

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESAFIOS NA ANÁLISE DE BENZOFENONAS EM LEITE MATERNO POR
INJEÇÃO DIRETA DE AMOSTRAS USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
HIFENADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA**

Welma Beatriz Costa*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA

Orientador(a): Quezia Bezerra Cass

***Bolsista FAPEMA**

**São Carlos - SP
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Welma Beatriz Costa, realizada em 30/08/2018:

Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass
UFSCar

Prof. Dr. João Oiano Neto
EMBRAPA

Profa. Dra. Bianca Rebelo Lopes Simões
Openeem for Life

Dedico esta Dissertação à minha família,
principalmente à minha mãe que sempre
fez todos os sacrifícios para que eu
pudesse chegar aonde cheguei, além de
me ter incentivado e apoiado,
mesmo que de muito longe,
a batalhar pelos meus objetivos.
Ao meu companheiro,
Luciano, que sempre esteve ao meu lado,
me dando força e alegria.

AGRADECIMENTO

Antes de tudo agradeço à **Deus**, por manter minha fé, pelo dom da capacidade, perseverança e vida.

À **minha família**, o alicerce da minha vida. Agradeço a compreensão, apoio, incentivo e a positividade em todos os momentos.

Agradeço à **professora Dra. Quezia Bezerra Cass** pela orientação, paciência (muita), confiança, e pela oportunidade de trabalhar em seu grupo e por ter acreditado na minha capacidade que com certeza me proporcionou uma excelente formação profissional.

À **professora Dra. Regina Vincenzi Oliveira**, por todo o ensinamento, confiança e liberdade, contribuindo muito para o meu aprendizado em cromatografia líquida.

À **Bianca Rebelo** pela amizade, por sua disposição em ajudar no desenvolvimento do trabalho, pela amizade e conselhos.

Ao meu companheiro e meu amor, **Luciano Rodrigues** por sempre estar ao meu lado, me incentivando, apoiando e compartilhando os momentos importantes e decisivos da minha vida.

Ao melhor grupo de amigos que o CLAE/SEPARARE poderia ter: **Bruno Amaral, Cleiton Leandro, Izadora Furlani, Larissa Ramos, Romário Pereira, João Marcos, Andrea Batista, Guilherme Rebelo, Adriana Bonatti, Amanda Jordano, Juliana Rodrigues, Ítalo Calisto, Juliana Magalhães, Neila Maria e Gabriel Scatena**. A todos vocês, que contribuíram muito para o meu amadurecimento pessoal e científico, seja na ajuda com os experimentos, seja nas discussões (científicas, filosóficas, culturais, políticas e futebolísticas), seja nas risadas na hora do café ou simplesmente pela amizade. Vocês são sensacionais!

Aos amigos que passaram pela minha vida nessa jornada, estão um pouco longe no dia a dia, mas são muito especiais: **Adriana Sales, Kenia Vanzolini, Alessandra Valverde, Fernando Martins, Juliana Barreiro, Marina Denadai**.

À **professora Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza**, juntamente com sua equipe, pela confiança e por abrir as portas do seu laboratório para a utilização de equipamentos.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Maranhão—**FAPEMA**, pela bolsa de Mestrado concedida (processo BM- 05219/15), ao **CNPQ, CAPES e FAPESP** pelos auxílios financeiros.

Aos **docentes e ao corpo técnico e administrativo** do Departamento de Química da UFSCar.

Ao **Programa de Pós-Graduação** em Química da UFSCar e às suas **secretárias**.

Aos meus amigos do laboratório de Produtos Naturais, principalmente minha Gêmea **Marina Zequin**, e **Waléria Rebelo** pela amizade, cumplicidade, carinho e companhia. A **minha família Maranhense** em São Carlos, que me ajuda a diminuir a saudade do meu “País”.

À **Geleia** pelo amor incondicional, companhia e por me proporcionar muitas alegrias.

À maternidade **Dona Francisca Cintra Silva** pelo leite materno doado.

À todas as **doadoras de leite materno** de São Carlos por ter se disponibilizado em ajudar na pesquisa.

Aos **amigos feitos na pós-graduação** durante as disciplinas e nos churrascos de defesas.

A todos que de alguma forma, estiveram presente ao meu lado e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1: Exemplos de compostos orgânicos utilizados em filtros UV em produtos cosméticos, agrupados de acordo com sua estrutura química e denominados de acordo com o INCI (Nomenclatura Internacional para Ingredientes Cosméticos). (Adaptado de CHISVERT e colaboradores ^{24,25}).....	3
TABELA 1.2. Estruturas e propriedades químicas de algumas benzofenonas (Adaptado de NEGREIRA e colaboradores ³⁰).....	7
TABELA 1. 3. Aplicação da SPME na análise de amostras biológicas.	14
TABELA 1. 4. Uso da TFC para análise de amostras biológicas.	15
TABELA 1. 5. Uso de colunas RAM para análises de matrizes biológicas.	18
TABELA 1. 6. Experimentos realizados pelo analisador do tipo QqQ (Adaptado de CARDOSO e colaboradores ⁸⁸).....	19
TABELA 3. 1. Condições cromatográficas utilizadas na separação dos analitos utilizando a coluna Acquity [®] HSS T3.....	35
TABELA 3. 2. Condições cromatográficas avaliadas na separação dos analitos.	36
TABELA 4.1. Condições de ionização e fragmentação para as benzofenonas.....	44
TABELA 4. 2. Valores obtidos de EM para a análise de benzofenonas em leite materno.	48
TABELA 4. 3. Resumos dos experimentos realizados para otimização das melhores condições cromatográficas.....	54
TABELA 4. 4 - Condições cromatográficas estabelecidas para exclusão e separação dos analitos.	58
TABELA 4. 5. Novas condições de ionização e fragmentação para as benzofenonas.	59
TABELA 4. 6. Valores obtidos do no estudo de ME para a análise de benzofenonas em leite materno.....	62
TABELA 4. 7. Condições cromatográficas utilizadas na separação dos analitos utilizando o modo Hilic de eluição.	76
TABELA 4. 8. Parâmetros obtidos pela equação de Stern-Volmer para a interação BSA / analitos.....	81

TABELA 4. 9. Benzofenonas encontradas em diferentes tipos de amostras de leite materno.	83
----------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA1.1. Biotransformação da benzofenona 3 (Adaptado de CHISVERT e colaboradores ²⁴).....	8
FIGURA1. 2. Composição nutricional do leite materno (Adaptado de ZIVKOVIC e colaboradores ⁵⁰	12
FIGURA 1.3. Representação da exclusão nas colunas do tipo RAM (Adaptado de SIMÕES ⁵⁵)	16
FIGURA4. 1. Imobilização da BSA.....	40
FIGURA 4. 2. Estrutura do corante Coomassie Brilhante Blue.	41
FIGURA 4. 3. Espectro obtido da reação proteína corante da amostra de referência e das frações coletadas após eluição na coluna RAM–BSA.....	42
FIGURA 4. 4. . Cromatogramas referentes aos perfis de exclusão das proteínas totais do leite materno, utilizando as Colunas 1 e 2.....	42
Figura 4. 5. Cromatogramas obtidos da injeção das benzofenonas em água (1000 ng/mL) utilizando a Coluna 1.....	44
FIGURA 4. 6. Cromatogramas obtidos da análise de leite materno fortificado com benzofenonas na concentração de 1000 ng/mL, utilizando a Coluna 1.	45
FIGURA 4. 7. Esquema para avaliação de EM, RE e EP, segundo TRUFELLI ⁹³	46
FIGURA 4. 8. Cromatogramas obtidos do leite fortificado com 1000 ng/mL de benzofenonas utilizando as Colunas 1 e 2.....	50
FIGURA 4. 9. Esquema de válvulas utilizado para as análises no sistema 2D LC-MS. Posição 1: sistema desacoplado (etapa de exclusão) e Posição 2: sistema acoplado (etapa de transferência) (Adaptado de SIMÕES ⁵⁵)	51
FIGURA 4. 10. Comparação dos cromatogramas referentes aos modos 1D e 2D utilizando a Coluna 2. Leite materno fortificado com 1000 ng/mL dos analitos.	52
FIGURA 4. 11.Cromatogramas obtidos utilizando tampão acetato e formiato de amônio, analisados com a Coluna 2. Leite materno fortificado com 1000 ng/mL dos analitos.....	55
FIGURA 4. 12.Comparação entre o uso de 2 e 5% de MeOH na fase de exclusão proteica, utilizando a Coluna 2. . Leite materno fortificado com 1000 ng/mL dos analitos.....	57

FIGURA 4. 13. Cromatograma obtido da análise no modo unidimensional utilizando a Coluna 2, referente as condições cromatográficas descritas na Tabela 4.3. Leite materno fortificado com 1000 ng/mL dos analitos.	58
FIGURA 4. 14. Esquema das condições cromatográficos definidas para o método.	60
Figura 4. 15. Cromatograma obtido na separação dos analitos no modo multidimensional, utilizando a Coluna 2 e a coluna HSS T3. Leite materno fortificado com 1000 ng/mL dos analitos.	61
Figura 4. 16. Cromatogramas da comparação entre o leite materno fortificado com 5,0 ng/mL dos analitos e leite materno branco.	64
FIGURA 4. 17. Cromatograma do leite materno branco, indicando que o sistema e a Coluna 2 foram limpos.	65
FIGURA 4. 18. Cromatograma da comparação entre o leite bovino desnatado e o leite materno.	67
FIGURA 4. 19. Cromatogramas indicando a perda de eficiência cromatográfica da Coluna 2. Leite bovino desnatado fortificado com 200 ng/mL dos analitos.	68
FIGURA 4. 20. Cromatograma do leite bovino desnatado fortificado com 200 ng/mL dos analitos, utilizando a Coluna 3 no modo unidimensional.	69
FIGURA 4. 21. Comparação entre o branco da amostra utilizando água como fase móvel e tampão acetato de amônio. Leite bovino desnatado fortificado com 200 ng/mL dos analitos.	70
FIGURA 4. 22. Cromatogramas da comparação entre a primeiras e última injeção, indicando a perda da eficiência cromatográfica da Coluna 3. Leite bovino desnatado fortificado com 200 ng/mL dos analitos.	72
FIGURA 4. 23. Cromatograma da análise leite bovino desnatado fortificado com 100 ng/mL dos analitos, utilizando a Coluna 5, mostrando a relação sinal ruído da amostra branco.	73
FIGURA 4. 24. Cromatograma da análise de preparo da amostra por precipitação de proteína do leite bovino desnatado fortificado com 200 ng/mL dos analitos, utilizando a coluna analítica HSS T3 e também o branco da amostra.	75
Figura 4. 25. Cromatograma da análise de preparo da amostra por precipitação de proteína do leite bovino desnatado fortificado com 200 ng/mL dos analitos, utilizando a coluna Acquity HILIC e também o branco da amostra.	77
FIGURA 4. 26. Supressão da fluorescência da BSA frente a diferentes concentrações do analito.	79

FIGURA 4. 27. Gráficos de Stern-Volmer de $\log (F_0 - F) / F$ versus $\log[Q]$ para a BSA na presença de diferentes concentrações dos analitos BP-1, BP-3, BP-4, Carbamazepina e Fluxetina.....80

RESUMO

DESAFIOS NA ANÁLISE DE BENZOFENONAS EM LEITE MATERNO POR INJEÇÃO DIRETA DE AMOSTRAS USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA HIFENADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA.

Como solução ao paradigma de obtenção de máxima eficiência em menor tempo de análise, separações no âmbito da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC) acoplado a espectrometria de massas (MS/MS) têm sido exploradas com sucesso. O maior problema ainda reside, no entanto, no preparo de amostras que além de provocar perda de tempo, gera resíduo e demanda grandes volumes de solventes orgânicos. Métodos por injeção direta de amostras com o intuito de atender a demanda por métodos mais eficientes e com menor geração de resíduos têm sido eficientemente usados para análises por LC-MS/MS. O presente trabalho descreve questões e desafios na quantificação de três benzofenonas em leite materno por injeção direta de amostra usando colunas de fases de acesso restrito (RAM). Perante as informações obtidas um método para determinação de 2,4-dihidroxibenzofenona (BP-1), 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3) e 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-sulfônico (BP-4) em leite materno foi proposto. Considerando a complexidade da matriz por sua composição, principalmente de proteínas, lipídeos e oligossacarídeos a extração dos analitos de interesse torna-se bastante desafiadora para o desenvolvimento de métodos analíticos quantitativos. Decidiu-se adotar a abordagem de injeção direta, utilizando colunas de meios de acesso restrito preparadas pela imobilização de albumina de soro bovino (RAM-BSA). Os resultados dos níveis de exclusão de proteína foram superiores a 82% para três alíquotas diferentes ($n = 3$). Os estudos de efeito de matriz, eficiência do processo e recuperação não foram satisfatórios devido à forte interação dos analitos com as fases RAM-BSA e também ao efeito memória. O preparo de amostra por precipitação de proteína foi avaliado como prova de conceito, porém o efeito memória permaneceu mesmo quando foram utilizadas diferentes colunas analíticas, modos de eluição diferentes, e leite bovino como matriz, indicando a contaminação do sistema cromatográfico e impossibilitando a validação do método. A triagem de amostras de leites maternos por LC-HRMS obtidos de 26 diferentes nutrízes permitiu a identificação da BP-1, BP-3 e BP-4 em 88% das amostras analisadas.

ABSTRACT

CHALLENGES IN THE ANALYSIS OF BENZOFENONAS IN BREAST MILK BY DIRECT SAMPLE INJECTION USING HIFENATED LIQUID CHROMATOGRAPHY TO MASS SPECTROMETRY.

As a solution to the paradigm of achieving maximum efficiency in a shorter analysis time, Ultra High-performance Liquid Chromatography (UHPLC) coupled to mass spectrometry (MS / MS) have been successfully explored. The biggest problem still lies in sample preparation which causes waste of time and generates residue, demanding usually high use of organic solvents. Methods by direct injection of samples furnishes more efficient and greener approaches and have been efficiently used for LC-MS/MS analysis. The present work describes the challenges involved in the quantification of three benzophenones in breast milk by direct injection of the sample using albumin serum bovine restricted access phases (RAM-BSA). This work describes the results obtained for the determination in breast milk of 2,4-dihydroxybenzophenone (BP-1), 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3) and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone sulfonic acid (BP-4). . The results of obtained showed protein exclusion levels greater than 82% for three different aliquots (n = 3). The studies of matrix effect, process efficiency and recovery were not satisfactory due to strong interaction of analytes with the RAM-BSA phases and also to memory effect. Sample preparation by precipitation of protein was used as a proof of concept but the memory effect remained even when we used different analytical columns, different elution modes, and bovine milk as a matrix, indicating contamination of the chromatographic system and making it impossible for the validation of the method. The screening of breast milks samples by LC-HRMS obtained from 26 different mothers allowed the identification of BP-1, BP-3 and BP-4 in 88% of the analyzed samples.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Poluentes orgânicos como interferentes endócrinos	1
1.2. Benzofenonas e seus efeitos no corpo humano.....	6
1.3. Leite materno e análise de seus contaminantes	10
1.4. Injeção direta de amostras complexas	12
1.5. Emprego da espectrometria de massas em bioanálises	18
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo geral	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Parte experimental	30
3.1.1. Generalidades	30
3.2. Sistemas cromatográficos utilizados.....	31
3.3. Colunas RAM–BSA	32
3.4. Preparo da Coluna de Acesso Restrito.....	32
3.4.1. Preenchimento da Coluna.....	32
3.4.2. Colunas 1, 3 e 4.....	33
3.4.3. Colunas 2 e 5.....	33
3.4.4. Análise do perfil de exclusão das proteínas do leite materno pelas colunas RAM-BSA	34
3.5. Preparo de amostra	34
3.6. Condições cromatográficas LC–2D.....	35

3.7. Estudos de interação com a BSA por espectroscopia de emissão de fluorescência.....	36
3.8. Triagem das amostras de leite materno.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Avaliação das colunas RAM–BSA	39
4.2. Espectrometria de massas: avaliação das condições de ionização e cromatográficas das benzofenonas	43
4.3. Efeito do tamanho da partícula.....	49
4.4. Cromatografia multidimensional	51
4.5. Otimização das condições cromatográficas	53
4.6. Nova condição de otimização de ionização.....	58
4.7. Influência de diferentes misturas de solvente no Efeito de matriz.....	62
4.8. Identificação do efeito memória	63
4.9. Uso do leite bovino como substituto	65
4.10. Uso de outra fase hidrofóbica.....	72
4.11. Precipitação de Proteína	74
4.1.4. Interação da BSA com os analitos	78
4.14. Triagem de diferentes leites maternos por LC- <i>HRMS</i>	82
5.0. CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXO	99

Introdução

Quando estiver em dificuldades
E pensar em desistir,
Lembre-se dos obstáculos que já superou.
OLHE PARA TRÁS.
Charles Chaplin – Olhe - Primeira estrofe

1. INTRODUÇÃO

1.1. Poluentes orgânicos como interferentes endócrinos

Interferentes endócrinos, por definição, são substâncias naturais ou sintéticas que podem modificar a atividade hormonal em organismos vivos. Também podem ser considerados como agentes exógenos, que alteram uma ou várias funções do sistema endócrino, como sua estrutura, causando efeitos nos hormônios naturais do corpo, responsáveis pela reprodução, manutenção, desenvolvimento e comportamento dos organismos ¹⁻³.

Os interferentes endócrinos podem alterar tanto o sistema feminino como o masculino, podendo se comportar de duas formas, como estrogênio (responsáveis pelo desenvolvimento e funções reprodutivas do sistema feminino) e androgênio (responsáveis pelo desenvolvimento das características masculinas) ^{2,4}.

O número de pesquisas sobre a possível relação entre a exposição dos seres vivos a estes tipos de substâncias exógenas, abrangendo malformações de órgãos reprodutivos, disfunção sexual, menarca precoce e câncer tem aumentado bastante nos últimos anos ⁵⁻⁷.

A indústria química apresentou muitos avanços no século XX, gerando melhorias para qualidade de vida. Inúmeros compostos e materiais surgiram para abranger todas as necessidades do ser humano. Entretanto, essa evolução na indústria expôs os humanos a uma ampla variedade de compostos xenobióticos que podem causar efeitos negativos à saúde ^{5,8}.

Diversas classes de substâncias afetam o sistema endócrino, tal como: pesticidas, ftalatos, bisfenol A e seus derivados clorados, medicamentos em geral, entre outros ⁹. Tem sido demonstrada a presença de alguns desses interferentes endócrinos em produtos de cuidados pessoais (PCPs) incluindo os cosméticos, produtos domésticos, entre outros ⁶. Grandes quantidades de PCPs são usadas diariamente em atividades humanas, sendo a maioria usada diretamente na pele, onde podem ser metabolizados, bioacumulados e/ou excretados ¹⁰⁻¹².

Inúmeras pesquisas investigam se os interferentes endócrinos absorvidos pelo corpo humano, através de alimentos, água, pele ou ar estão diretamente relacionados ao desenvolvimento do câncer de mama ¹³⁻¹⁵.

Pesquisadores sugerem que a exposição pode ser através da pele, devido a aplicações regulares de cosméticos em longo prazo com atividade estrogênica na área dos seios e axilas, onde podem ser absorvidos e acumulados em tecidos subjacentes ^{14,16,17}.

Dentro da ampla quantidade de PCPs utilizados no dia a dia, os filtros ultravioleta (UV) se destacam. A constante exposição à luz solar causa grandes problemas na saúde, e assim o uso de cosméticos com esses filtros aumenta de forma contínua ¹⁸.

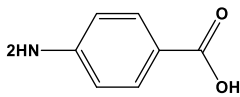
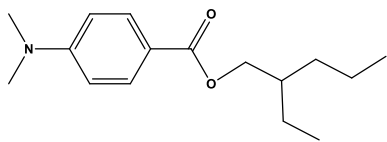
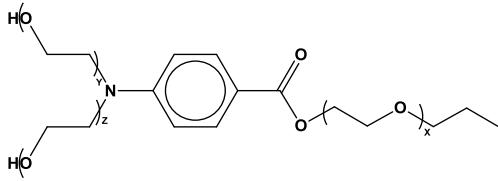
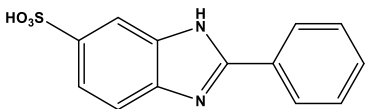
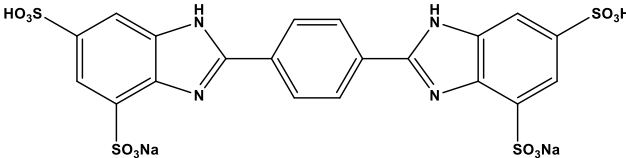
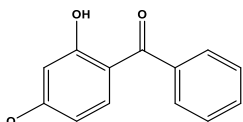
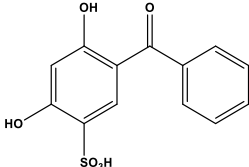
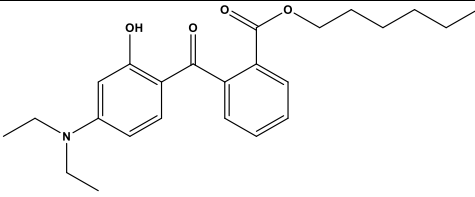
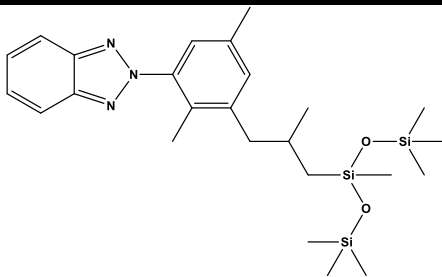
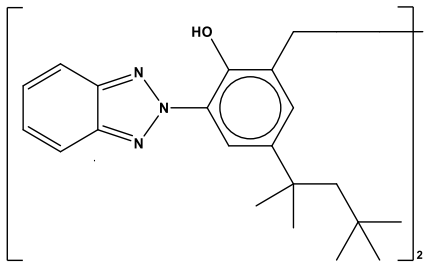
Os filtros ultravioleta são substâncias que absorvem radiações UVA (315-400 nm) e / ou UVB (280-315 nm). A radiação UVA pode penetrar profundamente na pele causando seu envelhecimento prematuro. A radiação UVB, comparada à UVA, é menor em proporção, porém é mais ativa e capaz de causar queimaduras solares, é responsável por induzir danos ao DNA e causar câncer de pele ¹⁹⁻²¹.

Além de serem utilizados em protetores solares, os PCPs são encontrados também em cremes faciais, produtos pós-barba, formulações de maquiagem, batons, xampus, materiais de embalagem plástica, entre outros ¹⁸. Os filtros UV são adicionados aos produtos de cuidados pessoais em concentrações de até 10% ^{21,22}. Apesar de suas propriedades benéficas, evitando queimaduras e lesões cutâneas devido à exposição ao sol, que eventualmente podem levar ao câncer de pele, alguns filtros UV prejudicam o sistema endócrino de mamíferos ^{22,23}. Portanto, para alcançar um ótimo compromisso entre proteção adequada e efeitos mínimos para os usuários, os compostos que podem ser usados como filtros UV em cosméticos, bem como suas concentrações máximas permitidas, foram regulamentados pela legislação em vigor em cada país ²⁴.

Baseado na composição, os filtros UV podem ser classificados em dois grupos: orgânicos (ou químicos) e inorgânicos (ou físicos). Os filtros inorgânicos abrangem partículas minerais, como TiO_2 e ZnO , e funcionam pela reflexão e espalhamento da luz UV na pele. Os filtros orgânicos na maioria das vezes possuem estruturas aromáticas que podem absorver a radiação UV ¹⁹.

As estruturas moleculares de compostos orgânicos utilizados em alguns filtros UV estão listadas na Tabela 1.1.

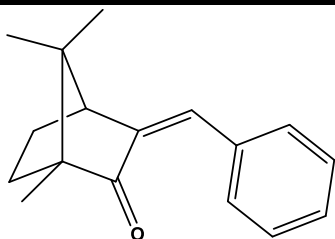
TABELA 1.1: Exemplos de compostos orgânicos utilizados em filtros UV em produtos cosméticos, agrupados de acordo com sua estrutura química e denominados de acordo com o INCI (Nomenclatura Internacional para Ingredientes Cosméticos). (Adaptado de CHISVERT e colaboradores^{24,25}).

Ácido 4-aminobenzóico e derivados		
		
Ácido <i>p</i> -Aminobenzóico (PABA)	Etil Hexil dimetil PABA (EDP)	PEG-25 PABA (P25)
Derivados do Benzimidazol		
		
Ácido fenilbenzimidazol sulfônico (PBS)	Tetrassulfonato dissódico de fenildibenzimidazol (PDT)	
Derivados da Benzofenona		
		
Benzofenona-3 (BP-3)	Benzofenona-4 (BP-4)	2-diethylaminodroxibenzoilbenzoato de hexila (DHHB)
Derivados de Benzotriazol		
		
Drometrisol trisiloxano (DRT)	Metileno bis-benzotriazolil Tetrametilbutilfenol (MBT)	

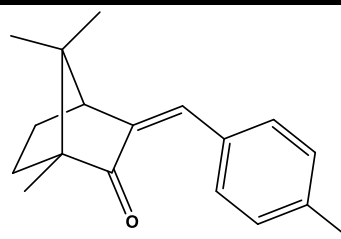
Continua

Continuação da Tabela 1.1

Derivados de Cânfora



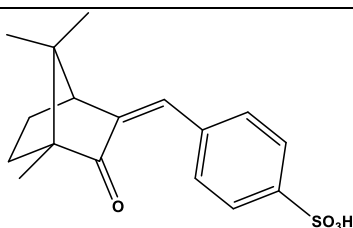
3-Benzilidenocânfora (3BC)



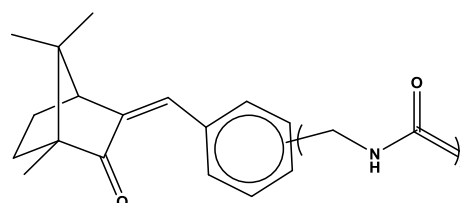
4-Metilbenzilidenocânfora (MBC)

Continua

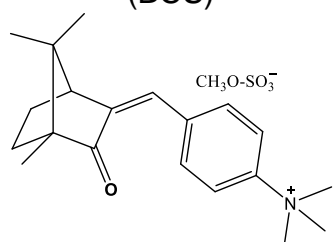
Continuação da Tabela 1.1



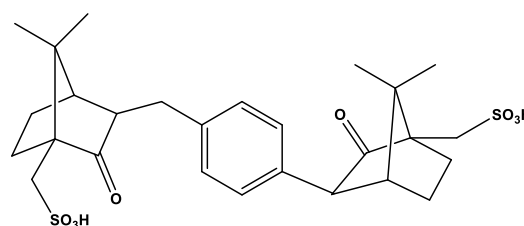
Ácido benzilidenocânfora sulfônico (BCS)



Poliacrilamidometil benzilidenocânfora (PBC)

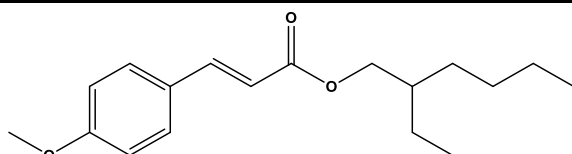


Metassulfato de benzalcônio cânfora (CBM)

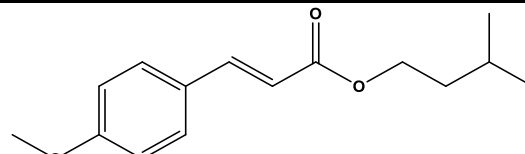


Ácido tereftalilideno dicânfora sulfônico (TDS)

Metoxicinamatos

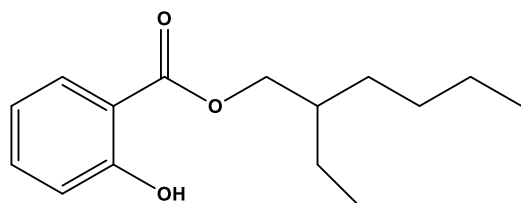


p-Metoxicinamato de etilexila (EMC)

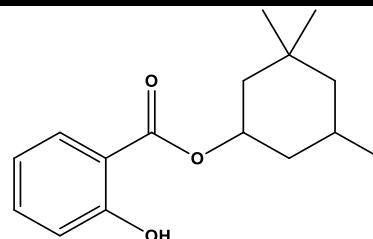


Metoxicinamato de isopentila (IMC)

Salicilatos



Salicilato de etilexila (ES)

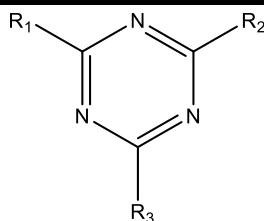


Salicilato de homomentila (HS)

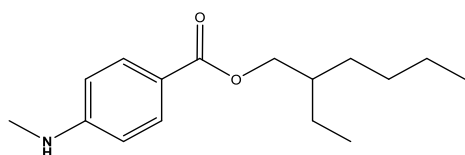
Continua

Continuação da Tabela 1.1

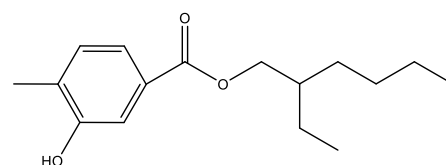
Derivados da Triazina



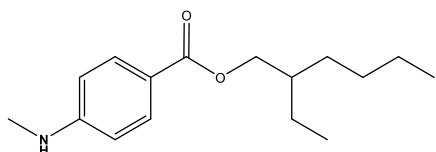
R₁=R₂



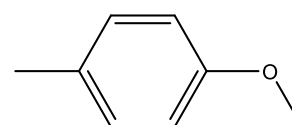
R₁=R₂



R₃



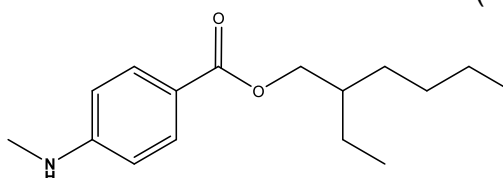
R₃



Dietilexil butamido triazona (DBT)

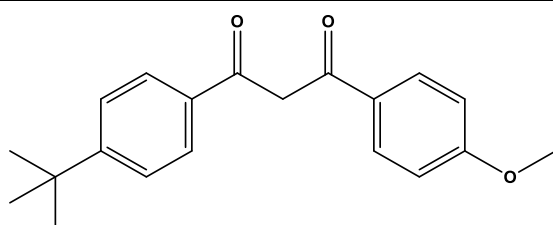
Bis-etilexiloxifenol metoxifenil triazona (EMT)

R₁=R₂=R₃

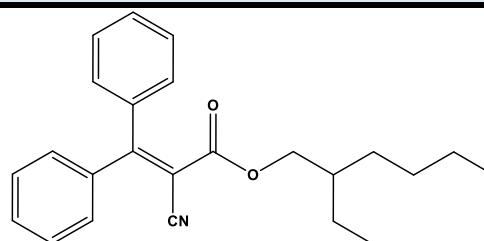


Etilexil triazona (ET)

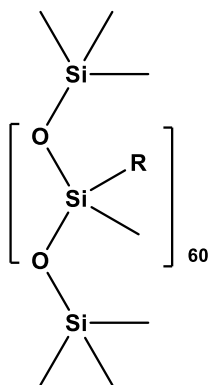
Outros



Butil metoxidibenzoilmetano (BMD)



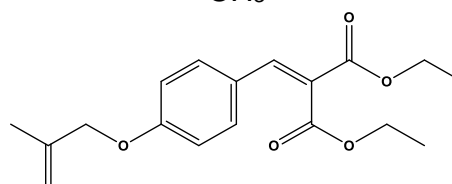
Octocrileno (OCR)



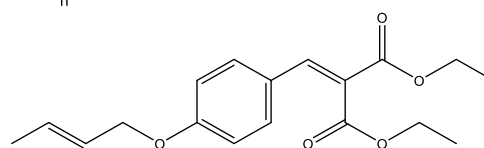
R=

CH₃

R=



R=



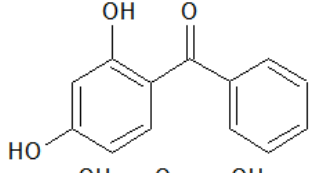
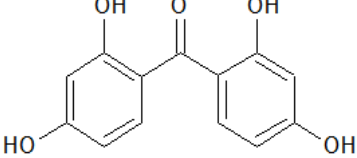
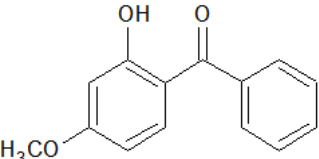
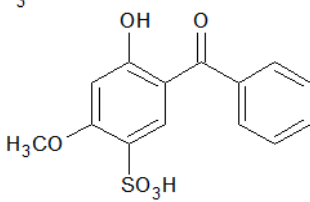
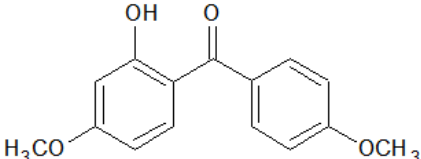
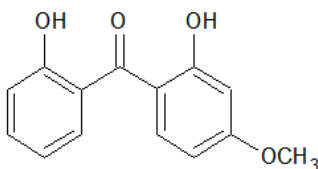
Polissilicone-15 (P15)

Entre os filtros solares orgânicos, destaca-se a família das benzofenonas (BPs) que consistem em 12 compostos principais, denominados de 2,4-dihidroxibenzofenona (benzofenona-1, BP-1), 2-hidroxi-4-metoxibenzofeno (benzofenona-3, BP-3) e outras menos conhecidas como 2-hidroxibenzofenona (2-OH-PA), 3-hidroxibenzofenona (3 -OH-PA) e 4-hidroxibenzofenona (4-OH-PA) ^{14,18}. Há evidências que os filtros UV à base de benzofenonas podem afetar o sistema endócrino. Estudos *in vitro* mostraram que as BPs estimulam a proliferação da linhagem de câncer de mama MCF-7 devido à sua atividade estrogênica ²⁶⁻²⁸.

