

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

EDUARDO DA LUZ LOPES

**ESTUDO E DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA REAÇÃO
DE SILILAÇÃO UTILIZADA NA ANÁLISE MULTIRRESÍDUO DE ANTI-
INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDES EM MATRIZES AQUOSAS AMBIENTAIS
POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

EDUARDO DA LUZ LOPES

**ESTUDO E DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA REAÇÃO
DE SILILAÇÃO UTILIZADA NA ANÁLISE MULTIRRESÍDUO DE ANTI-
INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDES EM MATRIZES AQUOSAS AMBIENTAIS
POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Prof^a. Dr^a. Tânia Mara Pizzolato.

Orientadora

Dra. Carla Sirtori

Co-orientadora

Porto Alegre, 2011

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi realizado no período de 2010 a 2011, dentro do projeto Determinação de fármacos em efluentes urbanos na região metropolitana de Porto Alegre por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e avaliação da capacidade de remoção por sistemas de tratamento convencionais/CNPq.

Para o desenvolvimento do trabalho, foi utilizado meu período disponível congregando meu trabalho rotineiro na empresa Laboratório Wesp Ltda. e as disciplinas da graduação.

Os estudos aqui realizados são pré-requisito para um trabalho de mestrado que tem por objetivo o monitoramento destes compostos em efluentes urbanos.

AGRADECIMENTOS

À minha família como um todo, pelo amor, amizade, e companheirismo.

Aos meus pais, Maria Clara da Luz Lopes e Clóvis dos Santos Lopes, pelo amor, amizade, carinho, orientação, e incentivo ao estudo e a boa conduta pessoal e profissional.

Às minhas irmãs, Nádia da Luz Lopes e Adriana da Luz Lopes, pelo amor, amizade, união, e respeito.

À minha noiva, Emeline dos Santos Domingues, pelo amor, carinho, amizade, companheirismo, paciência, motivação, e... amor, de novo, durante esses 4 anos que estamos juntos, os quais, sem dúvida, foram os mais felizes que já vivi.

À minha orientadora Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato pela oportunidade concedida, ensinamentos compartilhados, dedicação, motivação, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão pelo apoio na avaliação do planejamento experimental Doehlert e na análise dos resultados.

À Dra. Carla Sirtori pelos ensinamentos compartilhados, incentivo à pesquisa e amizade.

À mestranda Raquel Wielens Becker pela oportunidade concedida, amizade, paciência e pelo apoio durante a elaboração deste trabalho, desde a parte experimental até avaliação de dados.

Ao colega de graduação e amigo Nelson Beuter Junior pela colaboração durante a execução de experimentos.

Aos colegas do laboratório D-107 pela amizade e bons momentos compartilhados. Todos, sem exceção, foram fundamentais durante todo este projeto.

A todos os colegas e amigos que conheci durante as disciplinas da Graduação, em especial aos colegas Eduardo Pitthan Filho e Gisele Campos Pinto, pela forte amizade, companheirismo, e motivação ao “mundo acadêmico” desde as primeiras disciplinas do primeiro semestre até os dias de hoje.

À empresa Laboratório Wesp Ltda., em especial ao Diretor Max Pierre Wesp e ao Farmacêutico Responsável Técnico Vinicius Angheben Predebon, pela confiança desde o tempo em que eu era estagiário do curso Técnico em Química até os dias de hoje, pelo incentivo ao aperfeiçoamento profissional desde a fase pré-vestibular, e pela amizade construída nesses quase 8 anos de parceria.

À MULTILAB pela doação dos padrões de fármacos utilizados no trabalho.

A todos os meus amigos, os quais são meu grande tesouro.

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido dentro do projeto de DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO DE FÁRMACOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS, que está sendo realizado no Laboratório de Química Analítica e Ambiental do IQ/UFRGS. Na etapa desenvolvida neste trabalho, foram realizados estudos para a definição das condições experimentais para reação de sililação, com o reativo MSTFA, de sete dos principais fármacos pertencentes à classe dos Anti-inflamatórios Não-Esteróides (AINEs) consumidos em grande quantidade pela população (acetoaminofeno, ácido salicílico, cetoprofeno, diclofenaco, dipirona, ibuprofeno, naproxeno), além de um marcador antropogênico de contaminação de águas ambientais por esgoto urbano (cafeína). Inicialmente, foi realizado o estudo da reação de derivatização individualmente com cada fármaco. Após, esses compostos foram separados em dois grupos distintos em função do solvente utilizado (em isoctano: ácido salicílico, cafeína; cetoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, e naproxeno; em acetonitrila: acetoaminofeno e dipirona) para avaliação da análise multirresíduo. Em termos das condições da reação, foi realizada uma avaliação geral com relação aos parâmetros de maior relevância experimental: tempo de reação, solvente, catalisador, volume de derivatizante. Esta avaliação geral permitiu verificar que as melhores respostas com relação a reação de sililação para os dois grupos de compostos que foram separados nos solventes isoctano e acetonitrila são: volume de 50 μ L do reativo MSTFA ativado III, com aproximadamente 5% de imidazol, temperatura de 70 °C e tempo de reação de 1 hora. Apesar dos resultados terem sido considerados satisfatórios para a implementação da metodologia em amostras reais, propõe-se a aplicação do planejamento Doehlert, para melhor tratamento estatístico com relação à reação de derivatização propriamente dita. Propõe-se que estes experimentos sejam realizados em uma segunda etapa do projeto.

Palavras-chave: AINES; Sililação; MSTFA; MSTFA ativado III; CG/EM; Planejamento Doehlert.

LISTA DE ABREVIATURAS

(m/z): Razão massa-carga

2,3-D – Ácido 2,3-diclorofenoxiacético

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ACN – Acetonitrila

AINE – Anti-inflamatório Não-Esteroide

ANA – Agência Nacional de Águas

BSA – N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida

BSTFA – N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

CG – Cromatografia a gás

CG/EM – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

CL – Cromatografia a líquido

CV – Coeficiente de variação

DP – Desvio padrão

EFS – Extração em fase sólida

EM – Espectrometria de massas

EM/EM – Espectrometria de massas em *tandem*

ETE – Estação de tratamento de esgoto

EtOAc – Acetato de etila

HMDS - Hexametilsililazano

ISOC - Isoctano

MeOH – Metanol

MM – Massa molar

MSTFA – N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida

MTBE – éter metil tert-butílico

MTBSTFA – N-tert-butil(dimetilsilil)-N-(metil)-trifluoroacetamida

NaOAc – Acetato de sódio

ND – Não detectado

PFBBR – Brometo de pentafluorobenzila

SIM – Selected ion monitoring (monitoramento de íon selecionado)

S_N2 – Substituição nucleofílica de segunda ordem

TBDMCS – tert-butil(dimetil)clorosilano

TBDMS – Tert-butil(dimetil)silila

TBDMSIM – N-tert-butil(dimetil)sililimidazol

THF – Tetrahidrofurano

TMCS – Trimetilclorosilano

TMS – Trimetilsilila

TMSIM – N-trimetilsililimidazol

t_R – tempo de retenção

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação genérica da reação de sililação	5
Figura 2 – Representação do estado de transição da reação genérica de sililação	6
Figura 3 – Fórmula estrutural do derivatizante MSTFA (a) e do catalizador imidazol (b)	7
Figura 4 – Cromatograma no modo SCAN e os respectivos espectros de massas dos produtos da reação de sililação do MSTFA ativado III com o acetoaminofeno	17
Figura 5 – Cromatograma no modo SCAN e respectivo espectro de massas do produto da reação de sililação do MSTFA ativado III com o ácido salicílico	18
Figura 6 – Cromatograma no modo SCAN e respectivo espectro de massas do pico da cafeína	19
Figura 7 – Cromatograma no modo SCAN e respectivo espectro de massas do produto da reação de sililação do MSTFA ativado III com o cetoprofeno	20
Figura 8 – Cromatograma no modo SCAN e respectivos espectros de massas dos produtos da reação de sililação do MSTFA ativado III com o diclofenaco	21
Figura 9 – Proposta da reação de formação do produto minoritário da reação do MSTFA ativado III com o diclofenaco	22
Figura 10 – Cromatograma no modo SCAN e respectivo espectro de massas da dipirona	23
Figura 11 – Cromatograma no modo SCAN e respectivo espectro de massas do produto da reação de sililação do MSTFA ativado III com o ibuprofeno	24
Figura 12 – Cromatograma no modo SCAN e respectivo espectro de massas do produto da reação de sililação do MSTFA ativado III com o naproxeno	25
Figura 13 – Cromatograma no modo SIM da solução padrão mista derivatizada em solvente isoctano	27
Figura 14 – Cromatograma no modo SIM da solução padrão mista derivatizada em solvente acetonitrila	28
Figura 15 – Comparação das respostas obtidas em diferentes tempos de reação (1 e 2 horas) para a sililação com o MSTFA na solução mista em isoctano	30
Figura 16 – Comparação das respostas obtidas em diferentes tempos de reação (1 e 2 horas) para a sililação com o MSTFA na solução mista em acetonitrila	31
Figura 17 – Representação gráfica da média dos resultados dos experimentos realizados na tabela 10	33
Figura 18 – Gráfico do volume de derivatizante utilizado na reação de derivatização	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação química dos anti-inflamatórios não-esteróides inibidores não seletivos da ciclo-oxigenase	3
Tabela 2 – Características farmacológicas dos anti-inflamatórios não-esteróides	4
Tabela 3 – Soluções dos analitos em função dos solventes utilizados	15
Tabela 4 – Condições de operação do sistema CG/EM	16
Tabela 5 – Condições experimentais da reação de silição realizada em diferentes solventes (isooctano e acetonitrila)	26
Tabela 6 – Descrição dos tempos de retenção e íons selecionados dos analitos para análise multirresíduo	27
Tabela 7 – Descrição dos experimentos realizados para avaliação da influência do tempo de reação nas soluções mistas	29
Tabela 8 – Resposta de área para a variação do tempo de reação na solução mista com isooctano	29
Tabela 9 – Resposta de área para a variação do tempo de reação na solução mista em acetonitrila	30
Tabela 10 – Resultados dos experimentos de avaliação de diferentes condições de realização da reação de silição em uma solução com concentração $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cada analito	32
Tabela 11 – Separação dos analitos em dois sistemas em função dos diferentes solventes empregados (isooctano e acetonitrila) após avaliação dos experimentos de otimização realizados	34
Tabela 12 – Descrição experimental e resultados obtidos para avaliação de diferentes volumes de derivatizante (MSTFA ativado III) em isooctano	35
Tabela 13 – Descrição dos dados do planejamento Doehlert proposto	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDES	3
2.2 DERIVATIZAÇÃO EM CROMATOGRAFIA A GÁS	5
2.3 CROMATOGRAFIA A GÁS	8
2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	9
2.5 CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	10
2.6 DETERMINAÇÃO DE AINES EM MATRIZES AQUOSAS AMBIENTAIS	11
3 OBJETIVOS	13
3.1 OBJETIVO GERAL	13
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4 PARTE EXPERIMENTAL	14
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1.1 Materiais	14
4.1.1.1 Reagentes	14
4.1.2 Métodos	14
4.1.2.1 Lavagem da vidraria	14
4.1.2.2 Preparação das soluções padrão estoque e de trabalho	14
4.1.2.3 Derivatização – Reação de Sililação	15
4.1.2.4 Reação de Sililação das Soluções Mistas	15
4.1.2.5 Otimização da reação de sililação multirresíduo	15
4.1.2.6 Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas	16
4.1.3 Equipamentos	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	17
5.1 REAÇÃO DE SILILAÇÃO	17
5.1.1 Acetoaminofeno	17
5.1.2 Ácido Salicílico	18
5.1.3 Cafeína	19
5.1.4 Cetoprofeno	20
5.1.5 Diclofenaco	21
5.1.6 Dipirona	23
5.1.7 Ibuprofeno	24

5.1.8 Naproxeno	25
5.1.9 Avaliação geral das reações individuais	25
5.2 REAÇÃO DE SILILAÇÃO NAS SOLUÇÕES MISTAS	26
5.3 AVALIAÇÃO DE CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA ANÁLISE MULTIRRESÍDUO	28
5.3.1 Tempo de reação	28
5.3.2 Solventes e derivatizantes	31
5.3.3 Volume de derivatizante	35
5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
6 CONCLUSÕES	40
7 REFERÊNCIAS	41
APÊNDICE I	45
APÊNDICE II	47

1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 90, observa-se um maior interesse dos pesquisadores da área da química ambiental em realizar estudos referentes à ocorrência, destino, quantificação, monitoramento e remoção de fármacos em ambientes aquáticos. Esse tema de estudo se torna relevante pelo fato desses compostos serem frequentemente encontrados em águas superficiais e águas subterrâneas em concentração na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , sendo, inclusive, persistentes aos tratamentos convencionais utilizados nas estações de tratamento de esgoto (ETE) (1).

Estima-se que a maior fonte de poluição das águas por fármacos seja pela excreção de humanos e animais, tanto na sua forma inalterada, metabolizada, ou, até mesmo, conjugada com outras moléculas polares, como, por exemplo, na forma de glucoronídeos (2). Aliás, espera-se que o consumo de medicamentos aumente no futuro devido à elevação do padrão de vida das pessoas, especialmente nos países com a economia em crescimento. Ou seja, mais pessoas viverão mais e usarão mais remédios à medida que envelhecem, fato que deve ser considerado ao avaliar o risco dessas substâncias ativas no meio ambiente (3). Somado a tudo isso, há outras fontes como as emissões provenientes de sítios de produção, derramamentos acidentais em indústrias, descarte de medicamentos excedentes ou fora do prazo de validade em domicílios, vazamentos provenientes de redes de esgoto, afetando águas subterrâneas, tratamentos terapêuticos em animais do campo e efluentes de fazendas (1, 4).

Dentre as várias classes de medicamentos existentes, as mais frequentemente abordadas nas publicações científicas voltadas ao estudo de fármacos nas diferentes matrizes aquosas são os anti-inflamatórios, analgésicos, antibióticos, reguladores de lipídios, esteroides e hormônios relacionados, betabloqueadores e os empregados em terapias contra câncer (5, 6).

A ocorrência dessas substâncias no meio ambiente leva à diversas perguntas em relação aos seus efeitos prejudiciais para a flora, fauna, e humanos. Informações sobre a bioacumulação de fármacos em biota ou em cadeias alimentares é ainda limitada. Contudo, sabe-se, por exemplo, que a presença de antibióticos pode contribuir para a seleção de bactérias que são mais resistentes a tratamentos médicos com antibióticos; que esteroides interferem na reprodução dos peixes, e que, especificamente, o diclofenaco, classificado como um anti-inflamatório não-esteroidais (AINE), foi relacionado como responsável pela morte de urubus que consomem a carcaça de animais tratados com esse fármaco, fato causador da morte de dez milhões de urubus na Ásia, deixando três espécies a beira da extinção (3). Esses exemplos demonstram a importância do estudo da interação de fármacos descartados em meio ambiente; da eficiência da remoção desses compostos nas ETEs; e da elaboração de

metodologias de análise para, talvez, uma futura implantação desse tipo de controle nas ETEs antes do retorno do efluente tratado para o meio ambiente.

Sabe-se que uma significativa porção dos fármacos descartados em esgoto é composta por analgésicos e anti-inflamatórios classificados como AINEs, os quais são utilizados para aliviar sintomas de dor e combater processos inflamatórios, respectivamente (4).

Essa classe de fármacos está entre as mais consumidas no mundo, sendo, em alguns países, a mais consumida sem receita médica. Estima-se que mais de 30 milhões de pessoas tomem AINE diariamente e, só nos Estados Unidos da América, são vendidos mais de 30 bilhões de comprimidos anualmente (7).

No Brasil, apesar de geralmente não serem publicados dados referentes ao consumo e venda de fármacos por classe terapêutica, observa-se que os AINEs são amplamente usados pela população, visto que, ou, são livres de prescrição médica, como o naproxeno e o ibuprofeno, ou, apesar da legislação exigir apresentação de receituário médico para compra, são facilmente adquiridos em qualquer farmácia sem tal premissa, como, por exemplo, o diclofenaco (8).

Outro agravante é o fato de que, segundo a Agência Nacional de Águas (ANA), estima-se que menos da metade do esgoto gerado é coletado e que, apenas, aproximadamente, um terço desse volume é encaminhado para tratamento (9). Portanto, grande parte desses compostos e respectivos metabólitos são diariamente lançados no meio ambiente, podendo interagir livremente com a fauna e flora, acarretando possíveis e indesejados danos ambientais.

A metodologia amplamente utilizada por pesquisadores para a determinação de AINEs em matrizes aquosas ambientais é a utilização da técnica de extração em fase sólida (EFS), como técnicas de preparação da amostra, seguida por um processo de derivatização, para, finalmente, submeter à análise por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) (10).

A reação de derivatização é necessária pelo fato destes fármacos serem polares, o que implicaria em uma pior resolução na análise por cromatografia a gás. Essa reação consiste na substituição de hidrogênios ativos da molécula por grupamentos apolares, com o objetivo de reduzir a polaridade e aumentar a volatilidade desses compostos, tornando viável o uso da CG/EM (11).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDES

A denominação AINEs é dada a um grupo de compostos, os quais, do ponto de vista químico, são, na sua maioria, ácidos orgânicos, utilizados na medicina como anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos. Acredita-se, de modo geral, que a inibição da ciclo-oxigenase - enzima responsável pela biossíntese das prostaglandinas e de determinados autacóides relacionados - constitua um importante componente do mecanismo de ação dos AINEs (12). A classificação química desses fármacos é apresentada na tabela 1.

Tabela 1 – Classificação química dos anti-inflamatórios não-esteróides inibidores não seletivos da ciclo-oxigenase (*adaptado da referência 12*).

Derivados do ácido salicílico:

Ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, salicilato de sódio, trissalicilato de magnésio e colina, salsalato, diflunisal, sulfassalazina, olsalazina

Derivados do para-aminofenol:

Acetoaminofeno

Derivados da pirazolona:

Fenilbutazona, oxifembutazona, antipirina, aminopirina, dipirona

Ácidos indolacético e indenacético:

Indometacina, sulindaco

Ácidos heteroaril acéticos:

Tolmetina, diclofenaco, cetorolaco, aceclofenaco

Ácidos arilpropiónicos:

Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, fenoprofeno, oxaprozina

Ácidos antranílicos (fenamatos):

Ácido mefenâmico, ácido meclofenâmico

Ácidos enólicos:

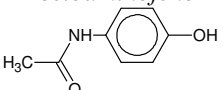
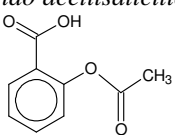
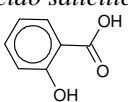
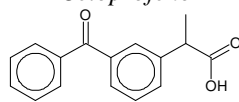
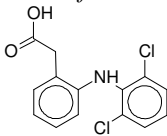
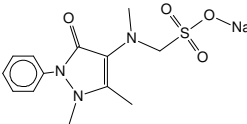
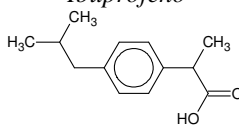
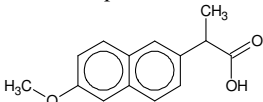
Oxicams (piroxicam, meloxicam)

Alcanonas:

Nabumetona

Na tabela 2 são dadas maiores informações farmacológicas sobre alguns dos AINEs mais consumidos e quantificados em matrizes aquosas ambientais.

Tabela 2 – Características farmacológicas dos anti-inflamatórios não-esteroides (12, 13, 14, 15,

Composto	Ação terapêutica	Dose habitual	Principais metabólitos	Excreção na forma inalterada
<p><i>Acetoaminofeno</i></p> 	<i>Analgésico; antipirético.</i>	350-1000 mg 1-3 x/dia	<i>N-acetil-benzoquinoneimina (<10%)</i>	90-100%
<p><i>Ácido acetilsalicílico</i></p> 	<i>Analgésico; antipirético; anti-inflamatório; antiagregante plaquetário.</i>	500-1000 mg 4-6 x/dia	<i>Ácido salicílico (75%); ácido salicílico (10%).</i>	30% (urina alcalina); 2% (urina ácida).
<p><i>Ácido salicílico</i></p> 	<i>Ceratolítico</i>	<i>Uso tópico</i>	-	-
<p><i>Cetoprofeno</i></p> 	<i>Anti-inflamatório</i>	50-75 mg 3-4 x/dia	<i>3-hidroxi-cetoprofeno</i>	10%
<p><i>Diclofenaco</i></p> 	<i>Anti-inflamatório</i>	50-100 mg 2-4 x/dia	<i>4-hidroxi-diclofenaco</i>	>50%
<p><i>Dipirona</i></p> 	<i>Analgésico; antipirético.</i>	500-1000 mg 1-4 x/dia	<i>4-acetil-amino-antipirina (45%)</i>	<10%
<p><i>Ibuprofeno</i></p> 	<i>Anti-inflamatório</i>	400-800 mg 3-4 x/dia	<i>2-hidroxi-ibuprofeno</i>	15%
<p><i>Naproxeno</i></p> 	<i>Anti-inflamatório</i>	250-500 mg 2 x/dia	<i>Naproxeno acil glicuronídeo (>50%)</i>	< 1%

A partir da tabela 2, observa-se que, considerando as elevadas doses diárias de ingestão destes fármacos (100 - 4000 mg), o percentual de excreção na forma inalterada e metabolizada de cada fármaco, e, ainda, o fato de serem comercializados sem receituário médico, de existirem poucas estações de tratamento de esgoto, e, segundo o Censo de 2010 (17), a população do Rio Grande do Sul ultrapassar os 10 milhões, e, a população brasileira tangenciar os 191 milhões de habitantes, a quantidade AINEs e dos seus respectivos metabólitos enviadas diretamente para o meio ambiente aquático é alarmante. Isso tudo justifica estudos como este e alerta para que se prossiga a avaliação do impacto dessas substâncias em biota.

