

## Pré-Tratamento de Amostras

Ricardo M. Orlando<sup>1</sup>

Diogo Dias Cordeiro; Ana Elisa Barreto Mathias, Kênnia R. Rezende; Eric de S. Gil<sup>2</sup>

**RESUMO:** Durante os últimos quinze anos, diversos avanços e novidades em tratamento de amostras vêm surgindo e ampliando as opções disponíveis. As técnicas analíticas instrumentais modernas têm contribuído em diversas áreas específicas promovendo a eficiência, rapidez e seletividade de variadas separações, embora relativamente limitadas em certos critérios como versatilidade, custo e consumo de solvente. Técnicas clássicas como a extração líquido-líquido ou extração em fase sólida são, ainda, a primeira escolha durante o desenvolvimento de metodologias analíticas. A primeira é bastante simples, barata e versátil e a segunda, apresenta grande flexibilidade de eluentes, além da seletividade. Alternativamente, técnicas como a microextração em fase sólida, extração em membrana e os novos materiais de acesso restrito, apesar de possuírem vantagens em diversas situações, ainda necessitam ser mais exploradas e aperfeiçoadas para adquirir aceitação e competitividade operacional.

**PALAVRAS-CHAVE:** preparação de amostra, extração líquido-líquido, extração em fase sólida, microextração em fase sólida, extração em membrana

### Biological samples cleanup during analytical method development

**ABSTRACT:** Cleaning up biological or non-biological samples is the rate limiting step during the development of an analytical method validation process. In spite of the fact that using more technological instrumental, analytical techniques needs sample preparation. During the past fifteen years a lot of advances and news are arriving and bringing up many options in sample preparation. Selectivity, fastness and low solvent consumption are some desirable goals to achieve in sample preparation. In this regard, classical methods as liquid-liquid extraction and solid phase extraction appear as the main choices during analytical method development. The first can be said as simplest, cheapest and versatile. The second has great flexibility and specificity. Regarding solid phase microextraction (SPME), membrane extraction (ME) and the new restricted access material there is some advantages for specific matrixes, although still requiring better exploration and improvement to acquire acceptance and operational competitiveness.

**KEYWORDS:** sample preparation; liquid-liquid extraction; solid phase extraction, solid phase microextraction, membrane extraction

<sup>1</sup> Pós Graduando, Instituto de Química, Unicamp. Contato: [orlando@iqm.unicamp.br](mailto:orlando@iqm.unicamp.br)

<sup>2</sup> Pesquisadores do Laboratório de Biofarmácia e Farmacocinética de Substâncias Bioativas - FF/UFG

## 1. INTRODUÇÃO

As diversas técnicas de pré-tratamento de amostras têm por finalidade a recuperação do analito da matriz, eliminando-o de substâncias que interfiram na análise. A concentração do analito a uma escala possível de ser quantificada realiza-se posteriormente à determinação do tipo de técnica e das condições de análise, de forma a tornar a matriz compatível com o sistema analítico. Em alguns casos, esta etapa serve também para modificar quimicamente o analito através de reações de derivatização. Algumas vantagens e desvantagens destas são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Comparação entre as principais técnicas de preparação de amostras

