 40-80 % B 13-18 min: 80 % B 18-21 min: 80-40 % B 21-25 min: 40 % B	222, 230, 258 e 275
Capítulo 11.7 ^b	15	0,5	Eluente A: H ₂ O com 2,5 % de CH ₃ COOH Eluente B: MeOH 0-5 min: 20 % B 5-15 min: 20-30 % B 15-25 min: 30-95 % B 25-35 min: 95-20 % B 35-38 min: 20 % B	260
Capítulo 11.8 ^c	20	0,5	Eluente A: H ₂ O com 2,5 % de CH ₃ COOH Eluente B: MeOH Isocrático com 80 % B	276

^a Uma coluna Mediterranea Sea-18 foi usada para a separação cromatográfica

^b Uma coluna Kinetex C18 foi empregada para a separação cromatográfica

^c Uma coluna Kinetex Hexil-fenil foi empregada para a separação cromatográfica

A.IV.3 GC-MS

O sistema GC-MS era constituído por um GC (Agilent 6890 Series) equipado com amostrador automático (Agilent 7683) e injetor PTV, acoplado ao detetor seletivo de massas (Agilent 5973N). O registo de dados e o controlo instrumental foram efetuados a partir do *software* MS ChemStation (G1701; versão E.02.02.1431; Agilent Technologies). A coluna capilar utilizada foi uma Zebron ZB-5 (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de fase estacionária; 95 % dimetil, 5 % difenil polissiloxano) da Phenomenex (Estados Unidos da América). A fase móvel usada foi hélio de elevada pureza (99,999 %, GASIN, Espanha) mantida no modo de pressão constante (pressão média: 9,80 psi). As temperaturas da linha de transferência, fonte de ionização e quadrupólo foram mantidas a 280, 230 e 150 °C, respetivamente. Um PTV foi empregado em modo *solvent vent* usando um *liner* com revestimento de lã de vidro. Foi usado o modo de LVI, sendo a velocidade de injeção de 100 µL min⁻¹. Para o estudo descrito no capítulo 11.5, foi empregue injeção de 2 µL a 100 µL min⁻¹ no modo *splitless* (250 °C). Foi utilizado ionização eletrónica (70 eV), operando na gama de massas compreendida entre 35 e 550 Da no modo de varrimento contínuo, com uma corrente de ionização de 34,6 µA e um potencial multiplicador de 1200 V. Na aquisição do modo SIM, um grupo de iões alvo foi monitorizado a diferentes janelas de tempo, definidas pelo tempo de retenção correspondente, usando um tempo de permanência de 100 ms. Três iões qualificadores e um quantificador foram escolhidos para cada composto, de acordo com as características dos espectros de massa obtidos no modo *full-scan* por comparação com o banco de dados espectrais da biblioteca de Wiley (G1035B; Rev D.02.00; Agilent Technologies). A gravação de dados e o controlo instrumental foram realizados pelo *software* MSD ChemStation (G1701CA; Versão C.00.00; Agilent Technologies). As restantes condições instrumentais para cada estudo em colaboração descritas no capítulo 11 encontram-se descritas na tabela A.III.3.1. Os dados referentes aos tempos de retenção e iões monitorizados para os OCPs no estudo do capítulo 11.3, encontram-se descritos na tabela A.III.3.2.

Tabela A.IV.3.1 – Condições experimentais utilizadas para análise por GC-MS para cada estudo em colaboração. Os iões apresentados são os qualificadores e os quantificadores (a sublinhado).