2.2 DERIVATIZAÇÃO EM CROMATOGRAFIA A GÁS

Para realizar uma análise por cromatografia a gás, é necessário que as substâncias sejam suficientemente voláteis e termicamente estáveis. No caso de substâncias de alta massa molar e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares, há a necessidade de derivatização ou de utilização de uma coluna cromatográfica com fase estacionária específica (18).

A derivatização é uma reação química de modificação de compostos a fim de gerar novos produtos com melhores propriedades cromatográficas. Para análises por CG, moléculas contendo grupos funcionais como $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $-\text{SH}$, são de grande preocupação devido à capacidade de formar pontes de hidrogênio entre as moléculas. Isso leva a uma fraca volatilidade, insuficiente estabilidade térmica, ou pode levar a interações dos compostos com a fase estacionária, resultando em uma baixa detectabilidade e diminuição da vida útil da mesma (21).

Dos tipos reações de derivatização que podem ser utilizados em análise por CG, as mais empregadas são a alquilação, a acilação e a sililação (19, 20). Em geral, essas reações têm como objetivo: aumentar a volatilidade; aumentar a estabilidade térmica; melhorar as propriedades cromatográficas para investigação por CG/EM; obter novas ou adicionais informações estruturais; estudo do mecanismo de dissociação iônica; aumentar a sensibilidade e seletividade de análises em nível de traços; e determinação quantitativa por monitoramento de íon selecionado (SIM) (21).

Dos tipos de reação anteriormente citados, destaca-se a reação de sililação. É a reação mais simples, rápida e versátil disponível para análises via CG. Essas reações caracterizam-se por ocorrerem em única etapa e por apresentarem alto rendimento mesmo em condições brandas. Ao realizar uma sililação, bloqueia-se sítios próticos, havendo uma redução de interações do tipo dipolo-dipolo, elevando a volatilidade dos compostos, resultando em picos mais estreitos e simétricos (11, 21).

A reação geral para formação do derivado é apresentada na figura 1.

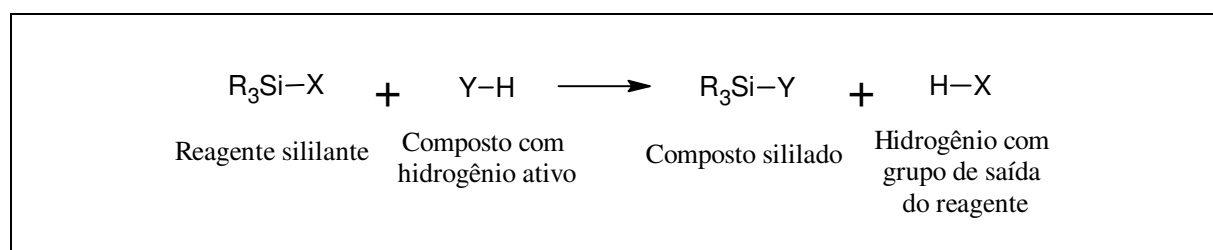


Figura 1 – Representação genérica da reação de sililação.

O mecanismo de reação é via substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N2), onde o par de elétrons do heteroátomo mais eletronegativo, por exemplo, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, ataca o átomo de silício do grupo silil pela região de menor impedimento estérico, produzindo um estado de transição bimolecular. O grupo de saída (X) deve possuir baixa basicidade - habilidade de estabilizar uma carga negativa no estado de transição - e pouca ou nenhuma tendência para retro-ligação $\pi(p-d)$ com o átomo de silício. Além disso, o grupo de saída ideal deve ser tal que rapidamente saia do estado de transição durante a reação, além de possuir estabilidade química suficiente para permitir o armazenamento do derivatizante em longo prazo para o uso quando necessário. Como a formação do estado de transição é reversível, a derivatização irá ocorrer completamente apenas se a basicidade do grupo de saída X for maior que a do grupo Y (11).

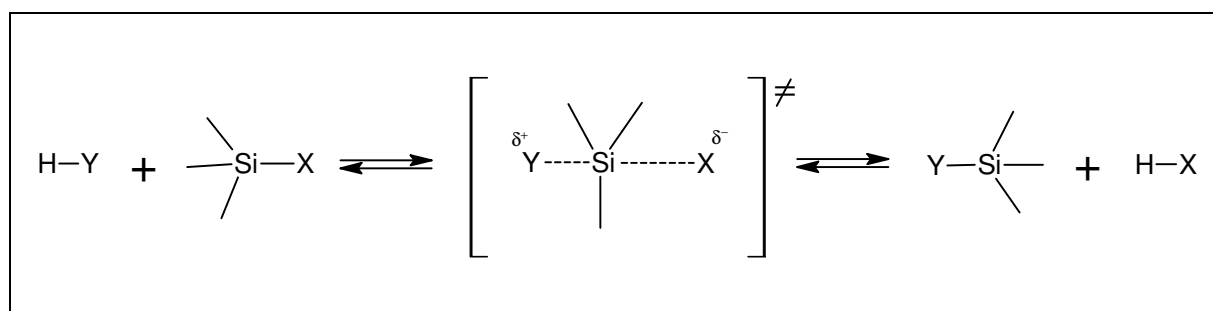


Figura 2 – Representação do estado de transição da reação genérica de sililação.

A facilidade de derivatização de diferentes grupos funcionais com um agente sililante segue a ordem: alcoóis > fenol > ácido carboxílico > amina > amida. Dentro dessa sequência de reatividade, também pode haver influência de impedimentos estéricos da estrutura do analito. Portanto, grupos primários reagem mais rapidamente que grupos secundários, os quais reagem mais rápido que grupos terciários (11, 21).

Quanto às condições práticas, deve-se ter atenção ao fato de que todos reagentes sililantes e seus respectivos derivados são sensíveis ao efeito hidrolítico. Conseqüentemente, as reações devem ser realizadas em frascos selados e com derivatizante em excesso. A escolha do solvente da reação também é um fator importante a ser estudado. Como a sililação ocorre em hidrogênios ativos, devem-se evitar solventes próticos. Em alguns casos, o próprio agente sililante pode ser empregado como solvente. Entre os solventes comumente empregados, destacam-se: piridina, hexano, isoctano (ISOC), dimetilformamida, dimetilsulfóxido,

tetrahidrofurano e acetonitrila (ACN). Geralmente, emprega-se aquecimento do sistema para favorecer uma derivatização efetiva (21).

Para aplicação da sililação em diversos compostos polares de diferente reatividade, vários agentes sililantes foram desenvolvidos, variando o poder silil-doador de cada reativo. Geralmente, para análises via CG, adiciona-se, em compostos polares, grupos trimetilsilila (TMS) ou tert-butil(dimetil)silila (TBDMS). Quando se deseja obter derivados-TMS, os agentes sililantes rotineiramente empregados são trimetilclorosilano (TMCS), N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N-trimetilsililimidazol (TMSIM), hexametilsililazano (HMDS) e N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), além de misturas entre eles, com o intuito de, ou catalisar as reações, ou derivatizar moléculas complexas. Quando se almeja derivados-TBDMS como produto, utiliza-se, em geral, os reativos tert-butil(dimetil)clorosilano (TBDMCS), N-tert-butil(dimetil)sililimidazol (TBDMSIM) e N-tert-butil(dimetilsilil)-N-(metil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA), ou a mistura deles para reação com moléculas de maior complexidade (11).

Entre os agentes sililantes utilizados quando se deseja obter derivados-TMS, o MSTFA se destaca por ser mais volátil que o BSA e o BSTFA, apesar de possuir similar poder silil-doador que ambos. Para aumentar o poder de sililação do MSTFA, pode-se usar catalisadores, como o TMCS e o imidazol (11). O derivatizante MSTFA e o catalisador imidazol estão apresentados na figura 3.

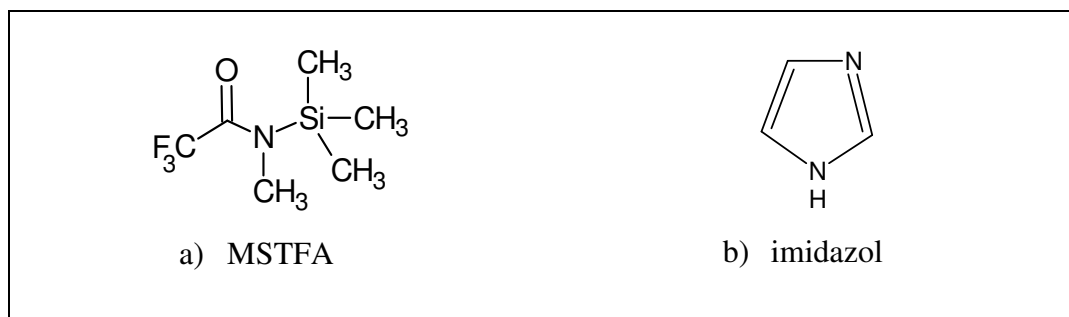


Figura 3 – Fórmula estrutural do derivatizante MSTFA (a) e do catalisador imidazol (b).

2.3 CROMATOGRAFIA A GÁS

Cromatografia é essencialmente um método físico de separação de misturas no qual os componentes a serem separados estão distribuídos entre duas fases, das quais uma é estacionária enquanto a outra é um fluido, chamada de fase móvel, que se move através ou sobre a fase estacionária em uma direção definida (25). A separação dos componentes da amostra é o resultado de repetidos eventos de sorção/dessorção ao longo da fase estacionária. Separações eficientes requerem uma adequada diferença de força das interações intermoleculares dos componentes da amostra nas duas fases, combinado com uma contribuição favorável das propriedades do sistema de transporte que controlam o movimento da amostra tanto intimamente com as fases quanto entre as fases. (22)

Os vários processos cromatográficos são nomeados de acordo com o estado físico da fase móvel. Dessa forma, por exemplo, quando se utiliza um gás como fase móvel (também conhecido como gás de arraste), chama-se o processo de cromatografia a gás, assim como quando a fase móvel é líquida, designa-se como cromatografia a líquido (CL). Uma subclassificação é feita em referência ao estado físico da fase estacionária. Por exemplo, se ela está no estado líquido, chama-se a técnica de cromatografia a gás-líquido (25).

Em resumo, um sistema cromatográfico a gás-líquido funciona da seguinte forma: um gás inerte (como o hélio) de elevado grau de pureza, oriundo de um cilindro de gás, percorre continuamente o sistema de injeção, a fase estacionária (também chamada de coluna cromatográfica, ou, simplesmente, coluna), e o detector. O fluxo do gás de arraste é cuidadosamente controlado para assegurar tempos de retenção (t_R) reproduzíveis e para minimizar o ruído do sistema. A amostra é colocada em um sistema de injeção aquecido, onde ela é vaporizada e introduzida na coluna cromatográfica (geralmente do tipo capilar) na qual se distribui entre a fase móvel e a fase estacionária, havendo, portanto, a separação dos seus componentes individuais devido a suas solubilidades relativas na fase líquida e suas respectivas pressões de vapor. Após isso, o gás de arraste e as substâncias já separadas pela coluna passam pelo detector, o qual detecta e quantifica cada substância, gerando um sinal elétrico que é enviado ao sistema de registro e tratamento de dados que gera um cromatograma, onde cada pico representa um composto individual. Em muitos casos, esse sistema integra as áreas dos picos automaticamente, realiza os devidos cálculos e emite um relatório com resultados quantitativos e respectivos tempos de retenção (18, 25).

Sobre o sistema de injeção de amostra em colunas capilares, o injetor mais comumente utilizado é do tipo *split/splitless*. No modo *split*, ocorre uma diluição da amostra pelo gás de arraste, sendo esse modo de injeção interessante quando os compostos de

interesse estão em alta concentração. Já no modo *splitless*, não ocorre esta diluição, o que é desejado para a análise em nível de traços, visto que, nesse caso, uma maior quantidade de amostra precisa ser injetada na coluna (18).

Quanto à fase estacionária, os parâmetros críticos a serem avaliados na sua seleção são: diâmetro interno; comprimento da coluna; espessura do filme; composição da fase estacionária; e o fluxo do gás de arraste. Em geral, observa-se que as colunas capilares com fase líquida são as mais utilizadas. Entre as fases líquidas, destaca-se o uso de polisiloxanos e misturas desse polímero com grupos metil, fenil, e ciano, as quais são realizadas a fim de mudar a polaridade da fase estacionária, fato que sempre deve ser avaliado em função do analito em análise.

Uma alternativa geralmente empregada para a otimização das condições experimentais é o controle de temperatura da coluna, sendo essa variável uma das mais importantes na CG. Em poucas palavras, o aumento da temperatura da coluna resulta em diminuição dos tempos de retenção, porém causa uma perda de resolução. Contudo, desde que corretamente utilizada, a separação entre compostos pode ser significativamente melhorada usando a programação de temperatura, também conhecida por rampa de aquecimento. Esse método tem como uma das principais vantagens a diminuição do tempo de análise de amostras complexas, mas é necessário cuidado no sentido de que pode ocorrer sangria da coluna a altas temperaturas, além de que se deve considerar o tempo de resfriamento da coluna para próxima análise.

Todavia, quando se deseja identificar e quantificar compostos, apenas a separação deles por coluna cromatográfica e comparação dos tempos de retenção não é suficiente. É necessário o emprego de um detector. Em geral, dos tipos de detectores existentes, como por condutividade térmica ou ionização em chama, utiliza-se a espectrometria de massas acoplada ao cromatógrafo a gás para essa finalidade (18, 25).

2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas baseia-se na formação de íons na fase gasosa, positivamente ou negativamente carregados, que podem ser isolados, eletricamente ou magneticamente, baseando-se na sua razão massa-carga (m/z). As análises realizadas por esse método podem fornecer informações importantes sobre os analitos, incluindo suas estruturas, pureza e composição (23).

Existem várias técnicas de ionização, porém a ionização por impacto eletrônico é a mais comum e simples (25). Esse método utiliza feixes de elétrons de alta energia (geralmente

70 eV) durante o processo de ionização. Um fluxo de elétrons (cargas negativa) é formado a partir de um filamento metálico aquecido, por exemplo, tungstênio, e, esses elétrons são eletricamente acelerados e dirigidos para colidir contra a amostra vaporizada, causando explosão eletrônica dos analitos e a subsequente formação de cátions radicais positivamente carregados, os quais, posteriormente, são separados em função da razão (m/z), gerando um espectro (23, 24). Essa separação é realizada pelo analisador de massas.

Atualmente, os quatro principais tipos de analisadores de massas utilizados em sistemas de CG/ EM são: quadrupolo, captura de íons, por tempo de voo e com transformada de Fourier (23).

O analisador de massas quadrupolo é formado por quatro barras cilíndricas (ou de seção hiperbólica) paralelos, de comprimento dentre 100 e 200 mm, montados segundo os vértices de um quadrado. Uma voltagem DC modificada por uma voltagem de radiofrequência é aplicada nas barras. Os íons entram em um “túnel” formado pelas quatro barras do quadrupolo no centro do quadrado em um das extremidades dos tubos e passam pelo eixo. Para cada combinação determinada de voltagem DC e voltagem modificada aplicada na frequência apropriada, somente íons com certo valor de m/z possuem uma trajetória estável e são capazes de atravessar o quadrupolo até o fim e chegar ao detector, sendo que os demais íons, com valores diferentes de m/z , têm oscilações erráticas e colidem com um dos tubos ou saem do quadrupolo (24).

2.5 CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A CG/EM é uma poderosa técnica para análise de compostos voláteis e, também, semi-voláteis. Esse tipo de sistema é muito interessante, pois fornece dados que são úteis tanto para identificação qualitativa de compostos desconhecidos (estrutura, composição, e massa molecular) pela análise dos espectros de massas, quanto para suas respectivas quantificações pela área dos picos (18, 25).

Desse tipo de sistema, pode-se obter dois tipos de cromatogramas, um no qual o detector registra todos os íons obtidos, chamado de modo “SCAN”, e outro em que apenas um pequeno número de íons (tipicamente de 2 a 4) são selecionados para serem registrados, conhecido como modo monitoramento de íon selecionado, cuja sigla é “SIM” (do inglês *selected ion monitoring*). A diferença entre esses dois modos de operação é fundamental na análise de matrizes com vários compostos em nível de traços. Em geral, utiliza-se o modo SCAN para obtenção de um espectro de massas individual de cada substância que se espera encontrar em uma determinada matriz. A partir da avaliação desse espectro de massas,

determinam-se os íons mais abundantes e característicos de cada substância para analisá-las no modo SIM na matriz real. Como poucos íons são monitorados, a taxa de aquisição de dados é mais rápida durante o tempo de vida de cada pico (~ 1s), garantindo maior sensibilidade ao método.

2.6 DETERMINAÇÃO DE AINES EM MATRIZES AQUOSAS AMBIENTAIS

A determinação de AINES por cromatografia a gás faz uso de uma etapa de derivatização com o objetivo de melhorar o desempenho cromatográfico desses compostos.

Para avaliação de uma reação de derivatização aplicável e satisfatória para determinação de AINES em efluente aquoso com análise por CG/EM, realizou-se uma exaustiva revisão na literatura, a qual está apresentada no APÊNDICE I.

Como o objetivo era analisar estes compostos na região de Porto Alegre-RS, em dissertação de mestrado em andamento (46), foi realizado levantamento dos principais fármacos consumidos pela população. A partir deste levantamento, verificou-se que os AINES mais consumidos são: ácido salicílico, acetoaminofeno, cetoprofeno, diclofenaco, fenoprofeno, ibuprofeno e naproxeno.

Geralmente, quando da análise de fármacos residuais, observou-se que a cafeína, estimuladora do sistema nervoso central, é adicionalmente avaliada em boa parte dessas publicações, sendo utilizada como um marcador antropogênico de contaminação de águas ambientais por esgoto urbano (6).

Com relação à metodologia normalmente utilizada para determinação de AINES em matriz aquosa ambiental por CG/EM, os principais aspectos experimentais são:

- coleta da amostra: utilização de frasco de vidro âmbar, e armazenamento da amostra coletada em baixas temperaturas (-20°C – 0°C) para evitar degradação dos analitos;
- filtração: com filtro de fibra de vidro de 0,7 µm, ou, pré-filtração primeiramente com camada de celite e com um filtro de maior porosidade, por exemplo, 1,2 µm, para retirar partículas suspensas e, em sequência, com um filtro de menor porosidade, como 0,45 µm;
- acidificação da amostra: a pH 2 – 3 com ácido clorídrico ou sulfúrico para tornar predominante na amostra os AINES em sua forma protonada, o que melhora a captura desses compostos na fase sólida e, também, contribui para a realização da reação de derivatização;

- extração/pré-concentração: para preparação da amostra, sendo a EFS a mais utilizada. Para isso, em geral, são empregados, como fase sólida, cartuchos Oasis[®] HLB e Strata[™] X. Essa técnica tem como objetivos principais a limpeza e pré-concentração da amostra;
- derivatização: mais comumente empregada é do tipo sililação. Entre os reagentes sililantes utilizados, destaca-se a utilização de reagentes BSTFA, BSTFA com 1% TMCS, MSTFA, MTBSTFA, MTBSTFA com 1 % TBDMCS. Essa reação tem como variáveis de reação o volume de derivatizante, o solvente empregado, o uso de catalisador, o tempo e a temperatura da reação. Por meio do controle dessas variáveis, pode-se determinar uma condição experimental viável para análise por CG/EM, que é o próximo passo.

Na etapa da análise por CG/EM propriamente dita, constata-se que a maioria dos trabalhos utilizou fase estacionária de 5% difenil dimetilsiloxano - MS. O hélio é utilizado como gás de arraste, com fluxo constante, que varia, nas publicações, de 0,6 à 1 mL.min⁻¹. Praticamente todos os trabalhos usam injeção *splitless*, com exceção de SEBÖK, *et. al.* (38, 39), que utilizaram injeção por meio de vaporização com temperatura programada. Com relação ao volume de injeção, geralmente os trabalhos usam de 1 à 2 µL de amostra, exceto GÓMEZ, *et. al.* (37) que utilizaram 10 µL. Além disso, observa-se o uso de programação de aquecimento da coluna para otimização da análise. O analisador de quadrupolo é o mais usado, mas o do tipo captura de íons também é encontrado nas publicações, principalmente quando utilizam a técnica de EM/EM. Como se trata de uma amostra com várias substâncias, o modo de análise por SIM é o mais adequado e se observa que, normalmente, são escolhidos de 2 a 4 íons na sua programação.