TÉCNICA	PRINCÍPIOS DA TÉCNICA	CARACTERÍSTICAS DA TÉCNICA
<b>Extração líquido-líquido</b>	Distribuição do analito entre dois líquidos imiscíveis em função de um coeficiente de partição.	Boa reprodutibilidade, fácil manuseio, utilizada para compostos pouco voláteis. Exige solventes puros, produz grandes quantidades de resíduos.
<b>Extração em fase sólida</b>	Adsorção seletiva do analito em materiais sólidos e posterior dessorção com solventes. Segue os mecanismos da cromatografia em coluna clássica.	Grande disponibilidade de materiais adsorventes, altas recuperações, baixo consumo de solventes. Cartuchos e discos extratores tornam a técnica mais cara, mais complicada quando realizada manualmente.
<b>Microextração em fase sólida</b>	Distribuição do analito entre duas fases imiscíveis onde a fase extratora é um polímero que reveste uma fibra de sílica.	Técnica versátil, com baixo consumo de solvente e necessidade de pouca quantidade de amostra. Fibras de extração reaproveitáveis. Limites de quantificação altos, poucos materiais de extração disponíveis.
<b>Extração por fluido supercrítico</b>	Solubilização do analito por um fluido no estado supercrítico que depois é coletado em um líquido ou adsorvente.	Pode ser utilizada tanto em amostras sólidas, semi-sólidas ou líquidas. Não necessita de solventes orgânicos. O analito precisa ser solúvel no fluido supercrítico.
<b>Extração em membrana</b>	Permeação seletiva do analito através de uma membrana que separa duas fases líquidas.	Eficiente na separação de fármacos de proteínas. Possui menor capacidade de separação e concentração do analito; separação mais demorada.
<b>Precipitação protéica</b>	Adição de sais e solventes orgânicos que competem com as proteínas pela água disponível.	Técnica muito simples; baixo custo. Pouca eficiência na retirada de interferentes; baixa reprodutibilidade; perda do analito.

A etapa de preparação da amostra é comumente manual e decisiva para a precisão e a exatidão do método, demandando maior tempo e empenho por parte do operador (Majors, 1991) na seleção dos procedimentos rápidos, com poucas etapas, capaz de produzir recuperações quantitativas e reprodutivas do analito e, de preferência, com possibilidade de automação (Queiroz et al., 2001). Dependendo do tipo de matriz, alguns analitos (*p.e.* gases e vapores) não requerem nenhum tipo de tratamento prévio, sendo analisados diretamente em equipamentos analíticos (*p.e.* cromatógrafo a gás). Outras matrizes, como os medicamentos, podem envolver ampla gama de misturas de compostos orgânicos e inorgânicos de origem sintética ou biológica cuja preparação para análise vai depender de cada caso em particular. A escolha do tipo de tratamento empregado é feita em função das características da matriz e do analito e das condições de análise empregadas que incluem, principalmente, o tipo de técnica e de instrumentação disponíveis no local de trabalho.

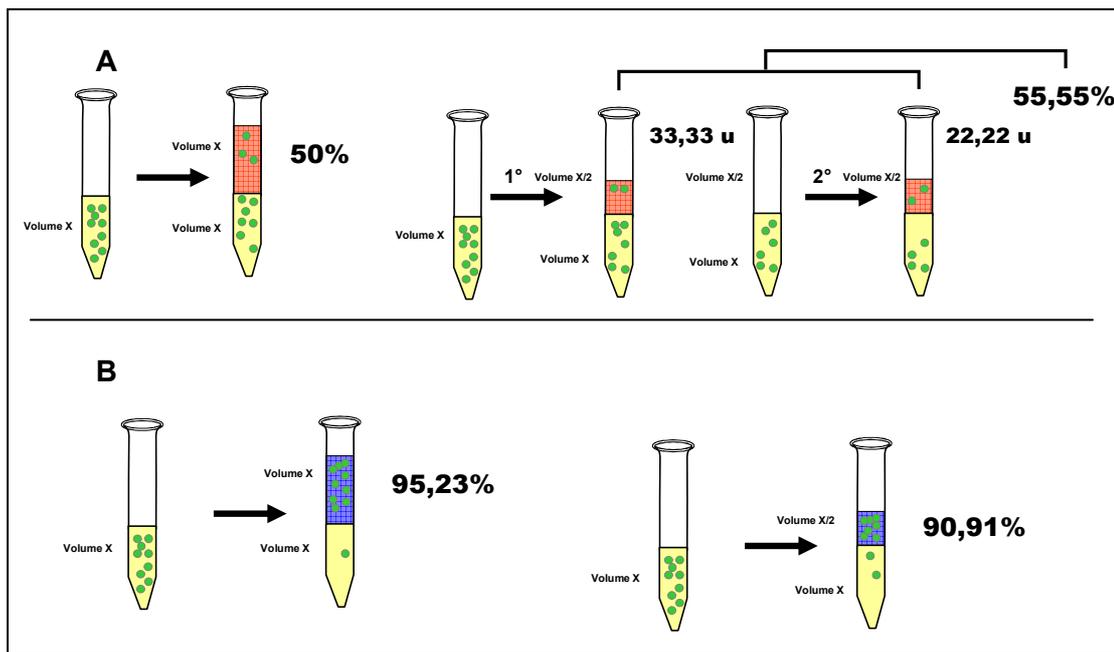
Neste artigo serão abordados métodos de preparação de amostras baseados em procedimentos usados principalmente em análise de substâncias orgânicas e inorgânicas utilizando técnicas de separação cromatográficas e eletroforéticas ou, quantitativas como na absorção atômica, espectrometria de massas, detecção eletroquímica e ultravioleta, e outras técnicas correlacionadas.