	Capítulo 11.3	Capítulo 11.4	Capítulo 11.5	Capítulo 11.9
Parâmetros de injeção	Tempo de vent: 0,3 min; Fluxo: 50 mL min ⁻¹ ; Pressão: 0 psi; Fluxo de purga: 60 mL min ⁻¹ (2 min) Volume: 2 µL	Tempo de vent: 0,3 min; Fluxo: 50 mL min ⁻¹ ; Pressão: 0 psi; Fluxo de purga: 60 mL min ⁻¹ (2 min); Volume: 20 µL	Injeção em modo <i>splitless</i> Volume: 2 µL	Tempo de vent: 0,3 min; Fluxo: 50 mL min ⁻¹ ; Pressão: 0 psi; Fluxo de purga: 60 mL min ⁻¹ (2 min); Volume: 10 µL
Programa de injeção	50 °C (0,4 min) até aos 320 °C (600 °C min ⁻¹ , 3 min), 50 °C min ⁻¹ até aos 200 °C	40 °C (0,35 min) até aos 320 °C (600 °C min ⁻¹ , 3 min), 50 °C min ⁻¹ até aos 200 °C	250 °C	80 °C (0,45 min) até aos 280 °C (600 °C min ⁻¹)
Programa do forno	60 °C (1 min) até aos 130 °C (50 °C min ⁻¹ , 1 min); 12 °C min ⁻¹ até aos 180 °C; até aos 240 °C (7 °C min ⁻¹); até aos 315 °C (12 °C min ⁻¹ , 2 min); tempo total: 24,39 min	150 °C (1 min) até aos 250 °C (20 °C min ⁻¹ , 2 min); tempo total: 8 min	60 °C até aos 180 °C (30 °C min ⁻¹); 10 °C min ⁻¹ até aos 300 °C (1 min); tempo total: 18 min	80 °C (1 min) até aos 240 °C (20 °C min ⁻¹ , 5 min); 1 °C min ⁻¹ até aos 245 °C; até aos 300 °C (20 °C min ⁻¹); tempo total: 21,75 min
Tempo de retenção (min)	Ver tabela A.IV.3.2	Irgarol: 5,60	α-PVP: 8,90 α-PVT: 9,20 MDPV: 12,20	AMT: 12,91 MIA: 13,13 TRI: 13,22 IMP: 13,28 MIR: 17,77 DOT: 15,96
Iões monitorizados (m/z)	Ver tabela A.IV.3.2	Irgarol: 182, 238, <u>253</u>	α-PVP: 77, 105, <u>126</u> α-PVT: 84, 111, <u>126</u> MDPV: 121, <u>126</u> , 149	AMT: <u>58</u> , 202, 2015 MIA: <u>193</u> , 220, 264 TRI: <u>58</u> , 249, 294 IMP: 58, <u>234</u> , 280 MIR: <u>195</u> , 208, 265 DOT: <u>58</u> , 202, 295

Tabela A.IV.3.2 – Tempos de retenção e iões monitorizados para os diferentes OCPs referente aos estudo do capítulo 11.3 Os iões apresentados são os qualificadores e os quantificadores (a sublinhado).

OCPs	Tempo de retenção (min)	Iões monitorizados (<i>m/z</i>)
α -HCH	10,01	181, <u>183</u> , 219
γ -HCH	10,46	181, <u>183</u> , 219
β -HCH	11,05	181, <u>183</u> , 219
δ -HCH	11,25	181, <u>183</u> , 219
HCL	11,85	100, <u>272</u> , 265
ALD	13,05	66, <u>263</u> , 265
HCE	13,95	81, <u>353</u> , 355
α -CLD	15,05	<u>373</u> , 375, 377
α -EDS	15,75	64, 195, <u>237</u>
β -CLD	15,95	<u>373</u> , 375, 377
DDE	16,01	<u>246</u> , 248, 318
DIE	16,63	<u>79</u> , 81, 263
END	16,76	79, <u>81</u> , 263
β -EDS	17,16	64, 195, <u>237</u>
DDD	17,45	165, 199, <u>235</u>
ENDA	17,55	<u>67</u> , 245, 345
ESS	18,23	272, 274, <u>387</u>
DDT	18,32	165, 199, <u>235</u>
ENDK	19,39	<u>67</u> , 317, 345
MCL	19,59	212, <u>227</u> , 228