A concentração encontrada nas águas de entrada e saída das ETEs varia de caso para caso. Contudo, é evidente que, na grande maioria, a operação realizada para tratamento do esgoto não foi suficientemente eficaz para remover os fármacos abaixo do limite de detecção do método, que, em grande parte dos estudos, fica na faixa de ng L⁻¹.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as condições experimentais da reação de sililação de anti-inflamatórios não-esteroides em matrizes aquosas ambientais por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Selecionar os principais derivatizantes utilizados para AINEs;

Avaliar os reagentes MSTFA e MSTFA ativado III para sililação de AINEs;

Determinar as melhores condições para a sililação dos AINEs;

Avaliar o melhor planejamento experimental para otimização dos resultados.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Materiais

4.1.1.1 Reagentes

Reagentes para a reação de derivatização: MSTFA, marca Sigma-Aldrich, em ampolas de 1 mL e MSTFA ativado III (~5% imidazol), marca Sigma-Aldrich, em frasco âmbar de 5 mL.

Padrões de AINEs: acetoaminofeno, ácido salicílico, cetoprofeno, diclofenaco, dipirona, ibuprofeno, e, naproxeno. Os padrões foram doados pela empresa *Multilab Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos Ltda.*

Solventes usados no preparo das soluções estoque e suas diluições, assim como solventes da reação de silição: acetonitrila grau HPLC (*Tedia Company*); isoctano grau HPLC (*Mallinckrodt Chemicals*); metanol grau HPLC (*Tedia Company*).

Solventes utilizados para limpeza da vidraria: acetona comercial; acetona grau p.a. (*ALZ Laboratórios*); água destilada; hexano grau p.a. (*Mallinckrodt Chemicals*).

4.1.2 Métodos

4.1.2.1 Lavagem da vidraria

A vidraria utilizada nos experimentos seguiu o seguinte procedimento de limpeza: lavagem com sabão neutro diluído e água potável em abundância, enxágue com água destilada, acetona, hexano, e, novamente, acetona. Os *vials* foram lavados em banho de ultrassom por 10 minutos com os solventes acetona, hexano, e, novamente, acetona. Ao final, toda vidraria foi colocada em forno a 300 °C por 3 horas, exceto a vidraria volumétrica, a qual foi submetida a enxágue adicional de acetona, hexano, acetona de grau p.a..

4.1.2.2 Preparação das soluções padrão estoque e de trabalho

As soluções padrão estoque dos analitos acetoaminofeno, ácido salicílico, cetoprofeno, diclofenaco, dipirona, ibuprofeno e naproxeno foram preparadas na concentração de 1 g.L⁻¹ em acetonitrila grau HPLC. Contudo, para solubilizar os padrões de diclofenaco, dipirona e naproxeno nesse solvente, foi necessário acrescentar, previamente, gotas de metanol grau HPLC. Essas soluções foram mantidas na temperatura de -4 °C à 0 °C ao abrigo da luz.

As soluções padrão de trabalho foram preparadas a partir da diluição das soluções padrão estoque no solvente desejado, havendo sempre o cuidado de realizar a evaporação da

alíquota retirada da solução padrão estoque antes de acrescentar o solvente de diluição. Isso por dois motivos: quando se desejava trocar o solvente acetonitrila pelo isoctano; e, quando fora necessário acrescentar metanol para solubilização do padrão, pois o metanol poderia ser derivatizado ao invés do analito de interesse.

4.1.2.3 Derivatização – Reação de Sililação

Inicialmente, realizou-se a reação de sililação com cada um dos fármacos em estudo, a fim de verificar a efetividade da reação bem como os parâmetros cromatográficos na condição estabelecida (tempo de retenção dos compostos derivatizados, e seus respectivos espectros de massas). Para essa etapa, utilizou-se soluções individuais na concentração de 10 mg L⁻¹, solvente isoctano, 100 µL do derivatizante MSTFA ativado III, 1 hora de reação, e 70 °C de temperatura de reação. Estas condições foram selecionadas a partir dos dados da literatura, os quais são apresentados no Apêndice I.

Os fármacos derivatizados foram analisadas por CG/EM, conforme condições de operação apresentadas na tabela 4 da seção 4.1.2.6. Após avaliação dos resultados, repetiu-se a reação com o acetaminofeno e com a dipirona nas mesmas condições, exceto o solvente, que foi substituído por acetonitrila.

4.1.2.4 Reação de Sililação das Soluções Mistas

Com base nos resultados obtidos da avaliação individual da reação dos fármacos com o MSTFA ativado III, os analitos foram divididos em dois grupos: um no qual a reação de sililação deve ser realizada no solvente isoctano e, o outro, em acetonitrila, conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Soluções dos analitos em função dos solventes utilizados.

Sistemas	Solvente	Analitos
SOLUÇÃO MISTA ISOC	Isoctano	Ácido salicílico; cafeína; cetoprofeno; diclofenaco; ibuprofeno; naproxeno
SOLUÇÃO MISTA ACN	Acetonitrila	Acetaminofeno; dipirona

4.1.2.5 Otimização da reação de sililação multirresíduo

Para otimização das condições experimentais da reação de sililação multirresíduo, as seguintes variáveis foram consideradas: tempo de reação, solvente, catalisador (imidazol), e volume de derivatizante. Estes experimentos foram realizados com as soluções mistas.

4.1.2.6 Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas

As condições de operação do CG/EM são apresentadas na tabela 4. A avaliação dos espectros de massas individuais possibilitou a verificação da efetividade da reação de sililação, bem como a escolha dos íons representativos de todos os compostos para a construção do modo SIM que será utilizada na quantificação das amostras reais. A área do pico do cromatograma foi utilizada como variável de resposta.

Tabela 4 – Condições de operação do sistema CG/EM.

INJEÇÃO	Temperatura do injetor	290 °C
	Volume de injeção	1 µL
	Modo de injeção	Splitless
CROMATOGRAFIA	Coluna	DB-5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
	Gás de arraste	Helio
	Fluxo do gás de arraste	1 mL/min
	Rampa de aquecimento	100 °C (5 min) – 10°C/min – 290 °C (10 min)
ESPECTROMETRIA DE MASSAS	Temperatura transfer line	290°C
	Analisador de massas	Quadrupolo
	Energia impacto eletrônico	70 eV
	Modo de registro dos íons	SCAN

4.1.3 Equipamentos

Cromatógrafo a gás Agilent, modelo 6890, acoplado ao espectrômetro de massas, modelo 5975 (quadrupolo), equipado com injetor automático 7698 e coluna capilar DB-5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Sistema de redução de volume de amostras Mini-Vap com 6 portas, marca Chromatography Research Supplies.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 REAÇÃO DE SILILAÇÃO

5.1.1 Acetoaminofeno

O cromatograma e respectivos espectros de massas obtidos após a reação de sililação do acetoaminofeno com o MSTFA ativado III é apresentado na figura 4.

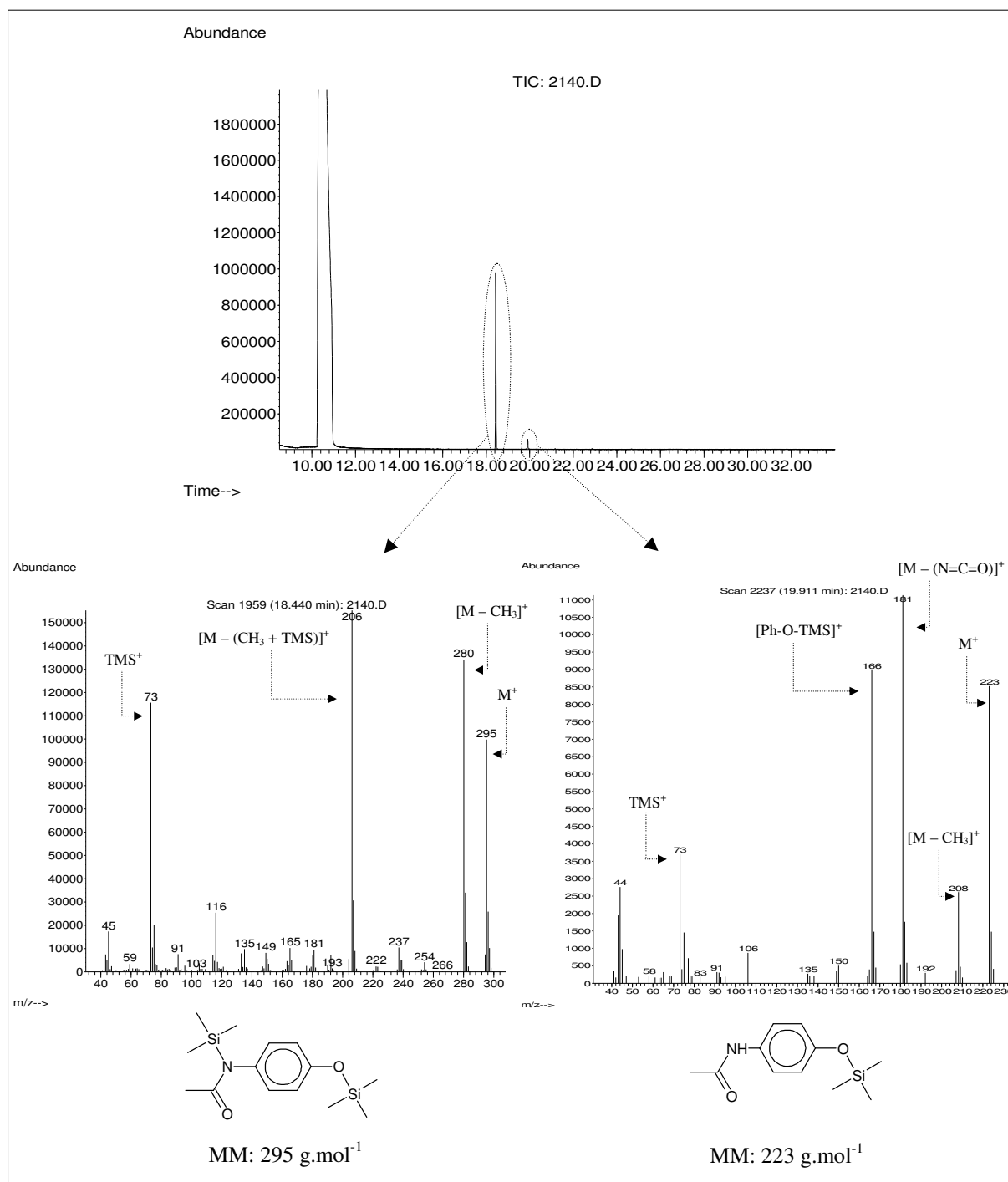


Figura 4 – Cromatograma no modo SCAN e os respectivos espectros de massas dos produtos da reação de sililação do MSTFA ativado III com o acetoaminofeno.

A análise do cromatograma, permite observar a formação de dois produtos, um deles com $t_R = 18,44$ minutos e, o outro, com $t_R = 19,91$ minutos. Pelo estudo dos respectivos espectros de massas, verifica-se que, no primeiro, ocorre a reação de sililação nos grupos $-OH$ e $-NH$ da molécula do acetoaminofeno. Já no segundo produto, observa-se que houve reação apenas no grupo $-OH$.

A efetividade da reação de sililação é comprovada experimentalmente pela existência do fragmento m/z 73 nos espectros de massas. Esse fragmento é referente ao grupo TMS.

Pode-se estimar que, nessas condições experimentais, provavelmente ter-se-ia apenas o produto com t_R 18,44 min. elevando o tempo da reação de sililação, fato que induz a um estudo da avaliação do tempo de reação, o qual foi realizado com a solução mista e será apresentado na seção 5.3.

5.1.2 Ácido Salicílico

O cromatograma e respectivo espectro de massas obtido após derivatização com MSTFA ativado III é apresentado na figura 5.

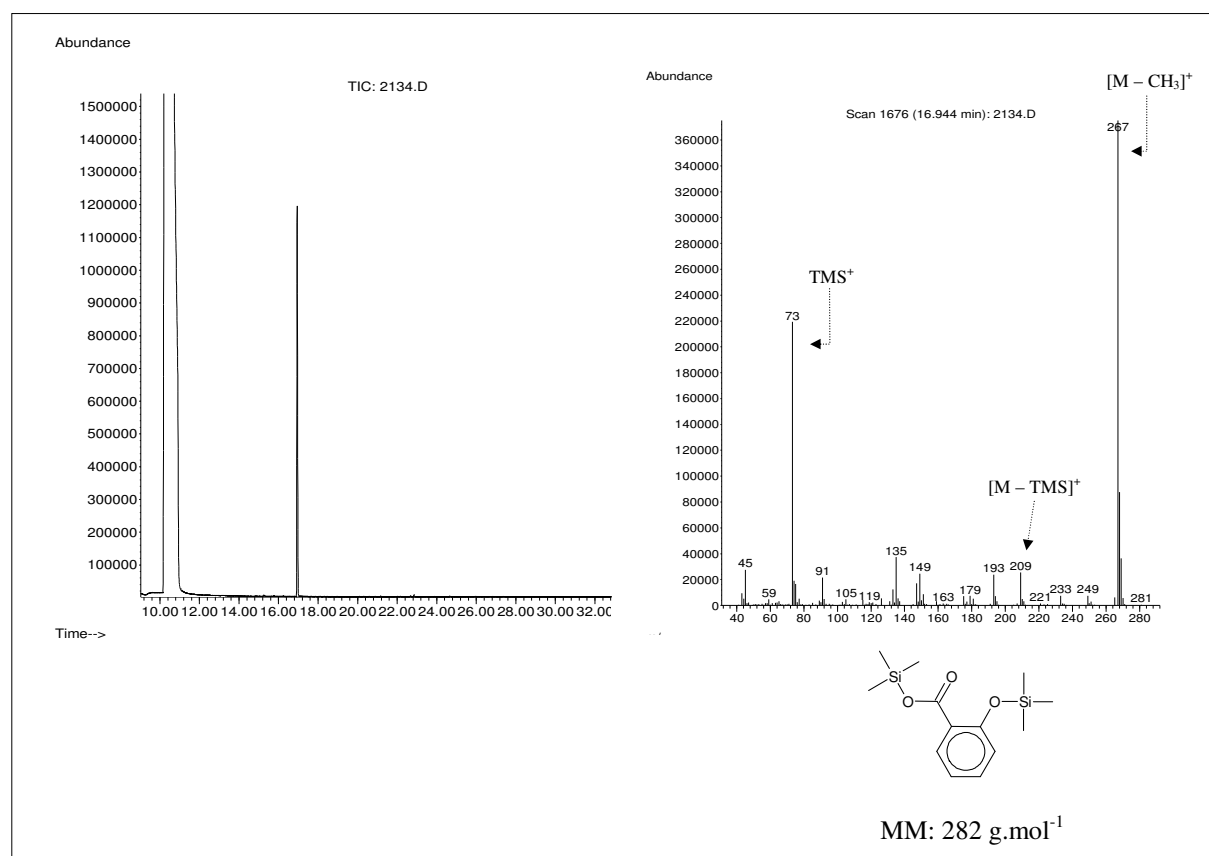


Figura 5 – Cromatograma no modo SCAN e respectivo espectro de massas do produto da reação de sililação do MSTFA ativado III com o ácido salicílico.

Pela análise da figura 5, constata-se que, nessas condições experimentais, a reação de sililação ocorre na função fenol e na função carboxi da molécula do ácido salicílico. O produto formado nessa reação tem t_R na coluna cromatográfica de 16,94 min. Além disso, não se observa a formação de subprodutos que possam interferir na quantificação desse fármaco pela reação de sililação.

5.1.3 Cafeína

O cromatograma e respectivo espectro de massas obtido após a reação de sililação da cafeína com o MSTFA ativado III é apresentado na figura 6.

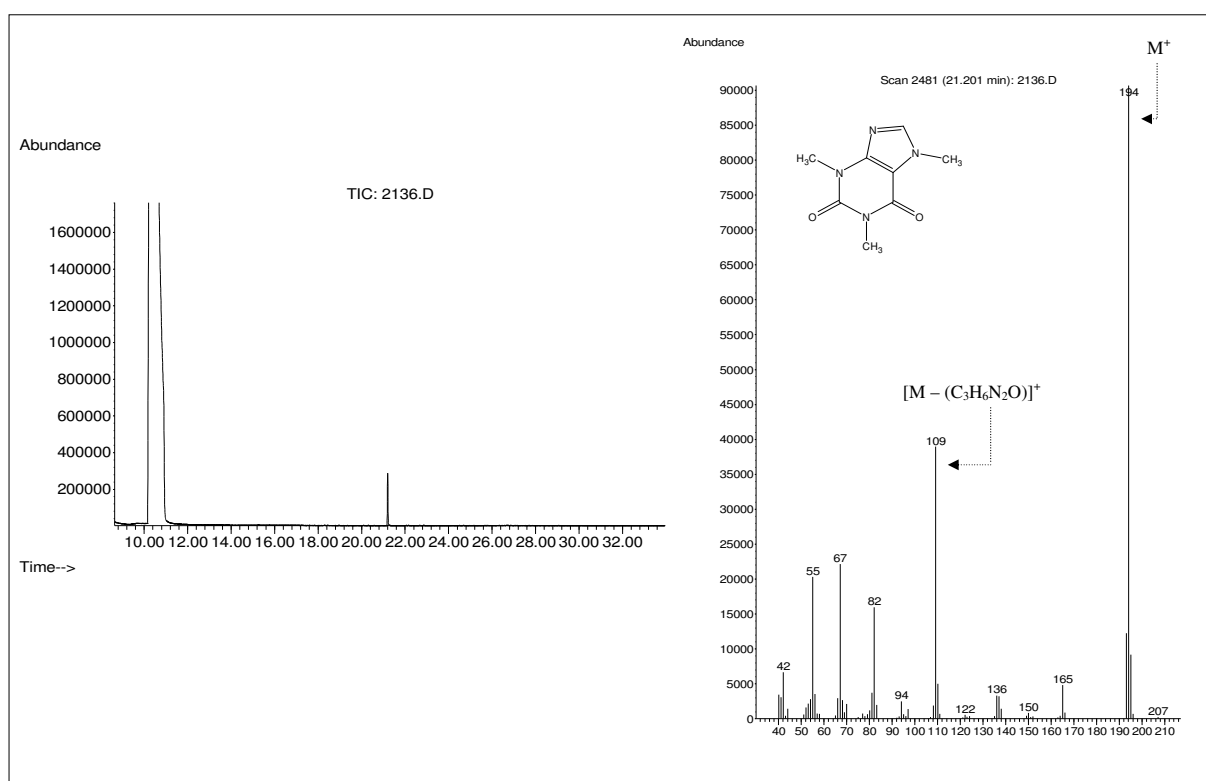


Figura 6 – Cromatograma no modo SCAN e respectivo espectro de massas do pico da cafeína.

Conforme se previa, a reação de sililação não ocorre na molécula da cafeína, pois sua estrutura não apresenta hidrogênios ativos para reagir. Esse fato é evidenciado experimentalmente pelo fato de não existir no seu respectivo espectro de massas o fragmento m/z 73, o qual representa o grupo TMS.

Além disso, verifica-se que a cafeína apresentou t_R de 21,20 minutos nas condições cromatográficas submetidas.

Observa-se, ainda, que, como não houve formação e respectiva separação de diferentes produtos na coluna cromatográfica, não houve degradação da cafeína ao ser submetida às condições de reação de sililação. Esse fato importante para o desenvolvimento da metodologia multirresíduo, pois ela poderá ser quantificada com os demais compostos em estudo.

5.1.4 Cetoprofeno

O cromatograma e respectivo espectro de massas obtido após a reação de sililação do MSTFA ativado III com o cetoprofeno é apresentado na figura 7.