### **1.1 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)**

A LLE é feita pela adição e agitação de um solvente imiscível na matriz e a extração acontece pela passagem do analito para o solvente imiscível (Queiroz et al., 2001). Após a agitação são formadas duas fases líquidas que são então separadas. A fase contendo o analito pode ser evaporada, no caso de solventes orgânicos, ou pode ser, quando aquosa, analisada diretamente no sistema cromatográfico

A LLE é um processo baseado no equilíbrio com o analito se distribuindo entre duas fases imiscíveis sendo que a quantidade total extraída está relacionada com o coeficiente de partição entre essas duas fases. Dessa forma, pelo menos em teoria não é possível esperar extrações com recuperação de 100%.

É importante lembrar que a LLE é mais eficiente se for realizada com duas alíquotas de um volume  $\times/2$  de solvente do que uma única alíquota  $\times$  daquele mesmo solvente (Figura 1A). Por outro lado, quando o analito possuir alta afinidade pelo solvente extrator o volume do mesmo pode ser reduzido sem muito prejuízo na recuperação (Figura 1B).



**Figura 1:** (A) Comparação do aumento da recuperação através da utilização de várias alíquotas de um mesmo volume de solvente considerando um coeficiente de partição de 1. (B) Comparação de uma variação de volume para um analito que possui alta afinidade (coeficiente de partição 20) pelo solvente de extração.

A eficiência da LLE vai depender de alguns fatores como pH, complexação e concentração salina, que devem ser ajustadas para aumentar a solubilidade do analito na fase extratora, elevando o coeficiente de partição (Snyder et al., 1997). Reações de derivação também são utilizadas para aumentar a solubilidade do analito na fase extratora.

No caso de amostras onde existem agentes complexantes na matriz, a extração pode ficar prejudicada se o analito estiver altamente ligado a este agente. Neste caso, podem ser utilizados detergentes, ácidos ou bases fortes ou outras substâncias que gerem a lise do complexo.

As principais vantagens da LLE são as facilidades de operação manual e o relativo baixo custo e variedade de solventes orgânicos utilizados. Já os principais problemas apresentados devem-se à produção de resíduos orgânicos, a formação de emulsões durante a extração, e as dificuldades de automação. Ademais há necessidade de evaporação de volumes consideráveis de solventes que introduzem vapores orgânicos no ambiente, a difícil automação e os baixos níveis de repetibilidade / reprodutibilidade das análises.

## 1.2 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

SPE é uma técnica bastante empregada em matrizes complexas e utiliza os mesmos materiais adsorventes empregados em cromatografia líquida, dentre os quais se destacam

os derivados de sílica C8, C18 e CN (Queiroz et al., 2001). Os mecanismos de retenção na SPE assemelham-se aqueles envolvidos na cromatografia líquida em coluna (Poole et al., 2000) e, dependendo do adsorvente e do modo como é empregada, a SPE é dividida em modo reverso, modo normal e troca iônica. Nos casos das fases reversas (C8, C18 e CN), a retenção do analito acontece devido, primeiramente, às interações de van der Waals não polares, entre as ligações carbono-hidrogênio do analito com os grupos funcionais da superfície da sílica. Já no modo normal, as principais interações são entre grupos polares do analito e da fase extratora através de ligações de hidrogênio, interações  $\pi$ - $\pi$  e dipolo-dipolo. Finalmente, no modo troca iônica, interações eletrostáticas são as responsáveis pela extração seletiva do analito (Snyder et al., 1997). A SPE conta com uma grande variedade de adsorventes disponíveis, que podem ser empregados com os mais diversos tipos de matrizes e classes de compostos (Tabela 2)(Queiroz et al., 2001).