1.2. Benzofenonas e seus efeitos no corpo humano

Os derivados das benzofenonas são bastante empregados como absorvedores de radiação UV. A 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-sulfônico (BP-4) e a 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3) são utilizadas na União Europeia como filtros solares em concentrações máximas de 5% e 10%, respectivamente ²⁹. Em outros países é permitido a utilização da 2,4-dihidroxibenzofenona (BP-1), 2,2,4,4 - tetraidroxibenzofenona (BP-2) e 2,2'-dihidroxi-4,4'-metoxibenzofenona (BP-6) em protetores solares ^{29,30}. Além dos compostos citados acima, a 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-8), pode ser usada como fotoestabilizador em muitos outros produtos de cuidados pessoais como, xampus e tinta de cabelo. Também é utilizada em roupas e plásticos para recipientes de alimentos, entre outros ³¹. A Tabela 1.2 mostra as estruturas químicas e algumas propriedades de relevância para uma série selecionada de benzofenonas.

TABELA 1.2. Estruturas e propriedades químicas de algumas benzofenonas (Adaptado de NEGREIRA e colaboradores ³⁰).

NOME ABREVIADO	MASSA MOLECULAR (g/mol)	ESTRUTURA	pK _a	Log K _{ow} *
BP-1	214,2		7,53	3,17
BP-2	262,2		6,98	3,16
BP-3	228,2		7,56	3,79
BP-4	308,3		- 0,70	0,89
BP-6	274,3		6,80	4,10
BP-8	244,2		6,99	3,93

* K_{ow}: coeficientes de partição octanol/água

A biotransformação das BPs pode levar a derivados mais ativos e / ou tóxicos do que as formas originais. Foi proposto pela primeira vez por Okereke e colaboradores ³² o padrão de biotransformação para a BP-3 em ratos, formando a BP-1 e BP-8 (2,2-diidroxi-4-metoxibenzofenona) como metabólitos. A benzofenona BP-1, por sua vez, leva a THB (2,3,4-triidroxibenzofenona). Foi proposto por esses autores que a BP-3 é O-desalquilada no grupo metoxi do anel A para formar BP-1, este é hidroxilado no mesmo anel na posição 3 para formar THB), enquanto BP-8 é formado por hidroxilação do anel B da BP-3 na posição 2' ²⁴, Figura 1.1. Outras BPs, tais como 4-OH-BP (4-hidroxibenzofenona) também são metabólitos da BP-3 ¹².

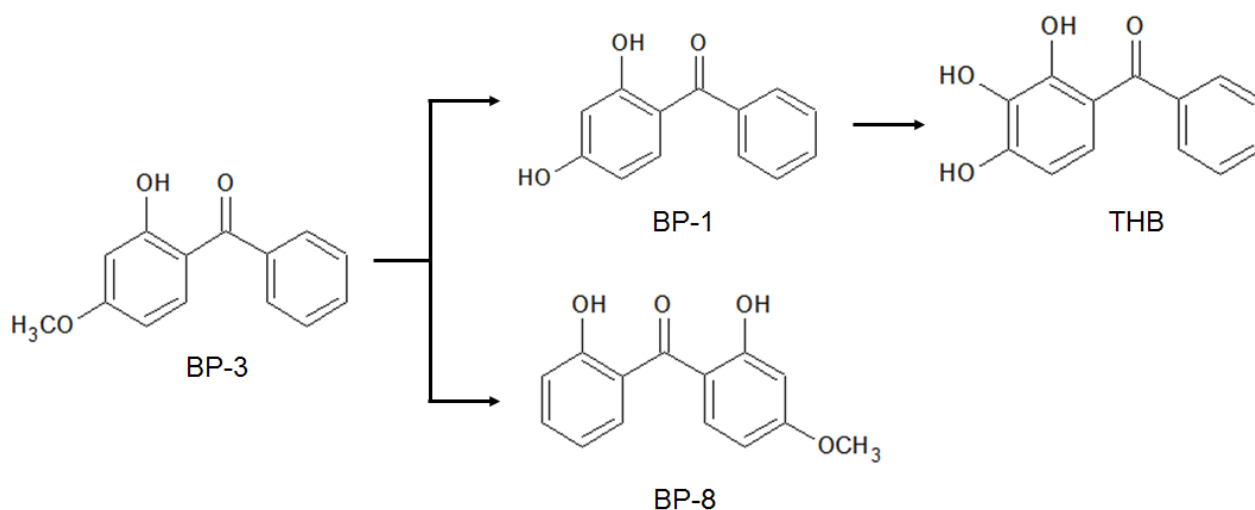


FIGURA1.1. Biotransformação da benzofenona 3 (Adaptado de CHISVERT e colaboradores²⁴).

A BP-3 é a mais utilizada em produtos de cuidados pessoais, portanto, a mais importante desta família de compostos. Semelhante a muitos outros filtros UV, a BP-3 é uma cetona aromática, capaz de absorver radiação UVA e UVB, é fotoestável, lipofílica ($\log K_{ow} = 3,79$), e potencialmente bioacumulativa^{33,34}. Comparada com outros filtros UV, a BP-3 pode penetrar em camadas mais profundas da pele, devido seu tamanho pequeno^{21,35,36}.

Nos homens, a exposição a esses produtos está associada a problemas de capacidade reprodutiva, testicular e câncer de próstata. Nas mulheres, a função endócrina anormal pode ser associada ao aumento do risco de endometriose, reprodução, deficiências dos ovócitos e câncer relacionando com o sistema endócrino. A exposição a esses produtos na infância pode acarretar, ao mal desenvolvimento neurológico e reprodutivo, ou câncer no futuro¹².

Embora as BPs estejam normalmente presentes em ecossistemas aquáticos e exibem bioacumulação em invertebrados e peixes^{22,33,37,38}, é possível também encontrar as BPs em fluidos e tecidos humanos que não estão diretamente ligadas à exposição ambiental^{33,39}.

KANG e seus colaboradores⁴⁰ avaliaram concentrações de seis derivados de BPs, coletadas de 1576 amostras de urina da população sul-coreana entre 6-89 anos. As análises das benzofenonas (BP-1, BP-2, BP-3, BP-4, BP-8 e 4-OH-BP) utilizadas no trabalho foram feitas utilizando cromatografia líquida acoplada à

espectrometria de massas (LC-MS/MS) e o preparo de amostra utilizado foi extração em fase sólida (SPE) com um cartucho C18 Sep-Pak (Water Milford, MA, EUA). Foi visto que as concentrações de BP-1 e 4-OH-BP foram de 1,24 e 0,45 ng.mL⁻¹, respectivamente, enquanto que BP-2, BP-3, BP-4 e BP-8 estavam todas abaixo de 25% do limite de detecção.

VELA-SORIA e colaboradores ⁴¹ determinaram por LC-MS/MS seis BPs (BP-1, BP-2, BP-3, BP-6, BP-8 e 4-OH-BP) em 16 tecidos placentários coletados de mulheres que vivem em Granada (Espanha). As amostras foram preparadas pelo método de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME). A BP-1 foi detectada e quantificada em 14 das 16 amostras, em concentrações variando de 0,5 a 9,8 ng.g⁻¹, BP-2 foi detectada em 7 amostras com concentrações de 1,2 a 8,9 ng.g⁻¹ e a 4-OH-BP foi determinada em 11 amostras em concentrações de 0,6 a 1,8 ng.g⁻¹. A BP-6, BP-3 e BP-8 não foram detectadas.

No trabalho de JIMÉNEZ-DÍAZ e colaboradores ⁶ foram determinadas 6 benzofenonas (BP-1, BP-2, BP-3, BP-6, BP-8 e 4-OH-BP) em 25 amostras de sangue menstrual humano utilizando LC-MS/MS. O preparo de amostra foi realizado pelo método DLLME. Para BP-1, BP-3 e BP-6 as concentrações máximas encontradas foram muito semelhantes, em torno de 3,1 a 3,7 ng.mL⁻¹, a BP-3 foi encontrada em 24 das 25 amostras coletadas. BP-2 e BP-8 não foram detectadas nas amostras analisadas.

VELA-SORIA e colaboradores ⁴² e TARAZONA e colaboradores ⁴³ avaliaram benzofenonas em soro humano utilizando LC-MS/MS, e ambos os trabalhos utilizaram o método DLLME para preparo das amostras. Vela-Soria determinou uma variação de limites de quantificação de 0,4 a 0,9 ng.mL⁻¹ para BP-1, BP-2, BP-3, BP-6, BP-8 e 4-OH-BP, porém Tarazona verificou um limite de quantificação de 27 ng.mL⁻¹ para BP-1 e BP-3.

YE e colaboradores ⁴⁴ estudaram 20 amostras de leite humano e determinaram a BP-3 em 60% das amostras com concentração máxima de 3,2 ng.mL⁻¹. Eles utilizaram um LC-MS/MS, e o preparo da amostra foi realizado por SPE *online*.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ e colaboradores ¹² avaliaram em 10 amostras, diversas benzofenonas (BP-1, BP-2, BP-3, BP-6, BP-8 e 4-OH-BP) em leite humano utilizando LC-MS/MS. A BP-3 foi quantificada em 8 das 10 amostras com concentrações variando de 4,5 a 15,7 ng.mL⁻¹. A 4-OH-BP foi detectada em 6 amostras e quantificada em 4, porém em concentrações mais baixas que a BP-3 (0,31

a 1,92 ng.mL⁻¹). A BP-1 foi detectada em 9 amostras, mas quantificada somente em uma (0,61 ng.mL⁻¹). A BP-6 e BP-8 não foram detectadas. O preparo de amostra foi realizado por extração assistida por ultrassom.

Em outro trabalho de VELA-SORIA e colaboradores ⁵, os níveis da BP-3 e BP-1 foram avaliados em 15 amostras de leite humano por LC-MS/MS, utilizando o método DLLME para preparo de amostra. Eles observaram que a BP-3 foi detectada em todas as amostras, mas quantificada em apenas cinco delas, com concentrações variando de 0,6 a 1,5 ng.mL⁻¹. A BP-1 foi detectada e quantificada em apenas uma das amostras com concentração de 0,61 ng.mL⁻¹. Todas as análises descritas usaram detector do tipo triplo quadrupolo.

1.3. Leite materno e análise de seus contaminantes

O leite materno é a principal fonte de alimento para os recém-nascidos por apresentar todos os tipos de nutrientes necessários para o desenvolvimento, hidratação e proteção da criança. Já foi visto que a prática da amamentação tem efeito positivo na saúde da criança evitando doenças como obesidade, diabetes, hiperlipidemia, doenças respiratórias, entre outras ⁴⁵. Devido a esses benefícios, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que durante os 6 primeiros meses a alimentação seja apenas pela amamentação, e sugere a sua continuação até os 2 anos de idade como alimento complementar ⁴⁶.

O leite materno é uma matriz complexa e bastante variável que evoluiu ao longo de milênios para alimentar os bebês e protegê-los, enquanto seu próprio sistema imunológico amadurece. A composição do leite humano muda de acordo com a idade do bebê e outras características da mãe, como alimentação, entre outras. Portanto, essa composição é especificamente adaptada por cada mãe para atender com precisão os requisitos de seu filho (a) ⁴⁷.

Entretanto, o leite humano nem sempre é puro. A OMS considerou o leite materno um alvo de monitoramento, por ser uma matriz de fácil coleta, de transferência de compostos químicos e seus metabólitos para a criança ⁴⁸. O uso de PCPs no dia a dia pela nutriz pode acarretar em perturbações no sistema da criança ¹². A contaminação humana por esses produtos ocorre pela corrente sanguínea de três maneiras: ingestão, inalação e contato dérmico ⁴⁹. Como o leite possui alto teor

de gordura, a amamentação pode levar os bebês à exposição de poluentes lipossolúveis. Os produtos químicos tóxicos mais comuns encontrados no leite materno são: benzofenonas, parabenos, octilfenóis, bisfenóis, dioxinas, furanos, metais pesados, pesticidas, e outros compostos orgânicos, incluindo os ftalatos ^{46,49}.

Os produtos químicos que possuem uma taxa mais lenta de degradação têm um longo tempo de meia-vida, permanecendo mais tempo no corpo e, portanto, mais propensos à bioacumulação ⁴⁶. Esses compostos podem circular na corrente sanguínea, podendo ser depositados nos tecidos adiposos, como por exemplo, nas glândulas mamárias. As condições maternas podem ajudar na transferência desses contaminantes para o leite, tais como: número de gestações, duração da lactação, índice de massa corporal, idade materna.

Apesar de o leite materno ser considerado uma boa matriz para monitoramento de substâncias ingeridas pela mãe e com a vantagem de ser coletada de forma simples, a extração dessas substâncias desta matriz apresenta uma alta complexidade analítica.

A composição do leite materno é algo bastante estudado e foi visto que sua composição é de 88% de água e os restantes estão divididos entre macro e micronutrientes que correspondem a proteínas, gorduras, lactose, oligossacarídeos e vitaminas (Figura 1.2). As proteínas mais encontradas são a caseína, α -lactalbumina, lactoferrina, lisozima e imunoglobulina A. Já sua gordura é caracterizada por altos teores de ácidos palmíticos e oleicos, e triglicerídeos. Essa composição nutricional é bastante variável, dependendo da alimentação da mãe, período de amamentação, sexo do bebê e outros fatores ⁵⁰⁻⁵².

Os oligossacarídeos são carboidratos importantes que desempenham a função de estimular o crescimento de bactérias probióticas na flora intestinal do bebê, e correspondem ao terceiro maior grupo de moléculas bioativas no leite materno. Em média um litro de leite contém 10-15 g de oligossacarídeos. A composição dos oligossacarídeos é diferente entre as mulheres e dependem da alimentação, período da lactação e outros fatores biológicos ^{47,53,54}. De acordo com dados recentes da literatura ⁵⁴ mais de 200 classes de oligossacarídeos foram identificadas e mais de 100 estruturas já foram elucidadas.

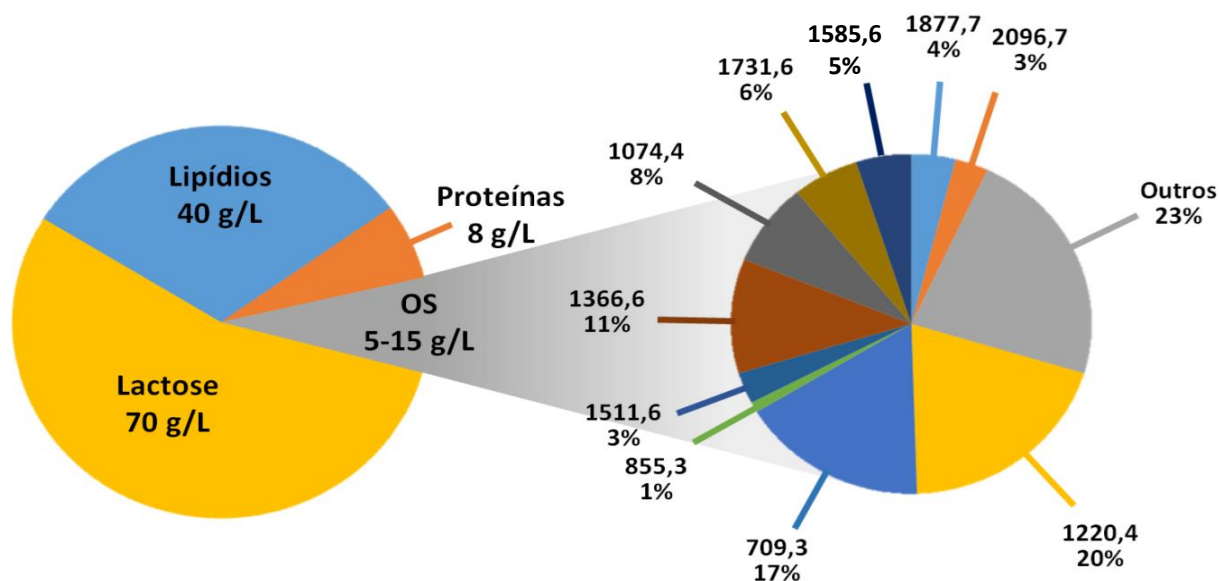


FIGURA1. 2. Composição nutricional do leite materno (Adaptado de ZIVKOVIC e colaboradores ⁵⁰).

A grande concentração e as mais diferentes formas de estrutura e tamanhos de cadeia dos oligossacarídeos trazem um grande desafio analítico no que diz respeito à extração do analito dessa matriz biológica, levando a um pronunciado efeito de matriz que pode interferir na quantificação das substâncias de interesse ⁵⁵. Sendo assim a escolha de um método adequado de preparo de amostra pode ser decisivo na resolução desses problemas.

1.4. Injeção direta de amostras complexas

A técnica de LC-MS/MS tem se mostrado bastante útil na análise de analitos em matrizes complexas por ser seletiva e sensível, entretanto, o preparo de amostra é ainda a etapa mais importante durante o desenvolvimento do método. A remoção de interferentes que podem coeluir com os analitos é um parâmetro essencial a ser avaliado durante o desenvolvimento de um método analítico, pois eles podem afetar a seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão do método cromatográfico, principalmente quando se trata de análises em matrizes biológicas ⁵⁶.

Existem inúmeros meios de preparo de amostra do leite materno, dentre eles os mais comuns são: Precipitação de Proteínas (PP), Extração Líquido-Líquido (LLE) e Extração em Fase Sólida (SPE). A técnica SPE se destaca na literatura como

o método mais utilizado para preparo de amostra, pois tem como vantagem a remoção de proteínas e fosfolipídios ⁴⁹. Porém, foi relatado que usando SPE para quantificação de hormônios sexuais femininos no leite humano houve entupimento dos cartuchos devido à precipitação de proteínas ^{49,57}.

Os procedimentos tradicionais de precipitação proteica são estratégias rápidas para eliminar as proteínas de amostras biológicas. Uma abordagem simples é precipitar as proteínas com solventes orgânicos, alteração de pH, ou removê-las por ultrafiltração. Todos esses procedimentos são demorados e introduzem fontes adicionais de erro, além do que a baixa seletividade desta técnica pode resultar na recuperação incompleta das substâncias alvo, devido à perda de alguns analitos através da co-precipitação, bem como a supressão iônica na espectrometria de massa devido à presença de agentes precipitantes residuais ⁵⁸.

Entretanto, as etapas de preparação de amostra constituem a principal parcela dos métodos bioanalíticos, por essa razão muito esforço foi dedicado ao desenvolvimento de sistemas cromatográficos líquidos compatíveis para a injeção direta de fluidos biológicos ⁵⁹.

Qualquer um dos métodos de preparo de amostra existentes que executam um passo de desproteínização e/ou um enriquecimento de amostra é mais lento que os métodos de injeção direta de amostra ⁵⁸. Assim, os esforços atuais estão voltados para o desenvolvimento de novas estratégias capazes de eliminar proteínas das amostras, como, por exemplo: Microextração em fase sólida *on-line* (SPME), Fluxo turbulento (TFC) e materiais de acesso restrito (RAMs), que permitem o uso de injeções diretas e repetidas de matrizes complexas como: alimento, plasma, urina, águas, leite materno, entre outros nos sistemas de LC ^{60,61}.

A microextração em fase sólida *on-line* (SPME) foi introduzida pela primeira vez no início dos anos 90, é uma abordagem eficiente e seletiva para preparo de amostras biológicas. O SPME pode ser classificado como microextração estático em vaso e microextração dinâmica em fluxo. Em geral, é realizado utilizando fibras e tubos capilares (*in-tube*) com uma fase estacionária apropriada. A técnica mais utilizada é a SPME fibra, no qual um polimérico revestido por fibra é utilizado como um dispositivo de extração, e a adsorção dos analitos ocorrem na superfície externa da fibra ^{60,62,63}.

Os sistemas operacionais SPME *in-tube* podem ser classificados como *flow-through* ou *draw-eject-extraction*. No primeiro sistema, a solução da amostra

passa continuamente por um capilar que está acoplado em uma válvula de seis caminhos. No segundo sistema, o capilar de extração é posicionado entre o *loop* de injeção e a agulha de injeção, a amostra é repetidamente aspirada e dispensada do capilar ^{60,62,63}.

Ambas as configurações são promissoras, porém as desvantagens dos sistemas SPME *in-tube* estão relacionadas com problemas de efeito memória, longos tempos de extração, além de problemas de linha de base ⁶⁰. A Tabela 1.3 mostra algumas aplicações utilizando esta técnica para preparo de amostras de matrizes biológicas.

TABELA 1. 3. Aplicação da SPME na análise de amostras biológicas.

Analito(s)	Matriz	Sistema	Analizador/ Detector	Ref.
Fluoxetina	Soro	<i>Draw-eject</i>	ESI-MS	64
Hormônios	Saliva	<i>Draw-eject</i>	ESI-MS/MS	65
Canabinoides	Plasma	<i>Flow-through</i>	QqQ-ESI-MS/MS	66
Hormônios	Urina	<i>Flow-through</i>	2D-LC-RF	67
Anabolizantes esteróides	Urina	<i>Draw-eject</i>	ESI-MS	68

Outro avanço relacionado à injeção direta de amostras biológicas é o uso da cromatografia de fluxo turbulento (*turbulent-flow chromatography* - TFC). Esta técnica utiliza colunas com diâmetro interno de 0,5, 1,0 ou 2,1 mm preparados com partículas na faixa de 25 a 60 μm , permitindo vazão de fase móvel superior a 1,2 ml/min. A operação em fluxo turbulento resulta na formação de um perfil de velocidade linear, permitindo à difusão das moléculas, nessa condição as moléculas de baixo peso molecular se difundem rapidamente para os poros da sílica, enquanto as macromoléculas são eluídas no volume morto da coluna ^{60,69,70}.

As colunas de TFC encontrou maior aplicação como meio de extração de amostras online, separando pequenas moléculas de material de matriz de maior peso molecular, como proteínas. Porém essas colunas quando utilizadas com

amostras biológicas possuem baixo tempo de vida útil, aproximadamente 500 injeções, dependendo da matriz utilizada e do pré-tratamento da amostra ^{69,70}. A Tabela 1.4 exemplifica algumas aplicações utilizando TFC para preparo de amostras de matrizes biológicas.

TABELA 1. 4. Uso da TFC para análise de amostras biológicas.

Analito(s)	Matriz	Coluna TFC	Analizador/ Detector	Ref.
Anfetaminas, opioides e benzodiazepíneos	Urina	Cyclone MAX (50 x 0,5 mm) (Termo Fisher)	QqQ-ESI-MS/MS	71
Antibióticos	Leite bovino	Cyclone (50 x 0,5 mm) (Termo Fisher)	QqQ-ESI-MS/MS	72
Paracetamol	Urina	Oasis HLB (20 x 2,1 mm) (Waters)	QqQ-ESI-MS/MS	73
Cortisol e cortisona	Urina	C18 (50 x 1,0 mm) (Termo Fisher)	QqQ-APCI-MS/MS	74
Metanefrina e normetanefrina	Plasma	Cyclone MCX-2(50 x 0,5 mm) (Termo Fisher)	QqQ-ESI-MS/MS	75

Dentre as técnicas de injeção direta de amostras, as que utilizam fases com meio de acesso restrito têm se destacado. As colunas do tipo RAM por possuírem uma barreira de difusão física (com base no tamanho dos poros de partículas) ou uma barreira de difusão química, constituída por um polímero / rede de proteínas na parte externa da partícula, são capazes de excluir macromoléculas, e os analitos de baixa massa molecular são seletivamente extraídos por partição, adsorção, pareamento ou troca iônica ⁷⁶.

Devido suas barreiras de difusão as pequenas moléculas são capazes de acessar o interior dos poros e ficam retidas, já as macromoléculas são excluídas no volume morto da coluna devido à repulsão ^{61,76} (Figura 1.3). Sendo assim, as fases estacionárias do tipo RAM são capazes de combinar os princípios da cromatografia de exclusão, afinidade, modo reverso, troca iônica, quiral, dentre outros ⁷⁷.

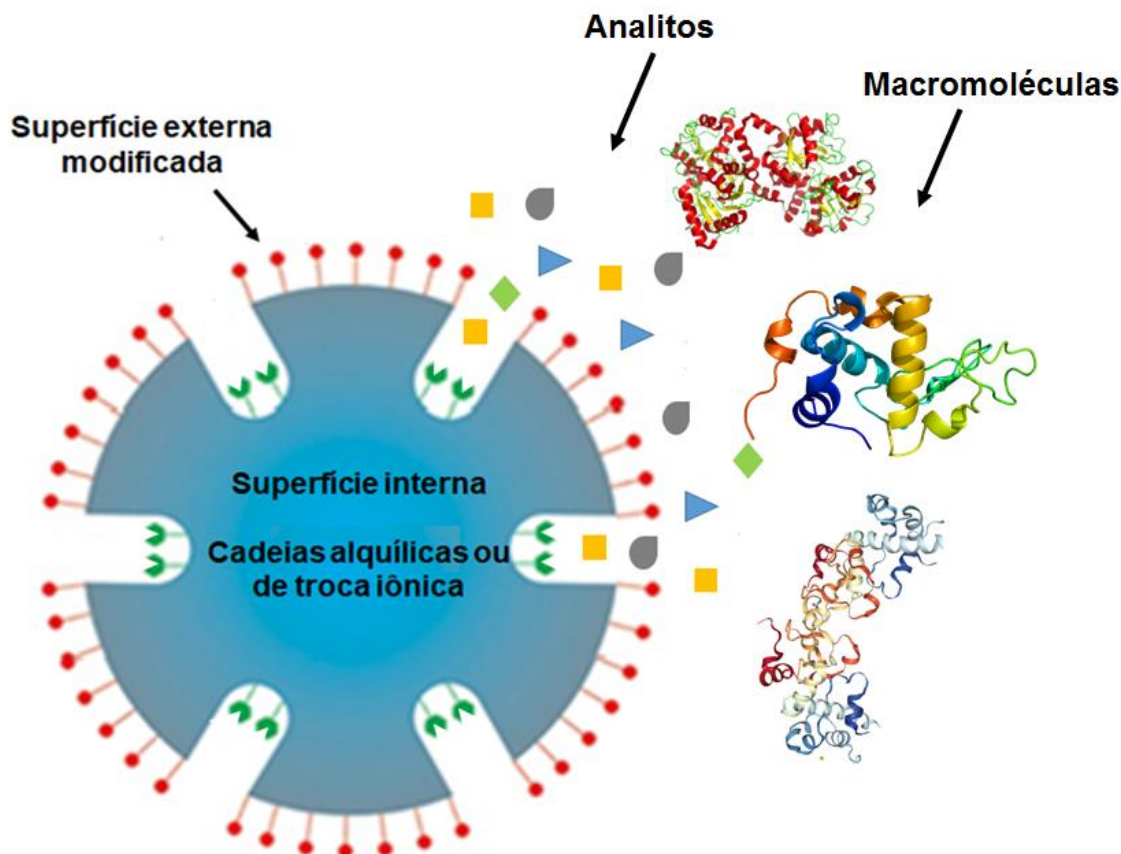


FIGURA 1.3. Representação da exclusão nas colunas do tipo RAM (Adaptado de SIMÕES ⁵⁵)

As colunas de meio de acesso restrito foram desenvolvidas para análises de xenobióticos em fluidos biológicos e empregadas pela primeira vez em 1985 por Hagestam and Pinkerton ⁷⁸ com o desenvolvimento das colunas *internal surface reversed-phase* (ISRP). Gisch e seus colaboradores ⁷⁹ em 1988 apresentaram as *Shielded hydrophobic phase* (SHP). Em 1990, Haginaka e Wakai ⁸⁰ produziram as colunas *Mixed-function phase* (MFP). Logo em seguida em 1991, Boos e colaboradores ⁸¹ introduziram o conceito das colunas *Alkyl-Diol Silica* (ADS) e Desilets e colaboradores ⁸² desenvolveram as *Semi-Permeable Surface* (SPS). No mesmo período, Yoshida e colaboradores ⁸³ apresentaram as fases com proteína imobilizada. Essas fases são disponíveis comercialmente e são de fácil preparo em laboratório.

As fases do tipo RAM podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de exclusão macromolecular, podendo ser bimodal, quando o exterior é hidrofílico e as superfícies internas são hidrofóbicas, ou unimodal, quando as duas superfícies são iguais ⁷⁷.

As colunas RAM possuem aplicação analítica bastante versátil, podendo ser utilizadas em sistemas cromatográficos em uma ou duas dimensões. No modo unidimensional (1D) ela serve como coluna extratora e analítica, com a exclusão das macromoléculas no volume morto da coluna. No modo bidimensional (2D), a RAM funciona como coluna extratora e após a exclusão das macromoléculas, os analitos são transferidos para uma coluna analítica ⁵⁶.

As colunas RAM, de modo geral, apresentam alta capacidade de exclusão e bons fatores de retenção para as pequenas moléculas, porém baixa seletividade, por isso elas são majoritariamente empregadas no modo 2D LC, através de comutação de colunas ⁵⁶.

Em injeção direta de amostra, 2D LC tem sido utilizada principalmente no modo *heart-cutting* (LC-LC), permitindo que a coluna RAM promova a limpeza da matriz, selecionando os analitos para a segunda dimensão, onde são separados e analisados ⁶⁰.

A Tabela 1.5 exemplifica algumas aplicações de diferentes colunas RAMs utilizadas em sistemas 2D LC-MS para análises de substâncias em fluidos biológicos.

A coluna RAM-BSA C18 de 50 mm com i.d de 4,6 mm foi utilizada por LOPES e colaboradores ⁸⁴ para análise de carbamazepina em amostras de leite materno e foram quantificadas na concentração de 2,26 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ usando LC-IT-MS/MS. Já consta na literatura o uso de coluna RAM-BSA C18 com i.d de 2,1 mm para análises de fármacos no leite materno. A fluoxetina foi reportada em um limite de quantificação de 7,5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ usando 2D LC-MS/MS ⁸⁵.

TABELA 1. 5. Uso de colunas RAM para análises de matrizes biológicas.

Analito(s)	Matriz	Coluna RAM	Analizador/ Detector	Ref.
Fluoxetina e Norfluoxetina	Leite materno	RAM-BSA C 18 (30.× 2.1 mm, 10 µm; <i>home made</i>)	QqQ-ESI-MS/MS	85
Antidepressivos	Plasma humano	RAMIP-BSA (10 × 4,6 mm)	QqQ-ESI-MS/MS	65
carbamazepina	Leite materno	RAM-BSA C 18 (50.× 4.6 mm, 10 µm; <i>home made</i>)	IT-ESI-MS/MS	84
Compostos exógenos e metabolitos endógenos	Urina	RAM LiChroCART 24-4 Lichrospher® RP4 ADS (25 µm, 25 × 4 mm; Merck)	QqQ-ESI-MS/MS	66
Alprenolol e Propranolol	Plasma humano	RAM alkil-diol-silica (Lichrospher® RP-18 ADS, 25 µm)	2D-LC-FD	67
Ampicilina	Leite bovino	RAM-BSA C 8 (30.× 2.1 mm, 10 µm; <i>home made</i>)	QqQ-ESI-MS/MS	86
Parabenos, Fenóis e Triclosan	Leite materno	Lichrospher® RP-18 ADS (25 × 4.0 mm ID, 25 µm; Merck)	Q-Trap APPI-MS/MS	69
Biomarcadores de exposição a xenobióticos	Urina	LiChroCART 25-4 Lichrospher® RP4 ADS (25 µm, 25 mm × 4 mm; Merck)	IT-ESI-MS/MS	87

O emprego das colunas RAM-BSA em sistemas de LC-MS tem se mostrado bastante útil em análises de matrizes biológicas, visto sua eficiência em excluir os interferentes, minimizando problemas de efeito de matriz e ajudando na sensibilidade e seletividade do detector ⁵⁶.



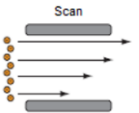


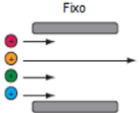
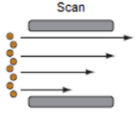

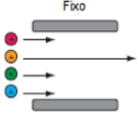
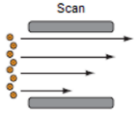

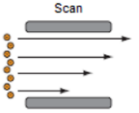
1.5. Emprego da espectrometria de massas em bioanálises

Na espectrometria de massas sequencial (MS/MS) os analisadores de massas são fundamentais e podem ser combinados em série, como Ion Trap, Triplo Quadrupolo, entre outros que permitem quantificar e confirmar os analitos ⁸⁸. Existem na literatura diversos trabalhos que usam os diferentes tipos de analisadores de

massas para determinar interferentes endócrinos, drogas, fármacos, poluentes ambientais, entre outros em matrizes biológicas^{12,87,89}.

O analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ) é um dos mais empregados na espectrometria de massas para a quantificação de compostos presentes em matrizes complexas, pois ele permite a fragmentação de massas, resultando em uma maior seletividade e sensibilidade. Além disso, gera dados quantitativos de qualidade, visto que pode realizar experimentos como, SRM (*selected reaction monitoring*), perda neutra (*neutral loss*), varredura de íons produtos (*product ion scan*) e varredura de íons precursores (*precursor ion scan*)^{60,88} (Tabela 1. 6).

TABELA 1. 6. Experimentos realizados pelo analisador do tipo QqQ (Adaptado de CARDOSO e colaboradores⁸⁸).

Experimentos	Q1	Q2	Q3	Aplicação
Varredura de íon produto				Análises qualitativas: obtenção de informação estrutural dos íons produzidos na fonte – fragmentação característica
SMR				Análises quantitativas: monitoramento seletivo de um íon de interesse. Permite alta seletividade e sensibilidade.
Varredura de íon precursor				Análises qualitativas: determinação de uma função orgânica comum a diferentes compostos presentes em uma mistura
Varredura de perda neutra				Análises qualitativas: identificação de compostos análogos que possuam perda neutra característica

Dentre os experimentos citados acima, o modo SRM é o mais adequado para quantificação, permitindo maior seletividade. Neste experimento, o primeiro quadrupolo (Q1) é usado para isolar um íon precursor pré-definido, que será enviado para o segundo quadrupolo (Q2), conhecido como cela de colisão, para ser fragmentado gerando um ou mais fragmentos devido à colisão com as moléculas do gás inerte (argônio, hélio ou nitrogênio). No terceiro quadrupolo (Q3) ocorre a seleção para monitorar os íons gerados pelo íon precursor. De forma simples, em SRM Q1 e Q3 tem a função de filtrar os íons selecionados enquanto Q2 trabalha como cela de colisão ^{88,90}.

As fontes de ionização à pressão atmosférica (API) – ESI (*electrospray ionisation*) e APCI (*atmospheric pressure chemical ionisation*) concedem aos analitos a ionização em diferentes modos além da possibilidade de análise de compostos em todas as faixas de polaridade, o que é um atrativo para a quantificação das benzofenonas e seus metabólitos. Atualmente, a ionização por ESI é a mais utilizada em amostras químicas e biológicas, com as vantagens de analisar compostos de baixa e elevada massa molecular a níveis traço ⁸⁸.