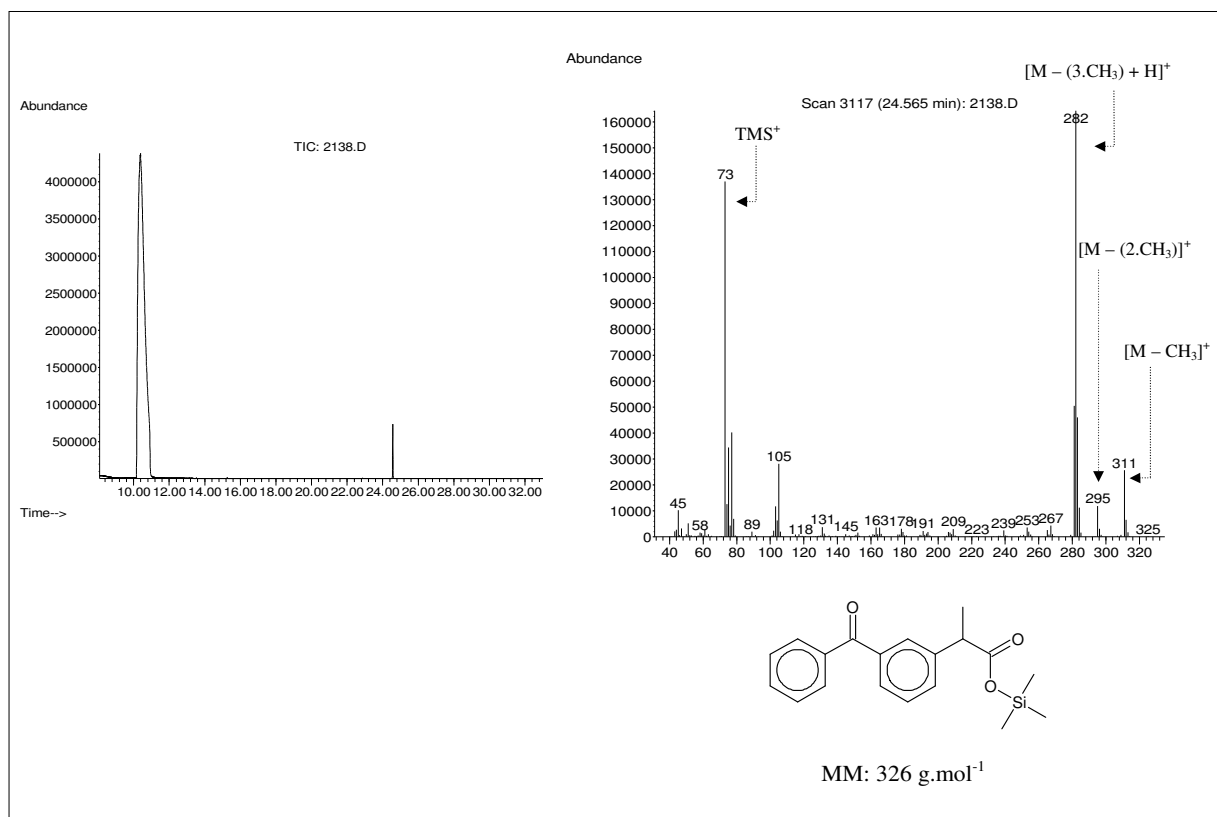


Figura 7 - Cromatograma no modo SCAN e respectivo espectro de massas do produto da reação de sililação do MSTFA ativado III com o cetoprofeno.

Observa-se, a partir do cromatograma e espectro de massas, que a reação de derivatização ocorre de fato, visto o fragmento m/z 73.

É possível avaliar, também, que a reação ocorre na função carboxi da molécula do cetoprofeno, e que apenas esse derivado-TMS é formado, cujo t_R é 24,56 minutos.

5.1.5 Diclofenaco

O cromatograma e respectivos espectros de massas obtido após a reação do MSTFA ativado III com o diclofenaco é apresentado na figura 8.

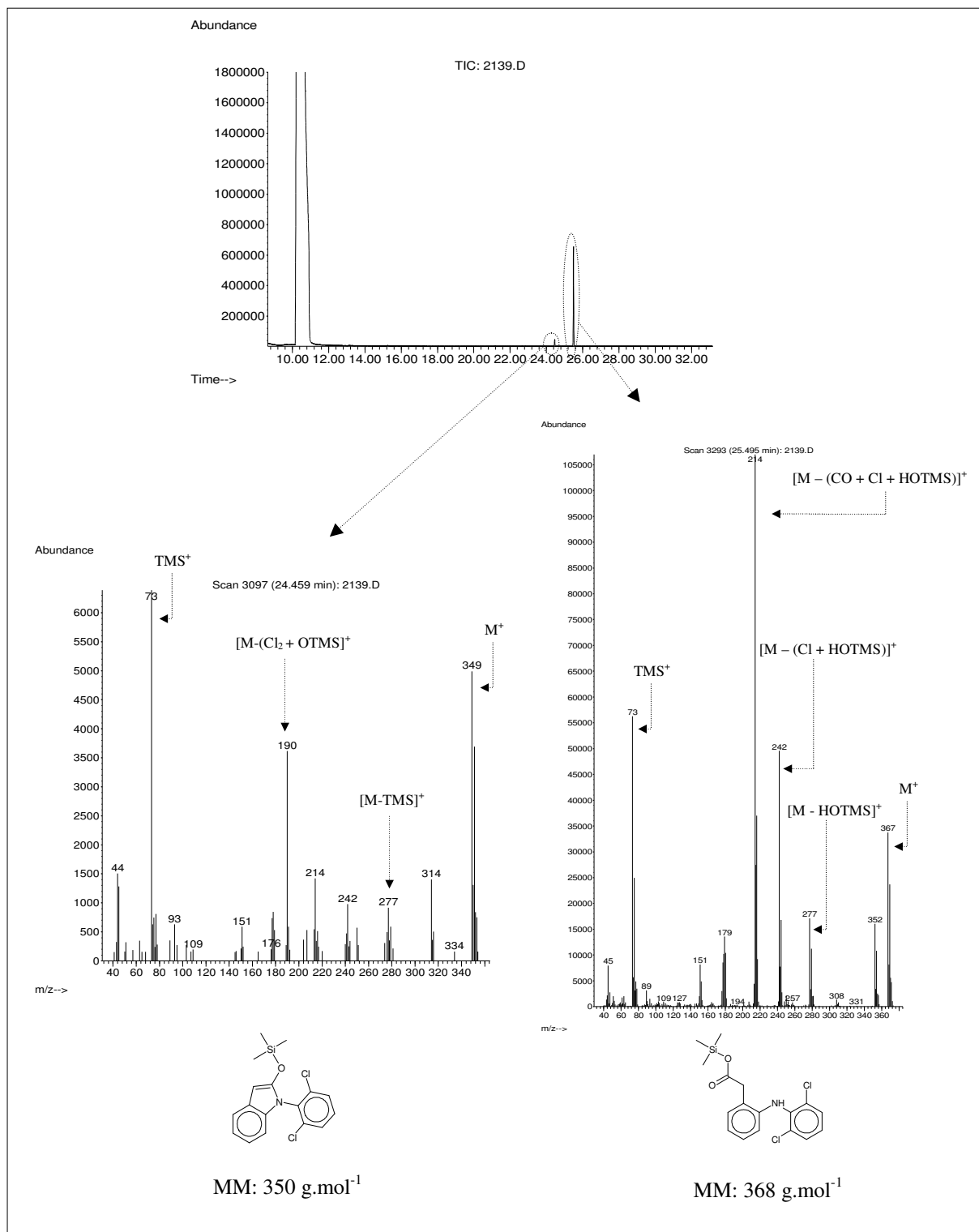


Figura 8 – Cromatograma no modo SCAN e respectivos espectros de massas dos produtos da reação de silição do MSTFA ativado III com o diclofenaco.

Observa-se, na figura 8, que, após submissão da reação de sililação e análise por CG/EM, obtêm-se dois produtos distintos, sendo um majoritário, com t_R de 25,49 minutos, e outro, minoritário, com t_R de 24,46 minutos.

O produto majoritário é o diclofenaco derivatizado, isto é, com o grupo TMS substituído no hidrogênio ativo do grupo carboxila, conforme evidenciado no respectivo espectro de massas.

O produto com t_R de 24,46 minutos, minoritário, também é susceptível a reação de sililação, fato comprovado pelo fragmento m/z 73 no seu respectivo espectro de massas. Contudo, pela avaliação do mesmo espectro de massas, observa-se que esse produto não se trata do diclofenaco. Para elucidação desse fato, propõem-se que, conforme cita a literatura (41), quando aquecido, um γ - ou δ -aminoácido sofre ciclização, formando uma lactama, sendo, nesse caso, o diclofenaco visto como um γ -aminoácido. Essa reação pode ter acontecido no CG/EM, provavelmente ou no injetor ou na coluna cromatográfica durante os 5 minutos iniciais à 100 °C da programação de aquecimento, com o diclofenaco que ainda não tinha derivatizado. A formação da lactama é favorecida por formar um anel de 5 membros e, também, porque ocorre a eliminação de um composto estável, no caso H_2O . O imidazol, que está presente no meio reacional pelo fato de ser utilizado como catalisador da reação de sililação, catalisa a reação de formação do íon enolato na lactama, que, finalmente, reage com MSTFA, formando o derivado trimetilsilila (42). Essa proposta é apresentada na figura 9.

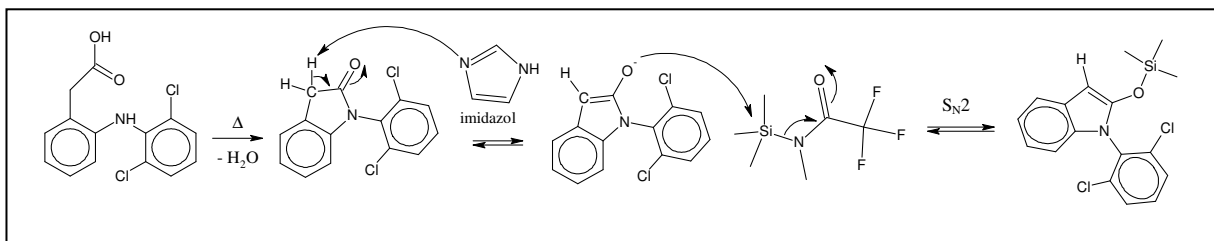


Figura 9 – Proposta da reação de formação do produto minoritário da reação do MSTFA ativado III com o diclofenaco.

Reitera-se que, segundo a proposta, esse produto se formou pelo diclofenaco excedente que não reagiu no tempo de reação submetido, que foi 1 hora. Esse excesso existiu pelo fato de trabalharmos, nessa etapa do estudo, com soluções de alta concentração (10 $mg.L^{-1}$). De acordo com o levantamento bibliográfico realizado (Apêndice I), não é esperado que houvesse uma concentração tão elevada de AINES em matriz ambiental. Logo, é pouco provável que essa reação secundária ocorra na análise da amostra real. Portanto, sugere-se que essa reação não irá interferir na quantificação do diclofenaco nesse tipo de matriz.

5.1.6 Dipirona

O cromatograma e respectivo espectro de massas obtido após submissão as condições aos reagentes de sililação é apresentado na figura 10.

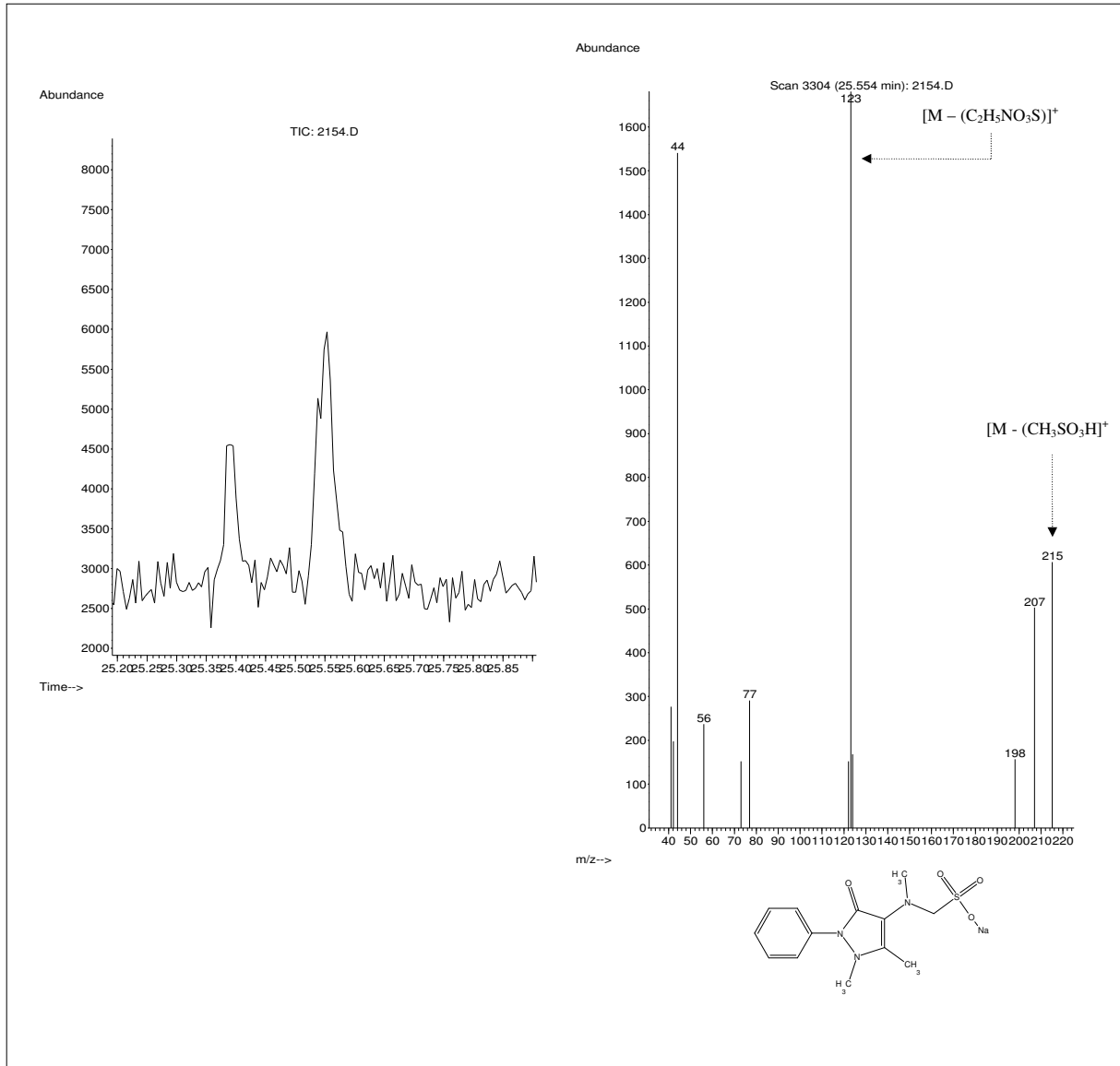


Figura 10 – Cromatograma no modo SCAN e respectivo espectro de massas da dipirona.

Pela análise do espectro de massas da dipirona, verifica-se, primeiramente, que, conforme previsto, não ocorre reação de sililação. Observa-se, ainda, que esse composto possui fator resposta muito baixo.

5.1.7 Ibuprofeno

O cromatograma e respectivo espectro de massas obtido após a reação de sililação do ibuprofeno com o MSTFA ativado III é apresentado na figura 11.

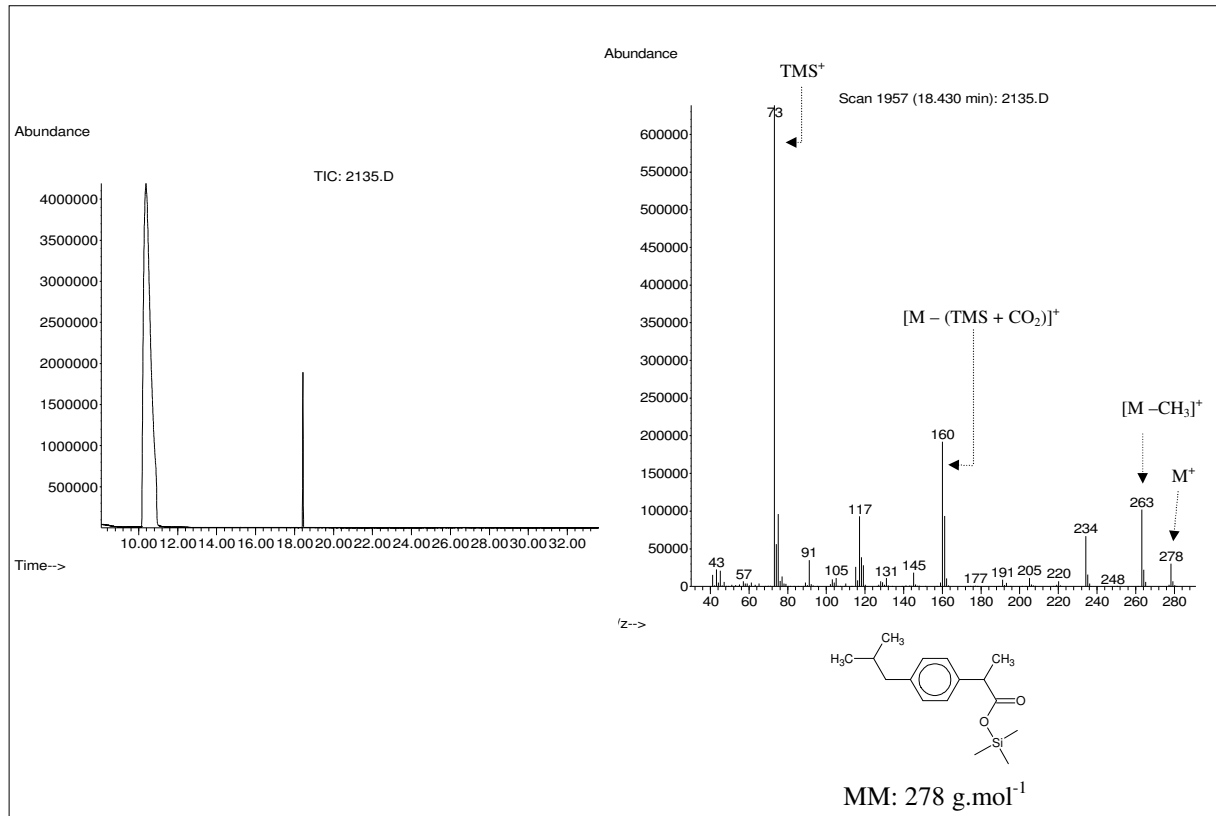


Figura 11 – Cromatograma no modo SCAN e respectivo espectro de massas do produto da reação de sililação do MSTFA ativado III com o ibuprofeno.

Verifica-se, a partir da análise por CG/EM, que o composto com t_R igual a 18,43 minutos trata-se do ibuprofeno derivatizado no hidrogênio ativo da carboxila. A avaliação do espectro de massas apresenta o íon molecular do ibuprofeno sililado, o fragmento m/z 73 referente ao grupo TMS, e o fragmento m/z 160, também característico do ibuprofeno.

5.1.8 Naproxeno

O cromatograma e respectivo espectro de massas obtido após a reação de derivatização do naproxeno com o MSTFA ativado III (~ 5% imidazol) é apresentado na figura 12.

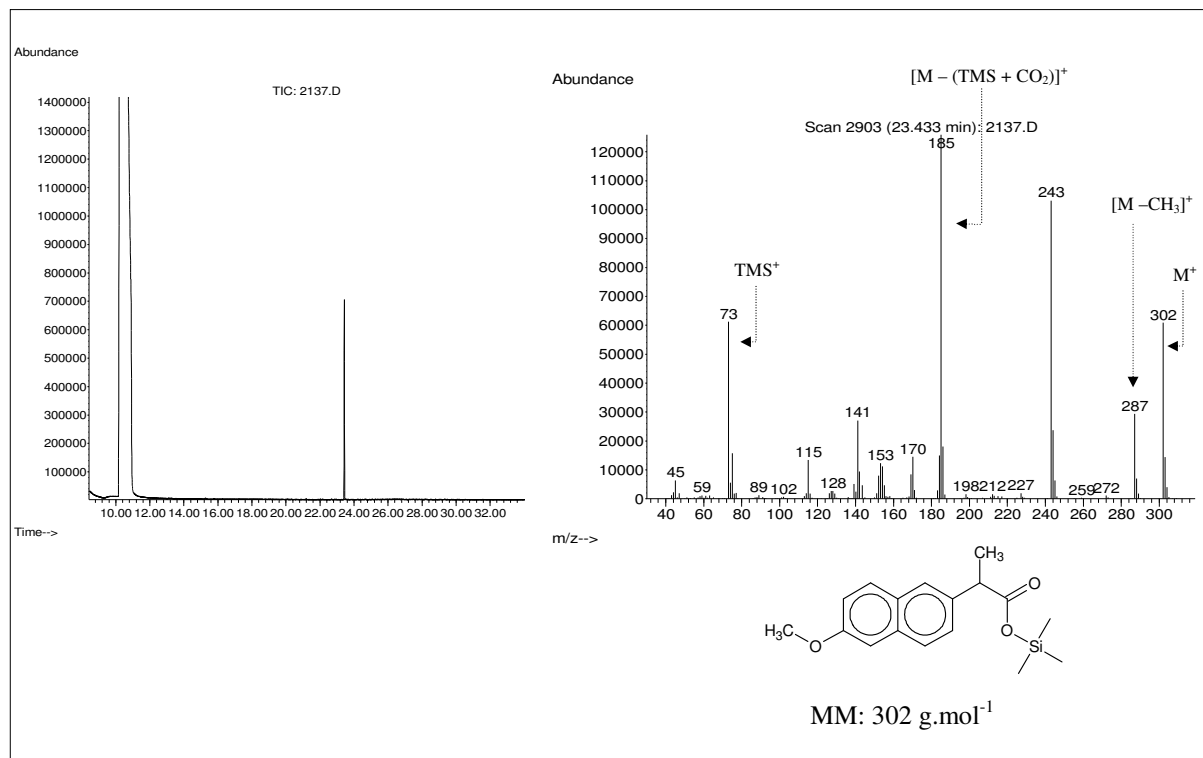


Figura 12 – Cromatograma no modo SCAN e respectivo espectro de massas do produto da reação de sililação do MSTFA ativado III com o naproxeno.

A partir da análise do espectro de massas do pico com tempo de retenção 23,43 min., observa-se que se trata do naproxeno sililado no hidrogênio ácido da carboxila. A efetividade da reação de derivatização é indicada pela existência do fragmento m/z 73, proveniente do grupo trimetilsilila. Observa-se também os demais fragmentos provenientes das quebras do naproxeno.