O desempenho dos métodos LC-MS/MS em ESI e APCI é prejudicado com o Efeito de Matriz (EM), causado pela presença de substâncias inerentes à matriz, que podem coeluir com o analito de interesse. Estas substâncias podem interferir na ionização dos analitos suprimindo ou aumentando a resposta do sinal. De tal forma, uma avaliação criteriosa do efeito de matriz deve ser realizada para identificar seus efeitos nos parâmetros de validação em métodos quantitativos por LC-MS/MS, visto que a precisão, exatidão, linearidade de resposta (sinal vs. concentração), limites de quantificação e detecção são afetados por este fenômeno ^{91,92}.

A origem e o mecanismo exato do efeito de matriz ainda não são totalmente conhecidos. Dentre as possíveis propostas têm-se que as substâncias interferentes menos voláteis podem mudar a eficiência de formação e evaporação das gotas, o que afetaria a quantidade de íons na fase gasosa ⁹³.

A principal fonte do efeito de matriz comumente observado em bioanálise por LC-MS/MS são os compostos endógenos, como os fosfolipídios, que estão presentes em todas as matrizes biológicas em alta concentração e podem interferir na supressão ou aumento de ionização ⁹².

Além dos fosfolipídios, os oligossacarídeos, e as proteínas encontrados no leite materno, podem interferir na extração dos analitos presentes na matriz, e na

detecção dos mesmos e, além disso, podem gerar efeitos de matriz pronunciados e como ainda não existe um protocolo definido para eliminar este problema, torna-se imprescindível a avaliação do efeito de memória em desenvolvimento de métodos por LC-MS/MS.

A literatura reporta diversas técnicas para o *clean-up* de interferentes presentes em matrizes biológicas, entretanto a eliminação dessas substâncias é uma das principais dificuldades dos métodos bioanalíticos por LC-MS/MS⁹⁴. Diante disso, a quantificação das benzofenonas em leite materno representa um grande desafio, devido principalmente à complexidade da matriz. Assim, o presente trabalho reporta o uso de coluna RAM-BSA para injeção direta de leite materno no sistema LC-MS para análise de benzofenonas.

Objetivos

Se tropeçar e cair, levante,

Não fique prostrado,

Esqueça o passado.

OLHE PARA FRENTE.

Charles Chaplin – Olhe - Segunda estrofe

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudo de condições cromatográficas para quantificação de benzofenonas para injeção direta de amostras de leite materno por LCMS/MS.

Materiais e Métodos

Ao sentir-se orgulhoso,
Por alguma realização pessoal,
Sonde suas motivações,
OLHE PARA DENTRO.
Charles Chaplin – Olhe - Terceira estrofe

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Parte experimental

3.1.1. Generalidades

Todos os experimentos analíticos foram realizados no laboratório SEPARARE, núcleo de pesquisa em cromatografia do Departamento de Química-UFSCar.

Foi utilizada uma empacotadora Shandon[®], para o empacotamento das colunas cromatográficas.

A água utilizada na composição das fases móveis e preparação de soluções foi obtida em um sistema Milli-Q[®] Direct 8.

Os solventes orgânicos utilizados foram grau HPLC (PANREAC[®], J. T. BAKER[®], Honeywell[®]), e degaseificados em ultra-som BRANSON[®] 1510.

Os eluentes usados foram sempre medidos na relação volume/volume.

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança analítica AND, modelo HR200, com precisão $\pm 0,0001\text{g}$.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro, GEHAKA[®], modelo PG1800, com precisão de $\pm 0,01$ unidades de pH, conectado a um eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl. A calibração do pHmetro foi realizada com soluções tampão pH 7,00 e 10,0 (GEHAKA[®]).

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram GILSON[®] e EPPENDORF[®].

As amostras foram centrifugadas utilizando uma centrífuga da marca Eppendorf[®] 5415R.

Durante as análises foram utilizados padrões das benzofenonas comercializados pela Sigma- Aldrich®.

O ácido fórmico foi comercial, Sigma- Aldrich®.

As colunas analíticas utilizadas neste trabalho foram: Acquity® HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm), Acquity® CSH (100 x 2,1 mm, 1.7 µm), (Symetry® C18 (50 x 2,1 mm, 3,5 µm), Acquity® BEH Phenyl (100 x 2,1 mm, 1.7 µm e Cortecs® C18+ (100 x 2,1 mm, 2,7 µm) e Acquity BEH HILIC (100 x 2,1 mm; 1.7 µm).

O *pool* de leite materno foi fornecido pelo banco de leite materno da maternidade Dona Francisca Cintra Silva, de São Carlos/São Paulo. O uso destas amostras foi aprovado pelo Comitê de ética humana da Universidade Federal de São Carlos, CAAE – 1488.0.000.135-08. As amostras de leite foram armazenadas em alíquotas de 2,0 mL à -20 °C.

3.2. Sistemas cromatográficos utilizados

A imobilização da BSA nas colunas RAM, o procedimento de coleta e as análises do perfil de exclusão das proteínas do leite materno foram realizadas num sistema cromatográfico contendo duas bombas Shimadzu® LC 20AD, um auto injetor SIL 20A e um detector ultravioleta SPD 20A operando em 220 e 280 nm, acoplado a uma interface Shimadzu® CBM 20A.

O sistema LC-MS/MS utilizado neste trabalho, consiste num cromatográfico Waters ACQUITY® UPLC (Miliford, USA) composto por uma bomba binária (BSM) e uma quaternária (QSM), com injetor automático 2777C e sistemas de válvulas comutadoras de seis caminhos, acoplado a um espectrômetro de massas Waters XEVO® TQ-MS (Waters® Miliford, USA) com ionização por *eletrospray* (ESI) operando no modo positivo e negativo para análise das benzofenonas.

Para triagem dos leites maternos foi utilizado o sistema UHPLC Agilent®1290 *Infinity* II (Agilent Technologies) composto por uma bomba binária (G7120A – *High speed Pump*), autoinjetor e compartimento de colunas (G7129B – 1290 *Vialsampler*) e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (G7114B –

modelo 1260 *Infinity* II – VWD, acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo QqTOF (Bruker Daltonics® - Impact, Rheinstetten, Alemanha) equipado com fonte ESI (LC-HRMS). A aquisição e processamento dos dados foi realizada utilizando o software Data Analysis® (Bruker Daltonics® GmbH, Bremen, Alemanha).

3.3. Colunas RAM–BSA

Para o preparo das colunas RAM–BSA C18 (2) (50 x 2,1 mm), as colunas foram primeiramente preenchidas com sílica Luna Phenomenex® de 10 µm de tamanho de partícula. Elas foram denominadas de Coluna 1, Coluna 3 e Coluna 4.

Para o preparo da RAM–BSA C18 (2) (30 x 2,1 mm) foi usada uma coluna comercial Luna Phenomenex® de 3 µm de tamanho de partícula e denominada Coluna 2. A coluna RAM-BSA C8 foi preparada a partir de uma coluna comercial *Symetry*® C8 (50 x 2,1 mm, 3,5 µm) da Waters® e nominada de coluna 5.

3.4. Preparo da Coluna de Acesso Restrito

3.4.1. Preenchimento da Coluna

As colunas foram preparadas em tubos aço inoxidável (50 x 2,1 mm) preenchidos com a fase hidrofóbica octadecil (Luna®, 10 µm e 100 Å), partindo-se de uma suspensão contendo 0,3 g de sílica em 20 mL de metanol. A suspensão foi homogeneizada em aparelho de ultrasson por 5 minutos, e, em seguida, a coluna foi preenchida em uma empacotadora Shandon®, sob pressão de 6000 psi, utilizando-se metanol como solvente. As colunas foram condicionadas em metanol por 24 horas a uma vazão de 1,0 mL/min.

3.4.2. Colunas 1, 3 e 4

Após preenchimento e condicionamento das colunas foi realizada a imobilização da albumina sérica bovina (BSA) *in situ*, por Cromatografia frontal de acordo com o procedimento descrito por MENEZES E FELIX⁹⁵ e adaptado pelo grupo para colunas com pequenos diâmetros internos⁹⁶.

Inicialmente uma solução tampão de KH_2PO_4 0,05 mol/L (pH 6,00) foi eluída pela coluna a uma vazão de 1,0 mL/min durante 20 min. Posteriormente, foi eluída uma solução de BSA 2,0 mg/mL (preparada em KH_2PO_4 0,05 mol/L (pH 6,00)) por 30 min, seguida de lavagem da coluna com água deionizada por 20 min. Imediatamente, duas porções de 10 mL de glutaraldeído a 25% (v/v) foram eluídas promovendo o intercruzamento da BSA.

Após repouso de 12 h a 4°C uma solução de NaBH_4 1,0 mg/mL foi eluída pela coluna até o eluente apresentar pH 10. Após o repouso, a fase estacionária foi lavada com água deionizada por 1 h. As colunas preparadas foram mantidas em água e armazenadas a 4 °C.

3.4.3. Colunas 2 e 5

Uma solução tampão de KH_2PO_4 0,05 mol/L (pH 6,00) foi eluída pela coluna em uma vazão de 0,2 mL/min durante 100 min. Posteriormente, foi eluída uma solução de BSA 2,0 mg/mL (preparada em KH_2PO_4 0,05 mol/L (pH 6,00)) por 150 min, seguida de lavagem da coluna com água deionizada por 100 min. Imediatamente, duas porções de 10 mL de glutaraldeído a 25% (v/v) foram eluídas promovendo o intercruzamento da BSA.

Após repouso de 12 h a 4°C uma solução de NaBH_4 1,0 mg/mL foi eluída pela coluna até o eluente apresentar pH 10. Após o repouso, a fase estacionária foi lavada com água deionizada por 1 h. As colunas preparadas foram mantidas em água e armazenadas a 4 °C.

3.4.4. Análise do perfil de exclusão das proteínas do leite materno pelas colunas RAM-BSA

A análise de exclusão proteica foi realizada usando o método de Bradford⁹⁷. As amostras de leite materno foram centrifugadas por 10 minutos a 9.300 x g a 4 °C. Após o condicionamento da coluna RAM-BSA, 10 µL do *pool* de leite materno centrifugado foi injetado em triplicata no sistema cromatográfico tendo H₂O como fase móvel a vazão de 0,4 mL/min para a exclusão das macromoléculas. Uma fração de 0 - 3 minutos foram coletados em tubos eppendorf. Após 3 min a fase móvel foi trocada para MeOH/H₂O (80:20, v/v) e mantida por 8 minutos para limpeza. A coluna foi condicionada no solvente de exclusão por 3 minutos.

Após a coleta da fração de 0 - 3 min foram aliqüotados 600 µL e adicionados 200 µL do reagente de Bradford. Em seguida, foi submetido à agitação em vórtex, e transferido para um cubeta de poliestireno e o espectro foi registro na região de 300 a 800 nm. A absorbância foi medida em 596 nm que é referente ao comprimento de onda de máxima absorção do complexo proteína-corante. Todas as amostras coletadas e a amostra de referência foram submetidas a esse procedimento.

As porcentagens de proteínas excluídas pelas colunas RAM-BSA foram calculadas pela razão entre os valores de absorbância das soluções de referência (100%) e das frações coletadas.

As medidas de absorção molecular na região do UV-visível foram realizadas em um espectrofotômetro da marca Beckman Coulter®, modelo DU 800.

3.5. Preparo de amostra

➤ Ressuspensão na matriz

Para estas análises, 10 µL de uma mistura de benzofenonas foram evaporadas em uma *speed vac* da marca Christ® RVC 2- 25 CD plus, e ressuspendidas com 400 µL do *pool* de leite materno, tendo uma concentração final de 1000 ng/mL ao qual foram adicionados 100 µL de 2-propanol para facilitar a extração das benzofenonas e precipitar os oligossacarídeos presentes na matriz, resultando assim, em um volume final de 500 µL. A solução padrão foi preparada em água na mesma concentração. Esta análise foi realizada nas seguintes condições cromatográficas: 0 – 2,50 min H₂O (100% v/v); 2,51 – 5 min MeOH/H₂O (80:20 v/v);

5,01 – 7 min MeOH/H₂O/ISO (75:20:5 v/v/v) e 7 – 10 min H₂O 100% (v/v); vazão de 0,4 mL/min, volume de injeção de 10 µL.

➤ **Adição dos analitos na matriz**

Para o preparo das amostras fortificadas, alíquotas de 8 µL da solução de trabalho preparada em MeOH (25 µg/mL) foram adicionadas em 400 µL de um *pool* de leite materno. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e mantidas em repouso por 15 minutos para propiciar o equilíbrio entre a matriz e os analitos, em seguida foram acrescentados 100 µL de 2-propanol. As amostras então foram submetidas à centrifugação a 9.300 x g por 10 minutos a 4°C, onde resultam em uma camada fina de gordura, uma camada aquosa intermediária e um precipitado no fundo do tubo. Dessas amostras alíquotas de 400 µL da fração aquosa foram transferidos para os vials e destes 15 µL foram injetados no sistema cromatográfico de LC–MS/MS.

➤ **Precipitação de proteína**

Para a análise de precipitação de proteína, o leite de vaca desnatado, utilizado com substituto, foi fortificado com os analitos em uma concentração de 200 ng/mL, e a estes adicionados 300 µL de acetonitrila. As soluções foram centrifugadas a 9.300 x g por 10 minutos a 4°C, sendo transferidos 300 µL para os *vials* e injetados 10 µL, nas condições cromatográficas descritas na Tabela 3.1.

TABELA 3. 1. Condições cromatográficas utilizadas na separação dos analitos utilizando a coluna Acquity® HSS T3.

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel (v/v)	Evento
0 – 2,5	MeOH /Tampão acetato (5mM pH9)	5:95	Exclusão
2,5 – 7,0	MeOH /Tampão acetato (5mM pH9)	80:20	Eluição dos analitos
7,0 – 9,0	MeOH/H ₂ O/ 2 - propanol	75:20:5	Limpeza da coluna
9,0 - 11	MeOH /Tampão acetato (5mM pH9)	5:95	Condicionamento da coluna

Vazão 0,3 mL/min

3.6. Condições cromatográficas LC–2D

Foram avaliados tempo de retenção, fase móvel e tempo de transferência para as benzofenonas. Foi utilizada a coluna Acquity® HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm) com fase de transferência isocrática de MeOH/H₂O (80:20 v/v), volume de injeção de 10 µL e vazão de 0,4 mL/min. A Tabela 3.2 resume as condições cromatográficas utilizadas neste experimento.

TABELA 3. 2. Condições cromatográficas avaliadas na separação dos analitos.

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel (v/v)	Evento
0 – 2,5	H ₂ O	100	Exclusão das macromoléculas
2,5 – 10	MeOH / H ₂ O	80:20	Eluição dos analitos
4 – 6	MeOH / H ₂ O	80:20	Acoplamento entre colunas
10 – 12	MeOH	100	Limpeza da RAM
12 – 15	H ₂ O	100	Condicionamento da coluna

3.7. Estudos de interação com a BSA por espectroscopia de emissão de fluorescência

O estudo de interação dos analitos com a proteína foi avaliado pela medida de supressão da fluorescência do resíduo de triptofano na BSA em tampão Tris pH 7,4.

Os experimentos foram realizados em triplicata empregando uma placa opaca de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 950 µL de BSA (2,6 µmol.L⁻¹) e 50 µL solução dos analitos em DMSO variando as concentrações entre 1,8 – 18,0 µmol.L⁻¹. A extinção da intensidade de emissão do resíduo de triptofano em 315 nm (comprimento de onda de excitação 270 nm) foi registrada em um fluorímetro BioTek® SYNERGY/H1 microplate reader, à 40 °C.

3.8. Triagem das amostras de leite materno

As amostras de leite materno utilizados no estudo da triagem foram coletadas por nutrizes de São Carlos/São Paulo, em diferentes estados de amamentação, as mães foram orientadas a fazer a acepcia dos seios e das mãos antes de fazer a devida ordenha. As amostras foram coletadas em tubos falcons e armazenadas à -20°C.

Os solventes utilizados foram: Solvente A – H₂O e B – MeOH. A eluição gradiente foi realizada nas seguintes condições 0-1,0 min, 5-95% B; 1,0-5,0 min, 20-80% B; 5,0-7,0 min, 5-95% B a uma vazão de 0,4 mL/min. O sistema cromatográfico utilizado foi o descrito no item 3.2. A coluna analítica utilizada foi a Acquity[®] HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm). As amostras foram preparadas utilizando a técnica de precipitação de proteína, onde foram aliquoteados 100 µL de leite materno e adicionados 300 µL de acetonitrila para precipitar as proteínas, centrifugadas e posteriormente, o sobrenadante límpido foi transferido para *vials*. O volume de injeção foi de 10 µL. As condições da fonte de ionização foram: capilar 4500 V, *offset* da placa final a 500 V, nebulizador a 0,8 bar, 6 L/min e 180°C vazão e temperatura do gás de secagem (N₂). Os espectros foram registrados no modo negativo de ionização de 80 - 700 *m/z*. As análises foram realizadas no modo *full scan*. Os íons 213,0546 (BP-1), 227,0703 (BP-3) e 307,0271 (BP-4) foram extraídos no intervalo de ± 10 ppm.

Resultados e Discussão

Antes que o egoísmo o domine,
Enquanto seu coração é sensível,
Socorra aos que o cercam.

OLHE PARA OS LADOS.

Charles Chaplin – Olhe - Quarta estrofe

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação das colunas RAM-BSA

As colunas de acesso restrito recobertas com albumina sérica bovina (RAM-BSA) mostraram excelentes resultados para os trabalhos realizados no nosso grupo de pesquisa com diferentes matrizes biológicas^{98,99}, incluindo o leite materno, matriz que possui uma alta complexidade analítica e há um grande desafio na extração dos analitos^{84,85,100}. As colunas do tipo RAM-BSA tem despertado interesse pela simplicidade no modo de preparo e pela eficiência no *clean-up* de macromoléculas em diferentes amostras biológicas^{60,76,77}.

No presente trabalho foram preparadas colunas RAM-BSA em suportes C₈ e C₁₈ com diferentes tamanhos de partículas. A escolha da BSA se deve à grande disponibilidade comercial da albumina sérica bovina, baixo custo, e principalmente devido às suas propriedades físico-químicas, que permitem o uso destas colunas em diversas condições cromatográficas no modo reverso de eluição, o que é vantajoso quando se trabalha com injeção direta de amostras complexas, como o leite materno¹⁰¹.

A imobilização da BSA (Figura 4.1) ao suporte de sílica é feita por cromatografia frontal onde a BSA é adsorvida na superfície do suporte. Para aumentar a resistência do material, uma série de reações é realizada promovendo o intercruzamento das proteínas para a formação de uma espécie de rede sobre a superfície da sílica. Isso se dá pela reação entre o glutaraldeído e os resíduos de lisinas presentes na proteína, levando a formação de iminas. Em seguida, utiliza-se uma solução de boroidreto de sódio para redução das bases de Schiff formadas e dos aldeídos residuais, evitando a reação desses grupos com os analitos de interesse na coluna cromatográfica e oferecendo assim uma fase estacionária com maior estabilidade e durabilidade⁵⁶.

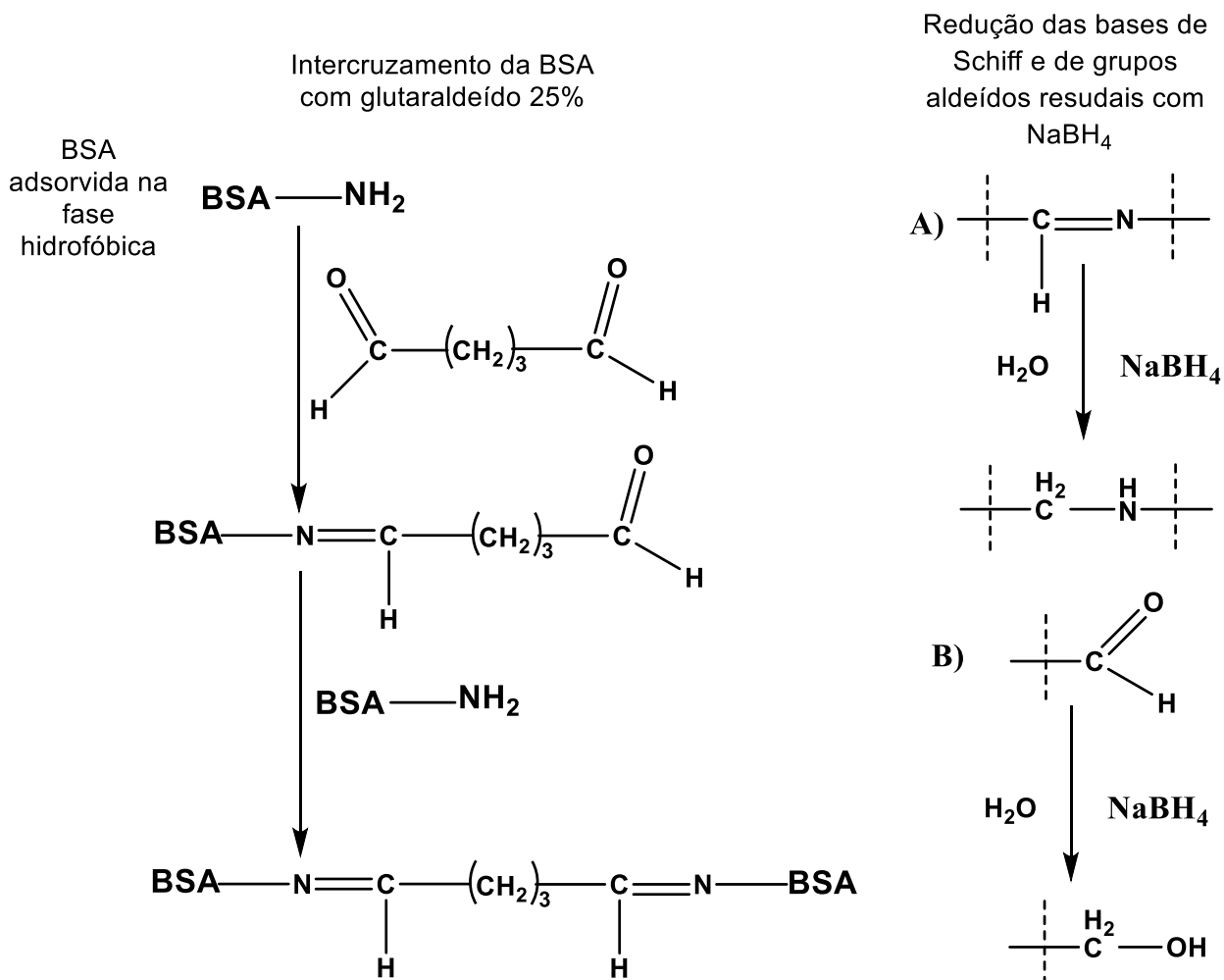


FIGURA 4. 1. Imobilização da BSA.

A eficiência na exclusão das proteínas totais do leite materno pelas colunas RAMs-BSA foi avaliada utilizando o método de Bradford ⁹⁷. Este método determina a quantidade de proteínas por meio da reação destas com o corante *Coomassie Brillhante Blue* (CBB) (Figura 4.2). O método é baseado na formação de um complexo entre o corante e as proteínas de alta massa molecular que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A reação entre a proteína de alta massa molecular e o corante CBB provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 596 nm ¹⁰².

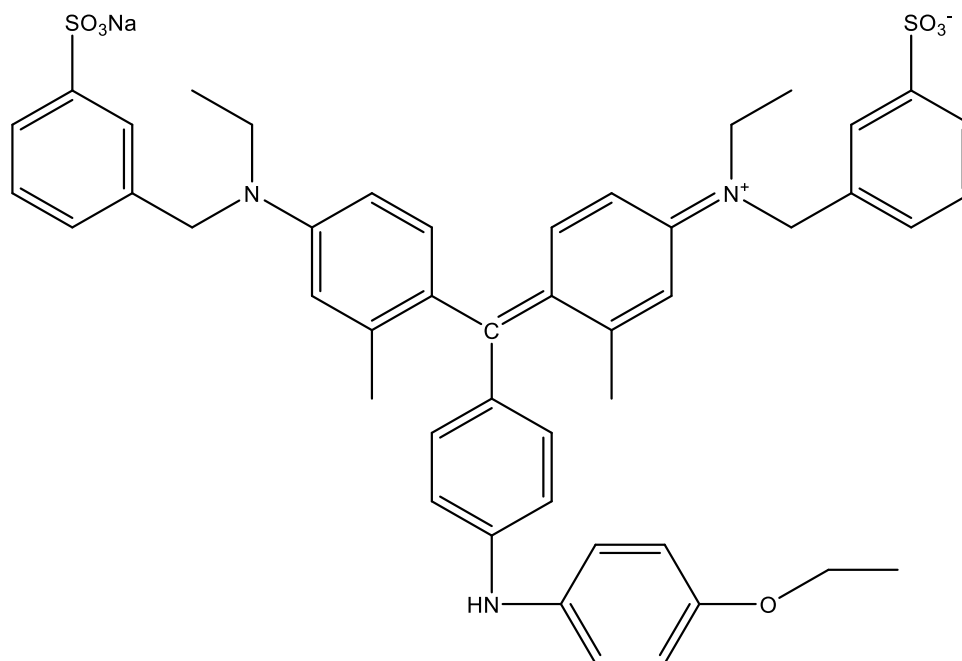


FIGURA 4. 2. Estrutura do corante *Coomassie Brilhante Blue*.

A eficiência de extração foi calculada através da comparação das absorbâncias das amostras coletadas na saída da coluna com as amostras de referência que não passaram pela coluna e representam a quantidade total das proteínas presentes no leite materno. Tanto a coluna Coluna 1 quanto a Coluna 2 apresentaram boa capacidade de exclusão no volume estudado de 10 μ L. A porcentagem de exclusão para a Coluna 1 foi de 82% e para a Coluna 2 foi de 69%.

O espectro de absorção obtido das frações coletadas de 0 – 3 min apresentou similaridade com o espectro da amostra de referência o qual representa o 100% das proteínas do leite. A Figura 4.3, indica que nas condições estudadas, as colunas foram eficientes na exclusão das proteínas presente no leite materno.

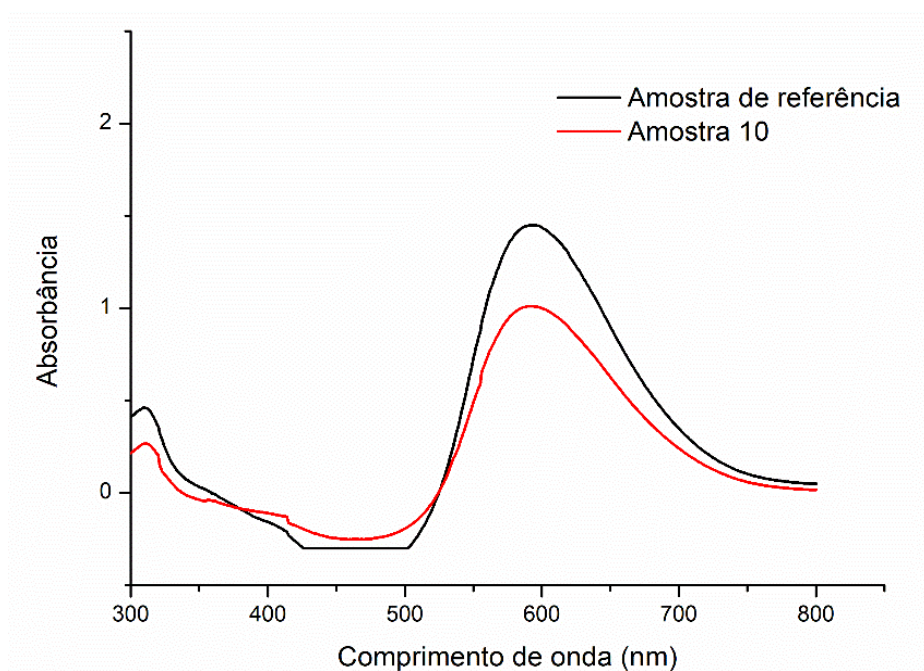


FIGURA 4. 3. Espectro obtido da reação proteína corante da amostra de referência e das frações coletadas após eluição na coluna RAM-BSA.

O perfil de eluição avaliado em 280 nm (monitoramento das proteínas) e 210 nm (referente aos oligossacarídeos) utilizando as Colunas 1 e 2, mostraram um tempo de exclusão de 2,5 min (Figura 4.4) para as amostras de leite. Além disso, o perfil de eluição de β -caseína e α -lactalbumina, as duas principais proteínas do leite humano^{55,84}, demonstraram que ambas as proteínas foram eluídas com água dentro de 1,5 min a uma vazão de 1,00 mL.

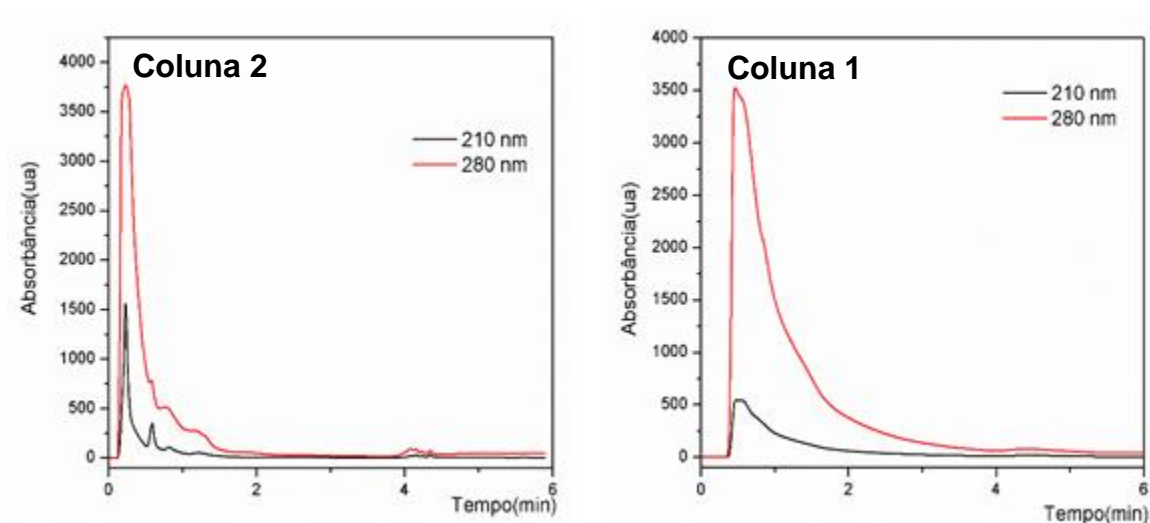


FIGURA 4. 4. . Cromatogramas referentes aos perfis de exclusão das proteínas totais do leite materno, utilizando as Colunas 1 e 2.

De acordo com o perfil cromatográfico pode-se concluir que as colunas RAM-BSA, nas condições utilizadas, apresentam boa capacidade para exclusão das macromoléculas presentes no leite materno. É importante ressaltar que a escolha da fase móvel de exclusão e eluição devem ser feita de forma adequada, pois quando se trata de amostras biológicas, para exclusão das macromoléculas, o menor percentual (< 10%) possível de solvente orgânico deve ser usado, para evitar a precipitação das proteínas da matriz. Ademais, o uso de fase móvel com o pH próximo ao ponto isoelétrico (pI) da albumina (pI = 4,9) deve ser evitado, pois pode ocasionar perda da eficiência da coluna RAM e / ou a precipitação das proteínas presentes no leite, o qual os pI correspondem a 4,8 para a α -lactalbumina, 4,6 para a β -caseína e 8,7 para a lactoferrina ⁵⁶.

4.2. Espectrometria de massas: avaliação das condições de ionização e cromatográficas das benzofenonas

A Coluna 1 mostrou-se excelente para injeção direta de leite materno no sistema LC-MS. Sendo assim, para análise das benzofenonas foram avaliados e ajustados os seguintes parâmetros: a) condição de ionização dos analitos; b) retenção dos compostos na coluna RAM durante a etapa de exclusão; c) fase móvel de extração e separação dos analitos; d) fase móvel de limpeza da coluna RAM.

Para a otimização das condições de ionização soluções aquosas, individuais de cada composto (1000 ng/ mL), foram infundidas no sistema no modo combinado com vazão de 50 μ L/min de MeOH/H₂O (80:20 v/v) vinda do sistema cromatográfico combinada com uma vazão de 5 μ L/min da bomba seringa contendo as soluções aquosas.

A Tabela 4.1 mostra as condições estabelecidas para ionização e fragmentação das benzofenonas no modo negativo, realizadas manualmente, levando em consideração a estabilidade dos íons gerados.

O espectrômetro de massa operou no modo *full scan* e duas transições de cada analito foram selecionadas, as utilizadas para quantificação foram: para a BP-

1 a m/z 213,02 > 91,02, para a BP-3 m/z 227,02 > 211,05 e para a BP-4 o fragmento m/z 307,03 > 262,90.

TABELA 4. 1. Condições de ionização e fragmentação para as benzofenonas.

Parâmetros de ionização	Compostos	Formula molecular	Massa molecular	Íon precursor (m/z)	Íons Fragmentos (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)	Modo de ionização
Voltagem do capilar (kV)	2,50	BP-1	$C_{13}H_{10}O_3$	214,02	213,02 91,02 134,99	30	25	Negativo
Temperatura de dessolvatação ($^{\circ}C$)	300	BP-3	$C_{14}H_{12}O_3$	228,02	227,02 183,90 211,05	30	20	Negativo
Vazão do gás de dessolvatação (L/h)	600	BP-4	$C_{14}H_{12}O_6S$	308,03	307,03 211,03 262,90	30	35	Negativo

Os cromatogramas da Figura 4.5 ilustram a seletividade obtida para as três benzofenonas, indicando que no tempo de exclusão das proteínas (0 – 2,5 min) nenhuma banda cromatográfica foi detectada, nas condições selecionadas. Foram avaliadas diversas porcentagens de MeOH/H₂O como fase móvel de extração dos analitos, sendo o melhor resultado utilizando a porcentagem de MeOH/H₂O (80:20 v/v), proporcionando uma boa separação, no qual a coluna RAM está sendo usada no modo unidimensional, onde a mesma tem a função de exclusão das macromoléculas e separação dos analitos.