5.1.9 Avaliação geral das reações individuais

De forma geral, observou-se que a reação de sililação foi efetiva para os compostos com hidrogênios ativos que participam da reação com o reativo sililante MSTFA ativado III (~ 5% imidazol).

Inicialmente, todos os analitos foram submetidos à reação de sililação no solvente isoctano. Porém, nesse solvente, o acetoaminofeno e a dipirona não foram detectados na análise por CG/EM. Como alternativa, a reação de sililação, para estes dois compostos, foi realizada em acetonitrila. Nessa condição, os dois apresentaram picos característicos no cromatograma obtido por CG/EM. Como tanto a dipirona quanto o acetoaminofeno são amplamente utilizados pela população, principalmente no Brasil, e que, devido a isso, a probabilidade de encontrar ambos os fármacos em matriz aquosa ambiental é elevada, decidiu-se dividir a análise em dois grupos: um utilizando isoctano e outro utilizando acetonitrila. Nos dois casos as condições de derivatização foram iguais (70 °C, 100 µL de derivatizante e 1 h de reação).

A cafeína e a dipirona não são suscetíveis à derivatização, pois, ambos não possuem hidrogênios ácidos para reagir.

5.2 REAÇÃO DE SILILAÇÃO NAS SOLUÇÕES MISTAS

As reações de sililação nos diferentes solventes foram realizadas nas condições descritas na tabela 5.

Tabela 5 – Condições experimentais da reação de sililação realizada em diferentes solventes (isoctano e acetonitrila).

Experimento	Sistema	Solvente	Compostos
1	SOLUÇÃO MISTA ISOC	Isoctano	Ácido salicílico; cafeína; cetoprofeno; diclofenaco; ibuprofeno; naproxeno
2	SOLUÇÃO MISTA ACN	Acetonitrila	Acetoaminofeno; dipirona
Condições de reação constantes de ambos os sistemas			
Temperatura	Concentração individual	Derivatizante	Volume derivatizante
70 °C	1 mg.L ⁻¹	MSTFA ativado III	100 µL

Após realização das reações, as amostras foram analisadas por CG/EM, conforme condições de operação apresentadas da seção 4.1.2.6, no modo SCAN. A partir dos espectros de massas de cada composto, dois íons representativos de todos os compostos e os respectivos tempos de retenção, foram selecionados para a construção do modo SIM. Estes dados estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 – Descrição dos tempos de retenção e íons selecionados dos analitos para análise multirresíduo.

SOLUÇÃO MISTA ISOC		
Tempo de retenção (min)	Composto	SIM (m/z)
16,93	Ácido Salicílico-TMS	193; 267
18,43	Ibuprofeno-TMS	160; 263
21,20	Cafeína	109; 194
23,43	Naproxeno-TMS	185; 243; 302
24,57	Cetoprofeno-TMS	282; 311
25,50	Diclofenaco-TMS	214; 242
SOLUÇÃO MISTA ACN		
Tempo de retenção (min)	Composto	SIM (m/z)
19,91	Acetoaminofeno-TMS	166; 223
25,50	Dipirona	123; 215

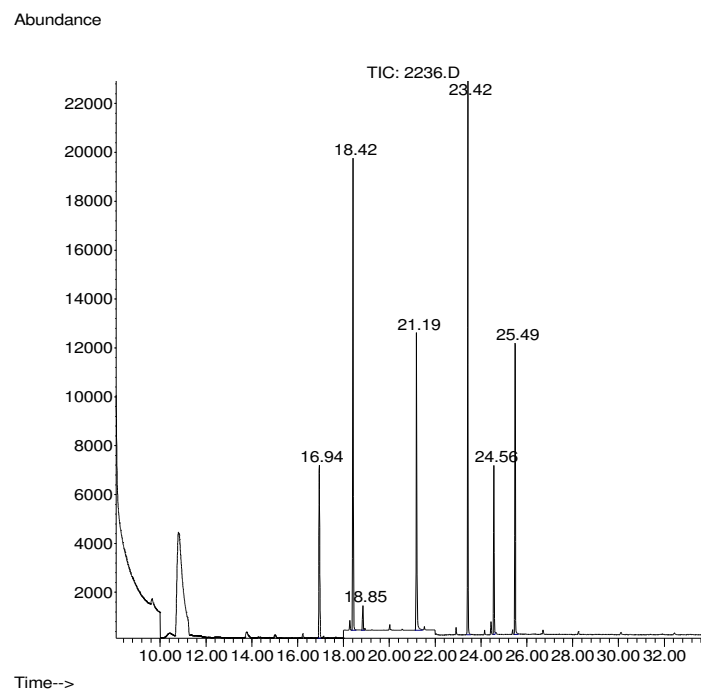


Figura 13 – Cromatograma no modo SIM da solução padrão mista derivatizada em solvente isoctano (t_R 16,94 min.: ácido salicílico-TMS; t_R 18,42 min.: ibuprofeno-TMS; t_R 18,85 min.: trifluralina; t_R 21,19 min.: cafeína; t_R 23,42 min.: naproxeno-TMS; t_R 24,56 min.: cetoprofeno-TMS; t_R 25,49 min.: diclofenaco-TMS).

Na figura 13, observa-se que os seis compostos de interesse estão bem definidos.

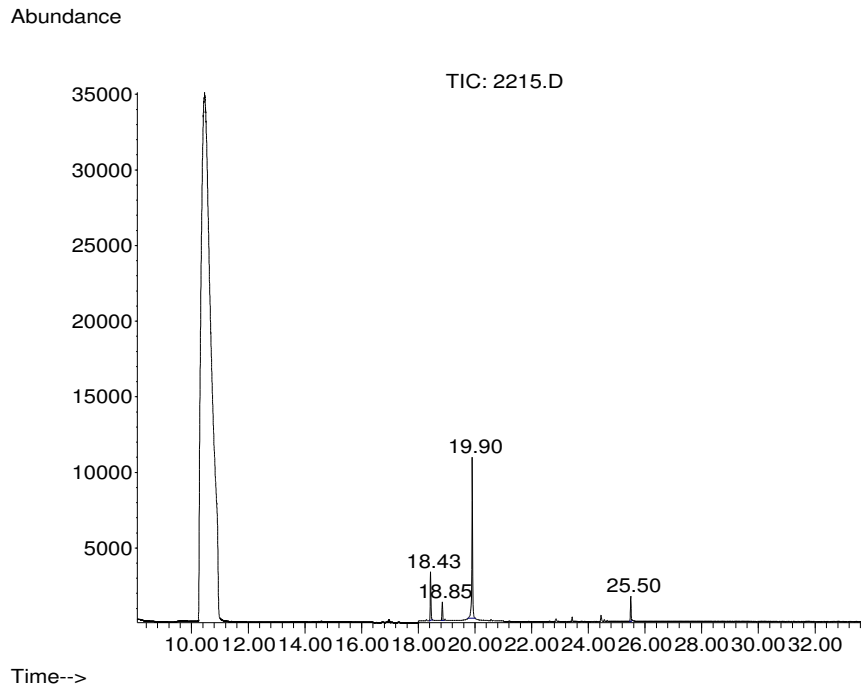


Figura 14 – Cromatograma no modo SIM da solução padrão mista derivatizada em solvente acetonitrila (t_R 18,43 min.: acetoaminofeno-(TMS)₂; t_R 18,85 min.: trifluralina; t_R 19,90 min.: acetoaminofeno-TMS; t_R 25,50 min.: dipirona).

Na figura 14, verifica-se que, da mesma forma que na solução em isoctano, os analitos são bem separados e que a condição de operação do sistema CG/EM, é satisfatória para analisar os compostos de interesse. Contudo, observou-se que, para o acetoaminofeno, diferentemente do que ocorre na análise individual, o produto majoritário da reação é o que tem t_R 19,9 minutos, ou seja, a reação de silição ocorre preferencialmente apenas na hidroxila da sua molécula. Portanto, os experimentos de avaliação de condições experimentais serão realizados no intuito de obter a melhor resposta possível para esse produto da reação.

Em ambos cromatogramas, figuras 13 e 14, observa-se um pico com t_R 18,85 minutos que é da trifluralina que foi incluída na solução em estudo porque será utilizada como padrão interno quando da quantificação das amostras reais.

5.3 AVALIAÇÃO DE CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DA ANÁLISE MULTIRRESÍDUO

5.3.1 Tempo de reação

Essa etapa do trabalho teve como objetivo avaliar se o tempo de reação influenciaria na resposta obtida na análise por CG/EM, isto é, se o tempo de reação de 1 hora, que foi o utilizado nas reações individuais, seria suficiente para derivatização dos analitos nas soluções

mistas. Para tanto, realizou-se a reação nos tempos de 1 hora e 2 horas, sendo que as demais condições experimentais foram mantidas iguais para ambos os tempos de reação avaliados. A descrição experimental é apresentada na tabela 7.

Tabela 7 – Descrição dos experimentos realizados para avaliação da influência do tempo de reação nas soluções mistas.

Experimento	Soluções mistas	Analitos	Solvente	Tempo de reação	Condições experimentais mantidas constantes
1	Solução Mista ISOC	Ácido salicílico; cafeína; cetoprofeno; diclofenaco; ibuprofeno; naproxeno	Isoctano	1h	Temperatura 70°C
2				2h	Concentração individual 1 mg.L ⁻¹
3	Solução Mista ACN	Acetoaminofeno; dipirona	Acetonitrila	1h	Derivatizante MSTFA
4				2h	Volume derivatizante 10 µL

Os resultados desses experimentos são apresentados nas tabelas 8 e 9 e representados graficamente nas figuras 15 e 16.

Tabela 8 – Resposta de área para a variação do tempo de reação na solução mista com isoctano.

Tempo de reação	Analitos (Área do pico)					
	Ácido Salicílico-TMS	Ibuprofeno-TMS	Cafeína	Naproxeno-TMS	Cetoprofeno-TMS	Diclofenaco-TMS
1 h	201929	2836481	630330	1459571	456368	1236688
	217052	2843328	658954	1428446	408551	1252421
Média	209490,5	2839904,5	644642	1444008,5	432459,5	1244554,5
2 h	202183	2943877	685133	1422352	476241	1241079
	205056	2915435	689132	1442185	497786	1292593
Média	203619,5	2929656	687132,5	1432268,5	487013,5	1266836
Variação (%)	-2,80	3,16	6,59	-0,81	12,61	1,79
Condições experimentais mantidas constantes durante as reações de sililação realizadas:						
Temperatura	Concentração individual	Solvente	Derivatizante	Volume de derivatizante		
70 °C	1 mg.L ⁻¹	Isoctano	MSTFA	10 µL		

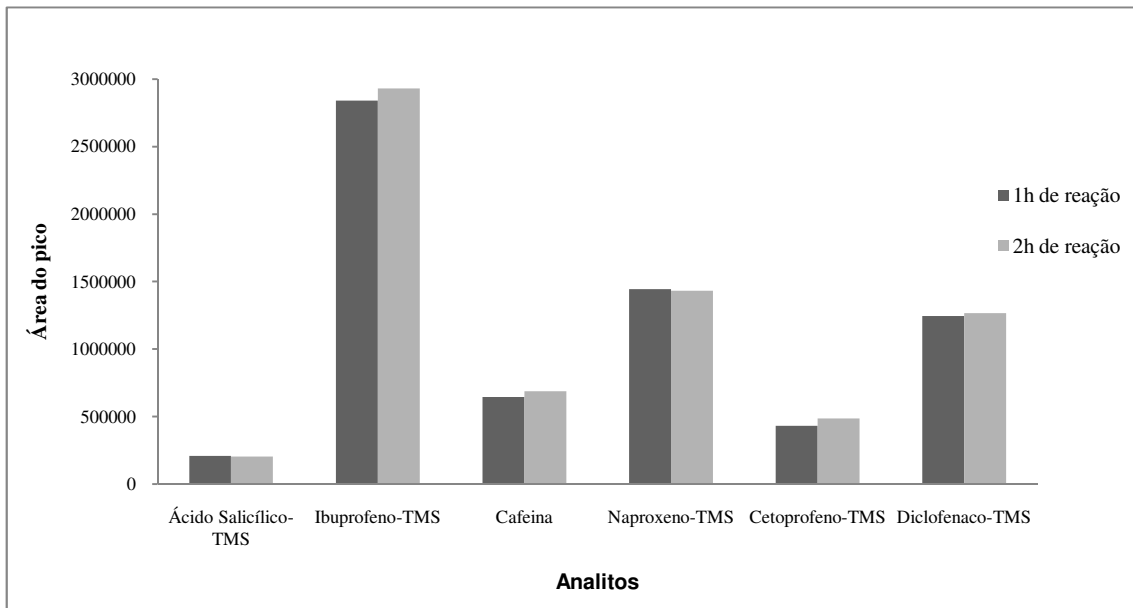


Figura 15 – Comparação das respostas obtidas em diferentes tempos de reação (1 e 2 horas) para a sililação com o MSTFA na solução mista em isoctano.

Pela análise dos dados do grupo de fármacos cuja reação de sililação ocorre em isoctano (tabela 8 e figura 15) observa-se que apenas para o cetoprofeno houve um aumento no valor de resposta (~12%) pela duplicação do tempo de reação. Para os demais analitos, a diferença não é significativa. Pode-se afirmar que essas variações não justificam realizar um procedimento de demorar o dobro do tempo (de 1 hora para 2 horas de duração).

Tabela 9 – Resposta de área para a variação do tempo de reação na solução mista com acetonitrila.

Tempo de reação	Analitos (Área do pico)			
	Acetoaminofeno-TMS	Dipirona		
1 h	23494	1002559		
	28883	919852		
	27640	902674		
Média	26672	941695		
2 h	27293	879856		
	25943	878944		
	25601	849605		
Média	26279	869468		
Variação (%)	-1,47	-7,67		
Condições experimentais mantidas constantes durante as reações de sililação realizadas:				
Temperatura	Concentração individual	Solvente	Derivatizante	Volume de derivatizante
70 °C	1 mg.L ⁻¹	Acetonitrila	MSTFA	10 µL

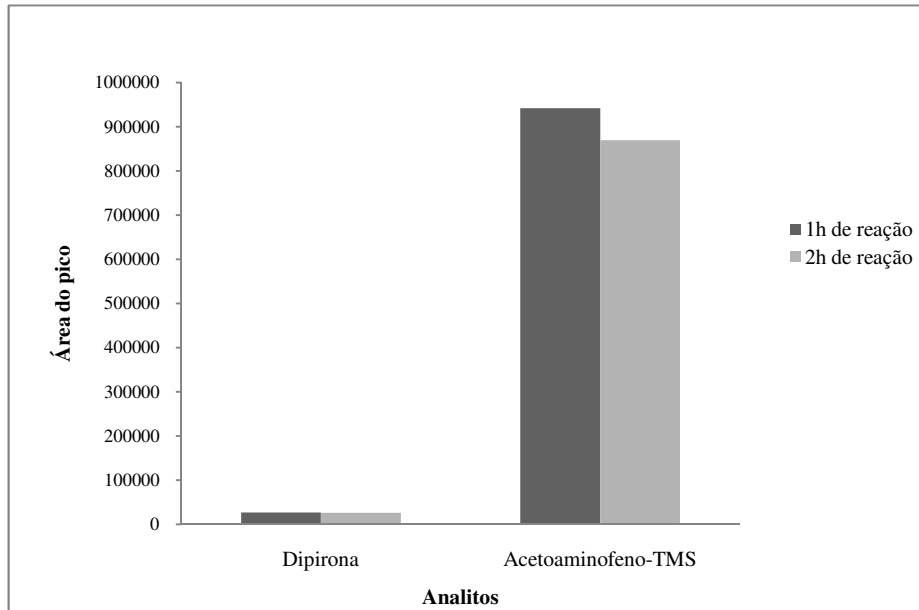


Figura 16 – Comparação das respostas obtidas em diferentes tempos de reação (1 e 2 horas) para a silição com o MSTFA na solução mista em acetonitrila.

A análise dos resultados dos experimentos dos analitos os quais foram submetidos à reação de silição em acetonitrila (tabela 9 e figura 16) evidencia que ao elevar o tempo de reação ocorreu um pequeno decréscimo nas respostas. Portanto o tempo de 1 h foi considerado mais adequado.

Nos dois solventes, o melhor tempo para a reação de silição foi de 1 h.

5.3.2 Solventes e derivatizantes

Nessa etapa, realizaram-se quatro experimentos utilizando-se os dois solventes (isooctano e acetonitrila) e os dois derivatizantes (MSTFA ou MSTFA ativado III). A descrição dos experimentos, assim como os resultados obtidos, estão na tabela 10 e na figura 17. Todos os experimentos foram realizados na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cada analito, à $70 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 1 h, e com $10 \text{ }\mu\text{L}$ do derivatizante em avaliação.

Tabela 10 – Resultados dos experimentos de avaliação de diferentes condições de realização da reação de sililação em uma solução com concentração $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cada analito. Condições mantidas constantes: Temperatura 70°C ; volume de derivatizante $10 \mu\text{L}$; tempo de reação: 1h.

Experimento	Derivatizante	Solvente	Solução mista $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (Área do pico)							
			Acetoaminofeno-TMS	Ácido Salicílico-TMS	Cafeína	Cetoprofeno-TMS	Diclofenaco-TMS	Dipirona	Ibuprofeno-TMS	Naproxeno-TMS
1	MSTFA	ACN	833.890	ND	825.351	450.408	ND	ND	57.623	ND
			929.994	ND	857.979	274.581	ND	ND	107.328	ND
	Média		881.942	-	841.665	362.495	-	-	82.476	-
	DP		67955,79	-	23071,48	124328,46	-	-	35146,74	-
	CV (%)		7,71	-	2,74	34,30	-	-	42,61	-
2	MSTFA ativado III	ACN	4.836.814	ND	1.008.035	502.254	ND	ND	ND	ND
			5.920.238	ND	1.109.401	389.126	ND	ND	ND	ND
	Média		5.378.526	-	1.058.718	445.690	-	-	-	-
	DP		766096,46	-	71676,59	79993,58	-	-	-	-
	CV (%)		14,24	-	6,77	17,95	-	-	-	-
3	MSTFA	ISOC	ND	127.903	48.667	91.626	117.749	ND	251.861	186.023
			ND	89.740	58.541	59.322	61.420	ND	199.723	107.093
	Média		-	108.822	53.604	75.474	89.585	-	225.792	146.558
	DP		-	26985,32	6981,97	22842,38	39830,62	-	36867,13	55811,94
	CV (%)		-	24,80	13,03	30,27	44,46	-	16,33	38,08
4	MSTFA ativado III	ISOC	ND	131.220	49.749	93.531	117.756	ND	252.909	181.413
			ND	130.731	51.378	74.498	102.738	ND	256.539	172.843
	Média		-	130.976	50.564	84.015	110.247	-	254.724	177.128
	DP		-	345,78	1151,88	13458,36	10619,33	-	2566,80	6059,91
	CV (%)		-	0,26	2,28	16,02	9,63	-	1,01	3,42

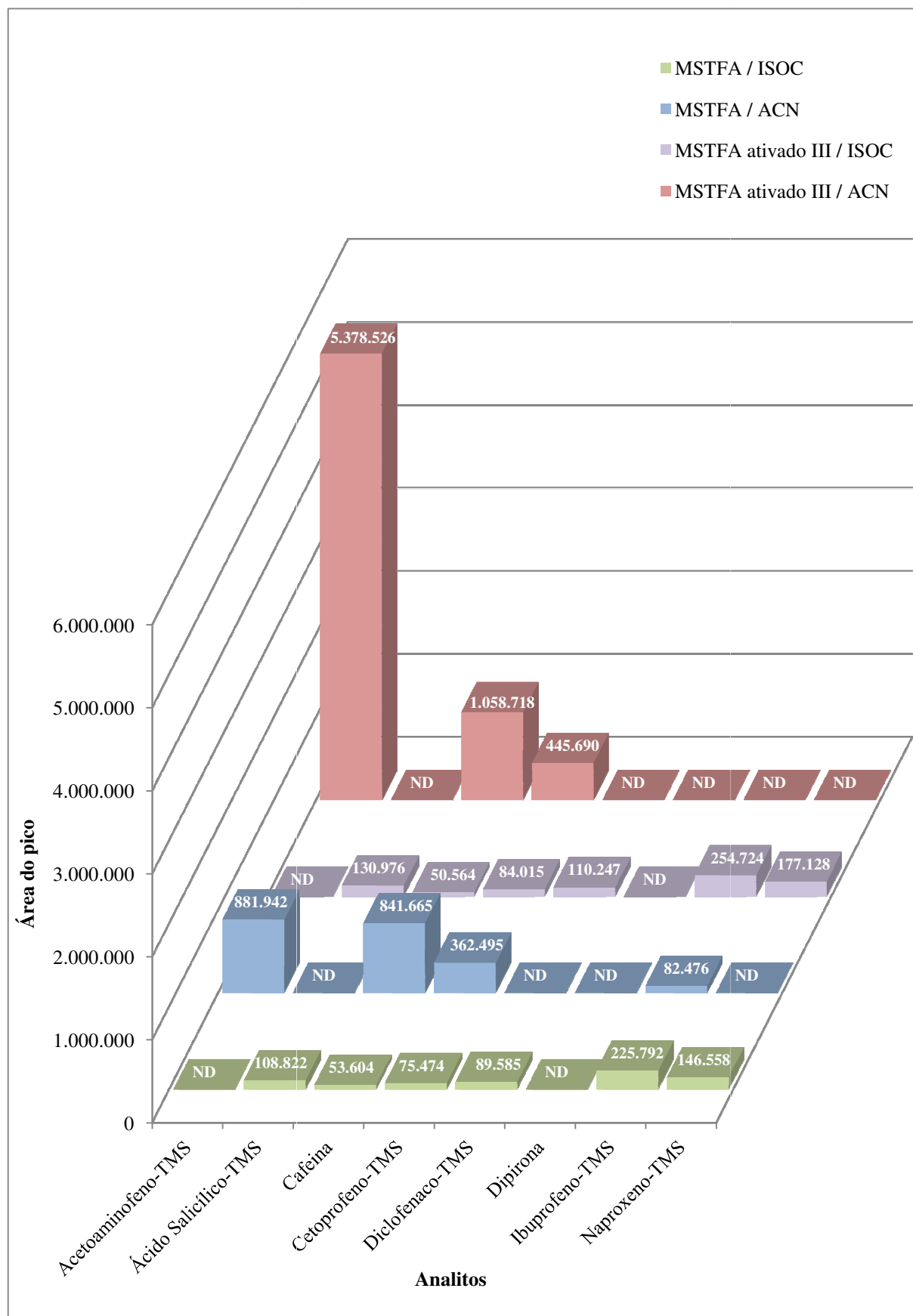


Figura 17 – Representação gráfica da média dos resultados dos experimentos realizados na tabela 10.