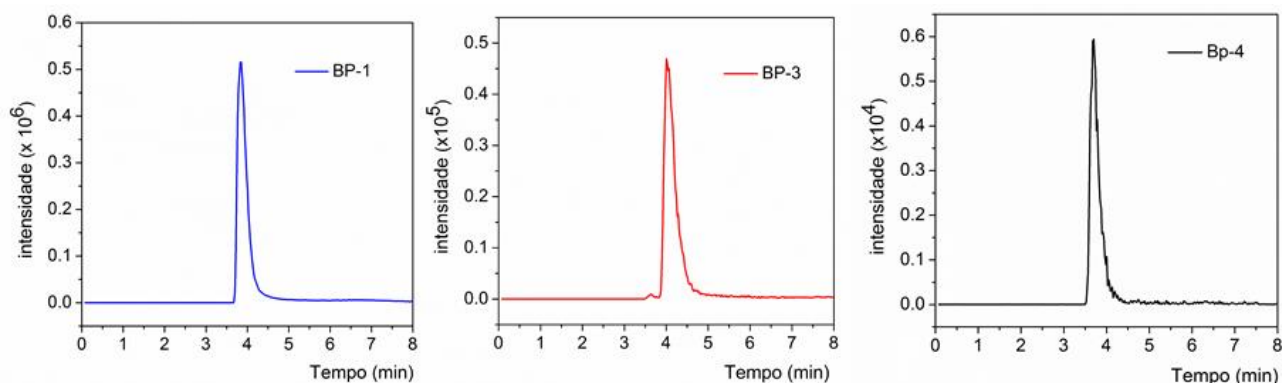


Figura 4. 5. Cromatogramas obtidos da injeção das benzofenonas em água (1000 ng/mL) utilizando a Coluna 1.

Após avaliar o perfil cromatográfico dos analitos em solução aquosa, foi investigado o comportamento das benzofenonas na matriz, sendo necessários a otimização da fase móvel e tempo de eluição dos analitos para evitar a interferência de compostos endógenos presentes em fluidos biológicos. Logo, 500 μL do *pool* de leite materno foram fortificados com uma mistura de benzofenonas em uma concentração final de 1000 ng/mL, utilizando a fase móvel MeOH/H₂O (80:20 v/v). A Figura 4.6 mostra o perfil cromatográfico das benzofenonas na presença de leite materno.

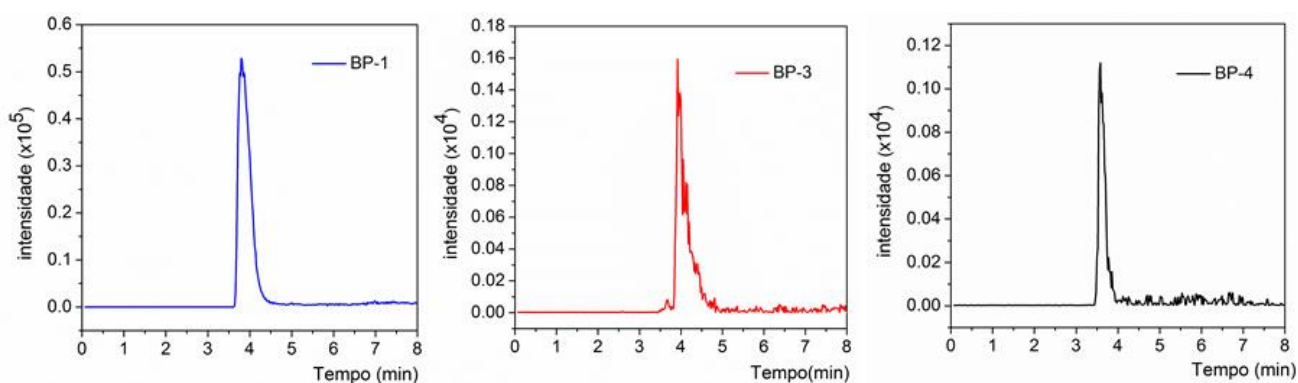


FIGURA 4. 6. Cromatogramas obtidos da análise de leite materno fortificado com benzofenonas na concentração de 1000 ng/mL, utilizando a Coluna 1.

Para avaliar a influência da matriz na ionização dos analitos e também verificar perdas durante a etapa de centrifugação no preparo da amostra, foram realizados os seguintes experimentos: A) as amostras são analisadas em solução padrão em solvente em uma dada concentração, B) a matriz é fortificada com uma solução padrão na mesma concentração que A, após o processo de centrifugação, C) a matriz é fortificada com a solução padrão antes do processo de centrifugação. A Figura 4.7 ilustra o esquema dos experimentos.

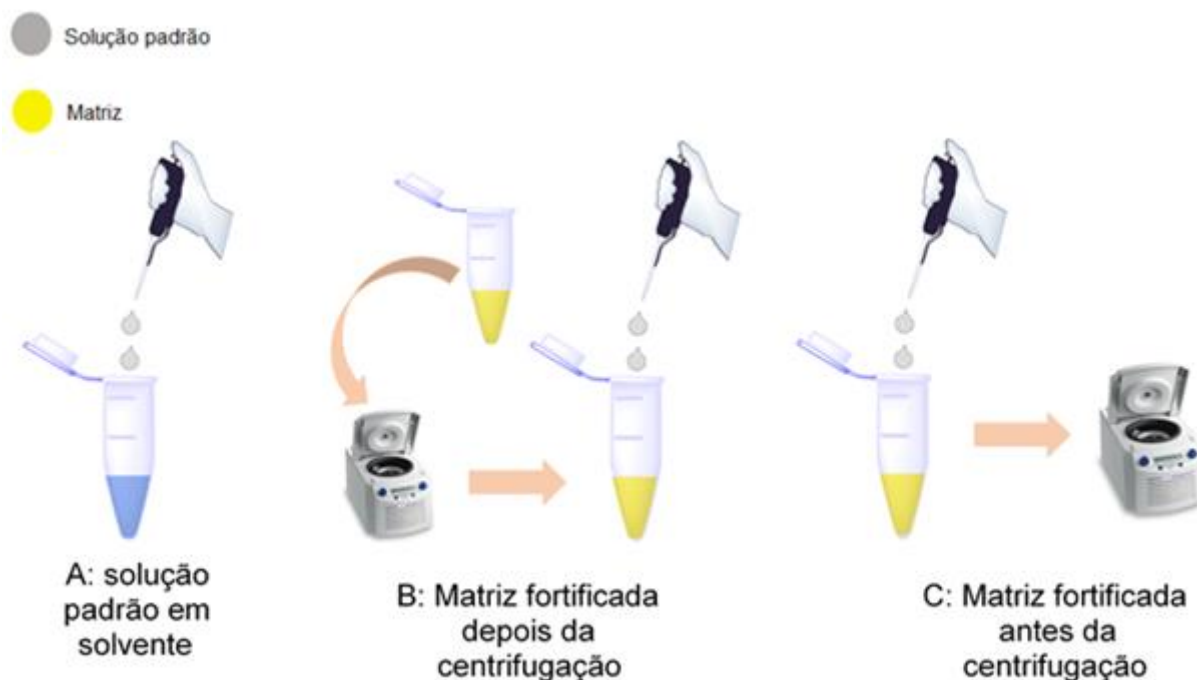


FIGURA 4. 7. Esquema para avaliação de EM, RE e EP, segundo TRUFELLI ⁹³.

O estudo foi realizado levando em consideração processos *off-line* introduzidos por TRUFELLI e colaboradores ⁹³. Neste estudo, os compostos endógenos presentes na matriz influenciam na ionização dos analitos e foram considerados como efeito de matriz (EM). Foi verificado também se a etapa de centrifugação influenciou na extração das benzofenonas, e foi chamado de recuperação (RE) e por fim, foi avaliada a eficiência da extração dos analitos, chamado de eficiência do processo (EP).

Sendo assim, foi calculada através das áreas das bandas cromatográficas a porcentagem do EM, RE e EP, de acordo com as seguintes fórmulas:

Efeito de Matriz (EM) %

$$EM = (B / A) \times 100$$

Recuperação (RE) %

$$RE = (C / B) \times 100$$

Eficiência do Processo (EP) %

$$EP = (C / A) \times 100 = (EM \times RE) / 100$$

O estudo quantitativo do EM é a determinação numérica da porcentagem de supressão ou aumento da ionização de um determinado composto causado por interferentes presentes na matriz. A banda cromatográfica decorrente da injeção do analito em solução aquosa é considerada como o valor referência, por ser uma amostra livre dos interferentes. Quando se injeta as amostras provenientes dos preparos (B) e (C), compare-se a área da banda cromatográfica obtida para o analito com a área obtida em (A) podemos ter as seguintes relações.

Em 2003 MATUSZEWSKI ¹⁰³ e colaboradores consideram que os valores de EM iguais a 100 % significam que não há efeito de matriz ($B = A$); valores de EM maiores que 100 % apontam que ocorreu um efeito de aumento de ionização ($B > A$) e EM menores que 100 % indicam que a matriz foi responsável pela supressão da ionização do analito ($B < A$). A influência da matriz na eficiência de ionização é dada pela diferença entre o valor de EM obtido e 100 % (nenhum efeito foi demonstrado), ou seja, para $EM = 105\%$, a matriz causou um efeito de aumento de sinal de 5 %, enquanto para $EM = 60\%$, 40 % representa a supressão de ionização.

Os resultados das análises para o efeito de matriz estão apresentados na Tabela 4.2 e foram obtidos de acordo com o procedimento 3.5 com a ressuspensão dos analitos na matriz. O sinal positivo (+) foi adotado para indicar aumento de ionização, e o sinal negativo (-) supressão de ionização. Podemos observar que houve um efeito de matriz pronunciado para os três analitos, a RE da BP-4 é maior que 100 % e isso pode ser explicado por um EM desigual quando a matriz biológica é fortificada com o analito antes ou depois do processo de centrifugação, indicando que há uma perda dos analitos para os componentes do leite materno.

Em relação à EP, todas as variáveis envolvidas no procedimento experimental são colocadas em questão, como: natureza da matriz biológica, perdas durante o preparo das amostras, efeito de matriz, erros sistemáticos ocasionados pelo analista, ou até mesmo variações relacionadas à sensibilidade dos equipamentos utilizados. Sendo assim, os valores obtidos de EP podem ser explicados pelas discussões já realizadas para os resultados de recuperação e de efeito de matriz.

TABELA 4. 2. Valores obtidos de EM para a análise de benzofenonas em leite materno.

Analitos	Efeito de matriz (%)	Recuperação (%)	Eficiência do processo (%)
BP-1	(-) 12	40,6	35,8
BP-3	(-) 58	72,7	30,8
BP-4	(+) 35	115	156

Apesar do efeito de matriz pronunciado, foi realizado o teste de variabilidade dos resultados encontrados, logo as amostras foram preparadas em triplicata e injetadas, porém os resultados não apresentaram repetibilidade. Sendo assim, foram feitos alguns estudos para identificar os problemas ocorridos.

Primeiramente, fizeram-se injeções em quintuplicada para verificar a repetibilidade das áreas e certificar se não havia problemas em relação ao auto injetor, houve repetibilidade entre as áreas, coeficiente de variações menores que 10%, indicando que não havia problema com o auto injetor.

Também foi feito um teste em relação à concentração da amostra, pois como podemos observar na Figura 4.6 as intensidades da BP-3 e BP-4 preparadas em 1000 ng/mL estavam em uma relação intensidade de sinal/concentração baixa (ordem de 10^4) então, aumentou-se a concentração para proporcionar uma intensidade maior nos sinais, e a integração das áreas serem mais eficientes, entretanto quanto aos resultados anteriores de RE e EP, não houve repetibilidade. Foram encontrados para a BP-3 valores inferiores aos apresentados anteriormente, Recuperação (10 %) e Eficiência do processo (2,3%), indicando que a concentração não influenciava nos resultados.

Foi investigado também se a forma de preparo de amostra interferia nos resultados, pois como mencionado acima os analitos eram ressuspensos no leite materno, podendo ocasionar em uma baixa solubilidade dos mesmos na matriz, então se optou por uma abordagem diferente, adicionando a matriz à solução dos analitos, entretanto, os resultados permaneceram sem repetibilidade e com valores discrepantes em relação aos apresentados na Tabela 4.2.

Por fim, foi realizado um teste utilizando uma coluna analítica Acquity HSS T3 para verificar se o problema era referente à Coluna 1 utilizada. Ao se comparar os resultados obtidos foi observado que o uso da coluna analítica levou à

uma menor variação (coeficiente de variação menor que 3%) das áreas das bandas cromatográficas dos analitos entre as análises, indicando que o problema poderia ser decorrente da coluna RAM utilizada.

Como a RAM estava sendo utilizada como coluna extratora e de separação, propôs-se a realização de uma coluna RAM de tamanho de partícula menor para proporcionar análises mais rápidas e eficientes, melhorando a resolução quando comparadas com as partículas maiores (10 μm).

4.3. Efeito do tamanho da partícula

A motivação para o estudo da influência do tamanho da partícula está baseada na equação de Van Deemter (equação 1), que relaciona inversamente o tamanho da partícula à eficiência cromatográfica.

$$H = Ad_p + \frac{BD_M}{\mu} + \frac{Cd_p^2\mu}{D_M} \quad (1)$$

Esta equação relaciona a eficiência, expressa pela altura do prato (H , μm), velocidade linear (μ , mm/s) e o tamanho da partícula (d_p), onde, D_M descreve o coeficiente de difusão do analito e A , B e C são constantes que se referenciam respectivamente, ao alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos seguidos pelas moléculas, difusão do soluto na fase móvel, e a transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária ¹⁰⁴.

Sabe-se que diminuindo o tamanho de partícula se ganha maior eficiência cromatográfica, levando a um estreitamento das bandas, aumentando a sensibilidade do método. Essa teoria pode ser ilustrada na Figura 4.8, onde foi visto um estreitamento das bandas e um ganho de sensibilidade, utilizando a Coluna 2, que possui um tamanho de partícula menor (3 μm). Vale ressaltar que é a vez que se tem relato do uso de partículas menores de 10 μm .

Entretanto os analitos BP-3 e BP-4 ainda estão com uma relação intensidade de sinal/concentração muito baixa. Como alternativa, para minimizar o possível efeito de matriz bastante pronunciado quando se utiliza as colunas RAMs no modo unidimensional, optou-se pelo acoplamento entre a RAM e uma coluna analítica.

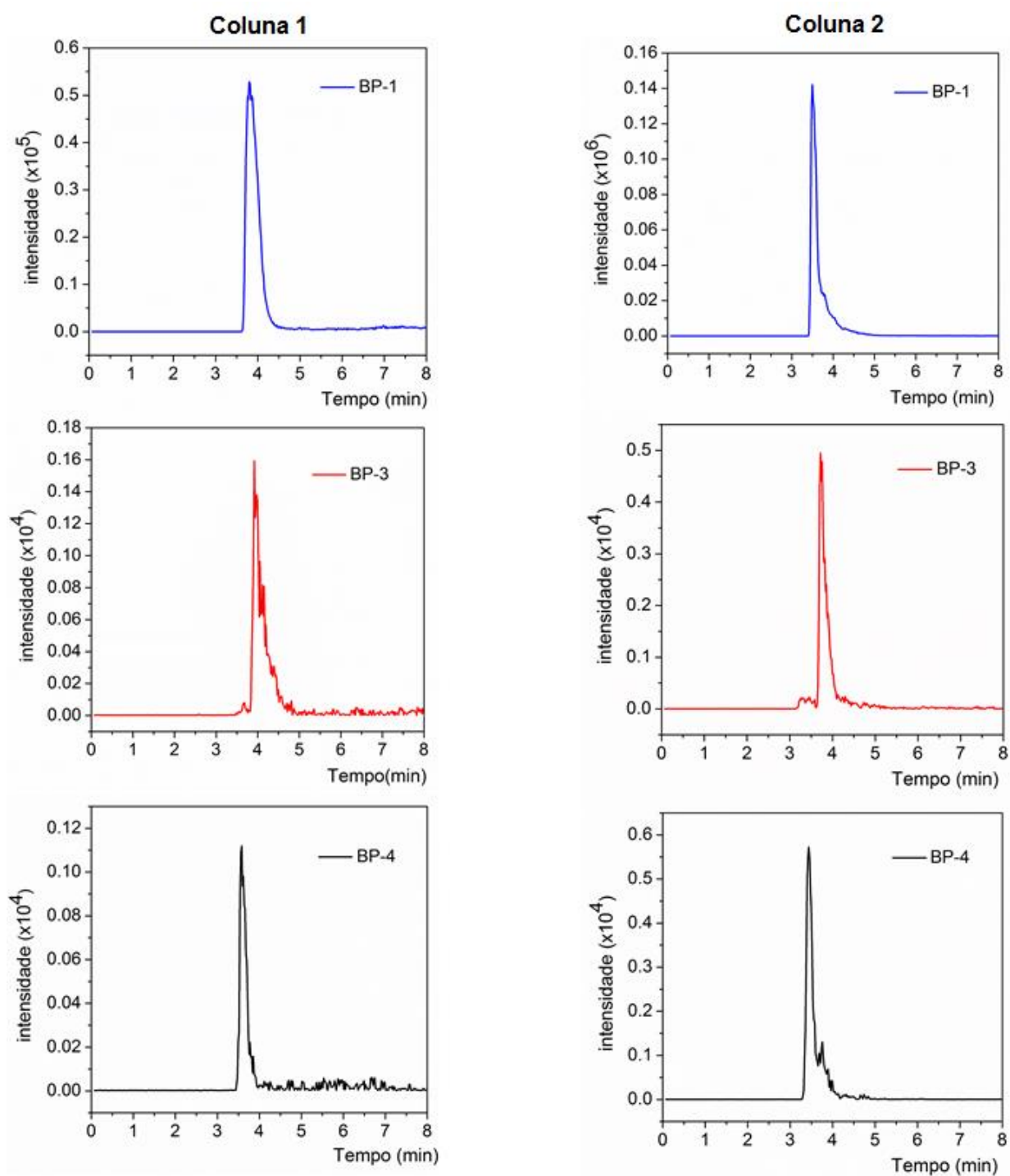


FIGURA 4. 8. Cromatogramas obtidos do leite fortificado com 1000 ng/mL de benzofenonas utilizando as Colunas 1 e 2.

4.4. Cromatografia multidimensional

O sistema 2D utilizado neste trabalho (Figura 4.9), foi configurado para injeção direta de amostras é constituído por duas válvulas, sendo uma válvula de injeção que suporta pressão de 15.000 psi, e uma válvula comutadora que é utilizada para acoplar a coluna RAM-BSA e a coluna da segunda dimensão.

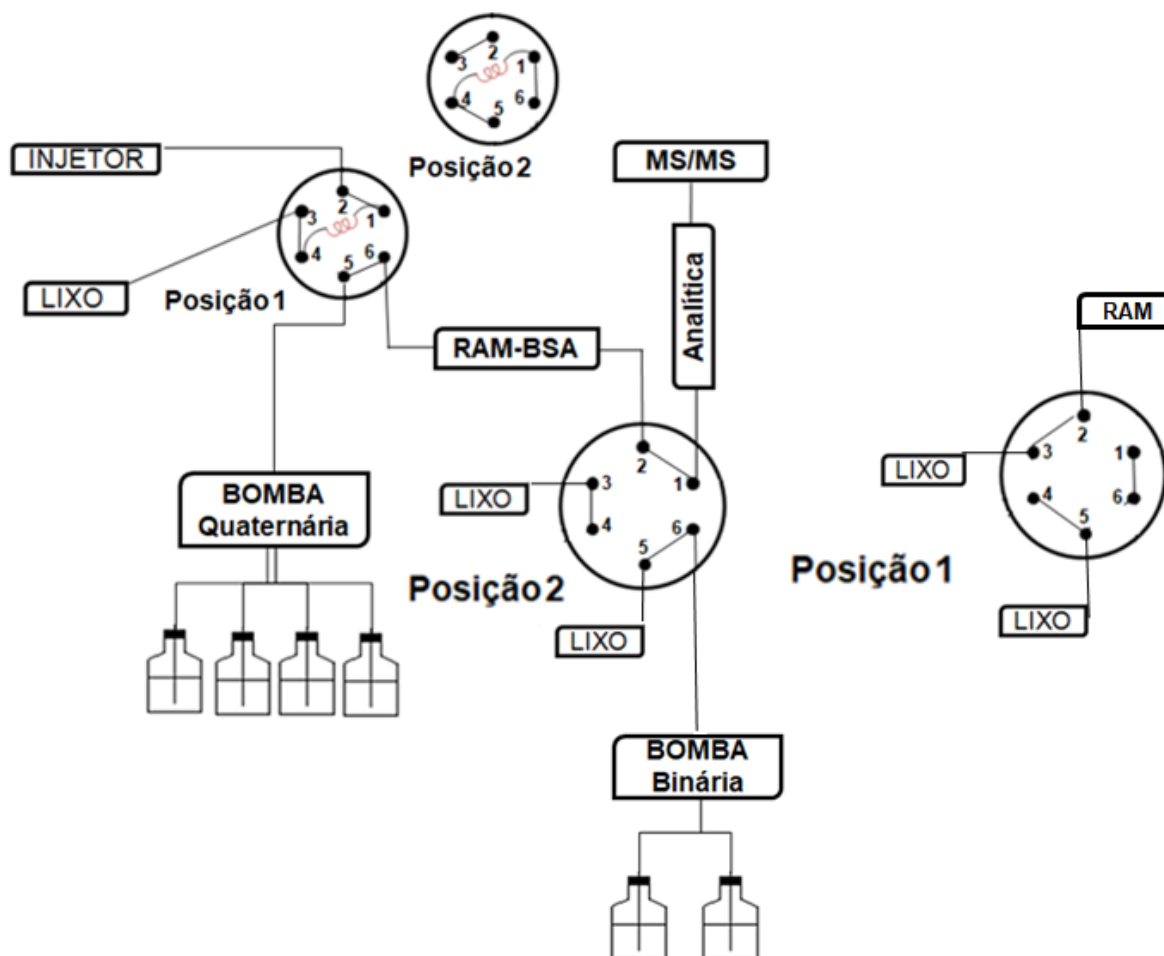


FIGURA 4. 9. Esquema de válvulas utilizado para as análises no sistema 2D LC-MS. Posição 1: sistema desacoplado (etapa de exclusão) e Posição 2: sistema acoplado (etapa de transferência) (Adaptado de SIMÕES⁵⁵)

A Figura 4.10 representa a comparação dos cromatogramas no modo 1D e 2D. Ao comparar os modos, podemos constatar um ganho significativo de sensibilidade para a BP-1 e BP-3, entretanto não houve grandes alterações para a BP-4, então foram testados alguns parâmetros para melhorar as condições cromatográficas. Dentre eles, pH da fase móvel, uso de tampão, outras colunas

analíticas na segunda dimensão e porcentagem de solvente orgânico na fase de exclusão proteica.

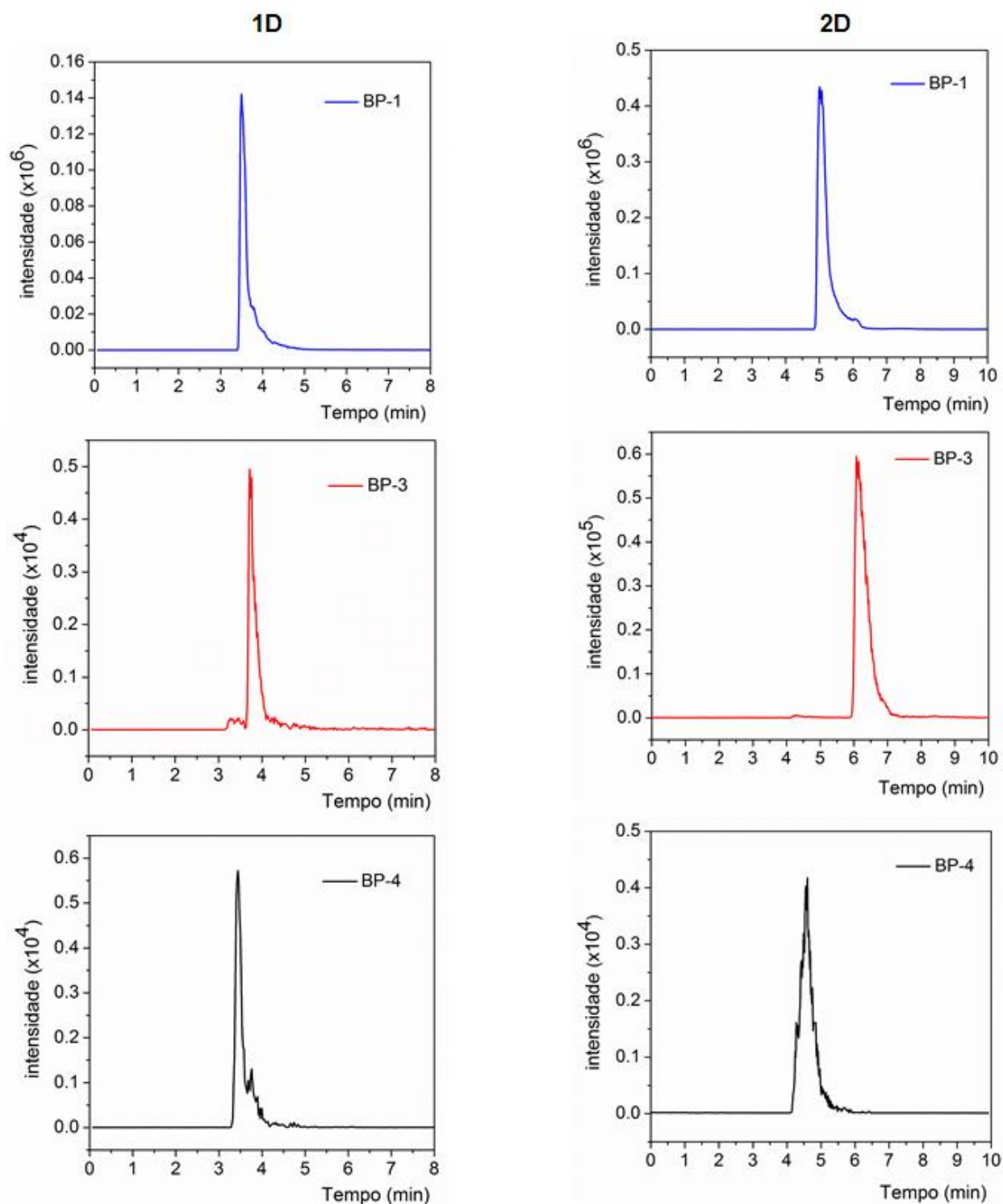


FIGURA 4. 10. Comparação dos cromatogramas referentes aos modos 1D e 2D utilizando a Coluna 2. Leite materno fortificado com 1000 ng/mL dos analitos.

4.5. Otimização das condições cromatográficas

Usualmente é sabido que, na maioria dos casos a fase móvel utilizada em sistemas LC–MS é composta por água e algum modificador orgânico (metanol ou acetonitrila). O uso de soluções tampão e aditivos são comumente utilizados com o intuito de melhorar a separação cromatográfica e a ionização dos analitos. Todos os testes aqui mencionados, foram realizados no modo unidimensional, apenas utilizando a Coluna 2, para observar a resposta da eficiência cromatográfica e ionização dos analitos. A Tabela 4.3 resume todos os experimentos realizados, juntamente do resumo dos resultados encontrados e discutidos abaixo.

Primeiramente, foi avaliado o uso de acetonitrila como modificador orgânico pelo fato de ser um solvente polar aprótico e promover diferentes interações. Não houve resultados satisfatórios visto, que apresentaram uma baixa eficiência cromatográfica, levando à um alargamento das bandas, diminuindo a sensibilidade, o cromatograma está representado no Anexo I (Figura A.1).

Foi realizado também o uso de aditivos voláteis (ácido fórmico e hidróxido de amônia) a fim de favorecer a ionização, promovendo melhor resposta analítica, entretanto, o uso de NH_4OH não ionizou completamente a BP-4 e utilizando HCOOH a ionização da BP-3 foi prejudicada. A Figura A.2 do Anexo I ilustra os resultados.

Quando se trata em melhorar a eficiência no processo de ionização é imprescindível que o analito esteja completamente ionizado em solução. Logo, para substâncias ácidas, recomenda-se o uso de soluções com valores de pH de 1,5 unidades acima do valor do pKa (constante de dissociação ácida) dos analitos favorecendo a desprotonação. E para substâncias básicas aconselha-se soluções com valores de pH de 1,5 unidades abaixo do valor do pKa dos analitos⁸⁸. Visto que o pKa das benzofenonas estão em torno de 7,5 foi estudado o uso de solução tampão acetato e formiato de amônio no pH 9, concentração de 5 mM como fase móvel. Não houve diferença na ionização em relação ao uso dos dois tampões examinados (Figura 4.11). Comparando os resultados entre as Figuras 4.10 (experimento realizado tendo $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ como fase móvel) e as Figuras 4.11 (fase móvel, tampão/ MeOH) percebe-se um ganho em sensibilidade para a BP-3 utilizando tampão acetato de amônio (5 mM e pH9)/ MeOH , sendo esta selecionada como fase móvel.

TABELA 4. 3. Resumos dos experimentos realizados para otimização das melhores condições cromatográficas.

1 D	Aditivos orgânicos	HCOOH NH ₄	✗
	Controle de pH	Tampão Acetato de amônio 5mM e pH 9	✓
		Tampão Formiato de amônio 5mM e pH 9	✗
	Modificador orgânico	Acetonitrila	✗
	Solvente orgânico na exclusão	2 % de MeOH	✗
		5 % de MeOH	✓
2 D	Colunas analíticas ortogonais	Acquity CSH, Cortecs C18+, Symetry C18, Acquity Phenyl, Acquity HSS T3	HSS T3

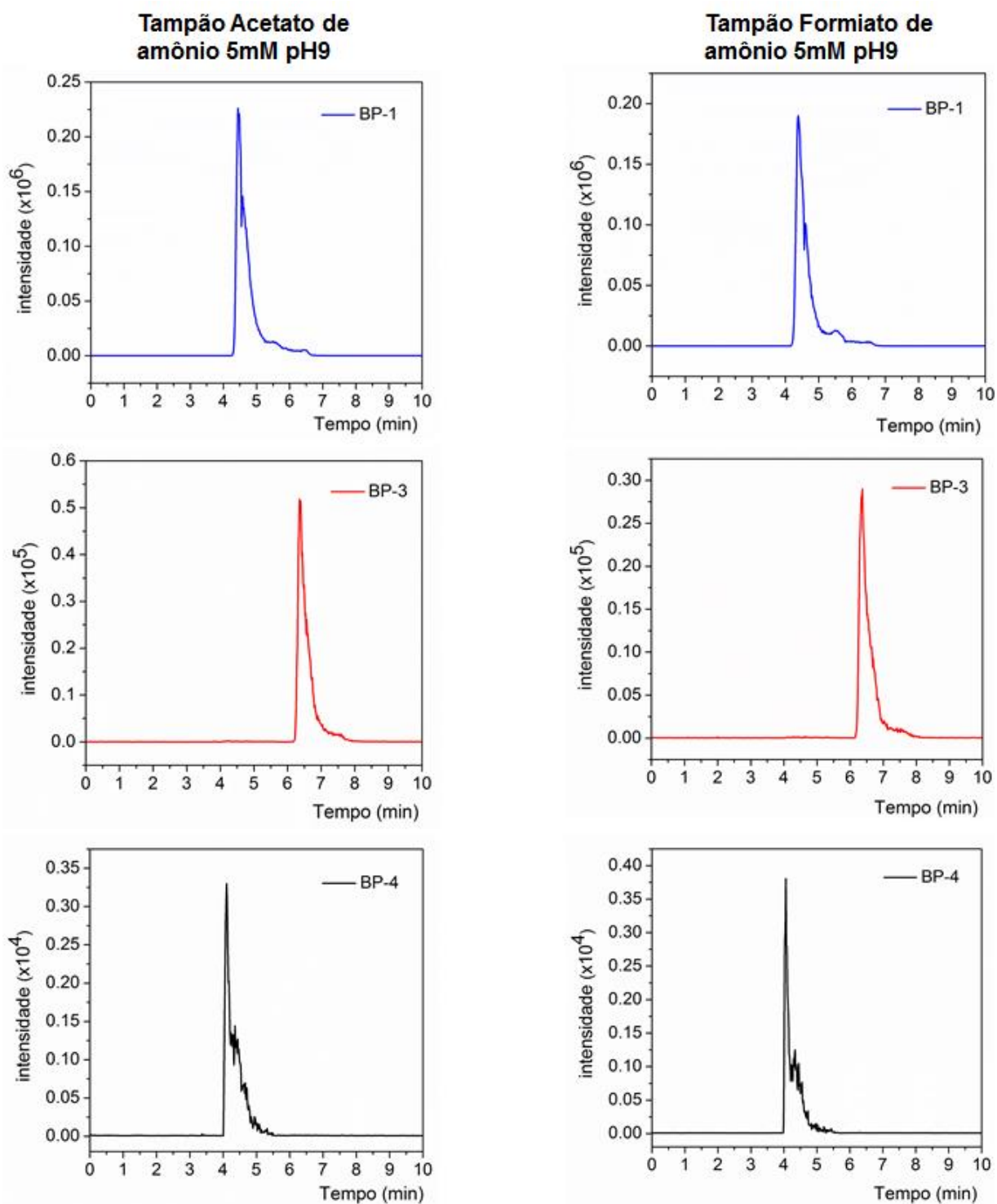


FIGURA 4. 11. Cromatogramas obtidos utilizando tampão acetato e formiato de amônio, analisados com a Coluna 2. Leite materno fortificado com 1000 ng/mL dos analitos.

Visto que solução tampão de acetato de amônio (5 mM e pH 9) apresentou resultados melhores que utilizando água, testou-se então, substituir metanol por acetonitrila, mas houve alargamento das bandas cromatográficas,

perdendo sensibilidade do método, o cromatograma encontra-se no Anexo I (Figura A.3).

Foram avaliadas colunas ortogonais na segunda dimensão. Os valores de ortogonalidade (F_s) para cada coluna foram adquiridos por um software livre da Farmacopeia Americana ¹⁰⁵ que se fundamenta no modelo de subtração hidrofóbica desenvolvido por Snyder ¹⁰⁶ e colaboradores. Para valores de $F_s \leq 3$ as colunas são consideradas equivalentes, $3 < F_s < 10$ são similares e colunas com $F_s > 10$ são ortogonais ¹⁰⁷. Sendo assim, a coluna HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,7 μ m) foi escolhida para ser comparada a outras 4 colunas, sendo elas: coluna Acquity CSH (100 x 2,1 mm, 1,7 μ m) similar ($F_s = 5,85$), Symetry C18 (50 x 2,1 mm, 3,5 μ m), Acquity BEH Phenyl (100 x 2,1 mm, 1,7 μ m) e Cortecs C18+ (100 x 2,1 mm, 2,7 μ m) ortogonalmente diferentes. Os cromatogramas estão representados no Anexo I (Figura A.4 e 5). A coluna analítica HSS T3 foi mantida por ela permitir bandas mais estreitas, aumentando a sensibilidade do método e também por possibilitar, se necessário, o uso de 100% de água como fase móvel.

De modo geral, muitos analitos possuem forte interação com proteínas de matrizes biológicas, por essa razão, a adição de pequenas quantidades ($\leq 5\%$) de solventes orgânicos na fase móvel de exclusão proteica às vezes é necessária, evitando as possíveis interações analito/proteína ⁵⁶. Desta forma, estudou-se a exclusão das proteínas com tampão acetato (5 mM e pH 9) com 2% e 5% de metanol. O uso de 5% de MeOH proporcionou um ganho de sensibilidade para a BP-3 e promoveu um menor tempo de separação (Figura 4.12).

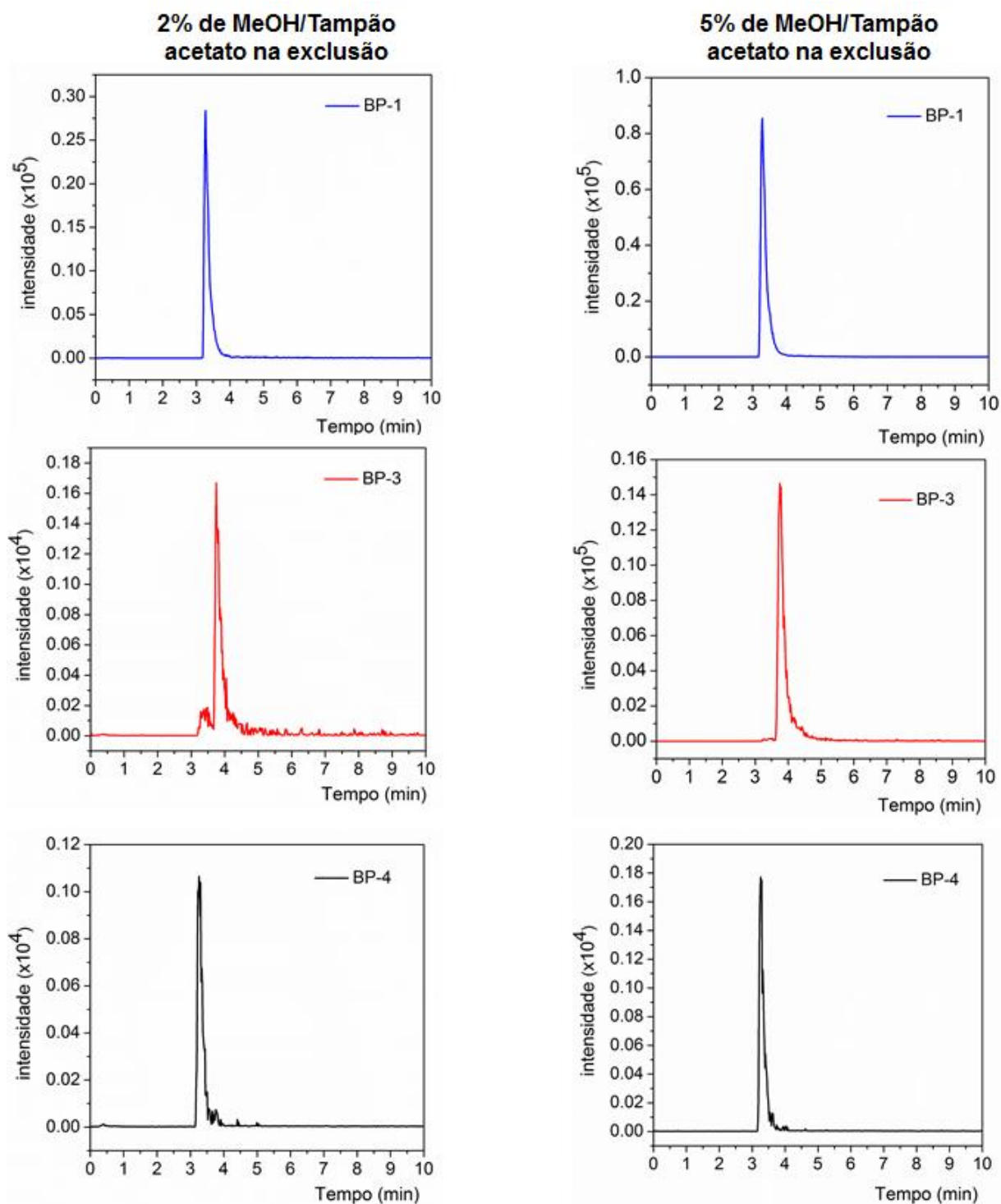


FIGURA 4. 12. Comparação entre o uso de 2 e 5% de MeOH na fase de exclusão proteica, utilizando a Coluna 2. . Leite materno fortificado com 1000 ng/mL dos analitos.

Estabelecidas às condições de exclusão e separação, que estão resumidas na Tabela 4.4, partiu-se para o acoplamento entre as colunas RAM (2) e HSS T3, entretanto os resultados não apresentaram repetibilidade, havendo duplicação das bandas cromatográficas, conforme a Figura 4.13.

TABELA 4. 4 - Condições cromatográficas estabelecidas para exclusão e separação dos analitos.

Tempo (min)	Fase móvel	Proporção da fase móvel (v/v)	Evento
0 – 2,5	MeOH /Tampão acetato (5mM pH9)	5:95	Exclusão das macromoléculas
2,5 - 10	MeOH /Tampão acetato (5mM pH9)	80:20	Eluição dos analitos
10 - 12	MeOH	100	Limpeza da RAM
12 - 15	MeOH /Tampão acetato (5mM pH9)	5:95	Condicionamento da coluna

Vazão 0,4 mL/min e volume de injeção de 10 μ L

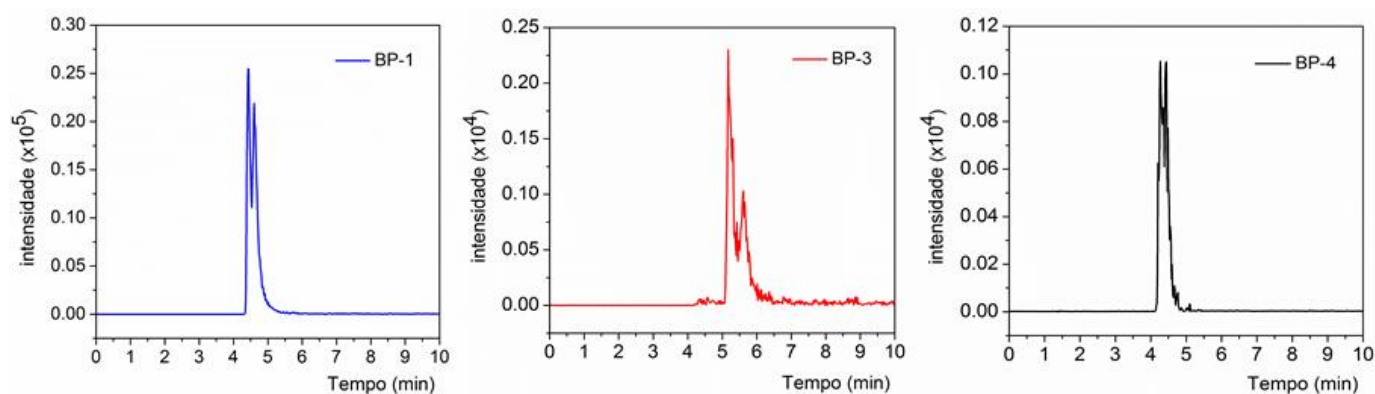


FIGURA 4. 13. Cromatograma obtido da análise no modo unidimensional utilizando a Coluna 2, referente as condições cromatográficas descritas na Tabela 4.3. Leite materno fortificado com 1000 ng/mL dos analitos.

4.6. Nova condição de otimização de ionização

Visto que, as primeiras condições de ionização para as benzofenonas foram realizadas utilizando MeOH/H₂O como fase móvel, e talvez os analitos não estavam ionizando em suas melhores condições, o que pode explicar a falta de repetibilidade dos resultados, optou-se por estabelecer novas condições de ionização.

Para a nova otimização das condições de ionização, soluções aquosas individuais de cada composto (1000 ng/mL), foram infundidas no sistema no modo combinado com vazão de 50 μ L/min de MeOH/tampão acetato de amônio (5 mM e pH9) (80:20 v/v) vinda do sistema cromatográfico combinada com uma vazão de 5 μ L/min da bomba seringa contendo as soluções aquosas. A Tabela 4.5 apresenta as

novas condições estabelecidas para ionização e fragmentação das benzofenonas no modo negativo (BP-1 e BP-4) e positivo (BP-3), realizadas manualmente, levando em consideração a estabilidade dos íons gerados.

O espectrômetro de massa operou no modo *full scan* e duas transições de cada analito foram selecionadas, as utilizadas para quantificação foram: para a BP-1 a m/z 213,10 < 90,89, para a BP-3 m/z 228,02 < 150,96 e para a BP-4 o fragmento m/z 307,03 < 210,93.

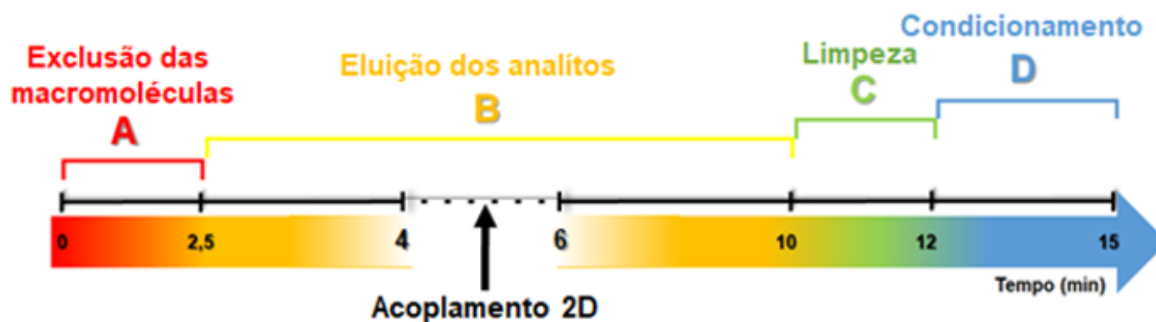
TABELA 4. 5. Novas condições de ionização e fragmentação para as benzofenonas.

Parâmetros de ionização	Compostos	Formula molecular	Massa molecular	Íon precursor (m/z)	Fragmentos (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)	Modo de ionização	
Voltagem do capilar (kV)	2,50	BP-1	C13H10O3	214,02	213,10	90,89 134,95	30	25	Negativo
Temperatura de dessolvatação (°C)	300	BP-3	C14H12O3	229,02	228,02	104,97 150,96	30	20	Positivo
Vazão do gás de dessolvatação (L/h)	600	BP-4	C14H12O6S	308,03	307,03	181,94 210,93	30	35	Negativo

Após estabelecer as novas condições de ionização repetiram-se as análises anteriores e houve repetibilidade. No entanto, para uma limpeza mais eficiente a fase móvel de limpeza da coluna RAM-BSA foi trocada para uma mistura de solventes (MeOH/H₂O/2- propanol). As duas colunas foram mantidas a 40 °C para evitar qualquer variação de temperatura no sistema. A Figura 4.15 ilustra os resultados obtidos para o modo 2D-LC. Ao se comparar com os resultados obtidos com o modo unidimensional observa-se um estreitamento das bandas cromatográficas, levando a um aumento de sensibilidade no método, podendo utilizar menores concentrações de trabalho.

A Figura 4.14 representa as condições cromatográficas definidas para o método. O tempo e a fase de limpeza da coluna RAM-BSA ficaram definidos como MeOH/H₂O/2- propanol 75:20:5 de 10-12 min e condicionamento da coluna entre 12-

15 min com MeOH /Tampão acetato (5mM pH9) 95:5. Para a posição das válvulas, ver Figura 4.9



Bomba 1: Coluna 2

(A) MeOH/ Acetato de amônio (5 mM; pH 9) (5:95 v/v)

(B) MeOH/ Acetato de amônio (5 mM; pH 9) (80:20 v/v)

(C) MeOH/H₂O/ISO (75:20:5 v/v/v)

(D) MeOH/ Acetato de amônio (5 mM; pH 9) (5:95 v/v)

Vazão: 0,4 mL/min

Bomba 2: Coluna analítica HSS T3

MeOH/Acetato de amônio (5 mM; pH 9) (80:20 v/v)

Vazão: 0,4 mL/min

FIGURA 4. 14. Esquema das condições cromatográficas definidas para o método.

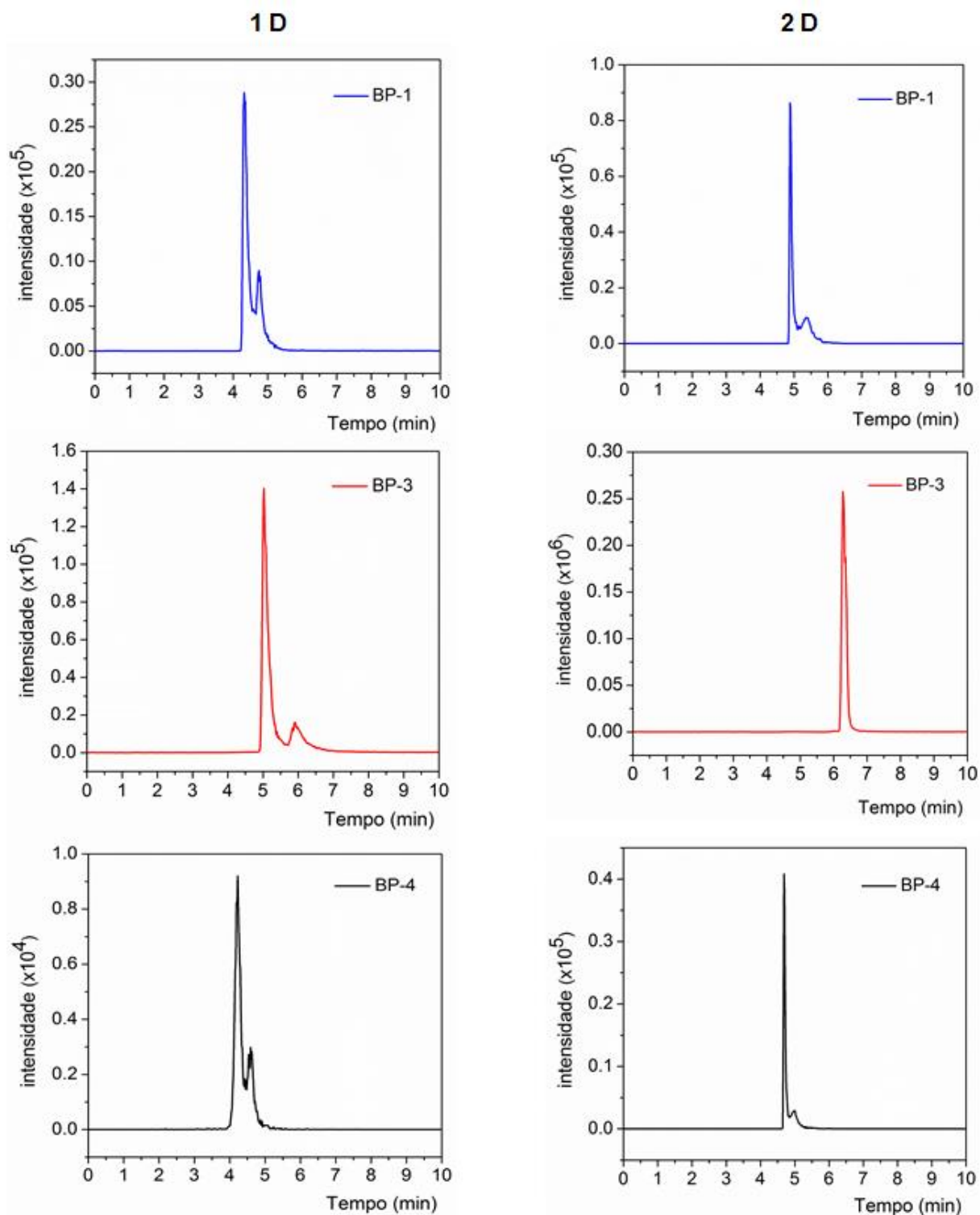


Figura 4. 15. Cromatograma obtido na separação dos analitos no modo multidimensional, utilizando a Coluna 2 e a coluna HSS T3. Leite materno fortificado com 1000 ng/mL dos analitos.

Como os resultados utilizando a Coluna 2 foram bastante satisfatórios e como a coluna estava sendo usada apenas como extratora a mesma condição cromatográfica foi utilizada com a Coluna 1, no entanto, com a mudança no

procedimento acarretou na perda de ionização da BP-3 na segunda dimensão. A Figura A.6 do Anexo I ilustra os resultados obtidos.

4.7. Influência de diferentes misturas de solvente no Efeito de matriz

O leite materno é composto em sua grande parte por proteínas, lipídeos e oligossacarídeos, como já mencionados anteriormente, e esses constituintes podem afetar na extração dos analitos na matriz e, portanto, a detecção dos mesmos. Desta forma, diferentes misturas de solventes foram avaliadas para melhorar a extração dos analitos da matriz e diminuir o efeito de matriz. Foram avaliados como solvente de extração: 100% de acetonitrila; 100% de 2-propanol; acetonitrila/2-propanol (30:70 v/v); 2-propanol/acetonitrila (70:30 v/v) e acetonitrila/2-propanol (50:50 v/v), os cromatogramas estão no Anexo I (Figuras A.7 -e A. 8).

Foram selecionados 100% de acetonitrila, 100% de 2-propanol e acetonitrila/2-propanol (50:50 v/v) para estudo do EM, RE, EP com base em Trufelli e colaboradores⁹³ por levarem a uma melhor ionização dos analitos e uma maior sensibilidade. A Tabela 4.6 ilustra os resultados obtidos quando foi utilizada a mistura de solventes acetonitrila/2-propanol (50:50 v/v). Observou-se EM menos pronunciado, porém ainda com baixa RE e EP.

TABELA 4. 6. Valores obtidos do no estudo de ME para a análise de benzofenonas em leite materno.

Analitos	Solvente	Efeito de matriz (%)	Recuperação (%)	Eficiência do processo (%)
BP-1		(-) 21	26,1	20,5
BP-3	2-propanol	(+) 11	8,4	9,3
BP-4		(-) 19	67,1	54,6
BP-1		(-) 12	36,1	32,0
BP-3	Acetonitrila	(+) 46	8,0	11,7
BP-4		(+) 14	67,6	77,0
BP-1	Acetonitrila:	(+) 6,0	21,9	23,3
BP-3	2-propanol	(+) 13	6,0	6,8
BP-4	(50:50 v/v)	(-) 4,0	213	205

Cabe ressaltar aqui que para avaliação do efeito de matriz em métodos com extração *on-line* a *European Medicines Guideline* (EMA)¹⁰⁸ sugere a análise de

no mínimo seis lotes diferentes da matriz fortificados nas concentrações estabelecidas para o controle de qualidade baixo e alto. O coeficiente de variação entre as amostras não deve ser superior a 15%. Porém não foi possível realizar este experimento devido a identificação do efeito memória entre as análises.

4.8. Identificação do efeito memória

Em cromatografia, o efeito de memória é um parâmetro importante a ser analisado, pois é onde as substâncias de interesse aparecem nas injeções de amostra “branco” (matriz sem a presença dos analitos). Quando muito pronunciado, compromete a repetibilidade do método. O efeito memória, de acordo com a EMA deve ser analisado injetando-se amostras brancas, após a injeção da amostra de maior concentração, não podendo ser maior que 20% do limite de quantificação. Este valor é encontrado pela relação das bandas cromatográficas da amostra fortificada com a amostra branco.

Depois de estabelecido as melhores condições cromatográficas, ionização e melhor solvente para extração dos analitos na matriz, foi avaliado o limite de quantificação para as benzofenonas nas seguintes concentrações: 5,0; 10; 25; 50; 100; 250; 500 e 1000 ng/mL. As amostras foram preparadas em triplicata, em leite materno e adicionados 100 µL da mistura de acetonitrila e 2-propanol (50:50) e injetados 10 µL. Contudo, na injeção do branco foi observada a presença da BP-3, 91% acima da área encontrada na amostra de menor concentração (5,0 ng/mL), indicando efeito memória. Os resultados encontrados estão ilustrados na Figura 4.16.

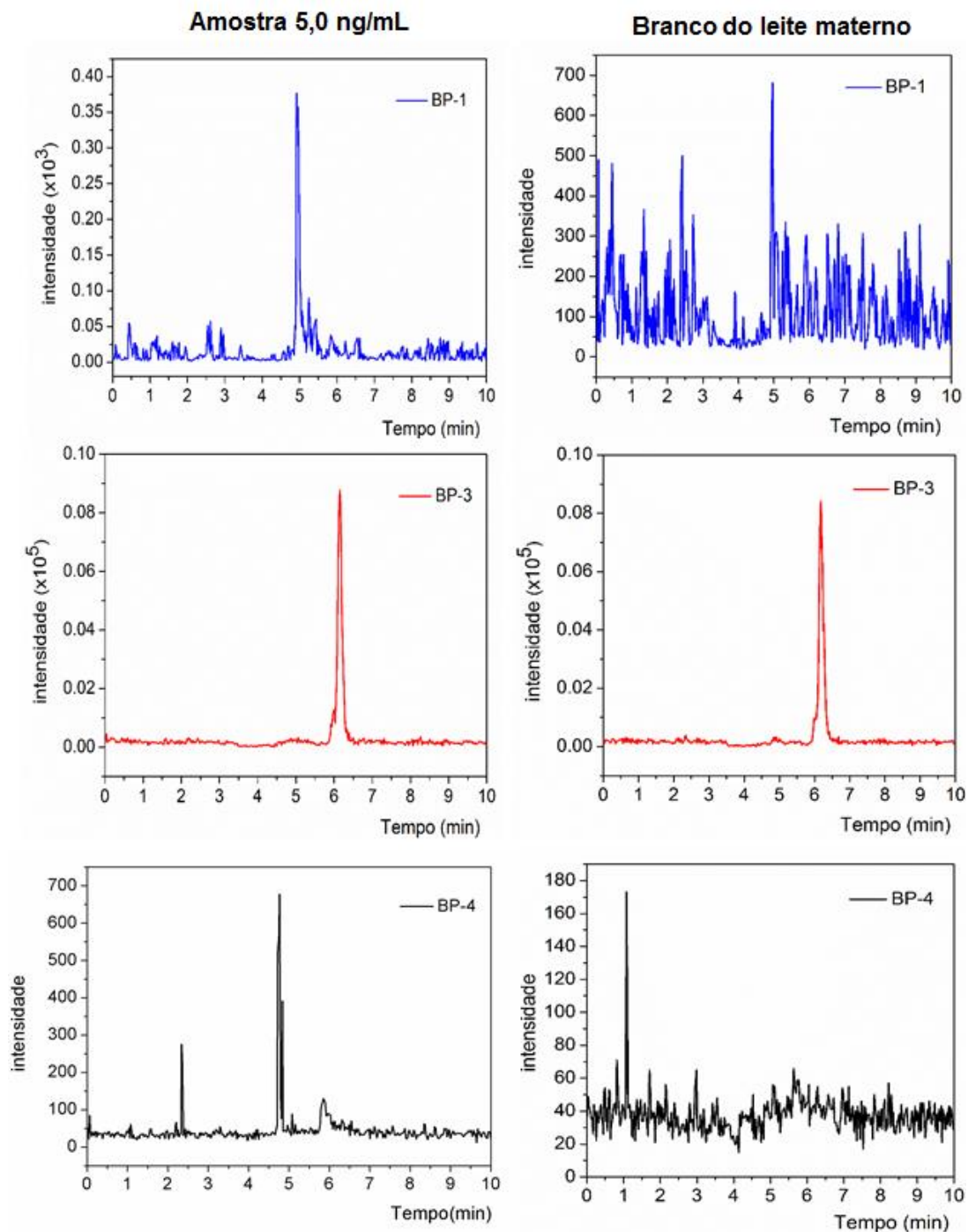


Figura 4. 16. Cromatogramas da comparação entre o leite materno fortificado com 5,0 ng/mL dos analitos e leite materno branco.

Diante da identificação do efeito memória, alguns estudos foram realizados para solucionar esse obstáculo. Inicialmente investigou-se a composição dos solventes do sistema de lavagem da seringa e da alça de injeção (*loop*) do auto-injetor. Verificou-se que utilizando uma mistura de metanol/2-propanol/água (75:20:5 v/v/v; 0,2% de ácido fórmico) como solvente forte e água ultrapura (10% de etanol) como solvente fraco, proporcionaram uma diminuição do efeito memória.

Foi avaliado também o tempo de limpeza da coluna RAM após a eluição das benzofenonas, e a adição de ácido fórmico na fase de limpeza, mas não houve influência na diminuição do efeito memória.

Outro fator avaliado foi o número de lavagens da seringa e da alça de injeção. Desta forma aumentou-se o número para 5 vezes a lavagem com o solvente forte e 5 vezes com o solvente fraco. Este procedimento proporcionou também uma melhora no efeito memória. O último parâmetro estudado foi a adição de baixos percentuais de DMSO (dimetilsulfóxido) ($\leq 5\%$) aos solventes da fase móvel com o intuito de sanar o efeito memória^{109,110}. Sendo assim, foi adicionado primeiramente DMSO apenas no solvente forte de limpeza da agulha e alça de injeção, mas não houve diminuição significativa do sinal, então adicionou-se o DMSO na fase móvel, em 2%, mas nessa percentagem houve prejuízo da ionização dos analitos (Ver Anexo I, Figura A.9).

Posteriormente todos os estudos de limpeza, as válvulas foram lavadas em todos os caminhos, os frascos de fase móvel foram lavados com DMSO, o capilar também foi lavado. A Figura 4.17 ilustra os cromatogramas obtidos nos canais de monitoramento para BP-1, BP-3 e BP-4. Após limpeza de todo o sistema, as massas referentes aos analitos não foram encontradas.

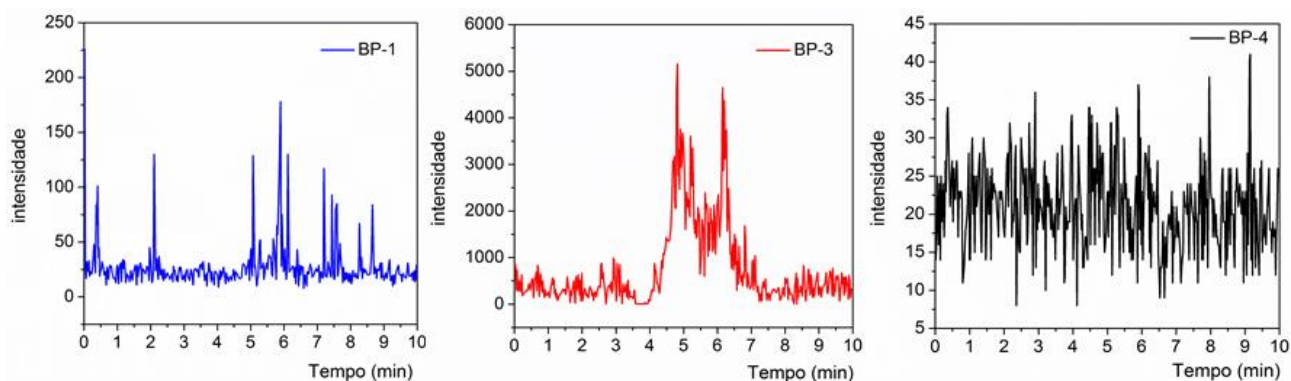


FIGURA 4. 17. Cromatograma do leite materno branco, indicando que o sistema e a Coluna 2 foram limpos.

4.9. Uso do leite bovino como substituto

Dentre todos os experimentos realizados, foi observado que a aparição das bandas dos analitos em amostras de leite materno branco era devido ao efeito memória, sendo assim foi realizado uma comparação entre o leite bovino (isento das

benzofenonas) e o leite materno a fim de identificar se a contaminação maior era proveniente do sistema ou se a matriz, usada como referência já estava contaminada com as benzofenonas. A Figura 4.18 ilustra a comparação dos cromatogramas do leite materno e leite bovino e percebe-se que há presença da BP-3 no leite materno, indicando que a matriz estudada já estava contaminada com o analito de interesse.

Como a matriz estava contaminada com o analito de interesse, foi utilizado o leite bovino desnatado como substituído do leite materno para distinguir nas análises o que era sinal relacionado à contaminação do problema de efeito memória. Optou-se também pela redução da concentração da solução de trabalho de 1000 para 200 ng/mL a fim de diminuir o efeito memória no sistema. Desta forma, após mudar a matriz e certificarmos que o sistema estava limpo, uma nova análise do limite de quantificação foi realizada.

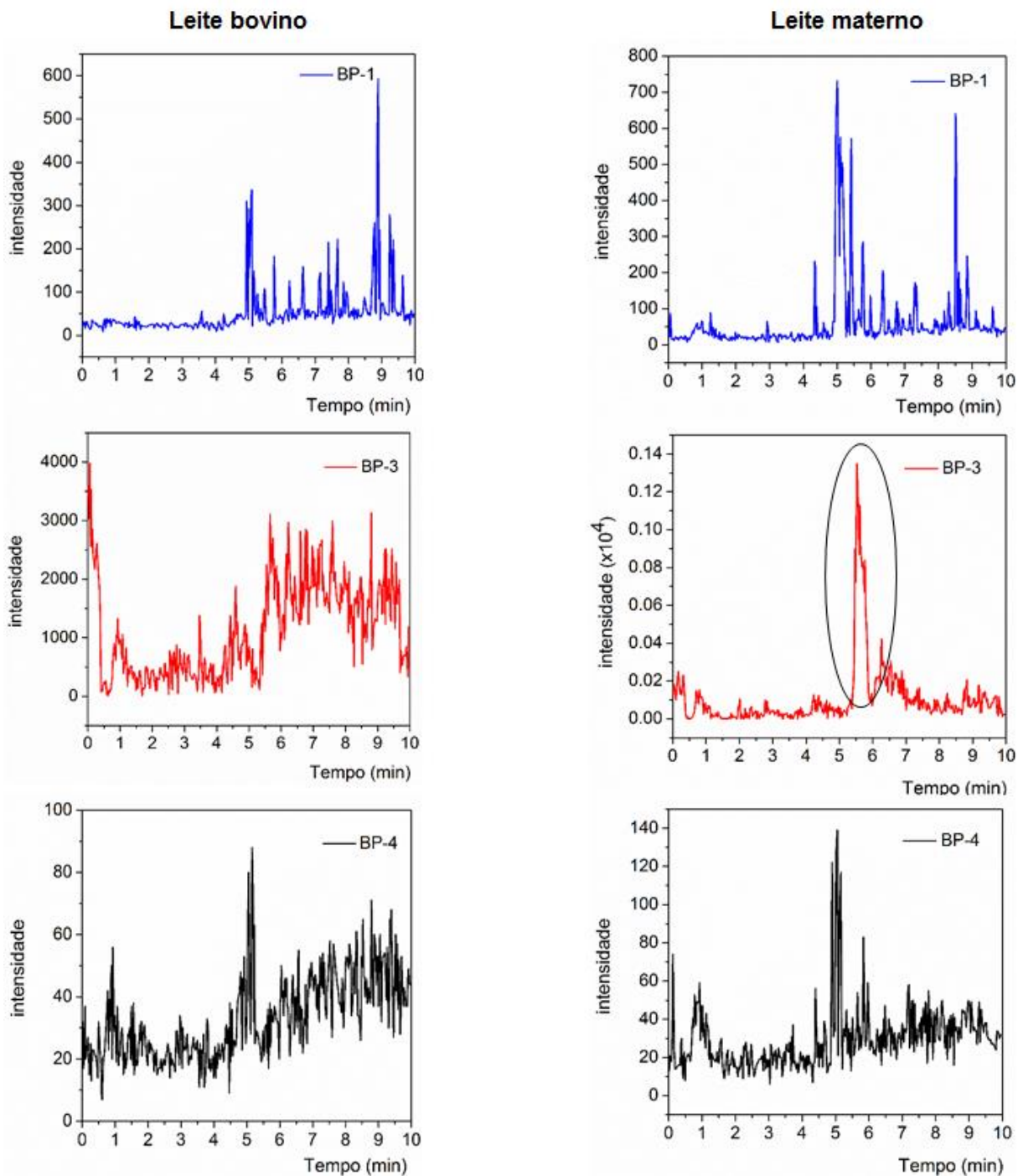


FIGURA 4. 18. Cromatograma da comparação entre o leite bovino desnatado e o leite materno.

Foi avaliado novamente o limite de quantificação para as benzofenonas nas seguintes concentrações: 1,0; 2,5; 5,0; 10; 20; 50; 100; 200 ng/mL. As amostras foram preparadas em triplicata, utilizando leite bovino desnatado e adicionados 100 μ L da mistura de acetonitrila e 2 - propanol e injetadas no volume de 10 μ L.

A Figura 4.19 ilustra, que a Coluna 2 perdeu eficiência cromatográfica. A comparação com os cromatogramas da Figura 4.14 exemplifica as diferenças. Os *frits* da coluna foram verificados, entretanto não foi observado nenhuma obstrução, porém, a fase estacionária apresentava *voids* em sua estrutura.