Pela avaliação desses experimentos, pode-se concluir que:

- quando utilizou-se o derivatizante MSTFA ativado III (que contém aproximadamente 5% de imidazol), obtiveram-se as melhores respostas de área, em módulo e com menores valores dos respectivos coeficientes de variação (CV), ou seja, são respostas com maior reprodutibilidade em comparação aos sistemas que utilizaram o MSTFA sem imidazol como derivatizante. Isso possivelmente se deve ao fato de que ao catalisar a reação, o imidazol propicia uma rota preferencial para a reação de silição, provavelmente facilitando a captura do hidrogênio ativo do sítio de reação, visto que o catalisador em questão é uma base. Isso contribui para que a reação seja completa e que necessite menor tempo para formação dos produtos de interesse;
- a dipirona não foi detectada nos sistemas avaliados, no entanto na solução individual à 10 mg.L⁻¹ e na solução mista à 1 mg.L⁻¹, ela foi detectada, sendo que ambas as soluções foram preparadas em acetonitrila. Já nesses experimentos realizados para avaliação da influência do solvente e do derivatizante na silição, as soluções foram preparadas com 0,5 mg.L⁻¹ de cada fármaco Sugere-se que a dipirona não foi detectada dessa vez porque o fator de resposta da dipirona é muito baixo em comparação com os demais fármacos, ou seja, é necessária uma concentração superior a 0,5 mg.L⁻¹;
- Verifica-se, também, que a avaliação do solvente empregado foi um fator importante a ser considerado, pois, por exemplo, em acetonitrila, apenas três fármacos (acetoaminofeno, cafeína, cetoprofeno), além da dipirona, são detectáveis quando submetidos à reação com MSTFA ativado III, enquanto que 6 fármacos (ácido salicílico, cafeína, cetoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno) são detectáveis em isoctano ao reagir com o mesmo derivatizante;
- Logo, pelos experimentos realizados até o momento, conclui-se que deve-se transferir os fármacos cafeína e cetoprofeno para a SOLUÇÃO MISTA em acetonitrila, conforme a tabela 11.

Tabela 11 – Separação dos analitos em dois sistemas em função dos diferentes solventes empregados (isooctano e acetonitrila) após avaliação dos experimentos de otimização realizados.

Sistemas	Solvente	Analitos
SOLUÇÃO MISTA ISOC	Isocetano	Ácido salicílico; diclofenaco; ibuprofeno; naproxeno
SOLUÇÃO MISTA ACN	Acetonitrila	Acetoaminofeno; dipirona; cafeína; cetoprofeno

5.3.3 Volume de derivatizante

Cinco experimentos foram realizados variando o volume de derivatizante (5 alíquotas diferentes), em soluções de concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de cada fármaco, à 70 °C, durante 1 h, no solvente isoctano. A descrição experimental, assim como as áreas dos picos obtidas é apresentado na tabela 12. Os resultados também são apresentados na figura 18.

Tabela 12 – Descrição experimental e resultados obtidos para a avaliação de diferentes volumes de derivatizante (MSTFA ativado III) em isoctano.

Exp.	MSTFA ativado III (μL)	Solução mista 0,5 mg.L ⁻¹ (Área do pico) *					
		Ácido Salicílico-TMS	Cafeína	Cetoprofeno- TMS	Diclofenaco- TMS	Ibuprofeno- TMS	Naproxeno- TMS
1	10	83599	64273	24025	41165	57842	64363
2	50	173856	80154	38702	45831	70040	104818
3	100	128544	79460	33090	37346	72771	92487
4	200	88709	83846	30062	29213	79834	85776
5	300	147419	76476	28117	28068	73565	97770

* acetaminofeno-TMS e dipirona não detectados

Condições experimentais mantidas constantes durante as reações de silação realizadas:			
Temperatura	Concentração individual	Solvente	Derivatizante
70°C	0,5 mg.L ⁻¹	Isoctano	MSTFA ativado III

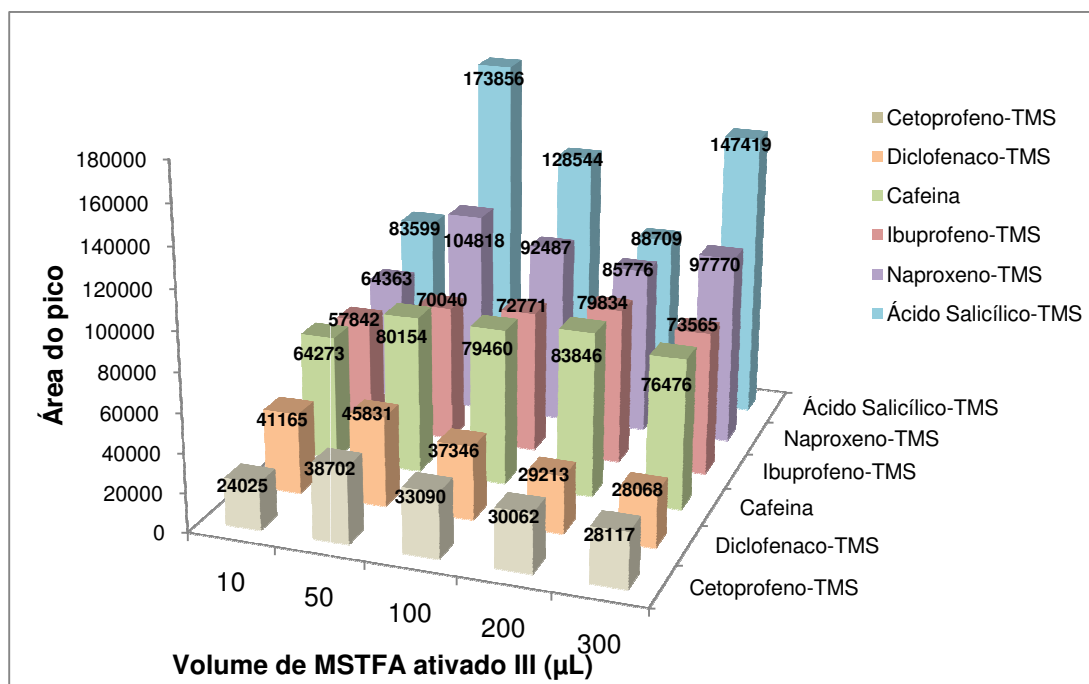


Figura 18 – Gráfico do volume de derivatizante utilizado na reação de derivatização.

Através da figura 18, observa-se que, as melhores respostas são obtidas quando a reação de sililação é submetida com 50 μL de derivatizante MSTFA ativado III. Para o ibuprofeno-TMS e a cafeína, observa-se que os melhores resultados são obtidos com 200 μL do derivatizante. Contudo, o acréscimo de área do pico em relação a reação com 50 μL não compensa o uso de um volume que seria o triplo dos demais e, além disso, como trata-se de um método multirresíduo, caso fosse escolhido o uso de 200 μL de derivatizante, ter-se-ia um decréscimo de aproximadamente 50% na resposta do ácido salicílico-TMS.

Não foi possível realizar esse estudo no solvente acetonitrila, solvente no qual o acetoaminofeno-TMS e a dipirona são detectáveis, porque não havia derivatizante MSTFA ativado III suficiente para realizar todos os experimentos. Realizou-se a compra de mais reagente, porém, por questões de importação, houve atraso na entrega desse reagente, não havendo tempo hábil para dar continuidade aos estudos.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Realizou-se esse trabalho no intuito de determinar as condições experimentais para realização da reação de sililação em anti-inflamatórios não-esteroides com o intuito de melhorar a performance cromatográfica destes analitos quando analisados por cromatografia a gás. Essa reação é importante, pois é uma etapa crucial da metodologia de análise de traços dessa classe de medicamentos em matriz aquosa ambiental.

A revisão da literatura foi o ponto de partida, sendo que no Apêndice I, apresentam-se todos os dados levantados. Sobre a reação de derivatização, constatou-se que a mais usada é a sililação, isto é, a derivatização na qual se inclui na estrutura da molécula de interesse, em geral, um ligante trimetilsilila no local em que há um hidrogênio ligado a oxigênio, nitrogênio, ou enxofre. Verificou-se que o derivatizante MSTFA seria uma boa alternativa por ser mais volátil que os derivatizantes BSA e o BSTFA e possuir similar poder silil-doador que ambos. Ainda na literatura, observou-se também a utilização do mesmo derivatizante MSTFA, porém com o acréscimo de um catalisador, o imidazol, sendo esse reativo chamado de MSTFA ativado III, segundo catálogo da Sigma-Aldrich.

Após adquirir os padrões dos fármacos, derivatizantes, solventes e afins, iniciou-se a parte experimental propriamente dita. Avaliou-se, no primeiro momento, a reação de sililação em cada um dos compostos, sendo essa reação realizada em condições experimentais semelhantes às encontradas na literatura (temperatura 70 °C; volume de derivatizante 100 μL ; tempo de reação 1 h). Após análise por CG/EM e avaliação dos respectivos resultados, repetiu-se essa mesma reação com os fármacos acetoaminofeno e dipirona, nas mesmas

condições experimentais, exceto o solvente, que foi acetonitrila, a fim de melhorar a resolução dos mesmos. Após constatação do êxito nessa tarefa, realizou-se o desenvolvimento as análises multirresíduo. Para isso, duas soluções mistas foram preparadas: uma em solvente isoctano contendo os fármacos ácido salicílico, cafeína, cetoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, e naproxeno, e, outra no solvente acetonitrila contendo os compostos acetoaminofeno e a dipirona. A análise por CG/EM dessas soluções mistas no modo SIM, foi estabelecida a partir da seleção dos íons mais intensos dos espectros de massas individuais, obtidos no modo SCAN (varredura).

Realizada essa etapa, partiu-se para a avaliação das condições experimentais da reação de sililação.

Quanto ao tempo de reação, após a realização dos experimentos e análise dos resultados obtidos, constatou-se que não há uma diferença significativa no que diz respeito a realizar a reação em 1 ou 2 horas, portanto, escolheu-se o tempo de reação de 1 hora.

Posteriormente, estudou-se a influência do solvente e do derivatizante utilizados na reação. Pela avaliação dos resultados experimentais, observou-se que as melhores respostas foram obtidas quando utilizado o MSTFA ativado III. Ainda nesse conjunto de experimentos, constatou-se que os fármacos: ácido salicílico, diclofenaco, ibuprofeno, e naproxeno, apresentam melhores respostas quando a reação de sililação foi realizada em isoctano. No entanto, para os fármacos: acetoaminofeno, cafeína, cetoprofeno, e dipirona, os melhores resultados foram para a reação com solvente acetonitrila.

A seguir, avaliou-se a influência do volume de derivatizante MSTFA ativado III adicionado na reação. Pela análise desses dados, verificou-se uma forte influência dessa variável na resposta. Porém, pelos experimentos realizados, observa-se que as melhores respostas foram obtidas quando foi utilizado o volume de 50 μ L de MSTFA ativado III. Contudo, por problemas técnicos, não havia derivatizante MSTFA ativado III suficiente para realizar os demais experimentos, e, aliado a isso, os entraves do processo de importação desse reagente impossibilitou o término dos experimentos.

A partir do conjunto de experimentos preliminares, realizados neste trabalho ainda não foi possível estabelecer as condições finais para a análise destes compostos em amostras de efluentes urbanos.

Com o objetivo de verificar qual seria um planejamento experimental adequado a ser utilizado depois destas avaliações preliminares, alguns sistemas foram avaliados (43). Entre estes, destacou-se a metodologia de superfície de resposta utilizando o planejamento Doehlert. Este sistema necessita poucos experimentos para encontrar a condição ótima e,

principalmente, possibilita a expansão do domínio do planejamento adicionando uma nova variável e aproveitando os dados anteriores sem a necessidade de descartá-los (43, 44). Cogitou-se, também, o uso do planejamento fatorial completo. Contudo, esse modelo não permite indicar valores ótimos das variáveis independentes para uma determinada resposta analítica, pois nesses planejamentos as variáveis são estudadas preferencialmente em dois níveis, e esses planejamentos descrevem somente linhas, e não curvas. Quando as medidas são realizadas em três ou mais níveis, é possível obter curvas e, portanto, calcular o ponto ótimo, contudo, nesse caso, o número de experimentos é elevado, tornando-o desvantajoso em comparação com o planejamento Doehlert (43).

O planejamento Doehlert é um sistema de otimização de experimentos de segunda ordem que possui seus pontos distribuídos uniformemente por todo o espaço experimental. Os pontos da matriz. Os pontos da matriz Doehlert correspondem aos vértices de um hexágono gerado de um simplex regular e, em geral, o número de total de pontos experimentais no planejamento é igual a k^2+k+pc , em que k é o número de fatores e pc é o número de experimentos no ponto central, os quais são geralmente feitos em triplicata para estimar o erro experimental (45).

Neste trabalho, pela avaliação dos experimentos até então realizados, verifica-se que as variáveis tempo de reação e volume de derivatizante são importantes nas respostas e deverão ser as variáveis consideradas no planejamento de otimização.

Segundo a literatura (45), com a prerrogativa de que se tratam de duas variáveis, o planejamento será realizado com 9 experimentos ($2^2 + 2 + 3 = 9$). Após isso é necessário determinar o valor de máximo e de mínimo para as variáveis selecionadas. Os valores foram escolhidos com base nos experimentos realizados neste trabalho. Esses dados aliados aos valores codificados da matriz Doehlert para um sistema com duas variáveis, propõem-se o planejamento experimental para otimização da reação de sililação. Todos esses dados são apresentados na tabela 13.

O objetivo é realizar esse planejamento experimental em dois sistemas diferentes. Um sistema será composto pelos fármacos na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ no solvente isoctano, enquanto que, o outro sistema, também terá os fármacos da concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, contudo, em solvente diferente, a acetonitrila. Todos os ensaios serão submetidos com o derivatizante MSTFA ativado III, e na temperatura de $70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Feita a análise por CG/EM, e tratamento estatístico necessário, obter-se-á a condição de reação de sililação ótima.

Tabela 13 – Descrição dos dados do planejamento Doehlert proposto.

Valores experimentais de máximo e mínimo para as variáveis V₁ e V₂.				
Variável	U _{máx.}	U _{mín.}	U _{oi}	ΔU
V ₁ – Volume de derivatizante (μL)	100	10	55	45
V ₂ – Tempo de reação (min.)	120	30	75	45
U _{máx.} : valor máximo; U _{mín.} : valor mínimo; U _{oi} valor médio				
Matriz Doehlert com os valores codificados e experimentais				
Ensaio	Matriz Doehlert para duas variáveis		Condições experimentais	
	V ₁	V ₂	V ₁	V ₂
1	1	0	100,0	75
2	0,5	0,866	77,5	114
3	-1	0	10,0	75
4	-0,5	-0,866	32,5	36
5	0,5	-0,866	77,5	36
6	-0,5	-0,866	32,5	114
7	0	0	55,0	75
8	0	0	55,0	75
9	0	0	55,0	75

6 CONCLUSÕES

A partir da revisão bibliográfica realizada, verificou-se que para a realização da reação de sililação necessária para análise de AINES por CG/EM, os derivatizantes MSTFA e o MSTFA ativado III são os mais indicados, sendo eles, portanto, os reagentes escolhidos para avaliação.

Pelos experimentos realizados até o momento, conclui-se que a condição experimental mais conveniente para reação de sililação dos compostos em estudo são as seguintes:

- Os analitos ácido salicílico, diclofenaco, ibuprofeno, e naproxeno deverão ser submetidos à reação de sililação com 50 μ L do reagente MSTFA ativado III, no solvente isoctano, durante 1 hora, na temperatura de 70°C;
- Os analitos acetoaminofeno, dipirona, cafeína, e cetoprofeno deverão ser submetidos à reação de sililação com 50 μ L do reagente MSTFA ativado III, no solvente acetonitrila, durante 1 hora, na temperatura de 70°C.

Contudo, concluiu-se que é necessário realizar a otimização das condições experimentais pela avaliação de superfície de resposta utilizando o planejamento Doehlert a fim de refinar as condições experimentais da reação de sililação. Não foi possível executar os experimentos dessa etapa por problemas de disponibilidade do derivatizante MSTFA ativado III em quantidade suficiente para realizar todos os experimentos.

7 REFERÊNCIAS

- (1) BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no Meio Ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.
- (2) HEBERER, T. *Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data*. **Toxicology Letters**, v. 131, p. 5-17, 2002.
- (3) KÜMMERER, K. *Pharmaceutical in the Environment*. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 35, p. 57-75, 2010.
- (4) ZIYLAN, A.; INCE, N. H. *The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: Treatability by conventional and non-conventional processes*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 24-36, 2011.
- (5) NIKOLAOU, A.; MERIC, S.; FATTA, D. *Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 1225-1234, 2007.
- (6) FATTA-KASSINOS, D.; MERIC, S.; NIKOLAOU, A.; *Pharmaceutical residues in environmental Waters and wastewater: current state of knowledge and future research*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 251-275, 2011.
- (7) LUZ, T. *et. al.* Fatores associados ao uso de antiinflamatórios não esteróides em população de funcionários de uma universidade no Rio de Janeiro: Estudo Pró-Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 4, p. 514-526, 2006.
- (8) BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 138, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- (9) BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Agência Nacional de Águas. **A experiência do Programa Despoluição de Bacias Hidrográficas – Prodes**. Brasília, DF, 2009.
- (10) HELENKÁR, A. *et. al.* *The role of the acquisition methods in the analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography – mass spectrometry*. **Talanta**, v. 82, p. 600-607, 2010.
- (11) BLAU, K.; HALKET, J. M. **Handbook of Derivatives for Chromatography**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1993.
- (12) HARDMAN, J. G.; GILMAN, L. E. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.
- (13) KHAN, S. J.; ONGERTH, J. E. *Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations*. **Chemosphere**, v. 54, p. 355-367, 2004.

- (14) KEPP, D. R.; SIDELMANN, U. G.; HANSEN, S. H. *Isolation and Characterization of Major Phase I and II Metabolites of Ibuprofen*. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 5, p. 676-680, 1997.
- (15) VREE, T.B. *The pharmacokinetics of naproxen, its metabolite O-desmethylnaproxen, and their acyl glucuronides in humans. Effect of cimetidine*. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 35, p. 467-472, 1993.
- (16) VIENO, N. *Occurrence of Pharmaceuticals in Finnish Sewage Treatment Plants, Surface Waters, and Their Elimination in Drinking Water Treatment Processes*. Tese de Doutorado, Tampere University of Technology, Tampere, 2007.
- (17) BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sinopse do Censo Demográfico 2010**. Tabela 1.4 – População nos Censos Demográficos, segundo as Grandes Regiões e as Unidades da Federação – 1872/2010. Rio de Janeiro, RJ, 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/sinopse_tab_brasil_pdf.shtm>. Acesso em: 14 mai. 2011.
- (18) COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. (Org.). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: UNICAMP, 2006.
- (19) SCHUMMER, C. *et. al. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to CG/MS analysis*. **Talanta**, v. 77, p. 1473-1482. (2009)
- (20) GREENE, T. W.; WUTS, P. G. M. **Protective Groups in Organic Synthesis**, 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.
- (21) HALKET, J. M.; ZAIKIN, V. G. *Derivatization in mass spectrometry – 1. Silylation*. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 9, p. 1-21, 2003.
- (22) POOLE, C. F. CHROMATOGRAPHY. **Encyclopedia of Separation Science**, v. 1, p. 40-64, 2000.
- (23) EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. *Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers*. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, p. 210-230, 2009.
- (24) SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2006.
- (25) MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic Gas Chromatography**. 2. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009.
- (26) COMEAU, F. *et. al. The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada*. **Science of the Total Environment**, v. 396, n. 2-3, p. 132-146, 2008.