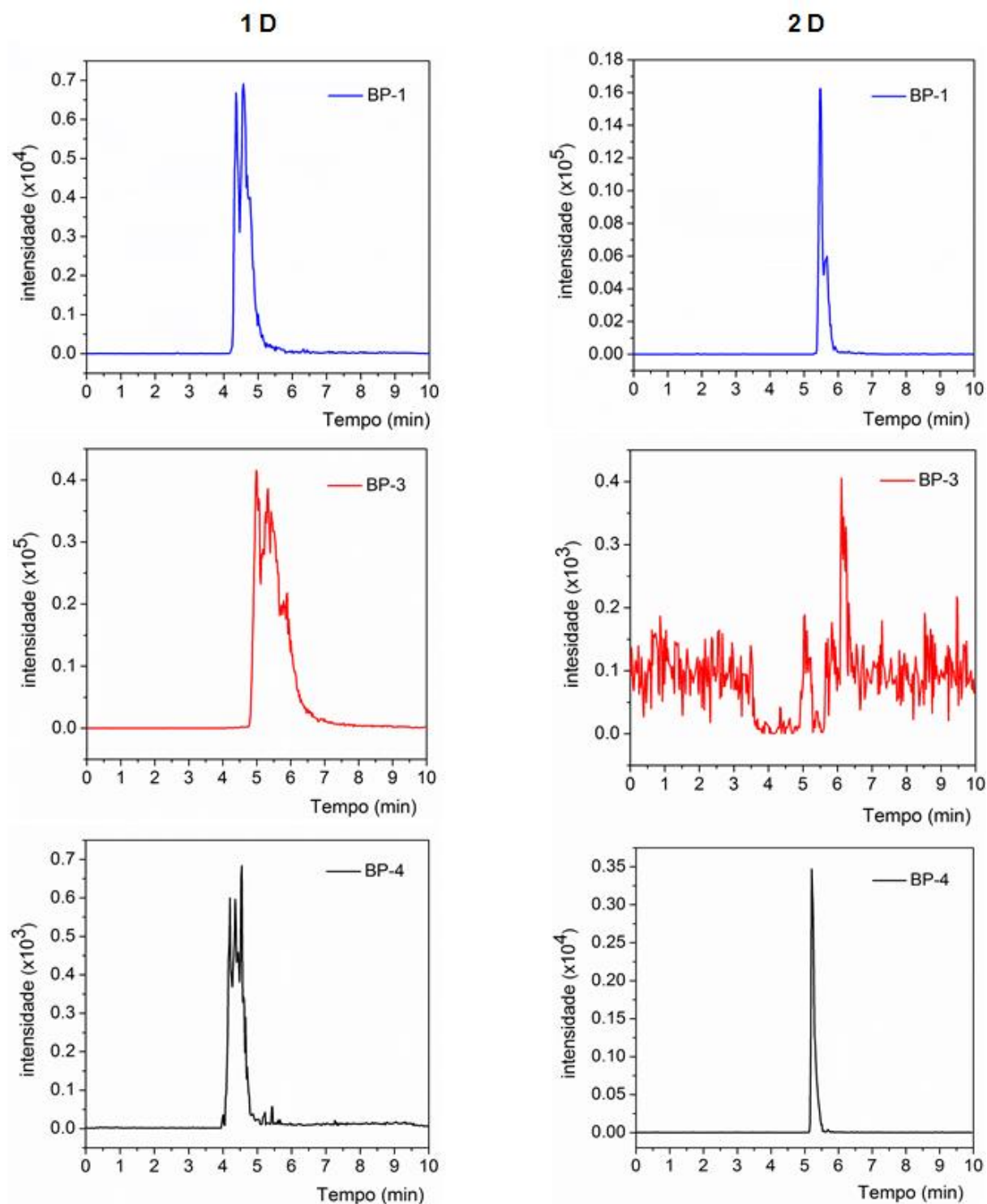


FIGURA 4. 19. Cromatogramas indicando a perda de eficiência cromatográfica da Coluna 2. Leite bovino desnatado fortificado com 200 ng/mL dos analitos.

Diante da perda da eficiência cromatográfica da Coluna 2, uma nova coluna RAM (Coluna 3), similar a Coluna 1, foi preparada. A nova coluna RAM preparada apresentou boa eficiência cromatográfica e o tempo de retenção dos analitos foi mantido (Figura 4.20), apresentando boa sensibilidade do método em uma concentração de 200 ng/mL, proporcionando o uso de concentrações menores para os testes de limite de quantificação e detecção.

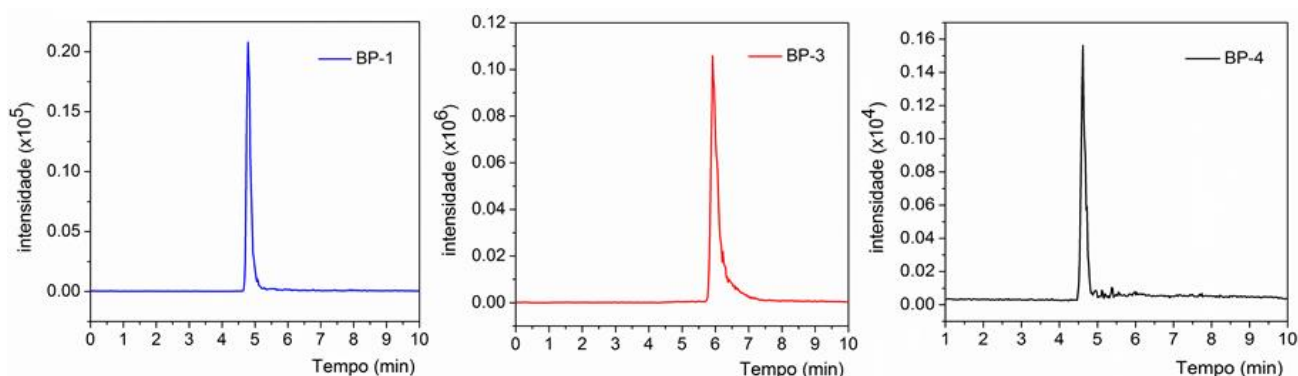


FIGURA 4. 20. Cromatograma do leite bovino desnatado fortificado com 200 ng/mL dos analitos, utilizando a Coluna 3 no modo unidimensional.

Apesar dos bons resultados da Coluna 3 no modo unidimensional, da diminuição da concentração de trabalho e da troca da matriz para o leite bovino, o problema do efeito memória continuava persistente. Uma vez que o leite bovino estava livre das benzofenonas, foi necessário investigar se este efeito memória era proveniente do sistema LC-MS ou da coluna RAM.

Após uma nova limpeza do sistema foi notado que a utilização de água, no lugar de tampão acetato de amônio, mascarou o efeito memória. Isto está relacionado à baixa ionização dos analitos devido ao baixo pH da fase móvel fazendo com que eles se encontrassem em sua forma protonada, justificando a continuação do uso de tampão acetato de amônio, pH 9, que proporciona uma melhor ionização, aumentando a sensibilidade do método (Ver Figura 4.21).

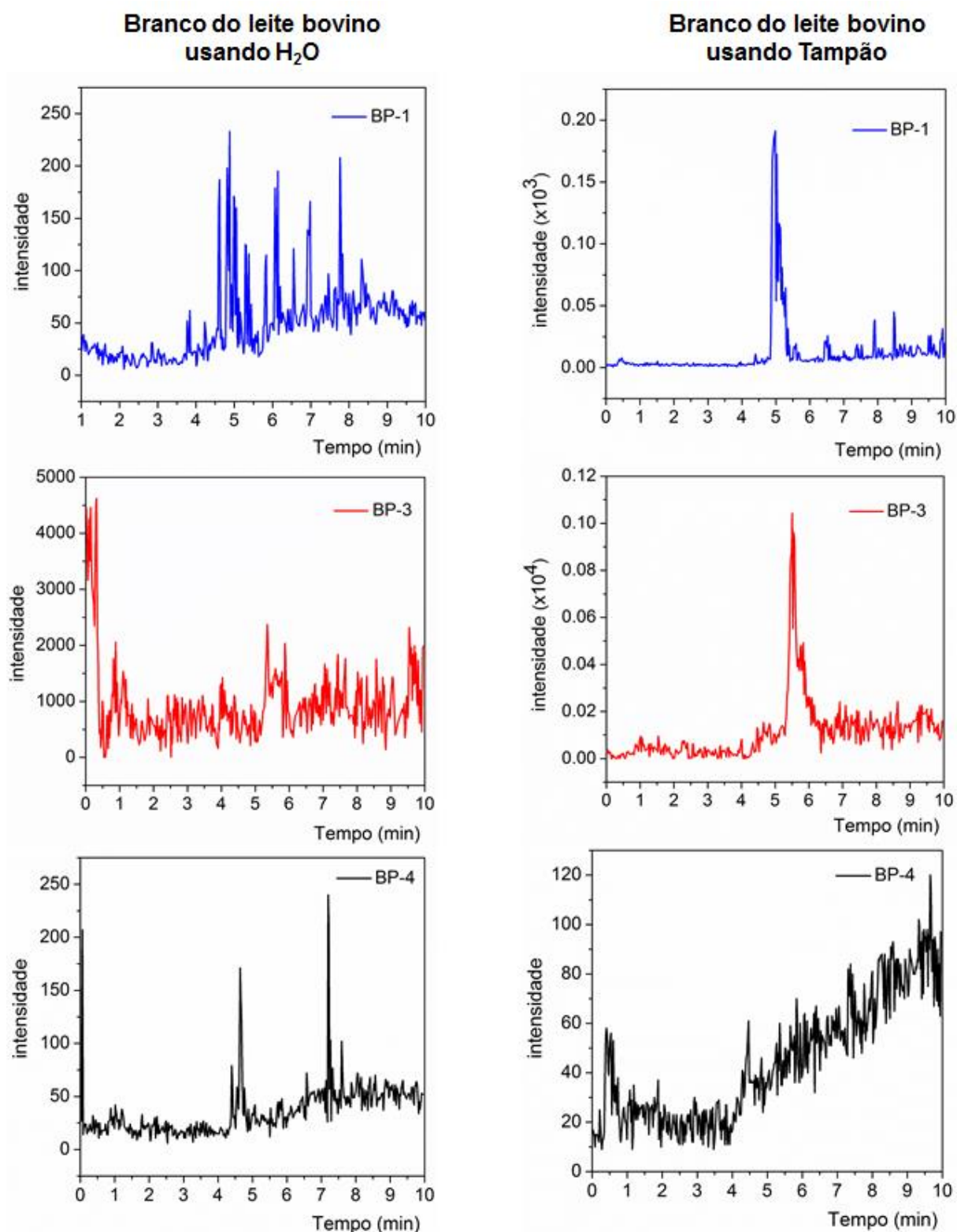


FIGURA 4. 21. Comparação entre o branco da amostra utilizando água como fase móvel e tampão acetato de amônio. Leite bovino desnatado fortificado com 200 ng/mL dos analitos.

Após a limpeza do equipamento e da Coluna 3, foi avaliado novamente o limite de quantificação nas seguintes concentrações: 1,0; 2,5; 5,0; 10; 20; 50; 100;

200 ng/mL. As amostras foram preparadas em triplicata, em leite bovino desnatado e adicionados 100 μL da mistura de acetonitrila e 2 - propanol e injetadas no volume de 10 μL .

Os cromatogramas apresentados na Figura 4.22, ilustram a perda da eficiência cromatográfica da Coluna 3 recém preparada, após injeção de apenas 240 μL do leite bovino desnatado fortificado com os analitos de interesse.

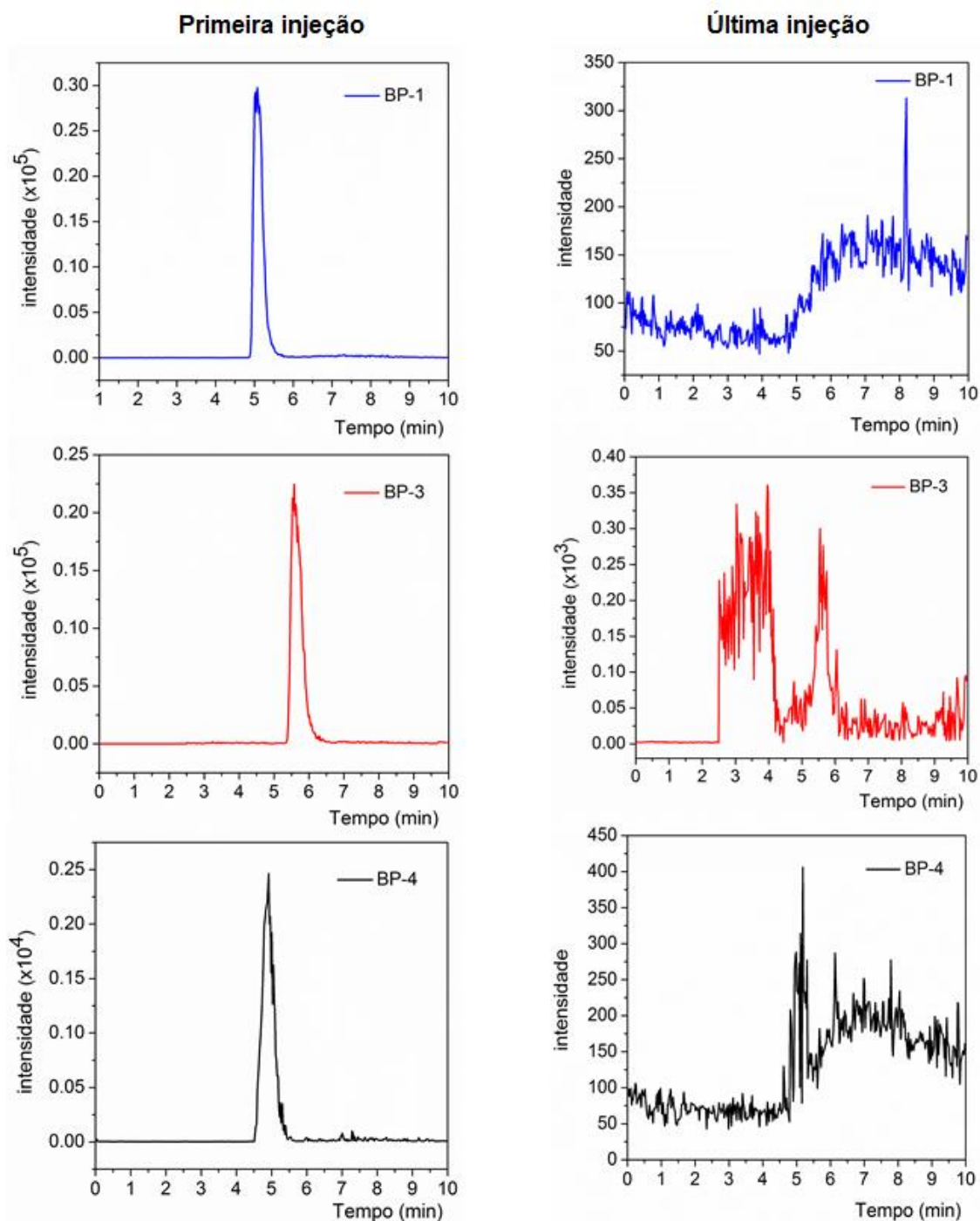


FIGURA 4. 22. Cromatogramas da comparação entre a primeiras e última injeção, indicando a perda da eficiência cromatográfica da Coluna 3. Leite bovino desnatado fortificado com 200 ng/mL dos analitos.

Dado que as condições cromatográficas utilizadas foram às mesmas mencionadas em testes anteriores (Figura 4.14) e que o volume de injeção do leite não é o suficiente para justificar sua perda de eficiência cromatográfica, ^{86,98} foi preparada uma nova coluna RAM (Coluna 4), similar as Colunas 1 e 3. A Coluna 4 também perdeu eficiência cromatográfica após pequeno volume de injeção de leite. O cromatograma está representado no Anexo I (Figura A.10).

4.10. Uso de uma fase alquila C8

Diante da perda de eficiência das Colunas 2,3 e 4 consideravelmente rápida, uma coluna comercial *Symetry* C8 (Coluna 5) foi usada para imobilizar BSA. O uso de uma fase hidrofóbica com grupo alquila menor poderia minimizar as interações entre os analitos, com características apolares, e a fase estacionária, podendo levar a uma diminuição do efeito memória, entretanto isso não foi observado.

A Figura 4.23 apresenta os resultados utilizando a coluna 5 no modo unidimensional, que levou a um estreitamento das bandas e, portanto, alta sensibilidade no método, nos permitindo diminuir a concentração maior de trabalho para 100 ng/mL. Porém, houve um aumento do efeito memória nessa fase estacionária, dificultando a limpeza entre uma injeção e outra, além do que a relação sinal ruído é maior do que o nível de ruído médio medido com a solução do branco.

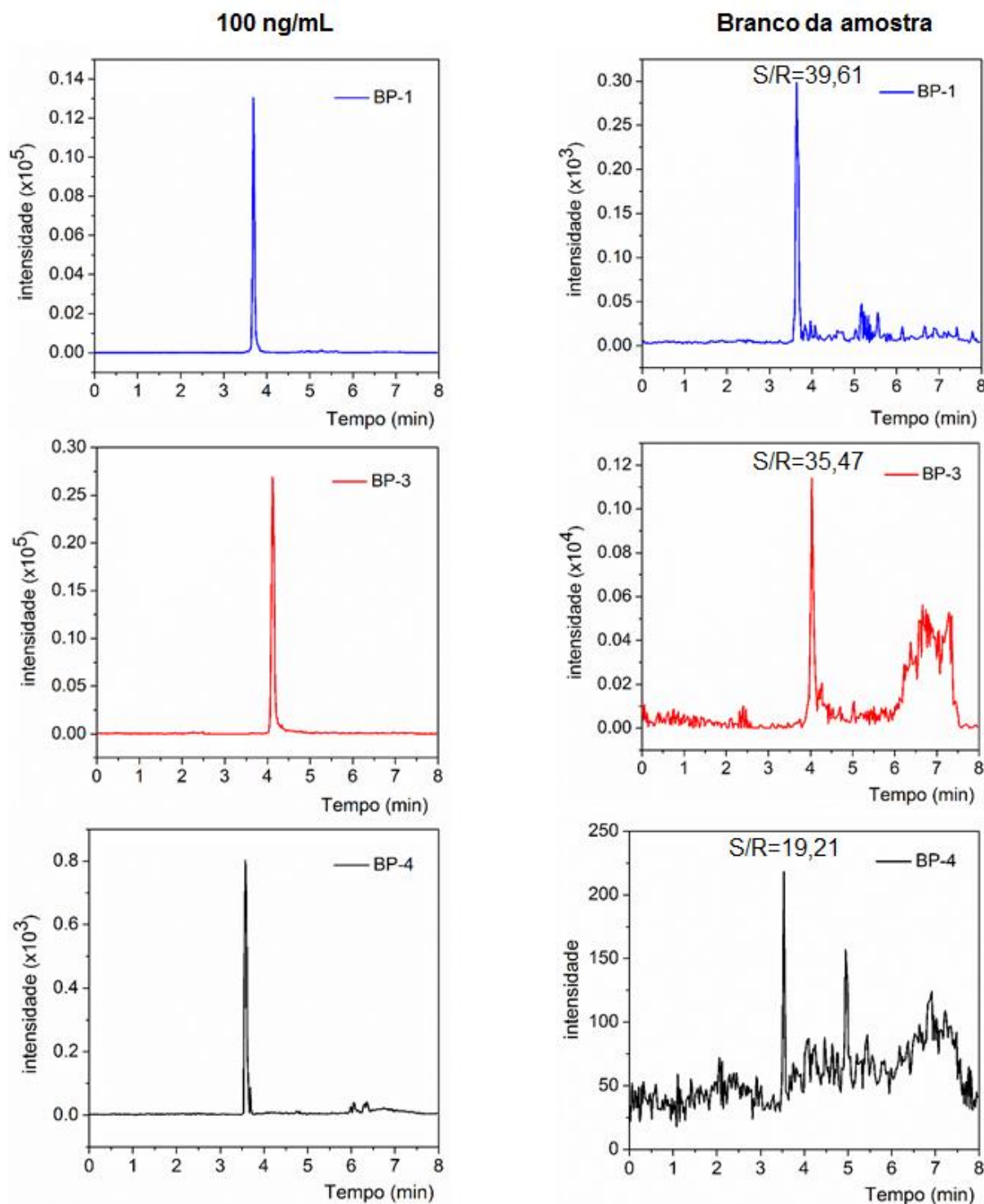


FIGURA 4. 23. Cromatograma da análise leite bovino desnatado fortificado com 100 ng/mL dos analitos, utilizando a Coluna 5, mostrando a relação sinal ruído da amostra branco.

Perante aos fatos mencionados e acreditando que as colunas RAM-BSA estavam sendo responsáveis pelo efeito memória, como prova de fato, o preparo de amostra por precipitação de proteína foi avaliado para quantificação com a coluna HSS T3, como coluna analítica.

4.11. Precipitação de Proteína

As colunas RAMs têm sido empregadas em nosso grupo de pesquisa para análises de substâncias em leite materno ^{85,100} e leite bovino ^{86,98}, porém as benzofenonas são as primeiras substâncias apolares estudada neste tipo de fase, logo esse tipo de substância possa influenciar, no efeito memória e na perda da eficiência cromatográfica. Sendo assim, a metodologia clássica de preparo de amostra, precipitação de proteína, foi avaliada para identificar os problemas envolvidos.

A Figura 4.24 refere-se aos cromatogramas da comparação do teste de preparo de amostra por precipitação de proteína e o branco da amostra (leite bovino), ilustrando os bons resultados obtidos na separação dos analitos pela coluna analítica Acquity HSS T3.

Os resultados apresentaram boa sensibilidade do método, indicando intensidade de sinais elevadas, em uma concentração de 200 ng/mL, entretanto, o efeito memória para a BP-1 e BP-3 se mostraram bastante pronunciados.

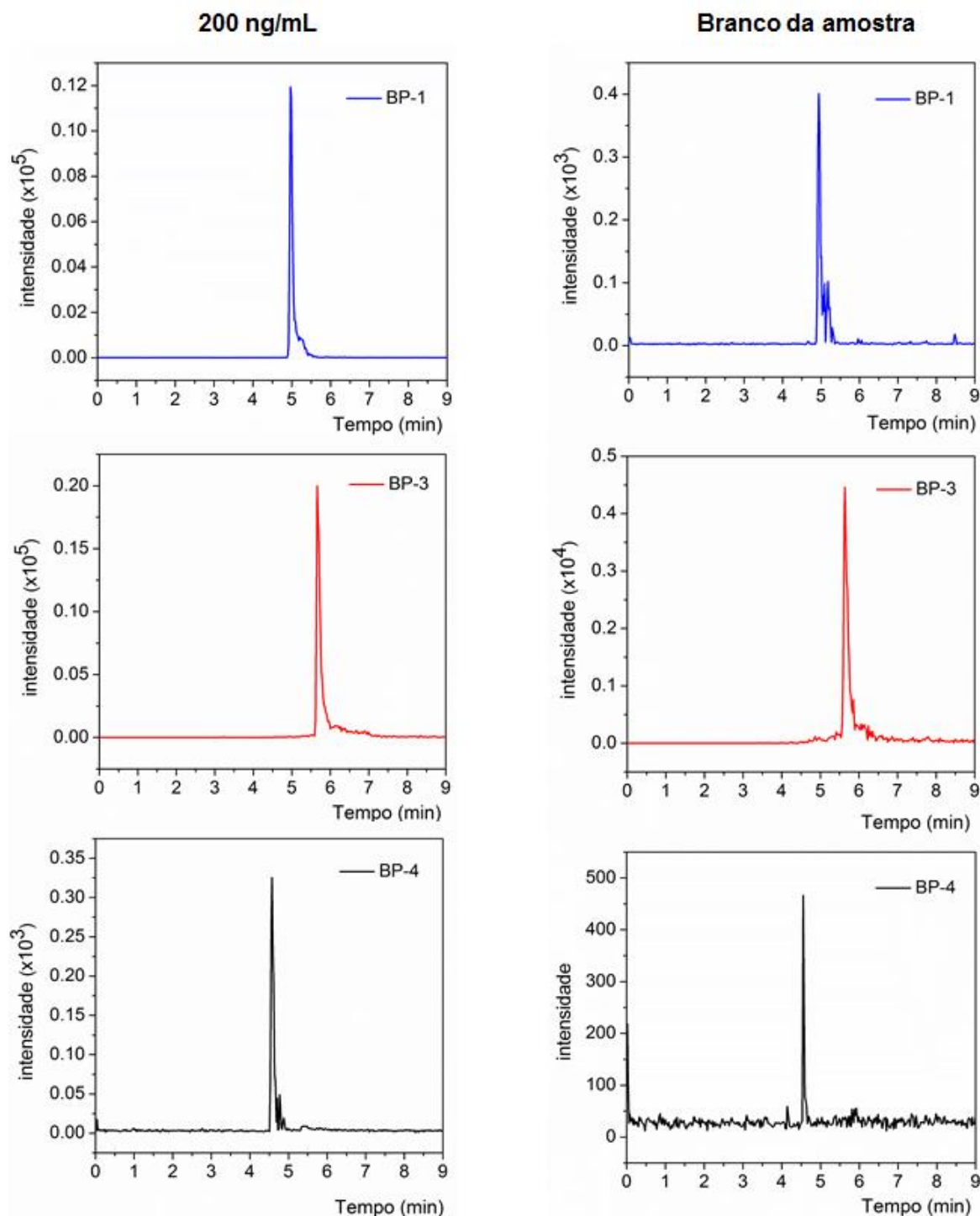


FIGURA 4. 24. Cromatograma da análise de preparo da amostra por precipitação de proteína do leite bovino desnatado fortificado com 200 ng/mL dos analitos, utilizando a coluna analítica HSS T3 e também o branco da amostra.

Como o efeito memória utilizando a coluna HSS T3 foi muito elevado, decidiu-se avaliar a precipitação de proteína e o uso do modo HILIC de eluição, aonde iria nos proporcionar o uso de solvente orgânico em alta concentração, o que poderia ajudar no problema de efeito memória.

Sendo assim, o procedimento do preparo de amostra foi realizado como descrito no procedimento experimental (item 3.5), mudando apenas a concentração da amostra para 100 ng/mL a fim de diminuir ainda mais o efeito memória. A coluna utilizada foi a Acquity BEH HILIC (2,1 mm x 100 mm; 1.7 μ m). A Tabela 4.7 exemplifica as condições cromatográficas utilizadas, preestabelecidas pelo fabricante da coluna

TABELA 4. 7. Condições cromatográficas utilizadas na separação dos analitos utilizando o modo Hilic de eluição.

Fase móvel	Tempo (min)	Proporção da fase móvel (v/v)
A: 50: 50 (ACN: H ₂ O) + 10 mM de acetato de amônio + 0,2% de ácido acético	0 – 0,4	0,1 % A 99,9% B
B: 90: 10 (ACN: H ₂ O) + 10 mM de acetato de amônio + 0,2% de ácido acético	0,4 – 2,0	99,9% A 0,1% B
	2,01 – 2,6	0,1 % A 99,9% B

Vazão 0,3 mL/min

A Figura 4.25 exemplifica que no modo HILIC obteve-se alta sensibilidade no método e um tempo de análise bastante reduzido. Porém, mesmo utilizando concentrações elevadas de solvente orgânico não foi o suficiente para eliminar o efeito memória observado. Foi realizada mais uma vez, a completa limpeza do sistema e da coluna, ainda assim o branco da amostra (leite bovino) apresentou os analitos estudados.

O preparo de amostra, precipitação de proteína, e também o modo HILIC de eluição nos possibilitou verificar que as colunas RAMs não são a principal causa do problema de efeito memória.

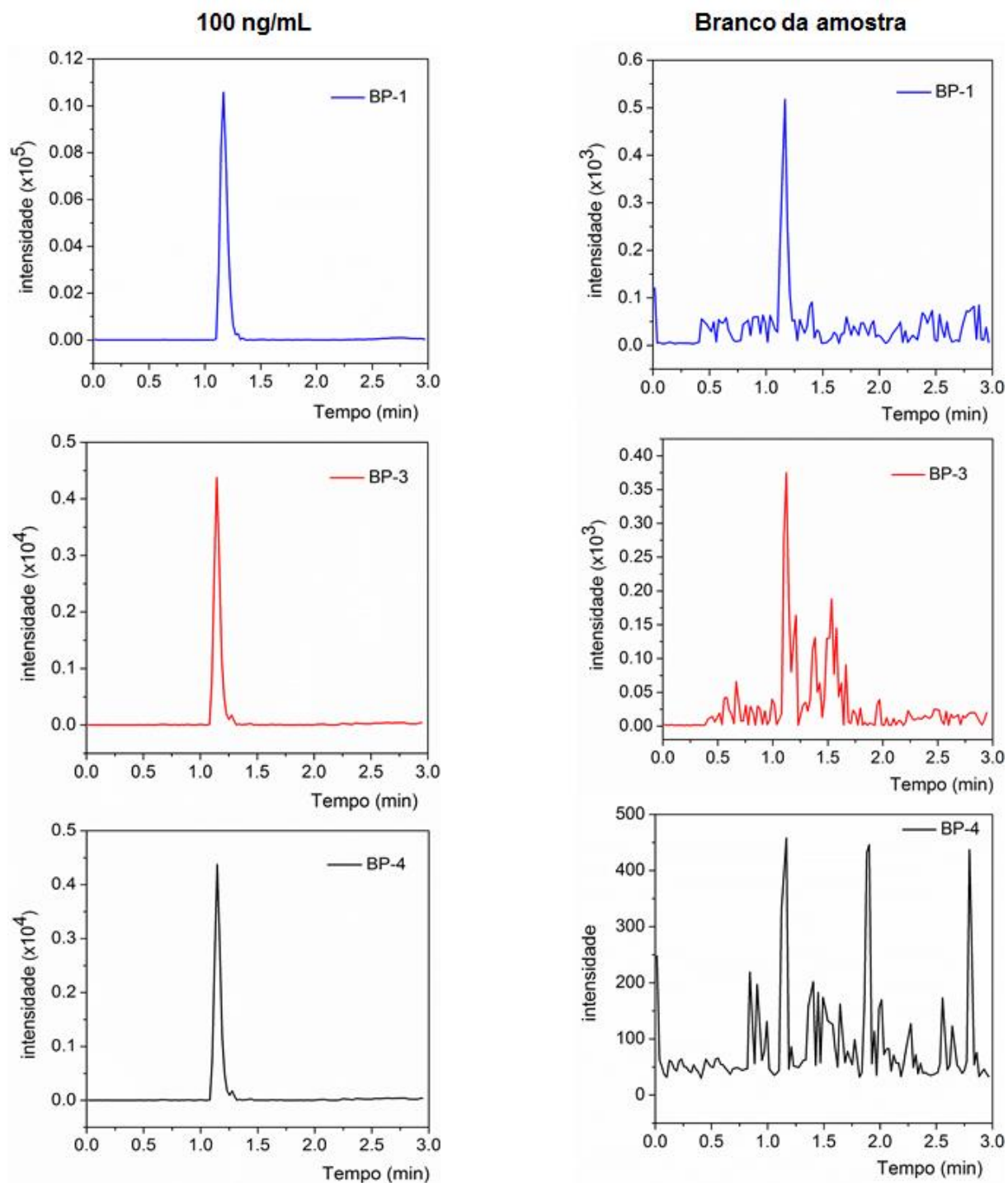


Figura 4. 25. Cromatograma da análise de preparo da amostra por precipitação de proteína do leite bovino desnatado fortificado com 200 ng/mL dos analitos, utilizando a coluna Acquity HILIC e também o branco da amostra.

Após concluir que as colunas RAMs não são as responsáveis pelo efeito memória, buscou-se na literatura uma relação entre o sistema cromatográfico e os problemas de contaminação. Dolan ¹¹² infere que a fonte mais provável de efeito

memória é o auto-injetor, pois uma pequena quantidade da amostra pode permanecer após uma injeção e assim contaminar a próxima.

Dolan também relata que a mais simples situação está relacionada ao sistema de lavagem da agulha de injeção, auto-injetores com rotor, onde passam tanto o solvente de limpeza, quanto descarte do mesmo pode sofrer algum tipo de ruptura, fazendo com que a amostra permaneça e contamine as próximas injeções. Além disso, quando se utiliza tubulações de aço inoxidável, o mau posicionamento do encaixe, pode gerar volumes morto na válvula ou na entrada da coluna, ocasionando problemas de efeito memória.

Em alguns casos existem compostos que aderem ao auto-injetor e as peças do sistema cromatográfico e podem atuar como superfícies cromatográficas e mimetizar uma coluna de separação. Existem substâncias que possuem interações com aço inoxidável, outros interagem melhor com tubulações de polieterecetonona (PEEK) e assim as contaminações em amostras subsequentes se tornam um grande empecilho para validar um método cromatográfico.

Com as afirmações colocadas por Dolan fica claro que o sistema cromatográfico é a principal fonte dos problemas relacionados ao efeito memória. Porém, o fato das colunas RAMs estarem perdendo sua capacidade cromatográfica efetiva ainda precisa ser mais bem investigado. Sendo assim, um ensaio de interação dos analitos com a BSA foi realizado.

4.1.4. Interação da BSA com os analitos

Como já discutido anteriormente, as benzofenonas são os primeiros analitos apolares estudados pelo grupo utilizando as colunas de meio de acesso restrito, perante esse fator decidiu-se avaliar as interações das substâncias frente à BSA, a fim de buscar uma correlação entre as associações proteína/ligante.

A fluorescência da BSA está associada a um resíduo de triptofano e os processos de supressão podem estar relacionados a alterações conformacionais nas subunidades proteicas, ligação do substrato ou desnaturação da proteína como resultado de sua interação com as moléculas estudadas. Esse processo pode nos ajudar a entender as interações medicamentosas com as proteínas do corpo ¹¹³.

O espectro de fluorescência foi acompanhado na faixa de 300 a 500 nm com um máximo de fluorescência em 305 nm gerado por uma excitação em 270 nm.

Conforme pode ser visto na Figura 4.26, a intensidade de fluorescência sofre um decréscimo à medida que se aumenta a concentração da substância.

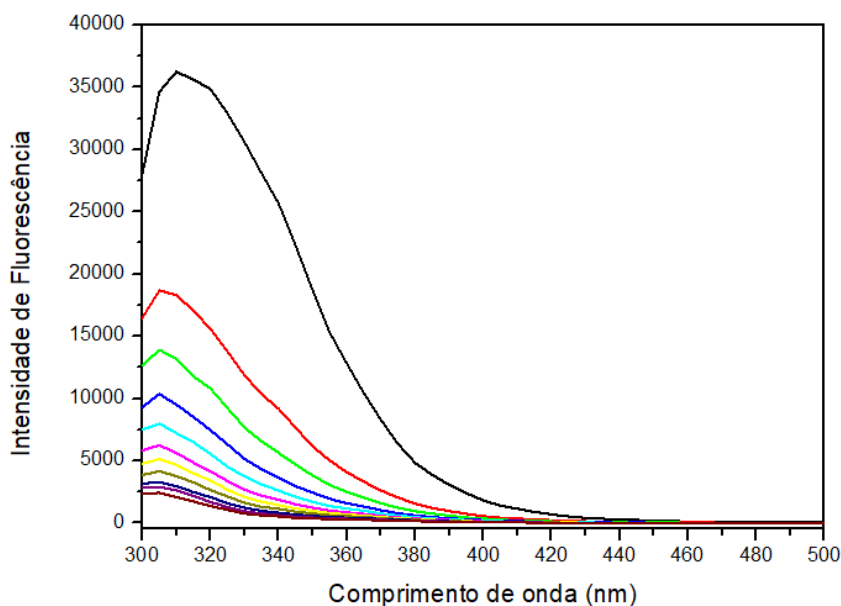


FIGURA 4. 26. Supressão da fluorescência da BSA frente a diferentes concentrações do analito

O processo de supressão de fluorescência pode ser analisado pela intensidade de fluorescência relativa (F_0 / F) em função da concentração $[Q]$ (concentração do inibidor), usando a equação de Stern-Volmer (Equação 2) ¹¹⁴

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q.t_0 [Q] \quad (2)$$

F_0 e F são as intensidades de fluorescência de BSA na ausência e na presença dos inibidores, respectivamente, K_q é a constante da taxa de inibição bimolecular e t_0 é o tempo de meia-vida da BSA na ausência dos inibidores. Da Equação 2, pode ser visto que a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) é igual a $t_0 \cdot K_q$ e pode ser obtida a partir da inclinação do gráfico traçado F_0 / F vs $[Q]$. Os valores de K_{sv} e K_q obtidos para os analitos estão listados na Tabela 4.8. Os valores de K_q foram calculados considerando que o tempo de meia vida da BSA no estado excitado é de $6,2 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ ¹¹⁵. Analisando os valores de K_q encontrados estão na ordem de $10^{11} - 10^{12}$ excedendo o valor máximo permitido para o mecanismo dinâmico ($2,0 \times 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$), sugerindo que a supressão da fluorescência da BSA pelos analitos ocorre estaticamente. Assim, assumindo que a interação BSA/analito ocorre por um modo estático, a constante de ligação (K_b) pode ser obtida do modelo de sítio de ligação que assume a existência

de sítios de ligação (n) a um inibidor em uma biomolécula. Estes parâmetros podem ser extraídos do gráfico de $\log (F_0-F)/F$ vs. $\log [Q]$, ilustrado na Figura 4. 27, cujo $\log K_b$ é dado pelo coeficiente linear e o número de sítios de ligação (n), pelo coeficiente angular, determinados pela Equação 3 ¹¹⁴. Os valores obtidos para as substâncias estudadas neste trabalho estão dispostos na Tabela 4. 8.

$$\log [(F_0 - F)/F] = \log K_b + n \log [Q] \quad (3)$$

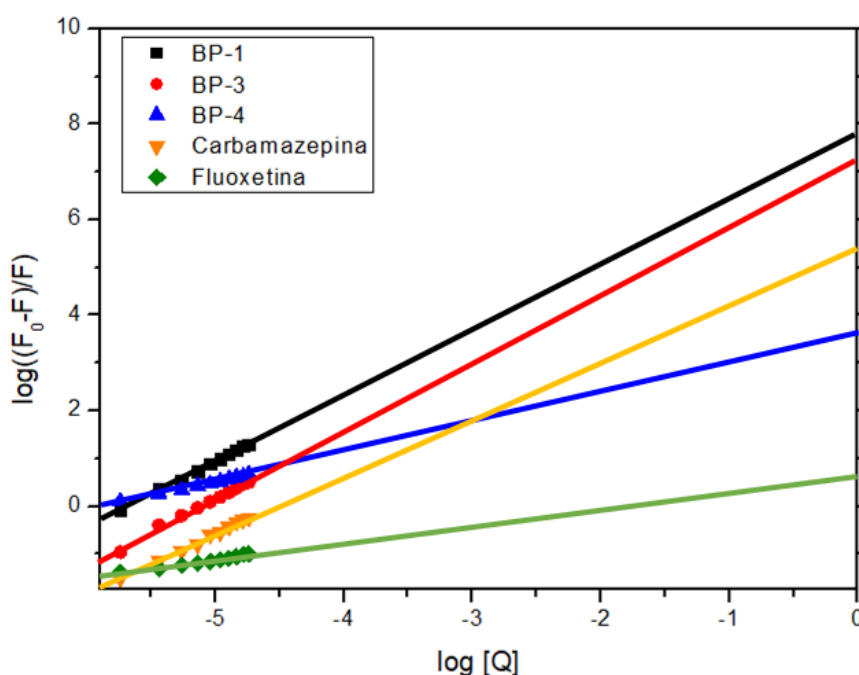


FIGURA 4. 27. Gráficos de Stern-Volmer de $\log (F_0 - F) / F$ versus $\log [Q]$ para a BSA na presença de diferentes concentrações dos analitos BP-1, BP-3, BP-4, Carbamazepina e Fluxetina.

TABELA 4. 8. Parâmetros obtidos pela equação de Stern-Volmer para a interação BSA / analitos.

Analitos	T (K)	Ksv	Kq	R ²	Kb	N	R ²
BP-1	310,15	913000	3,51E+13	0,9802	39800000	1,36	0,9978
BP3	310,15	159000	6,12E+12	0,9858	24100000	1,46	0,991
BP-4	310,15	149000	5,73E+12	0,9895	1060	0,52	0,993
Carbamazepina	310,15	37200	1,43E+12	0,9871	2330	0,74	0,9966
Fluoxetina	310,15	5710	2,2E+11	0,9698	98,2	0,61	0,9698

Foi demonstrado que a proteína pode ligar-se reversivelmente a uma variedade de compostos endógenos ou exógenos ¹¹⁶. A força dessas interações é extremamente importante, uma vez que pode influenciar as propriedades farmacocinéticas, como armazenamento e transporte, que podem influenciar na eficiência do fármaco ¹¹⁷. No caso do estudo deste trabalho, ela pode estar associada a danos irreversíveis às colunas RAMs, pois uma interação forte pode inativar os sítios de ligação levando a uma diminuição ou completa perda da eficiência cromatográfica.

Ainda não existem na literatura trabalhos que estabeleçam uma relação entre a perda da eficiência cromatográfica e o limite dos valores de constante de ligação (K_b). Então, buscaram-se substâncias analisadas pelo grupo de pesquisa utilizando o método de injeção direta da mesma matriz abordada neste trabalho. Nos trabalhos desenvolvidos por LOPES e seus colaboradores ^{84,100}, não houve relatos sobre a perda da eficiência cromatográfica da coluna RAM com baixos volumes de injeção. Os valores de K_b obtidos para carbamazepina e fluoxetina, estão dentro da faixa estabelecida para interações moderadas ¹¹⁸. Em contrapartida, dois dos analitos estudados neste trabalho, BP-1 e BP-3, apresentaram constantes de ligação na mesma ordem de grandeza da bilirrubina (10^7), substância endógena produzida pelo corpo com forte interação pela BSA ¹¹⁹. Coincidentemente, estes mesmos dois analitos foram os mesmos que mais apresentaram problemas em relação ao efeito memória e falta de repetibilidade entre as análises, dando um indicio de que a forte interação desses analitos com a BSA imobilizada estaria levando a sua inativação e perda da eficiência cromatográfica.

4.14. Triagem de diferentes leites maternos por LC-HRMS

Diante dos problemas enfrentados com as condições cromatográficas examinadas usando o LC-QqQ e tendo observado na matriz usada como branco a presença das benzofenonas, fez-se então uma triagem qualitativa em 26 amostras de leite materno, coletadas de nutrizes na cidade de São Carlos/São Paulo em diferentes estados de amamentação.

Perante o fato que o sistema cromatográfico LC-QqQ estava contaminado com os analitos de interesse, antes do estudo da triagem, foi realizado uma análise para identificar se o QqTOF não apresentava problemas relacionados a efeito memória. Após identificar que o sistema não apresentava efeito memória quando injetado um branco do leite materno, prosseguiu-se para triagem das amostras.

Os leites maternos foram avaliados por LC-HRMS usando o QqTOF como espectrômetro de massas. O protocolo usado foi em acordo com o procedimento experimental descrito na página 19. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.9.

Embora o número de amostras analisadas não seja alto, é possível formar algumas conclusões interessantes. Os resultados demonstram a ocorrência disseminada da BP- 1 e BP-3 em amostras de leites maternos. Foi encontrado também, a BP-4, porém em apenas 2 amostras. As benzofenonas foram detectadas em 88% das amostras analisadas. Os resultados obtidos nessa triagem são preocupantes, uma vez que estes analitos mesmo em baixas concentrações são prejudiciais tanto as mães quanto aos filhos.

TABELA 4. 9. Benzofenonas encontradas em diferentes tipos de amostras de leite materno.

Amostras	Presença de Benzofenonas		Benzofenonas encontradas (erro em ppm)
	SIM	NÃO	
Leite 01	X		BP-3 (1.3 ppm) BP-1 (0.9 ppm)
Leite 02	X		BP-1 (0.0 ppm)
Leite 03		x	-
Leite 04	X		BP-1 (0.4 ppm)
Leite 05	X		BP-1 (-1.4 ppm)
Leite 06	X		BP-1 (-0.2 ppm)
Leite 07	X		BP-1 (-5.3 ppm)
Leite 08	X		BP-1 (-2.3 ppm)
Leite 09	X		BP-1 (-3.3 ppm)
Leite 10	X		BP-1 (-4.8 ppm) BP-3 (2.5 ppm) e BP-4 (1,3 ppm)
Leite 11	X		BP-1 (-3.1 ppm)
Leite 12	X		BP-1 (-3.7 ppm) BP-3 (2.3 ppm)
Leite 13		x	-
Leite 14	X		BP-1 (-3.3 ppm) BP-3 (-0.4 ppm)
Leite 15	X		BP-1 (-5.2 ppm) BP-3 (-2.5 ppm)
Leite 16	X		BP-1 (-6.9 ppm) BP-3 (-2.5 ppm)
Leite 17	X		BP-1 (-4.2 ppm)
Leite 18	X		BP-1 (-5.3 ppm) BP-4 (-2.2 ppm)

Continua

Continuação da Tabela 4.9

Leite 19	X		BP-1 (-2.0 ppm)
Leite 20	X		BP-1 (-2.9 ppm)
Leite 21		x	-
Leite 22	X		BP-1 (-0.9 ppm) BP-3 (5.9 ppm)
Leite 23	X		BP-1 (-2.6 ppm) BP-3 (2.1 ppm)
Leite 24	X		BP-1 (-0.8 ppm) BP-3 (-1.0 ppm)
Leite 25	X		BP-1 (-2.5 ppm) BP-3 (-0.1 ppm)
Leite 26	X		BP-1 (-4.4 ppm)

Conclusões

Na escalada rumo às altas posições,
No afã de concretizar seus sonhos,
Observe se não está pisando EM ALGUÉM
OLHE PARA BAIXO.

Charles Chaplin – Olhe - Quinta estrofe

5.0. CONCLUSÕES

As RAMs-BSA estudadas mostraram-se eficiente para a exclusão das proteínas do leite materno, assim como os oligossacarídeos presentes na matriz.

As colunas RAMs com suporte de 3 μm apresentaram eficiência cromatográfica e poderia ser usada no modo simples de eluição proporcionando análises rápidas e sem preparo de amostra. Porém, a forte interação dos analitos com a coluna RAM-BSA causou perdas de eficiência cromatográfica.

Os estudos realizados inferem bons limites de detecção, com todos os parâmetros cromatográficos ajustados, os testes finais na concentração mais alta de trabalho, 100 ng/mL, permitia sensibilidades elevadas ao método.

A metodologia clássica de preparo de amostra, precipitação de proteína, foi avaliada neste trabalho, porém o efeito memória permaneceu mesmo quando foram utilizadas diferentes colunas analíticas, modos de eluição, e o uso de uma matriz substituta (leite bovino), indicando contaminação do sistema cromatográfico, provavelmente no auto-injetor, impossibilitando a validação e aplicação do método desenvolvido.

Existem vários trabalhos analíticos publicados na literatura sobre a determinação das benzofenonas selecionadas em leite materno, a maioria das vezes foi focado na determinação das BPs utilizando técnicas como microextração líquido-líquido dispersiva e extração em fase sólida. O preparo de amostra proposto neste trabalho difere dos reportados na literatura. A injeção direta de amostras utilizando colunas RAMs é considerada uma boa escolha em relação a sua boa capacidade de extração e operação, especialmente quando comparado ao SPE que é tradicionalmente utilizado em análises de fluidos biológicos, porém os analitos de baixa polaridade apresentaram forte interação com as colunas RAMs avaliadas.

A triagem de amostras de leite materno coletadas de 26 diferentes mães da Cidade de São Carlos foi avaliada por LC-HRMS e apresentou a presença de benzofenonas em 88% das amostras analisadas.

Referências

Em todos os momentos da vida,

Seja qual for sua atividade,

Busque a aprovação de Deus!

OLHE PARA CIMA.

Charles Chaplin – Olhe - Última estrofe

REFERÊNCIAS

1. LIEBERMAN; S. Are the differences between estradiol and other estrogens, naturally occurring or synthetic, merely semantical?. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 81 (2) :850–851, 1996.
2. GHISELLI; G. & JARDIM; W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Quimica Nova*. 30 (3) :695–706, 2007.
3. BILA; D. M. & DEZOTTI; M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. *Quimica Nova*. 30 (3) :651–666, 2007.
4. BIRKETT; J. W. & LESTER; J. N. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. *Journal Hazardous Materials*. 100 (1–3) :317–318, 2003.
5. VELA-SORIA; F.; JIMÉNEZ-DÍAZ; I.; DÍAZ; C.; PÉREZ; J.; IRIBARNE-DURÁN; L. M.; SERRANO-LÓPEZ; L.; ARREBOLA; J. P.; FERNÁNDEZ; M. F. & OLEA; N. Determination of endocrine-disrupting chemicals in human milk by dispersive liquid-liquid microextraction. *Bioanalysis*. 8 (17) :1777–91, 2016.
6. JIMÉNEZ-DÍAZ; I.; IRIBARNE-DURÁN; L. M.; OCÓN; O.; SALAMANCA; E.; FERNÁNDEZ; M. F.; OLEA; N. & BARRANCO; E. Determination of personal care products –benzophenones and parabens– in human menstrual blood. *Journal Chromatography B*. 1035 :57–66, 2016.
7. KUMAR; V.; YADAV; C. S.; SINGH; S.; GOEL; S.; AHMED; R. S.; GUPTA; S.; GROVER; R. K. & BANERJEE; B. D. CYP 1A1 polymorphism and organochlorine pesticides levels in the etiology of prostate cancer. *Chemosphere*. 81 (4) :464–468, 2010.
8. RODRÍGUEZ-GÓMEZ; R.; JIMÉNEZ-DÍAZ; I.; ZAFRA-GÓMEZ; A.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ; R.; BALLESTEREOS; O. & NAVALÓN; A. A multiresidue method for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk based on a simple extraction procedure. *Talanta*. 130 :561–570, 2014.
9. REIS FILHO; R. W.; LUVIZOTTO-SANTOS; R. & VIEIRA; E. M. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. 2 (3) :283–288, 2007.
10. KUNZ; P. Y. & FENT; K. Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquatic Toxicology*. 79 (4) :305–324, 2006.
11. DIETRICH; D. R. & HITZFELD; B. C. Bioaccumulation and ecotoxicity of synthetic musks in the aquatic environment. *Handb. Environmental chemistry*. 3 :233–244, 2004.
12. RODRÍGUEZ-GÓMEZ; R.; ZAFRA-GÓMEZ; A.; DORIVAL-GARCÍA; N.; BALLESTEREOS; O. & NAVALÓN; A. Determination of benzophenone-UV filters in human milk samples using ultrasound-assisted extraction and clean-up with dispersive sorbents followed by UHPLC-MS/MS analysis. *Talanta* 134 :657–664, 2015.

13. WOLFF; M. S.; BRITTON; J. a & WILSON; V. P. Environmental risk factors for breast cancer among African-American women. *Cancer*. 97 (1) :289–310, 2003.
14. DARBRE; P. D. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology Metabolismo*. 20 (1) :121–143, 2006.
15. SNEDEKER; S. M. Pesticides and breast cancer risk: A review of DDT, DDE and dieldrin. *Environmental Health Perspectives*. 109 (1) :35–47, 2001.
16. HARVEY; P. W. & DARBRE; P. Endocrine disrupters and human health: Could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? A review of evidence and call for further research. *Journal of Applied Toxicology*. 24 (3) :167–176, 2004.
17. DARBRE; P. D. Underarm Cosmetics and Breast Cancer. *Journal Applied Toxicology*. 23 (2) :89–95, 2003.
18. LI; N.; ZHU; Q.; YANG; Y.; HUANG; J.; DANG; X. & CHEN; H. A novel dispersive solid-phase extraction method using metal-organic framework MIL-101 as the adsorbent for the analysis of benzophenones in toner. *Talanta* 132 :713–718, 2015.
19. KIM; S. & CHOI; K. Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: A mini-review. *Environment International*. 70 :143–157, 2014.
20. SVOBODOVÁ; A.; PSOTOVÁ; J. & WALTEROVÁ; D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Paper*. 147 (2) :137–145, 2003.
21. GONZÁLEZ; M. T. P.; FUMAGALLI; F.; BENEVENUTO; C. G.; EMERY; F. da S. & GASPAR; L. R. Novel benzophenone-3 derivatives with promising potential as UV filters: Relationship between structure, photoprotective potential and phototoxicity. *European Journal Pharmaceutical Sciences*. 101 :200–210, 2017.
22. ZUCCHI; S.; BLÜTHGEN; N.; IERONIMO; A. & FENT; K. The UV-absorber benzophenone-4 alters transcripts of genes involved in hormonal pathways in zebrafish (*Danio rerio*) eleuthero-embryos and adult males. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 250 (2) :137–146, 2011.
23. SCHREURS; R.; LANSER; P.; SEINEN; W. & BURG; B. van der. Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. *Archives Toxicology*. 76 (5–6) :257–261, 2002.
24. CHISVERT; A.; LEÓN-GONZÁLEZ; Z.; TARAZONA; I.; SALVADOR; A. & GIOKAS; D. An overview of the analytical methods for the determination of organic ultraviolet filters in biological fluids and tissues. *Analytica Chimica Acta*. 752 :11–29, 2012.
25. CABRAL; L. D. D. S.; PEREIRA; S. D. O. & PARTATA; A. K. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no brasil. *Revista Científica do ITPAC*. 4 (3) :1–10, 2011.

26. GOMEZ; E.; PILLON; A.; FENET; H.; ROSAIN; D.; DUCHESNE; M. J.; NICOLAS; J. C.; BALAGUER; P. & CASELLAS; C. Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: Parabens, UV screens, and musks. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 68 (4) :239–251, 2005.
27. SUZUKI; T.; KITAMURA; S.; KHOTA; R.; SUGIHARA; K.; FUJIMOTO; N. & OHTA; S. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 203 (1) :9–17, 2005.
28. SCHLUMPF; M.; COTTON; B.; CONSCIENCE; M.; HALLER; V.; STEINMANN; B. & LICHTENSTEIGER; W. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environmental Health Perspectives*. 109 (3) :239–244, 2001.
29. Salvador; a. & Chisvert; a. Sunscreen analysis: A critical survey on UV filters determination. *Analytica Chimica Acta*. 537 (1–2) :1–14, 2005.
30. NEGREIRA; N.; RODRÍGUEZ; I.; RAMIL; M.; RUBÍ; E. & CELA; R. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of hydroxylated benzophenone UV absorbers in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*. 654 (2) :162–170, 2009.
31. RICHARDSON; S. D. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*. 80 (12) :4373–4402, 2008.
32. OKEREKE; C. S.; KADRY; A. M.; ABDEL-RAHMAN; M. S.; DAVIS; R. A. & FRIEDMAN; M. A. Metabolism of benzophenone-3 in rats *Drug Metabolism and Disposition*. 21 (5) :788–791, 1993.
33. BALMER; M. E.; BUSER; H. R.; MÜLLER; M. D. & POIGER; T. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes. *Environmental Science & Technology*. 39 (4) :953–962, 2005.
34. RODIL; R.; MOEDER; M.; ALTENBURGER; R. & SCHMITT-JANSEN; M. Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395 (5) :1513–1524, 2009.
35. FREITAS; J. V.; PRAÇA; F. S. G.; BENTLEY; M. V. L. B. & GASPAR; L. R. Trans-resveratrol and beta-carotene from sunscreens penetrate viable skin layers and reduce cutaneous penetration of UV-filters. *International Journal of Pharmaceutics*. 484 (1–2) :131–137, 2015.
36. GONZALEZ; H. Percutaneous absorption with emphasis on sunscreens. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 9 (4) :482–8, 2010.
37. BLÜTHGEN; N.; ZUCCHI; S. & FENT; K. Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 263 (2) :184–194, 2012.
38. KIM; S.; JUNG; D.; KHO; Y. & CHOI; K. Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of japanese medaka (*Oryzias latipes*)-A two generation exposure study. *Aquatic Toxicology*. 155 :244–252, 2014.

39. SCHLUMPF; M.; Karin; K.; WITTASSEK; M.; ANGERER; J.; MASCHER; H.; MASCHER; D.; VÖKT; C.; BIRCHLER; M. & LICHTENSTEIGER; W. Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: Correlation of UV filters with use of cosmetics. *Chemosphere*. 81 (10) :1171–1183, 2010.
40. KANG; H.-S.; KO; A.; KWON; J. E.; KYUNG; M. S.; MOON; G. I.; PARK; J. H.; LEE; H. S.; SUH; J. H.; LEE; J. M.; HWANG; M. S.; KIM; K.; HONG; J. H. & HWANG; I. G. Urinary benzophenone concentrations and their association with demographic factors in a South Korean population. *Environmental Research*. 149 :1–7, 2016.
41. VELA-SORIA; F.; JIMÉNEZ-DÍAZ; I.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ; R.; ZAFRA-GÓMEZ; A.; BALLESTEROS; O.; NAVALÓN; A.; VÍLCHEZ; J. L.; FERNÁNDEZ; M. F. & OLEA; N. Determination of benzophenones in human placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*. 85 (4) :1848–1855, 2011.
42. VELA-SORIA; F.; BALLESTEROS; O.; ZAFRA-GÓMEZ; A.; BALLESTEROS; L. & NAVALÓN; A. A new method for the determination of benzophenone-UV filters in human serum samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*. 121 :97–104, 2014.
43. TARAZONA; I.; CHISVERT; A. & SALVADOR; A. Determination of benzophenone-3 and its main metabolites in human serum by dispersive liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*. 116 :388–395, 2013.
44. YE; X.; KUKLENYIK; Z.; NEEDHAM; L. L. & CALAFAT; A. M. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography B*. 831 (1–2) :110–115, 2006.
45. Kramer; M. S. 'Breast is best': The evidence. *Early Human Development*. 86 (11) :729–732, 2010.
46. Picone; S. & Paolillo; P. Chemical Contaminants in Breast Milk. *Early Human Development*. 89 (4) :S117–S118, 2013.
47. ANDREAS; N. J.; KAMPMANN; B. & LE-DOARE; K. Human breast milk : A review on its composition and bioactivity Human breast milk : A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*. 91 (11) :629–635, 2015.
48. KÄRRMAN; A. & LINDSTRÖM; G. Trends , analytical methods and precision in the determination of perfluoroalkyl acids in human milk. *Trends in Analytical Chemistry*. 46 :118–128, 2013.
49. Lopes; B. R.; Barreiro; J. C. & Cass; Q. B. Bioanalytical challenge: A review of environmental and pharmaceuticals contaminants in human milk. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*. 130 :318–325, 2016.
50. ZIVKOVIC; A. M.; GERMAN; J. B.; LEBRILLA; C. B. & MILLS; D. A. Human

- milk glycobioime and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108 (1) :4653–4658, 2011.
51. ZIVKOVIC; A. M.; LEWIS; Z. T.; GERMAN; J. B. & MILLS; D. A. Establishment of a Milk-Oriented Microbiota (MOM) in Early Life: How Babies Meet Their MOMs. *Journal of Functional Foods*. 5 (1) :3–12, 2013.
 52. BALLARD; O. & MORROW; L. A. Human Milk Composition Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*. 60 (1) :49–74, 2013.
 53. BODE; L. Early Human Development The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development*. 91 :1–4, 2015.
 54. KULINICH; A. & LIU; L. Human milk oligosaccharides : The role in the fi ne-tuning of innate immune responses. *Carbohydrate Research*. 432 :62–70, 2016.
 55. Simões; B. R. L. Quantificação de carbamazepina, fluoxetina e seus metabólitos principais em leite materno por injeção direta de amostra utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 2013. Tese de Doutorado, 122 p.
 56. LOPES; B. R. & CASSIANO; N. M. Injeção direta de amostras: uma nova tendência em LC in *Cromatografia Líquida: Novas tendências e aplicações*. CASS, Q.B. e CASSIANO, N.M., 2015, Elsevier: Rio de Janeiro. P. 127.
 57. MARKOPOULOU; C. & KONDOURELLIS; J. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of ethinyl estradiol, cyproterone acetate, and norgestrel in breast milk following solid-phase extraction. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 29 (5) :685–700, 2006.
 58. ALVAREZ-COQUE; M. C. G. & BROCH; S. C. Direct injection of physiological fluids in micellar liquid chromatography. *Journal Chromatography B*. 736 :1–18, 1999.
 59. De Lima; V. V.; Cassiano; N. M. & Cass; Q. B. Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína-imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano. *Quimica Nova*. 29 (1) :72–78, 2006.
 60. CASSIANO; N. .; BARREIRO; J. .; OLIVEIRA; R. . & CASS; Q. Direct bioanalytical sample injection with 2D LC – MS. *Bioanalysis* 4. (22) :2737–2756, 2012.
 61. DE FARIA; H. D.; ABRÃO; L. C. de C.; SANTOS; M. G.; BARBOSA; A. F. & FIGUEIREDO; E. C. New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta*. 959 :43–65, 2017.
 62. KATAOKA; H. & SAITO; K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 54 (5) :926–950, 2011.
 63. KATAOKA; H.; ISHIZAKI; A. & SAITO; K. Recent progress in solid-phase microextraction and its pharmaceutical and biomedical applications. *Analytical*

- Methods. 8 (29) :5773–5788, 2016.
64. QUEIROZ; M. E. C.; OLIVEIRA; E. B.; BRETON; F. & PAWLISZYN; J. Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry for analysis of fluoxetine in serum samples. *Journal Chromatography A*. 1174 (1–2) :72–77, 2007.
 65. YASUHARA; R.; EHARA; K.; SAITO; K. & KATAOKA; H. Automated analysis of salivary stress-related steroid hormones by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*. 4 (11) :3625–3630, 2012.
 66. SOUZA; I. D.; HANTAO; L. W. & QUEIROZ; M. E. C. Polymeric ionic liquid open tubular capillary column for on-line in-tube SPME coupled with UHPLC-MS/MS to determine endocannabinoids in plasma samples. *Analytica Chimica Acta*. 1045 (1): 1–9, 2018.
 67. LUO; X.; LI; G. & HU; Y. In-tube solid-phase microextraction based on NH₂-MIL-53(Al)-polymer monolithic column for online coupling with high-performance liquid chromatography for directly sensitive analysis of estrogens in human urine. *Talanta*. 165 (1) :377–383, 2017.
 68. SAITO; K.; YAGI; K.; ISHIZAKI; A. & KATAOKA; H. Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 52 (5) :727–733, 2010.
 69. COUCHMAN; L. Turbulent flow chromatography in bioanalysis: A review. *Biomedical Chromatography*. 26 (8) :892–905, 2012.
 70. RUDEWICZ; Pa. J. Turbulent flow bioanalysis in drug metabolism and pharmacokinetics. *Bioanalysis*. 14 (3) :1663–1671, 2011.
 71. SCHAEFER; N.; PETERS; B.; SCHMIDT; P. & EWALD; A. H. Development and validation of two LC-MS/MS methods for the detection and quantification of amphetamines, designer amphetamines, benzoylecgonine, benzodiazepines, opiates, and opioids in urine using turbulent flow chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405 (1) :247–258, 2013.
 72. STOLKER; A. A. M.; PETERS; R. J. B.; ZUIDERENT; R.; DIBUSSOLO; J. M. & MARTINS; C. P. B. Fully automated screening of veterinary drugs in milk by turbulent flow chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 397 (7) :2841–2849, 2010.
 73. MODICK; H.; SCHÜTZE; A.; PÄLMKE; C.; WEISS; T.; BRÜNING; T. & KOCH; H. M. Rapid determination of N-acetyl-4-aminophenol (paracetamol) in urine by tandem mass spectrometry coupled with on-line clean-up by two dimensional turbulent flow/reversed phase liquid chromatography. *Journal Chromatography B*. 925 (1) :33–39, 2013.
 74. SÁNCHEZ-GUIJO; A.; HARTMANN; M. F.; SHI; L.; REMER; T. & WUDY; S. A. Determination of free cortisol and free cortisone in human urine by on-line turbulent flow chromatography coupled to fused-core chromatography-tandem mass spectrometry (TFC-HPLC-MS/MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 406 (3) :793–801, 2014.