- (27) LEE, H. *et. al.* *Acidic Pharmaceuticals in Sewage—Methodology, Stability Test, Occurrence, and Removal from Ontario Samples.* **Water Quality Research Journal of Canada**, v. 38, n. 4, p. 667-682, 2003.
- (28) KOSJEK, T. *et. al.* *Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples.* **Environment International**, v. 31, p. 679-685, 2005.
- (29) LEE, H.; PEART, T. E.; SVOBODA, M. L. *Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry.* **Journal of Chromatography A**, v. 1094, p. 122-129, 2005.
- (30) RODRÍGUEZ, I. *et. al.* *Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography–mass spectrometry as tert-butyldimethylsilyl derivatives.* **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 265-274, 2003.
- (31) VERENITCH, S.; LOWE, C. J.; MAZUMDER, A. *Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry.* **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 193-203, 2006.
- (32) AL-RIFAI, J.H., GABELISH, C.L., SCHÄFER, A.I. *Occurrence of pharmaceutically active and non-steroidal estrogenic compounds in three different waste water recycling schemes in Australia.* **Chemosphere**, v. 69, p. 803-815, 2007.
- (33) STUMPF, M. *et. al.* *Polar drug residues in sewage and natural Waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil.* **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135-141, 1999.
- (34) YU, T. J.; BOUWER, E. J.; COELHAN, M. *Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent.* **Agricultural Water Management**, v. 86, p. 72-80, 2006.
- (35) LORAINE, G. A.; PETTIGROVE, M. E. *Seasonal Variations in Concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water and Reclaimed Wastewater in Southern California.* **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 687-695, 2006.
- (36) GÓMEZ, M.J. *et. al.* *Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography-tandem mass spectrometry in wastewater.* **Talanta**, v. 73, p. 314-320, 2007.
- (37) GÓMEZ, M.J. *et. al.* *Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast.* **Chemosphere**, v. 66, p. 993-1002, 2007.

- (38) SEBÖK, Á. *et. al.* *Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry.* **Talanta**, v. 76, p. 642-650, 2008.
- (39) SEBÖK, Á. *et. al.* *Multiresidue analysis of pollutants as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography-mass spectrometry.* **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2288-2301, 2009.
- (40) SAMARAS, V. G. *et. al.* *Determination of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewater by gas chromatography-mass spectrometry.* **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 90, p. 219-229, 2010.
- (41) HAJ, B.M. *et. al.* *The GC/MS analysis of some commonly used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pharmaceutical dosage forms and in urine.* **Forensic Science International**, v. 105, p. 141-153, 1999.
- (42) SOLOMONS, T. W.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, v. 2, p. 77-78, 8 ed.. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- (43) VIANA, R. D. **Otimização de métodos de digestão de amostras de tecido vegetal em sistema fechado utilizando planejamento fatorial e matriz Doehlert.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, 2005.
- (44) SOUZA, K. R. **Degradação foto-fenton de carbono orgânico total em efluentes da indústria de beneficiamento de castanha de caju.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.
- (45) TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. *Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial.* **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
- (46) DALLEGRAVE, A. **Estudo de degradação de hormônios presentes em efluentes urbanos utilizando processos avançados.** Dissertação de Mestrado em andamento. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

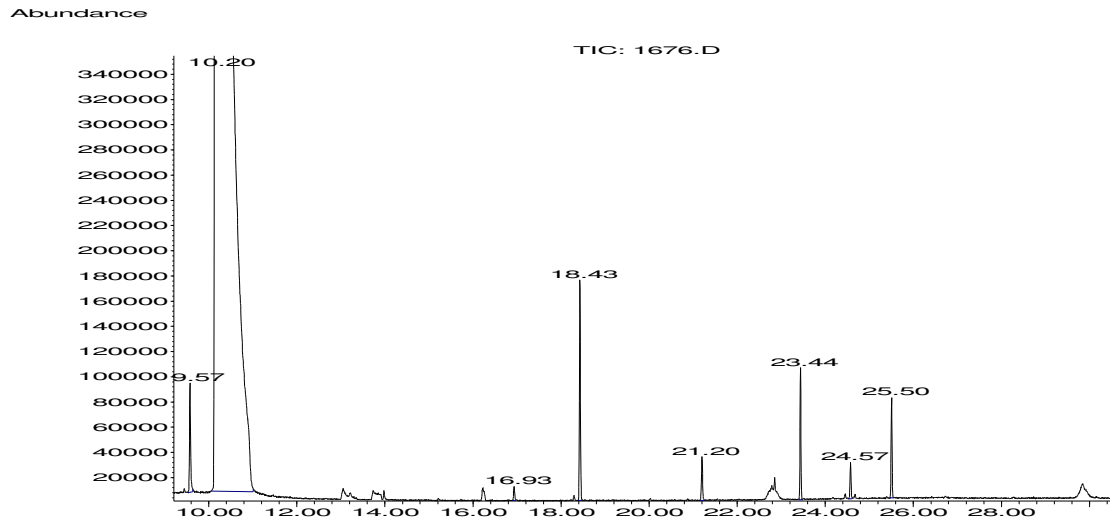
APÊNDICE I

Revisão bibliográfica referente à determinação de AINEs em matriz aquosa ambiental com análise por CG/EM:

APÊNDICE II

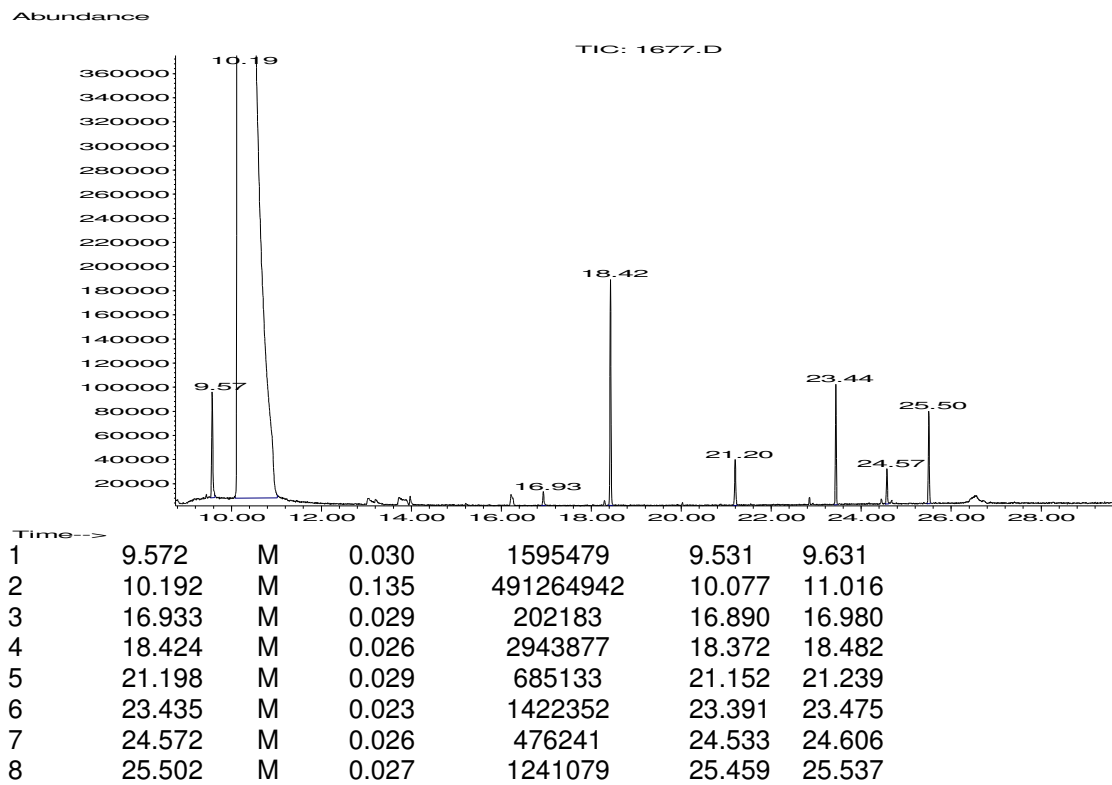
Cromatogramas dos experimentos realizados para avaliação de condições experimentais da análise multirresíduo:

Solução Mista ISOC ;1 mg.L⁻¹; 10uL MSTFA; 1 hora reação



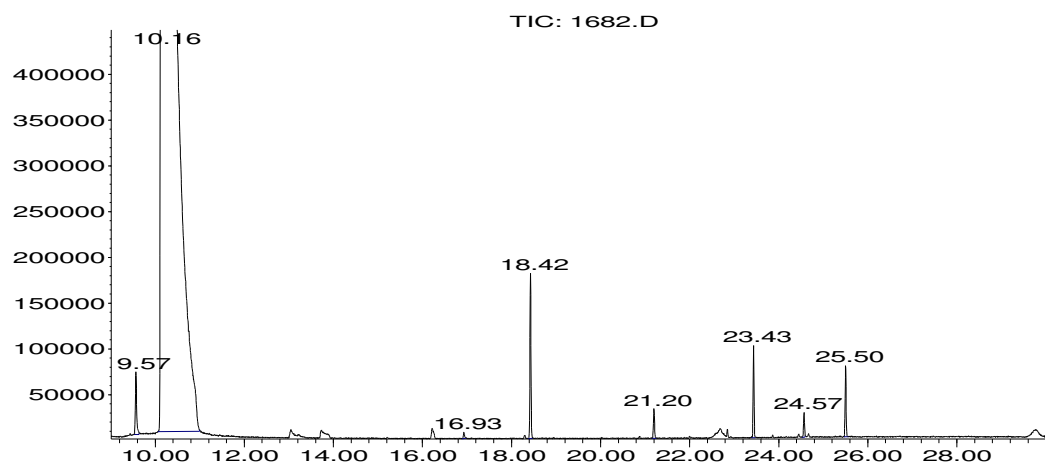
1	9.574	M	0.031	1615127	9.526	9.635
2	10.198	M	0.133	492050293	10.060	11.012
3	16.933	M	0.030	201929	16.906	16.980
4	18.426	M	0.027	2836481	18.387	18.473
5	21.200	M	0.030	630330	21.153	21.254
6	23.437	M	0.023	1459571	23.396	23.475
7	24.574	M	0.026	456368	24.532	24.606
8	25.505	M	0.026	1236688	25.469	25.549

Solução Mista ISOC; 1 mg.L⁻¹; 10 µL MSTFA; 2 h de reação.



Solução Mista ISOC; 1 mg.L⁻¹; 10 µL MSTFA; 1 h de reação.

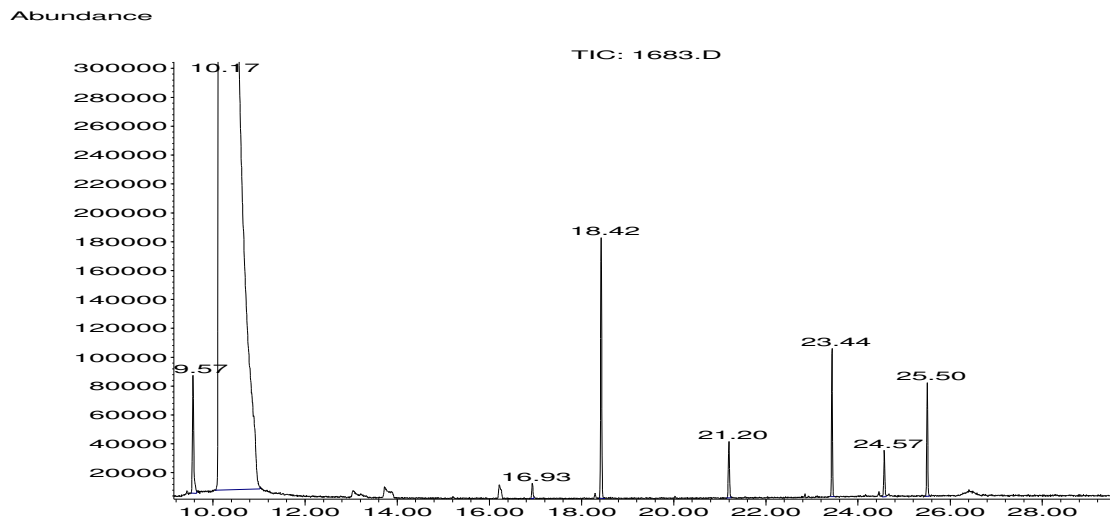
Abundance



Time-->

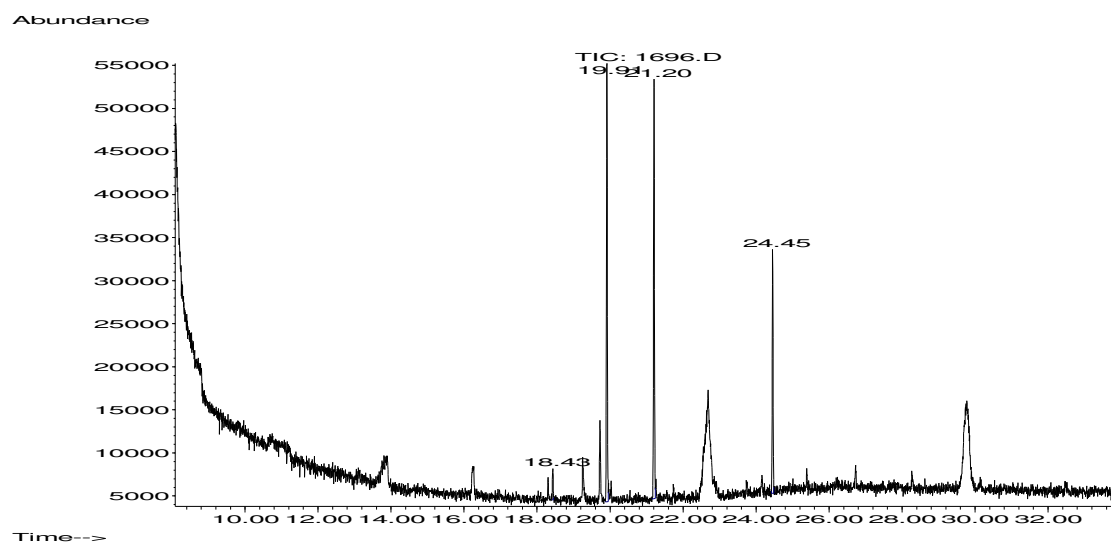
1	9.566	M	0.034	1380917	9.529	9.635
2	10.162	M	0.148	432274370	10.064	10.996
3	16.930	M	0.029	217052	16.898	16.975
4	18.424	M	0.026	2843328	18.382	18.468
5	21.198	M	0.028	558954	21.158	21.244
6	23.435	M	0.023	1428446	23.395	23.470
7	24.570	M	0.025	408551	24.528	24.596
8	25.502	M	0.027	1252421	25.468	25.543

Solução Mista ISOC; 1 mg.L⁻¹; 10 µL MSTFA; 2 h de reação.



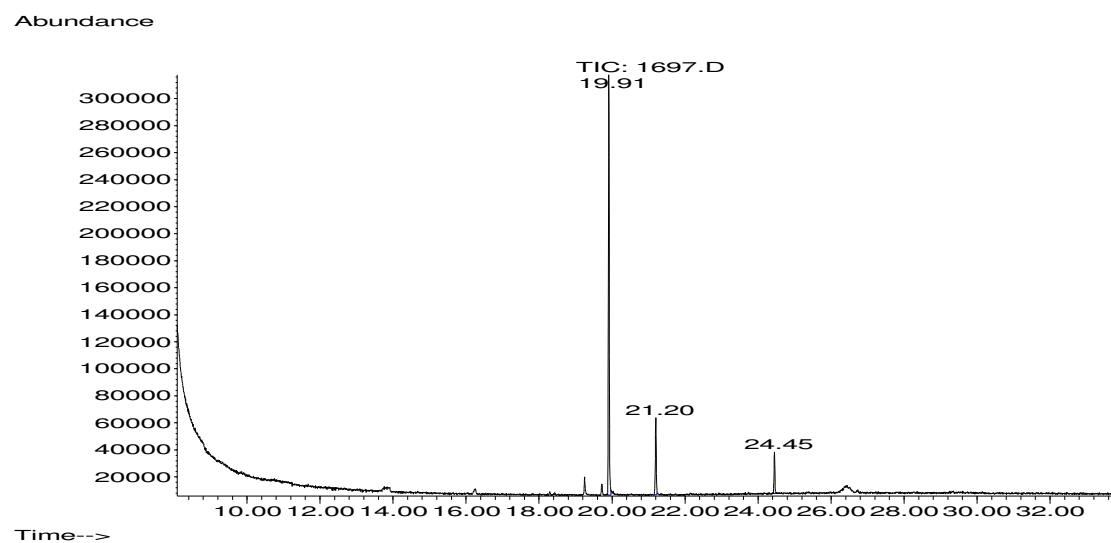
1	9.569	M	0.032	1620196	9.527	9.650
2	10.173	M	0.140	440876458	10.058	11.022
3	16.931	M	0.032	205056	16.900	16.965
4	18.424	M	0.027	2915435	18.382	18.488
5	21.198	M	0.029	689132	21.151	21.238
6	23.436	M	0.023	1442185	23.401	23.479
7	24.571	M	0.025	497786	24.523	24.614
8	25.503	M	0.027	1292593	25.463	25.545

Solução Mista em ACN; 0,5 mg.L⁻¹; 10µL MSTFA; 1 hora reação



1	18.430	M	0.026	57623	18.408	18.456
2	19.913	M	0.026	833890	19.868	19.953
3	21.204	M	0.028	825351	21.156	21.237
4	24.454	M	0.026	450408	24.419	24.486

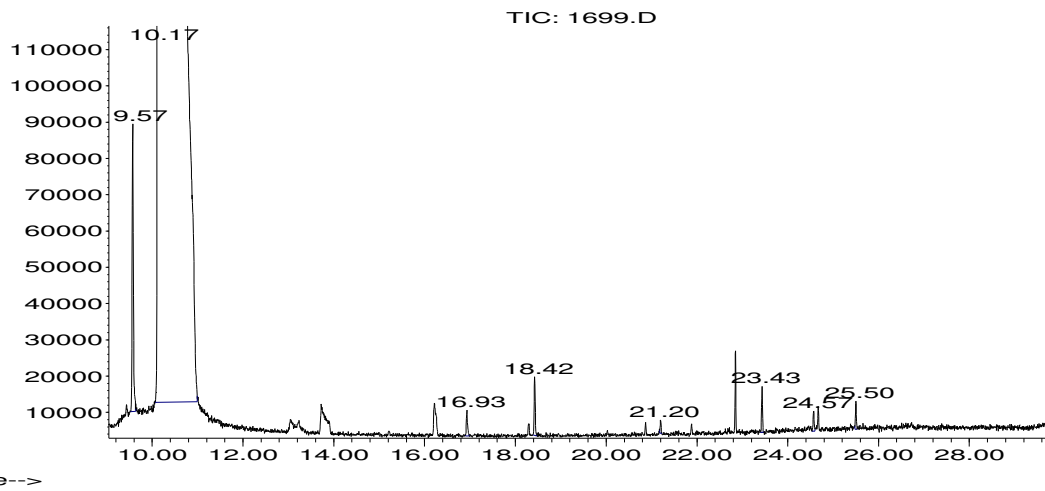
Solução Mista em ACN; 0,5 mg.L⁻¹; 10µL MSTFA ativado III; 1 hora de reação



1	19.912	M	0.026	4836814	19.869	19.968
2	21.198	M	0.029	1008035	21.145	21.237
3	24.451	M	0.026	502254	24.421	24.486

Solução Mista em ISOC; 0,5 mg.L⁻¹; 10µL MSTFA; 1 hora de reação

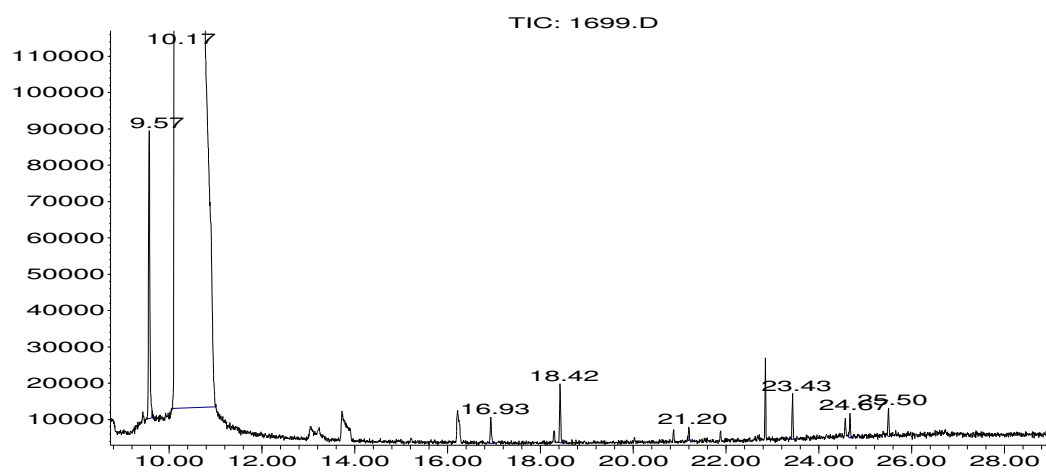
Abundance



1	9.570	M	0.032	1527207	9.524	9.635
2	10.168	M	0.149	453344368	10.068	10.989
3	16.933	M	0.030	127903	16.899	16.976
4	18.425	M	0.026	251861	18.391	18.470
5	21.198	M	0.022	48667	21.180	21.220
6	23.435	M	0.024	186023	23.399	23.459
7	24.570	M	0.027	91626	24.533	24.600
8	25.500	M	0.025	117749	25.478	25.528