75. He; X. & Kozak; M. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for plasma-free metanephrines with ion-pairing turbulent flow online extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 402 (9) :3003–3010, 2012.
76. CASSIANO; N. M.; BARREIRO; J. C.; MORAES; M. C.; OLIVEIRA; R. V & CASS; Q. B. Restricted-access media supports for direct high-throughput analysis of biological fluid samples: review of recent applications. *Bioanalysis*. 1 (3) :577–594, 2009.
77. CASSIANO; N. M.; LIMA; V. V.; OLIVEIRA; R. V.; PIETRO; A. C. de & CASS; Q. B. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 384 (7–8) :1462–1469, 2006.
78. HAGESTAM; I. H. & PINKERTON; T. C. Production of 'internal surface reversed-phase' supports: The hydrolysis of selected substrates from silica using chymotrypsin. *Journal Chromatography A*. 368 (1) :77–84, 1986.
79. GISCH; D. J.; HUNTER; B. T. & FEIBUSH; B. Shielded hydrophobic phase: a new concept for direct injection analysis of biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 433 (1) :264–268, 1988.
80. HAGINAKA; J. & WAKAI; J. Synthesis of a Mixed-Functional Silica Support for Direct Injection Analysis of Drugs in Serum by Liquid Chromatography. *Chromatographia*. 29 (5–6) :223–227, 1990.
81. BOOS; K.-S.; RUDOLPHI; A.; VIELHAUER; S.; WALFORT; A.; LUBDA; D. & EISENBEIB; F. Alkyl-Diol Silica (ADS): restricted access precolumn packings for direct injection and coupled-column chromatography of biofluids. *Toxicologic Pathology*. 45 (2) :353–361, 2017.
82. DESILETS; C. P. .; ROUNDS; M. A. . & REGNIER; F. E. Semipermeable-surface reversed-phase media for high- performance liquid chromatography. *Journal Chromatography*. 544 (1–2) :25–39, 1991.
83. YOSHIDA; H.; MORITA; I.; TAMAI; G.; MASUJIMA; T.; TSURU; T.; TAKAI; N. & IMAI; H. Some characteristics of a protein-coated ODS column and its use for the determination of drugs by the direct injection analysis of plasma samples. *Chromatographia*. 19 (1) :466–472, 1984.
84. LOPES; B. R.; BARREIRO; J. C.; BARALDI; P. T. & CASS; Q. B. Quantification of carbamazepine and its active metabolite by direct injection of human milk serum using liquid chromatography tandem ion trap mass spectrometry. *Journal Chromatography B*. 889–890 :17–23, 2012.
85. ALvim-JR; J.; LOPES; B. R. & CASS; Q. B. Simultaneous enantioselective quantification of fluoxetine and norfluoxetine in human milk by direct sample injection using 2-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography A*. 1451 :120–126, 2016.
86. MOURA; F.; DE ALMEIDA; F. G.; LOPES; B. R. & CASS; Q. B. Quantification of ampicillin in bovine milk by coupled-column ultrahigh-performance liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 35 (19) :2615–2620, 2012.
87. YE; X.; BISHOP; A. M.; NEEDHAM; L. L. & CALAFAT; A. M. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. *Analytica Chimica Acta*. 622 (1–2) :150–156, 2008.
 88. CARDOSO; J. de O. & OLIVEIRA; R. V. LC-MS: fundamentos, vantagens e problemas do acoplamento in *Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações*. CASS, Q.B. e CASSIANO, N.M., 2015, Elsevier: Rio de Janeiro. P. 127.
 89. SANTOS; M. G.; TAVARES; I. M. C.; BARBOSA; A. F.; BETTINI; J. & FIGUEIREDO; E. C. Analysis of tricyclic antidepressants in human plasma using online-restricted access molecularly imprinted solid phase extraction followed by direct mass spectrometry identification/quantification. *Talanta*. 163 :8–16, 2017.
 90. PITT; J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography- Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*. 30 (1) :19–34, 2009.
 91. DEVANSHU; S.; RAHUL; M.; ANNU; G.; KISHAN; S. & ANROOP; N. Quantitative Bioanalysis by LC-MS / MS : A Review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 7 (1) :1–9, 2010.
 92. AHMAD; S.; KALRA; H.; GUPTA; A.; RAUT; B. & HUSSAIN; A. HybridSPE: A novel technique to reduce phospholipid-based matrix effect in LC–ESI-MS Bioanalysis. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 4 (4) :267–276, 2012.
 93. TRUFELLI; H.; PALMA; P.; FAMIGLINI; G. & CAPPIELLO; A. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry. Rev.* 20 (3) :133–138, 2007.
 94. GUO; X. & LANKMAYR; E. Phospholipid-based matrix effects in LC-MS bioanalysis. *Bioanalysis*. 3 (4) :349–352, 2011.
 95. MENEZES; M. L. & FELIX; G. Analysis of Organochlorine Pesticides in Plain Milk Using Direct Injection on an ISRP Column , with Column Switching. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 19 (19) :3221–3228, 1996.
 96. DENADAI; M. & CASS; Q. B. Simultaneous determination of fluoroquinolones in environmental water by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with direct injection: A green approach. *Journal Chromatography A*. 1418 (1) :177–184, 2015.
 97. BRADFORD; M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72 (1–2) :248–254, 1976.
 98. OLIVEIRA; R. V. & CASS; Q. B. Evaluation of liquid chromatographic behavior of cephalosporin antibiotics using restricted access medium columns for on-line sample cleanup of bovine milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54

- (4) :1180–1187, 2006.
99. CASS; Q. B.; GOMES; R. F.; CALAFATTI; S. A. & JR PEDRAZOLLI; J. D. Determination of amoxicillin in human plasma by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography. *Journal Chromatography A*. 987 (1–2) :235–241, 2003.
 100. REBELO; B.; CASSIANO; N. M.; CARVALHO; D. M.; MOISÉS; E. C. D. & CASS; Q. B. Simultaneous quantification of fluoxetine and norfluoxetine in colostrum and mature human milk using a 2-dimensional liquid chromatography – tandem mass spectrometry system. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 150 (1) :362–367, 2018.
 101. DENADAI; M. Fluoroquinolonas em amostras aquosas ambientais e em teleósteos: quantificação, avaliação de toxicidade e ensaios de biotransformação. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 2015. Tese de Doutorado, p. 154.
 102. ZAIA; D. A. M.; ZAIA; C. T. B. V & LICHTIG; J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quimica Nova*. 21 (6) :787–793, 1998.
 103. MATUSZEWSKI; B. K.; CONSTANZER; M. L. & CHAVEZ-ENG; C. M. Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids: A Method for Determination of Finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentrations. *Analytical Chemistry*. 70 (5) :882–889, 1998.
 104. MALDANER; L. & JARDIM; I. C. S. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Quimica Nova*. 32 (1) :214–222, 2009.
 105. USP. “PQRI Approach for Selecting Columns of Equivalent Selectivity | USP”. Available at: <http://www.usp.org/resources/pqri-approach-column-equiv-tool>. (Accessed: 1st August 2018)
 106. SNYDER; L. R. & DOLAN; J. W. Optimizing selectivity during reversed-phase high performance liquid chromatography method development: Prioritizing experimental conditions. *Journal Chromatography A*. 1302 (1) :45–54, 2013.
 107. Cass; Q. B. Ortogonalidade no modo reverso de eluição in *Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações*. CASS, Q.B. e CASSIANO, N.M., 2015, Elsevier: Rio de Janeiro. P. 127.
 108. Guideline on bioanalytical method validation, 2011.
 109. HAHNE; H.; PACHL; F.; RUPRECHT; B.; MAIER; S. K.; KLAEGER; S.; HELM; D.; MÉDARD; G.; WILM; M.; LEMEER; S. & KU; B. DMSO enhances electrospray response, boosting sensitivity of proteomic experiments. *Nature Methods*. 10 (10) :989–991, 2013.
 110. STRZELECKA; D.; HOLMAN; S. W. & EYERS; C. E. Evaluation of dimethyl sulfoxide (DMSO) as a mobile phase additive during top 3 label-free quantitative proteomics. *International Journal of Mass Spectrometry*. 391 (1) :157–160, 2015.
 111. ACQUITY UPLC™ BEH Column Care and Use Instructions. Available at: www.waters.com/sampleprep. (Accessed: 1st August 2018)

-
112. Dolan; J. W. Autosampler Carryover. LCGC Europe.:1–6, 2001.
 113. LAKOWICZ; J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3ª edição. Nova York: Springer, 2006.
 114. LI; J.; LI; J.; JIAO; Y. & DONG; C. Spectroscopic analysis and molecular modeling on the interaction of jatrorrhizine with human serum albumin (HSA). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 118 (1) :48–54, 2014.
 115. ZHANG; Y.-Z.; ZHANG; J.; LI; F.-F.; XIANG; X.; REN; A.-Q. & LIU; Y. Study on the interaction between ketoprofen and bovine serum albumin by molecular simulation and spectroscopic methods. *Spectroscopy*. 26 (6) :337–348, 2011.
 116. MULLER; W. E. & WOLLERT; U. Human serum albumin as a ‘silent receptor’ for drugs and endogenous substances. *Animal Genetics*. 39 (5) :561–563, 2008.
 117. FU; Z.; CUI; Y.; CUI; F. & ZHANG; G. Modeling techniques and fluorescence imaging investigation of the interactions of an anthraquinone derivative with HSA and ctDNA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 153 (1) :572–579, 2016.
 118. SUGANTHI; M. & ELANGO; K. P. Synthesis, characterization and serum albumin binding studies of vitamin K3 derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 166 (1) :126–135, 2017.
 119. CHEN; J.; SONG; G.; HE; Y. & QIUJUN; Y. Spectroscopic analysis of the interaction between thiazolo[2,3-b]pyrimidine analogues and bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 96 (1) :690–697, 2012.

ANEXO

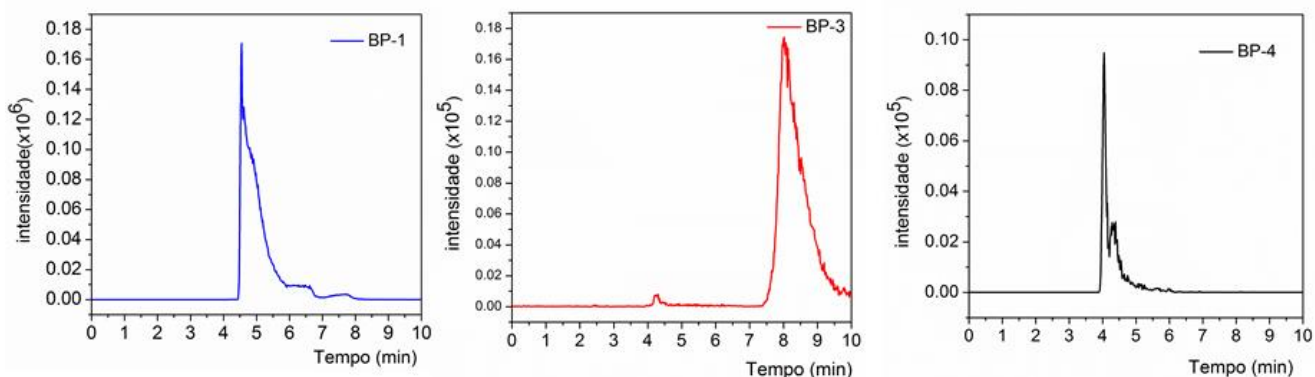
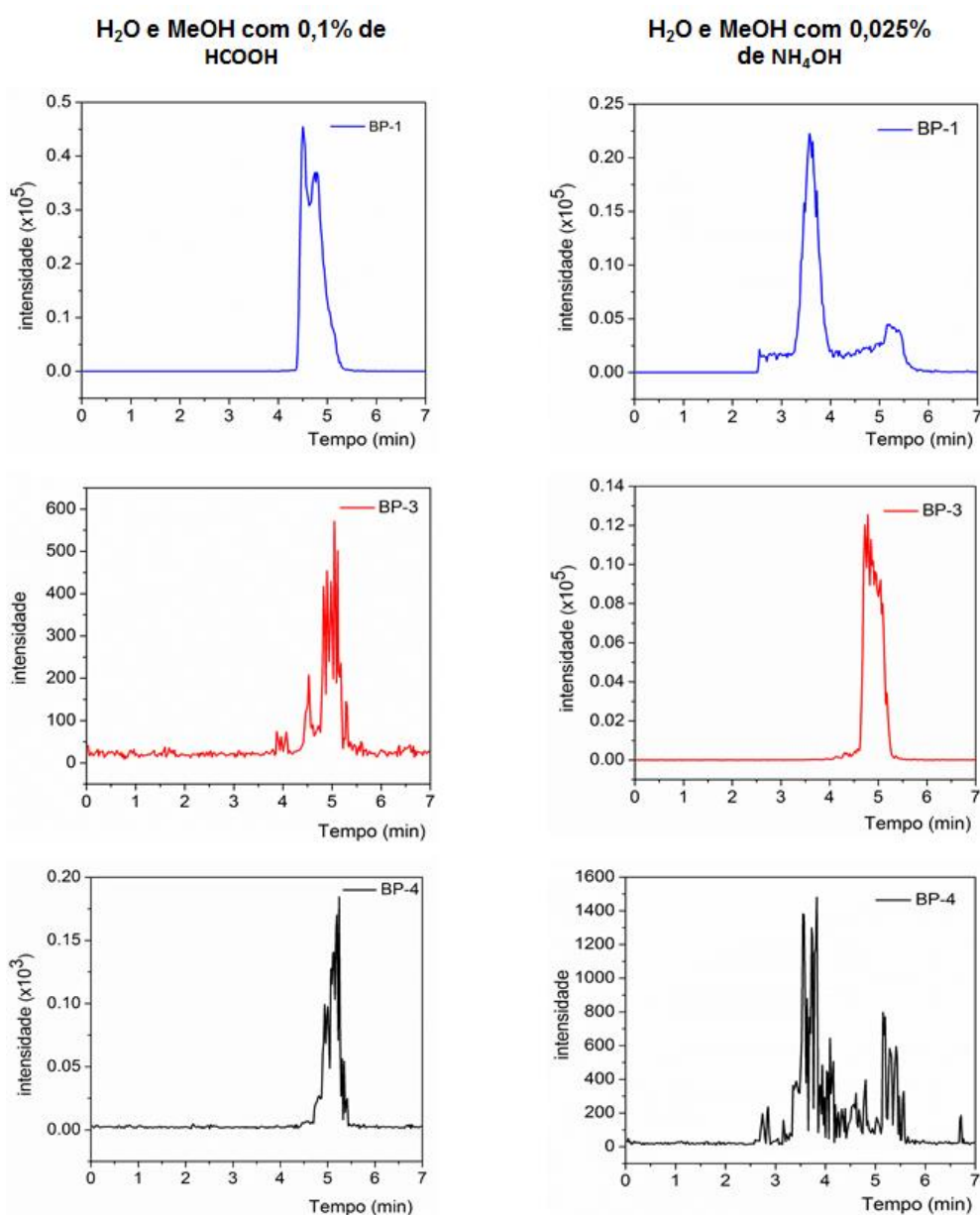


FIGURA A. 1. Cromatogramas referente ao teste de acetonitrila como solvente orgânico.

FIGURA A. 2. Uso de aditivos (NH₄OH e HCOOH) na cromatografia.

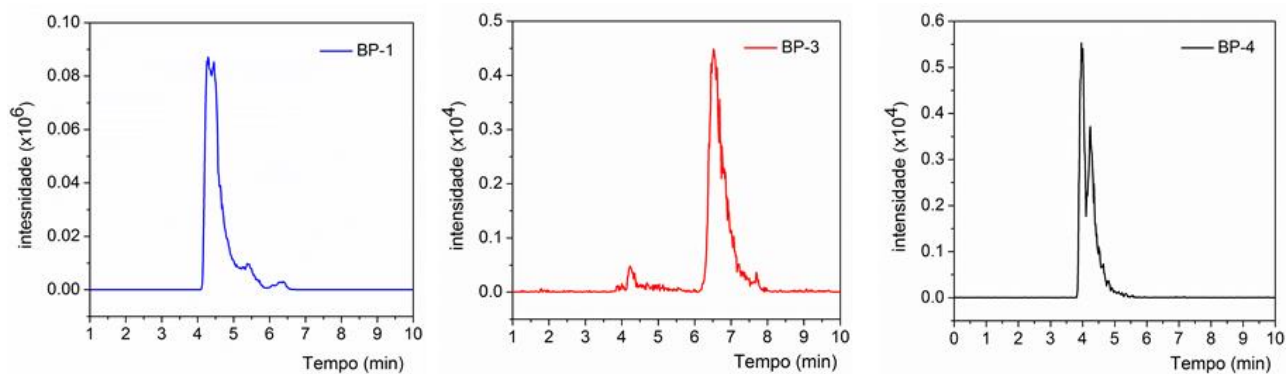


FIGURA A. 3. Cromatogramas referentes à troca de metanol por acetonitrila.

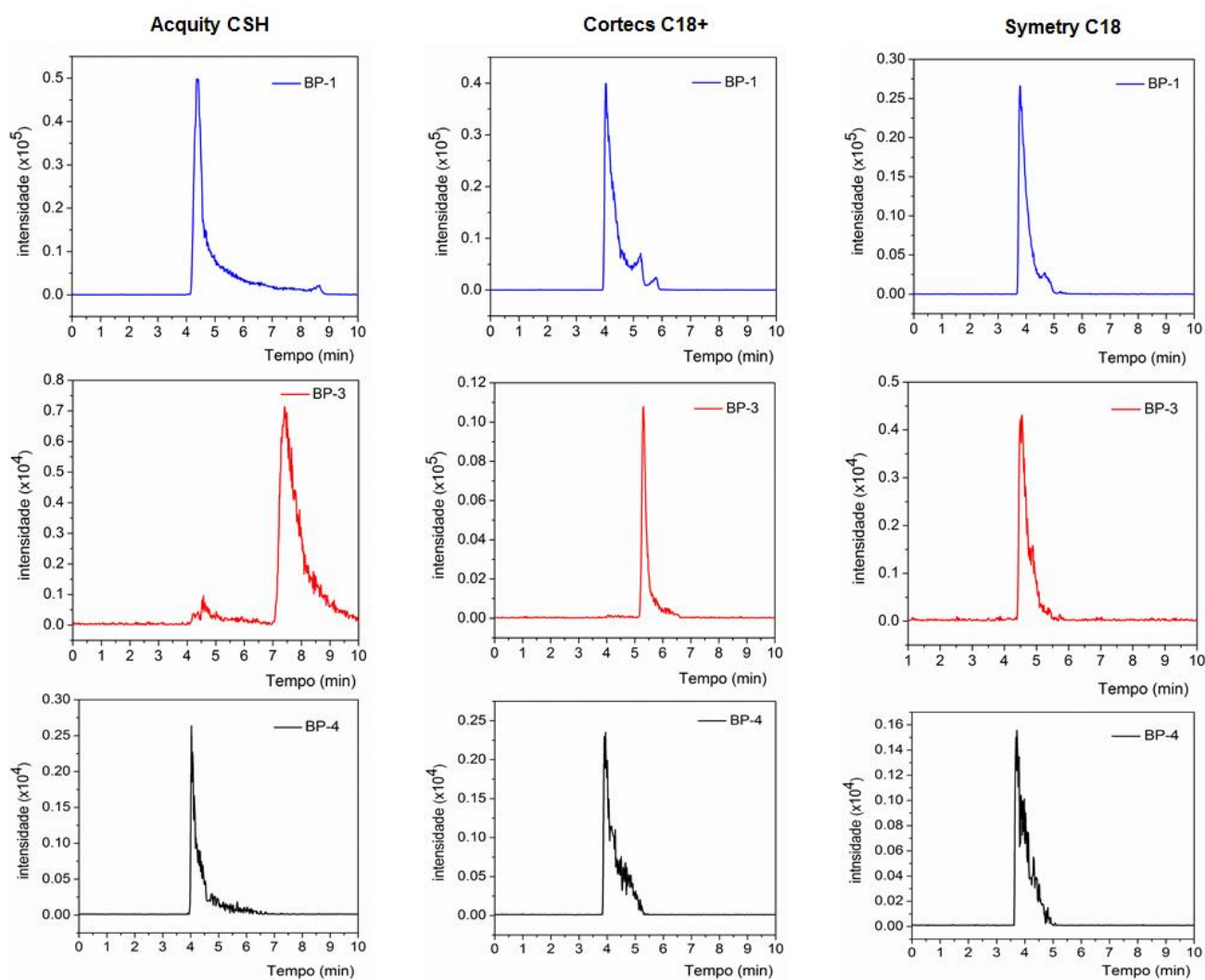


FIGURA A. 4. Cromatograma das colunas ortogonais.

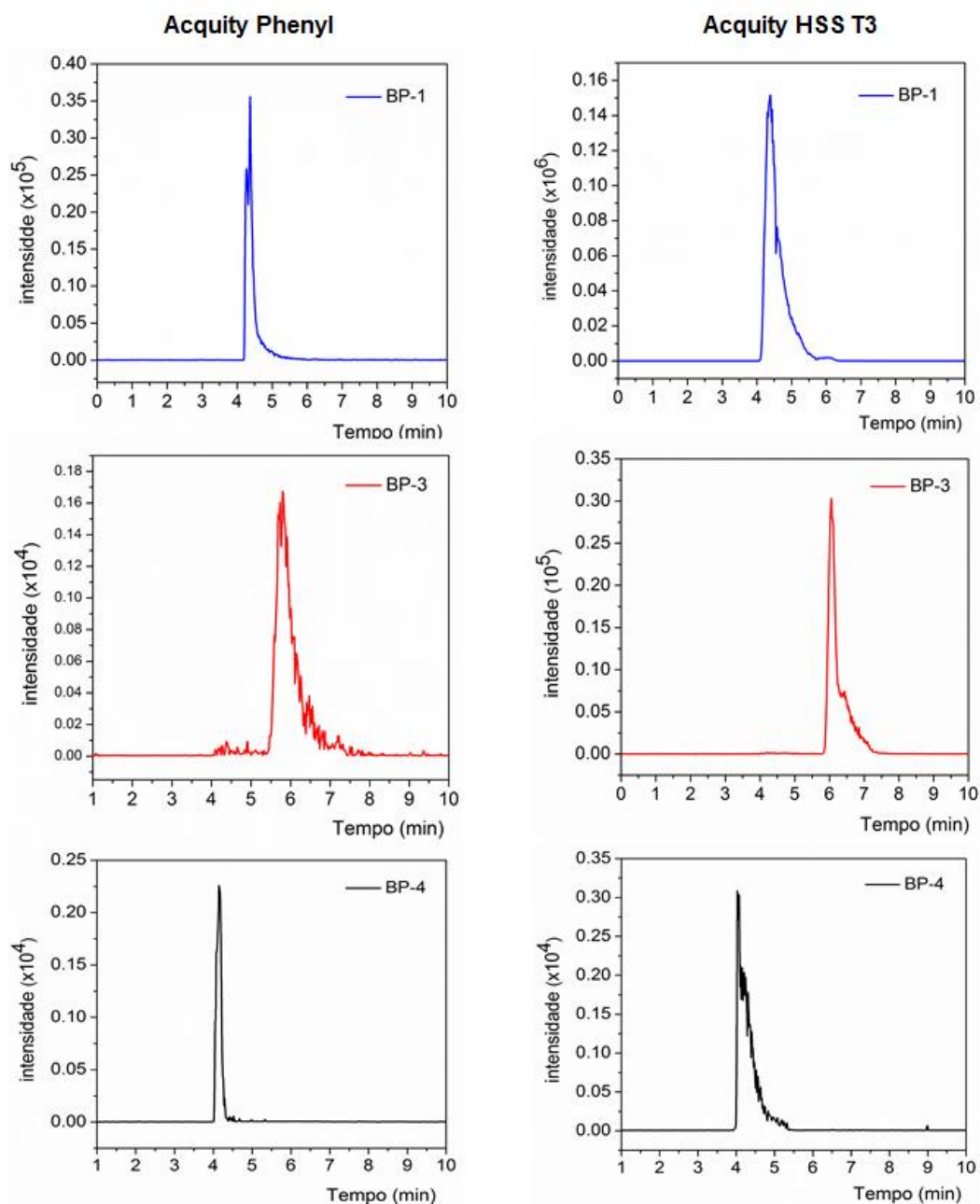


FIGURA A. 5. Continuação dos cromatograma das colunas ortogonais.

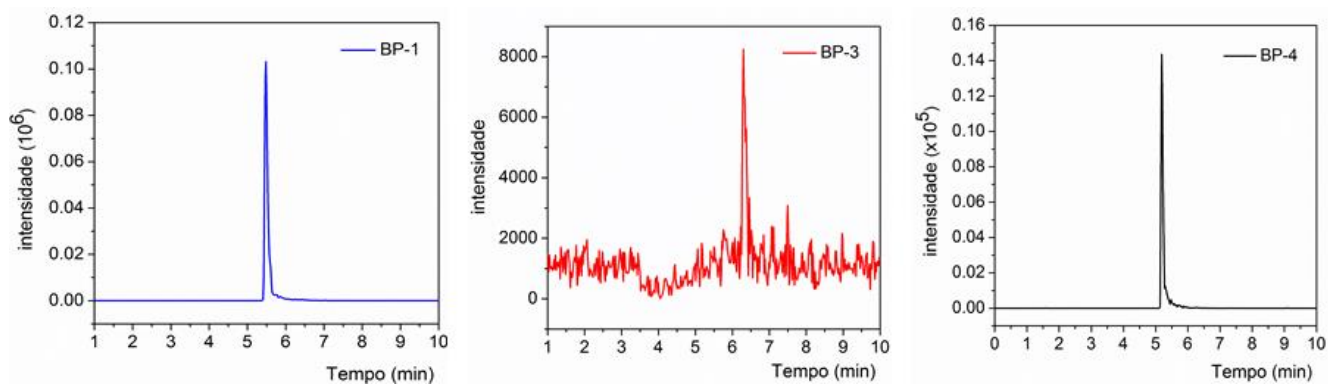


FIGURA A. 6. Cromatograma referente ao experimento das melhores condições cromatográficas utilizando a Coluna 1.

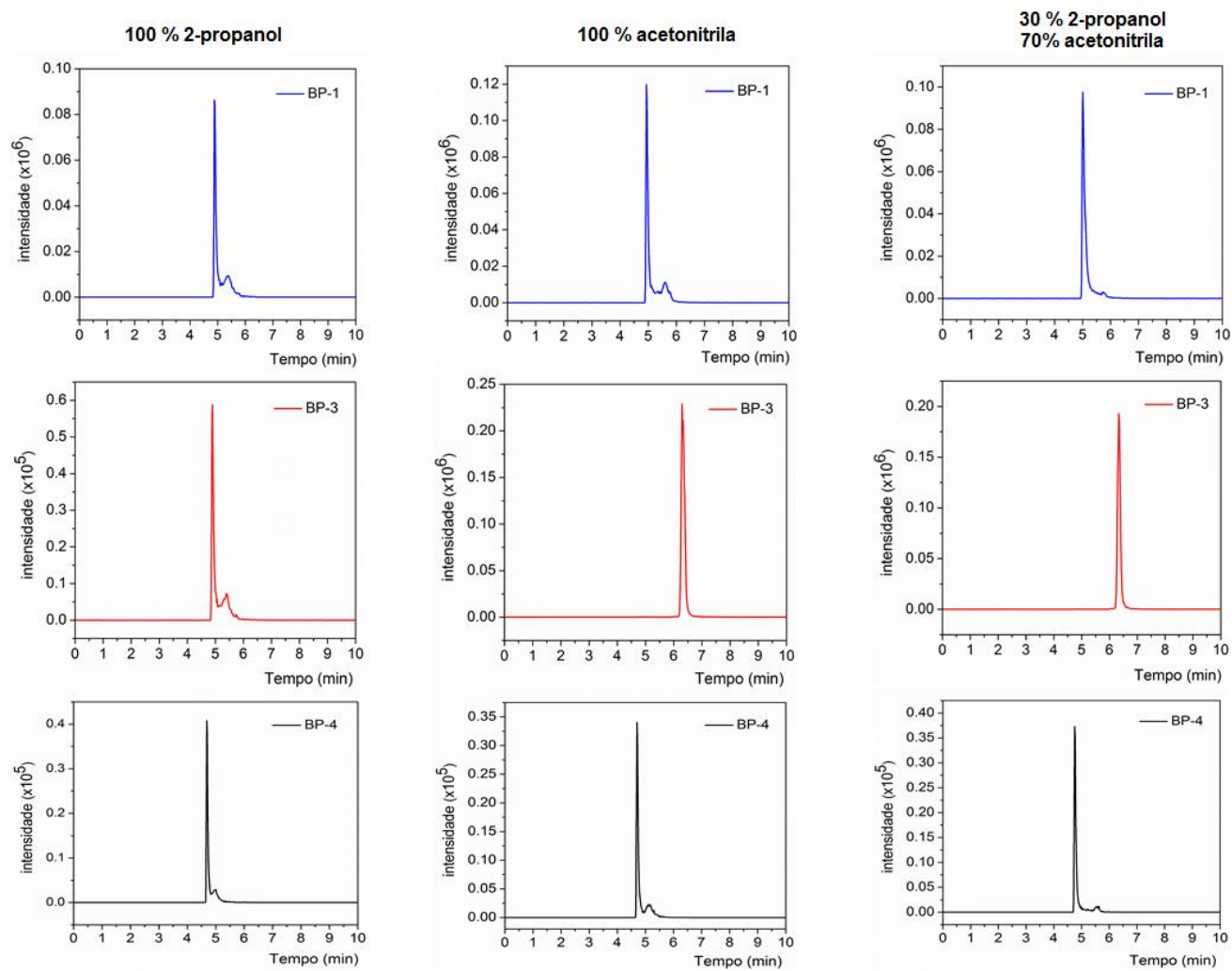


FIGURA A. 7. Cromatograma referente ao teste de influência de solventes no efeito de matriz.

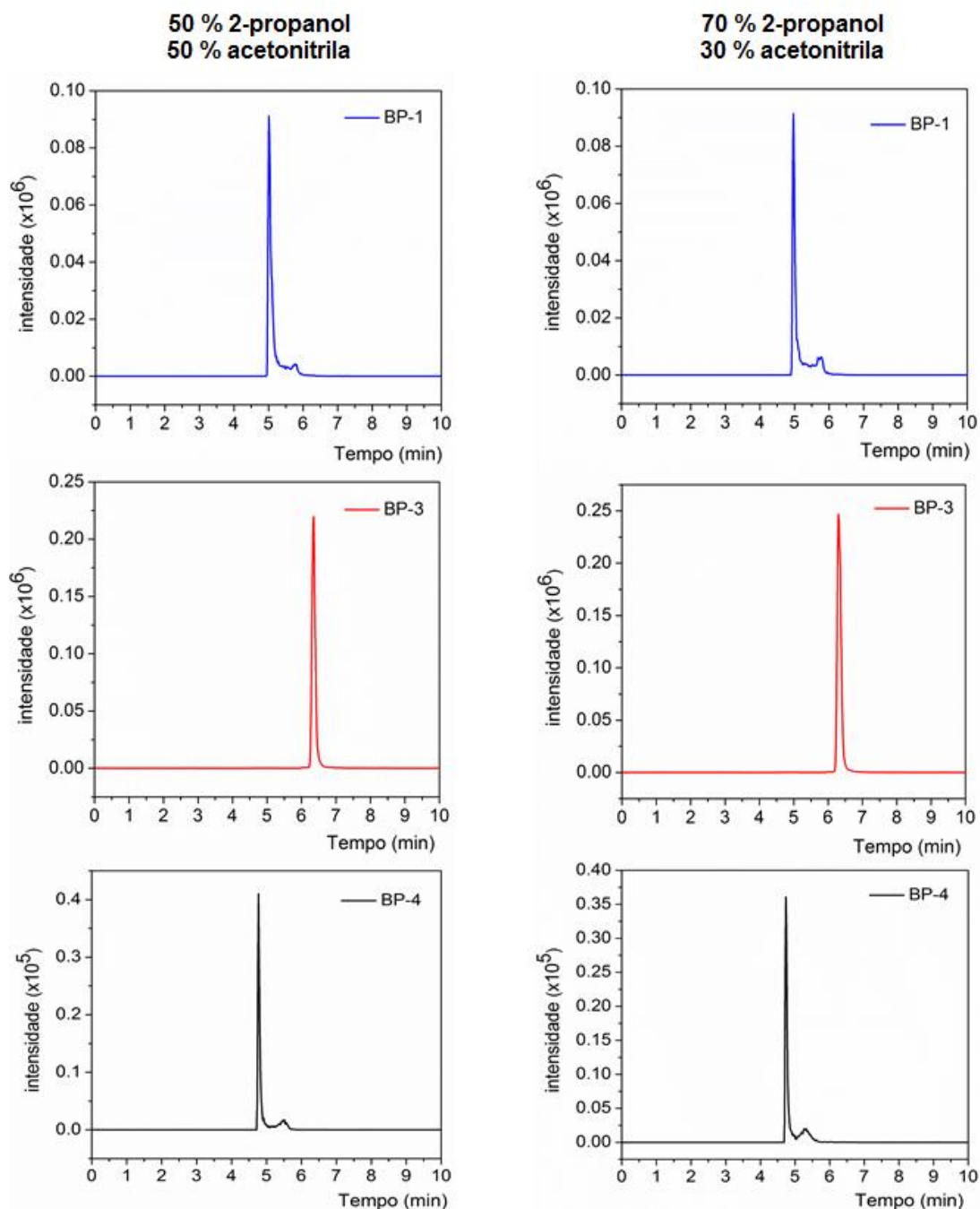


FIGURA A. 8. Continuação dos cromatograma referente ao teste de influência de solventes no efeito de matriz.

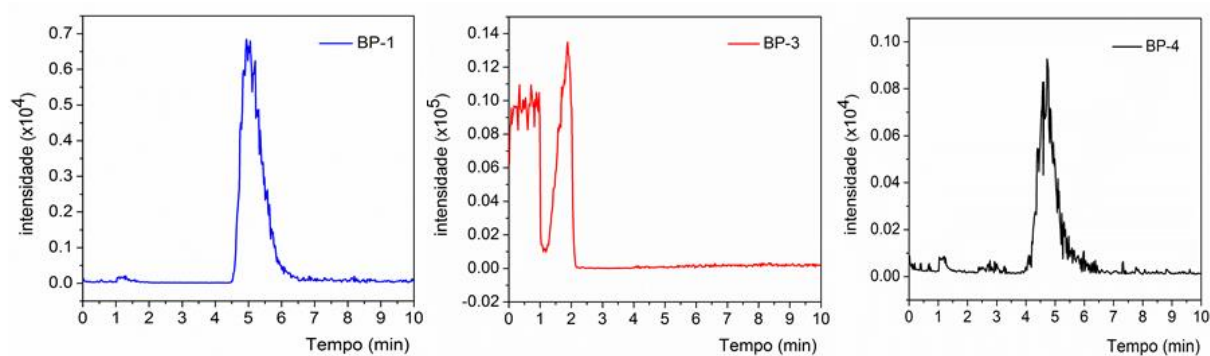


FIGURA A. 9. Uso de DMSO na fase móvel para diminuir o efeito memória.

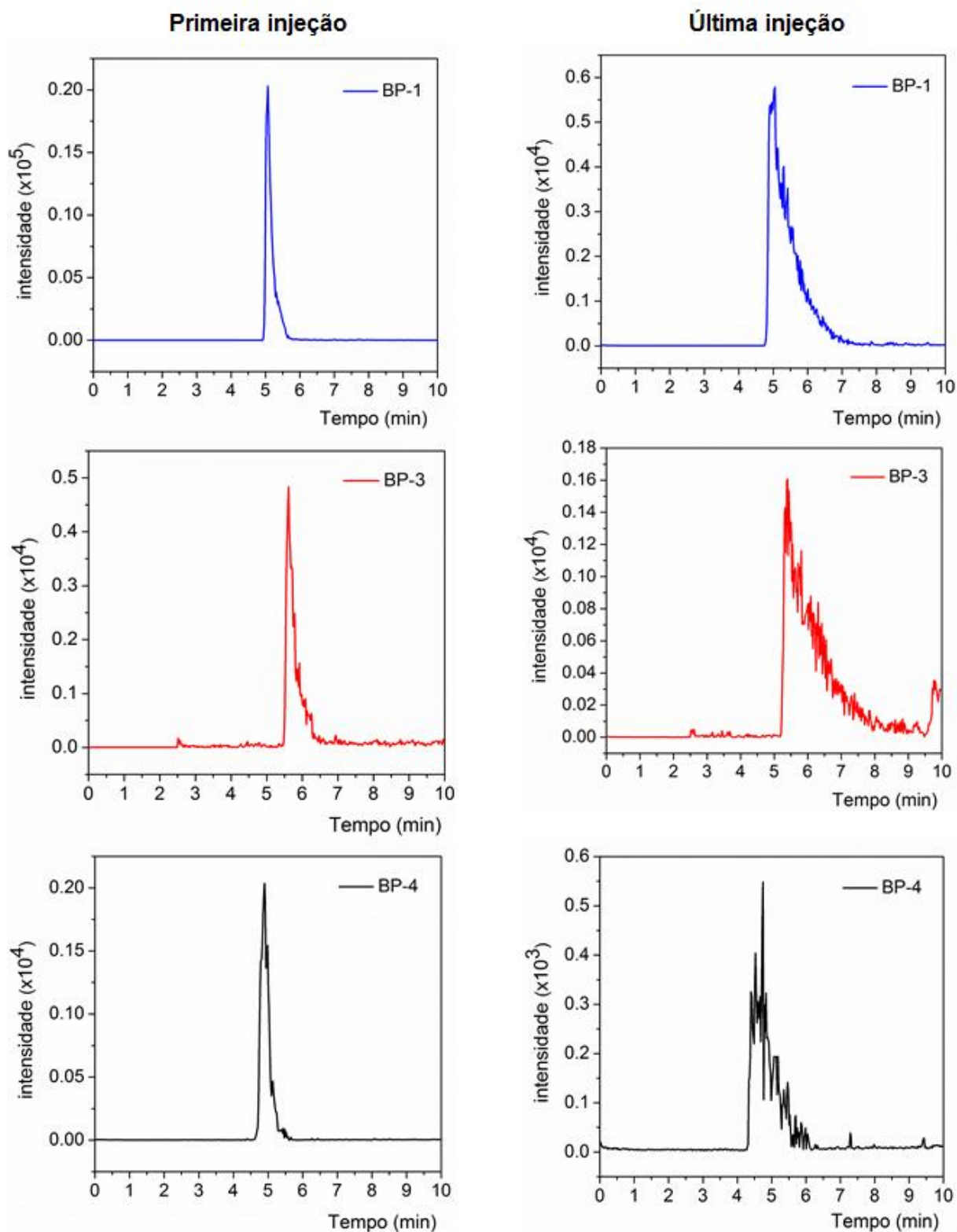


FIGURA A. 10. Cromatogramas da comparação entre as primeiras e últimas injeções do dia, indicando a perda da eficiência cromatográfica.