Solução Mista em ISOC; 0,5 mg.L⁻¹; 10uL MSTFA ativado III; 1 hora de reação

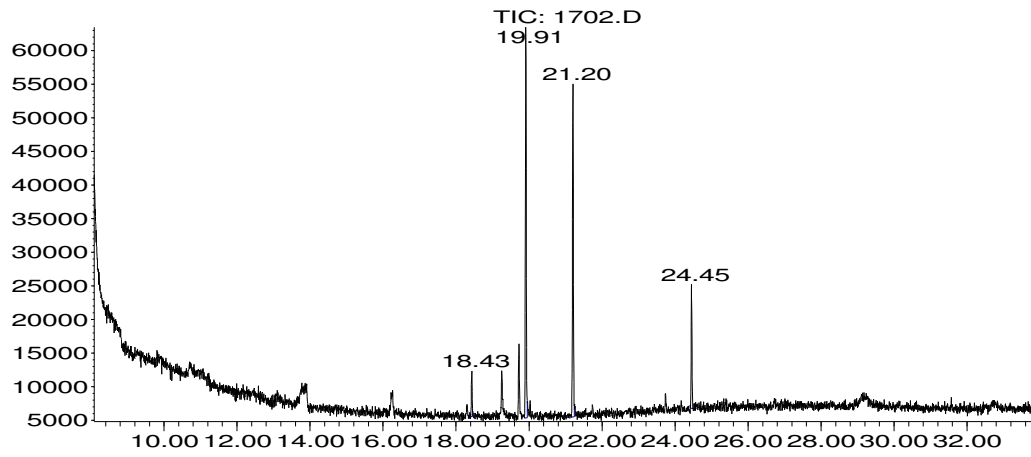
Abundance



1	9.570	M	0.032	1525860	9.524	9.635
2	10.168	M	0.149	453131612	10.067	11.010
3	16.933	M	0.030	131220	16.899	16.976
4	18.425	M	0.026	252909	18.387	18.466
5	21.198	M	0.022	49749	21.180	21.217
6	23.435	M	0.023	181413	23.400	23.459
7	24.671	M	0.023	93531	24.645	24.698
8	25.500	M	0.026	117756	25.479	25.527

Solução Mista em ACN; 0,5 mg.L⁻¹ ; 10µL MSTFA; 1 hora de reação

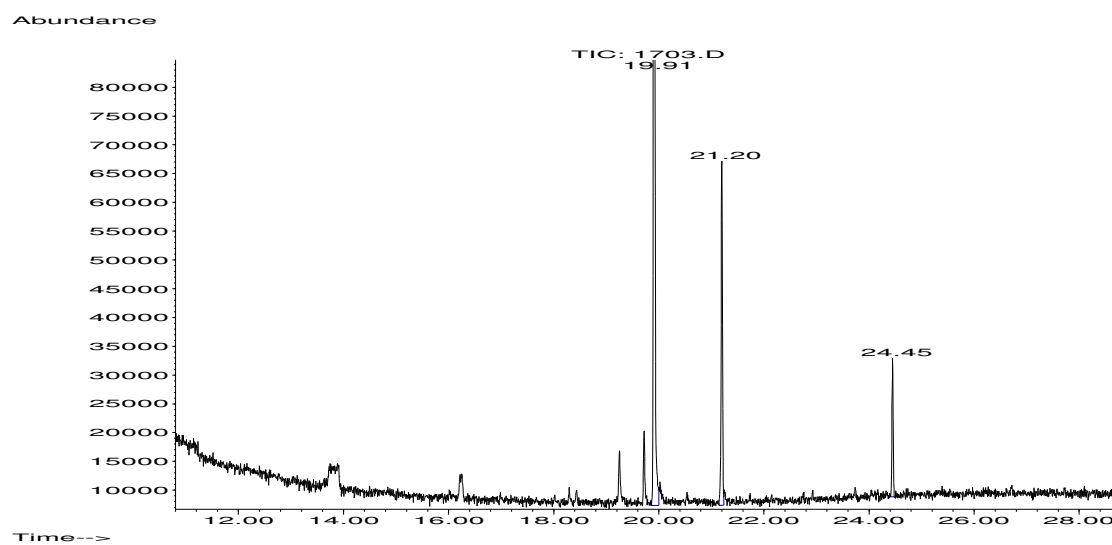
Abundance



Time-->

1	18.431	M	0.026	107328	18.404	18.456
2	19.911	M	0.027	929994	19.868	19.951
3	21.202	M	0.029	857979	21.157	21.244
4	24.450	M	0.024	274581	24.423	24.487

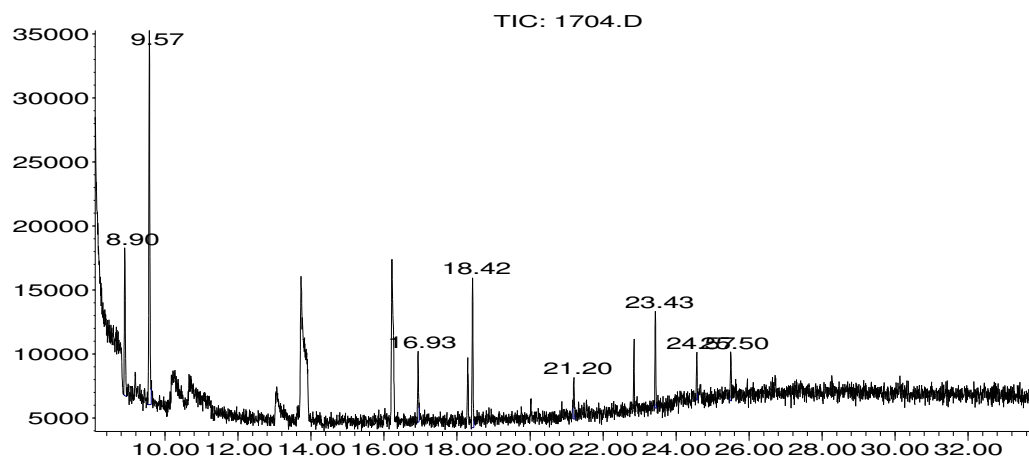
Solução Mista em ACN; 0,5 mg.L⁻¹; 10µL MSTFA ativado III; 1 hora de reação



1	19.911	M	0.026	5920238	19.863	20.001
2	21.199	M	0.030	1109401	21.144	21.240
3	24.449	M	0.027	389126	24.409	24.484

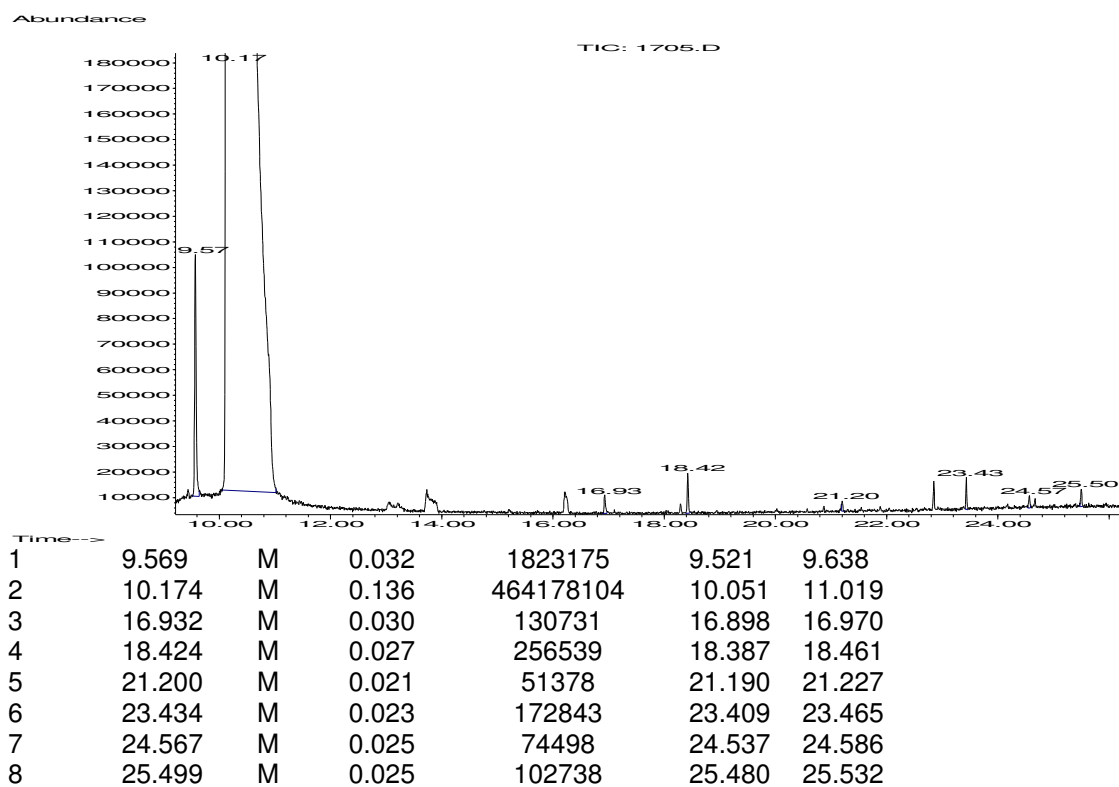
Solução Mista em ISOC; 0,5 mg.L⁻¹; 10µL MSTFA; 1 hora de reação

Abundance

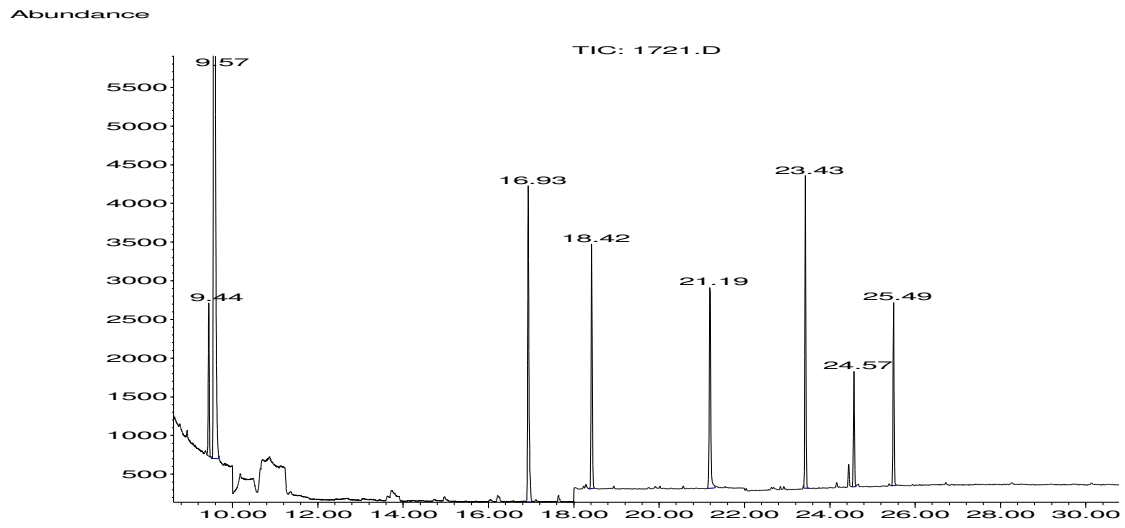


1	8.900	M	0.032	220229	8.867	8.948
2	9.571	M	0.032	556072	9.528	9.621
3	16.932	M	0.027	89740	16.907	16.959
4	18.424	M	0.028	199723	18.387	18.462
5	21.200	M	0.030	58541	21.180	21.235
6	23.433	M	0.024	107093	23.412	23.459
7	24.569	M	0.026	59322	24.543	24.591
8	25.497	M	0.026	61420	25.474	25.523

Solução Mista em ISOC; 0,5 mg.L⁻¹; 10µL MSTFA ativado III; 1 hora de reação

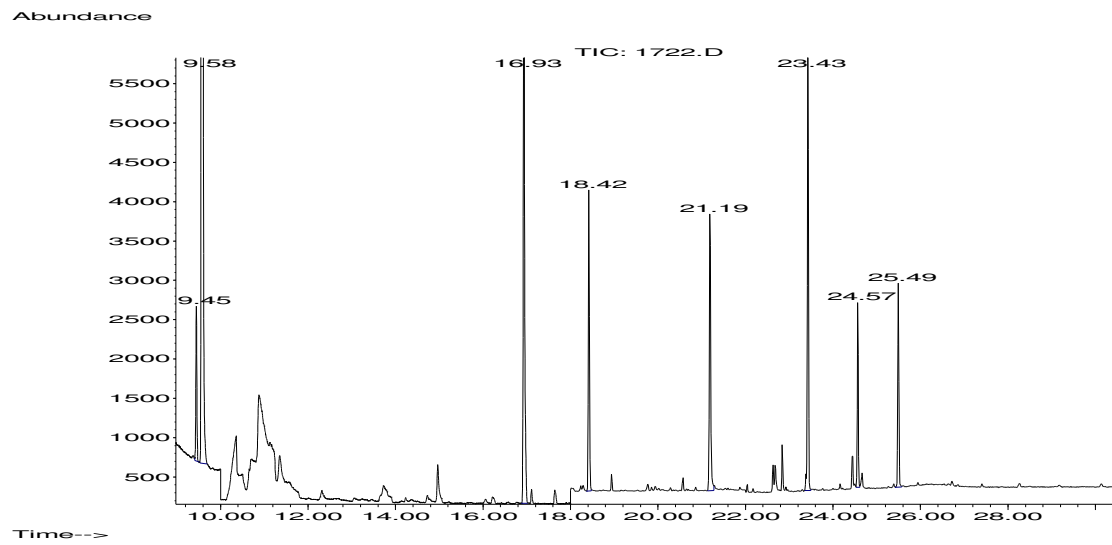


Solução mista em ISOC; 0,5 mg.L⁻¹; 10µL MSTFA ativado III; 1 h de reação



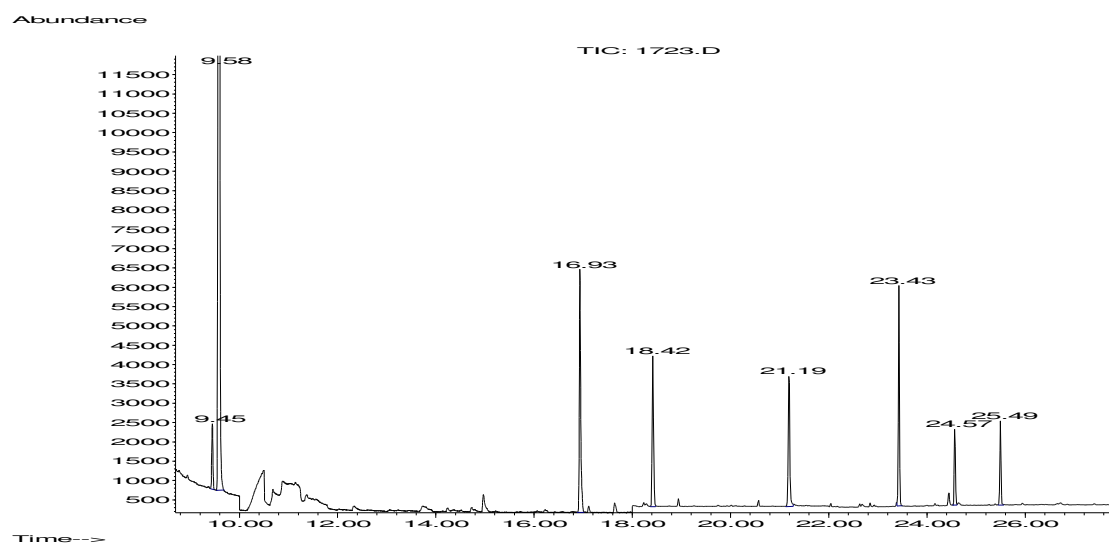
1	9.445	M	0.028	33080	9.402	9.484
2	9.575	M	0.032	1045919	9.528	9.680
3	16.932	M	0.034	83599	16.885	17.011
4	18.417	M	0.030	57842	18.367	18.481
5	21.192	M	0.038	64273	21.132	21.310
6	23.427	M	0.026	64363	23.391	23.497
7	24.566	M	0.027	24025	24.527	24.612
8	25.495	M	0.029	41165	25.450	25.553

Solução mista em ISOC; 0,5 mg.L⁻¹; 50µL MSTFA ativado III; 1 h de reação



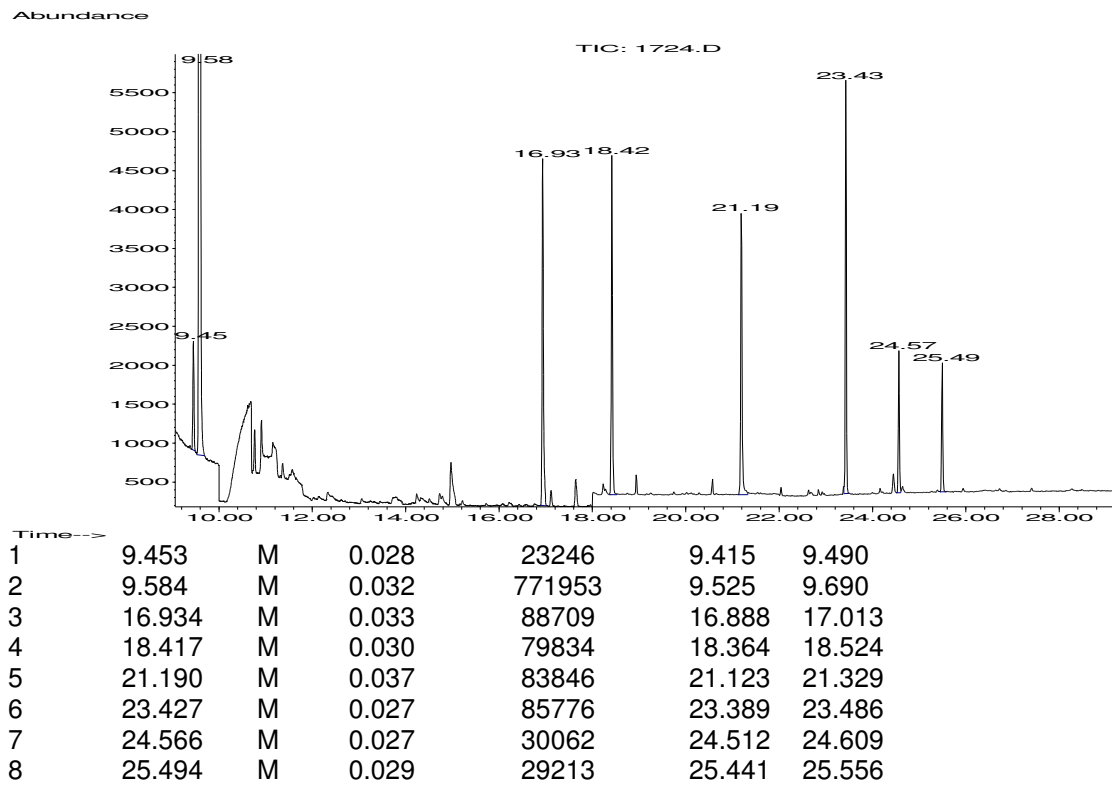
1	9.448	M	0.028	33290	9.414	9.492
2	9.578	M	0.032	1038717	9.529	9.690
3	16.933	M	0.034	173856	16.881	17.023
4	18.417	M	0.030	70040	18.367	18.476
5	21.190	M	0.036	80154	21.127	21.276
6	23.427	M	0.027	104818	23.353	23.494
7	24.566	M	0.027	38702	24.529	24.612
8	25.495	M	0.029	45831	25.418	25.569

Solução mista em ISOC; 0,5 mg.L⁻¹; 100µL MSTFA ativado III; 1 h de reação.



1	9.450	M	0.028	27955	9.411	9.487
2	9.581	M	0.032	886692	9.527	9.679
3	16.934	M	0.034	128544	16.878	17.016
4	18.417	M	0.031	72771	18.368	18.476
5	21.191	M	0.036	79460	21.124	21.278
6	23.428	M	0.027	92487	23.391	23.483
7	24.567	M	0.027	33090	24.524	24.612
8	25.495	M	0.029	37346	25.447	25.564

Solução mista em ISOC; 0,5 mg.L⁻¹; 200µL MSTFA ativado III; 1 h de reação



Solução mista em ISOC; 0,5 mg.L⁻¹; 300 µL MSTFA ativado III; 1 h de reação