**Tabela 2:** Características da SPE empregada nos modos reverso, normal e troca iônica

	<u>ANALITOS</u>	<u>MATRIZES</u>	<u>GRUPOS ADSORVENTES</u>	<u>SOLVENTES DE ELUIÇÃO</u>
<b>Fase Reversa</b>	Apolares: fármacos, pesticidas, peptídeos	Aquosas: fluidos biológicos, água, tecidos, tampões	octadecilsilano $\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ octilsilano $\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$ metilsilano $\equiv\text{Si}-\text{CH}_3$ cicloexilsilano $\equiv\text{Si}-$ 	Metanol, acetone, clorofórmio, hexano
<b>Fase Normal</b>	Polares: carboidratos, fenóis, metabólitos de vitaminas	Oleosas: óleos, lipídios, tecidos gordurosos	sílica $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ alumina $\text{Al}_2\text{O}_3$ florisil $\text{MgO}_3\text{Si}$ aminopropilsilano $\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	Metanol, etanol, acetona
<b>Troca Iônica</b>	Catiônicos: bases iônicas ou ionizáveis (fármacos, herbicidas, catecolaminas)	Aquosas: fluidos biológicos, água, tecidos, tampões	Carboximetilsilano $\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ sulfonilpropilsilano $\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$	Tampões básicos ou com alta força iônica
	Aniônicos: ácidos iônicos ou ionizáveis (ácidos orgânicos, fármacos, vitaminas, ácidos graxos, fosfatos)	Aquosas: fluidos biológicos, água, tecidos, tampões	Dietilaminopropilsilano $\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_3-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$ trimetilaminopropilsilano $\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$	Tampões ácidos ou com alta força iônica

Atualmente, a SPE tem ganhado aplicações específicas com o desenvolvimento de fases mais seletivas. Este é o caso do material extrator composto de fenilboronato ( $\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{C}_6\text{H}_5)-\text{B}(\text{OH})_2$ ) que possui aplicação na análise de nucleosídeos, nucleotídeos, carboidratos e catecolaminas (Mitchell et al., 1992; Liebich et al., 1998). Extrações seletivas em materiais biológicos também são realizadas pela fixação de anticorpos ou polímeros impressos molecularmente, como no caso da extração de insulina do plasma (Rosenfeld et al.,

1991). Vários são os dispositivos empregados para SPE dentre eles os mais utilizados são os cartuchos e os discos de extração (Figura 2).

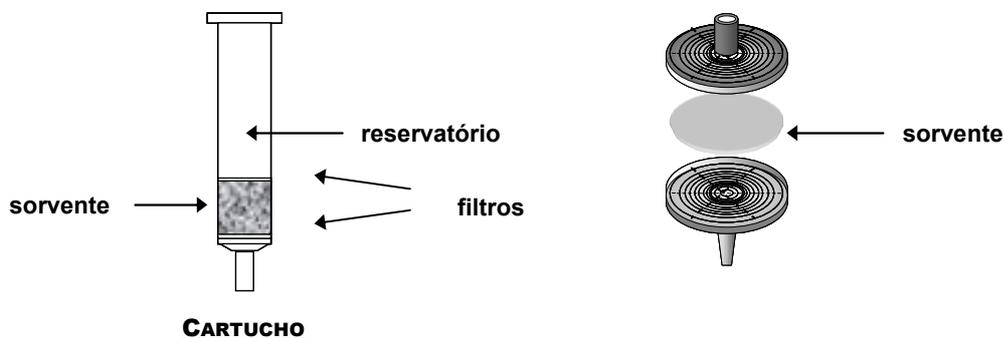


Figura 2: Representação de um cartucho e um disco, usados na SPE

Em ambos dispositivos, a amostra é forçada a passar pelo material extrator pela aplicação de pressão em uma das extremidades do cartucho ou disco. Para realizar a análise simultânea de várias amostras e extrações mais rápidas, geralmente são utilizados sistemas extratores com vácuo (Figura 3).

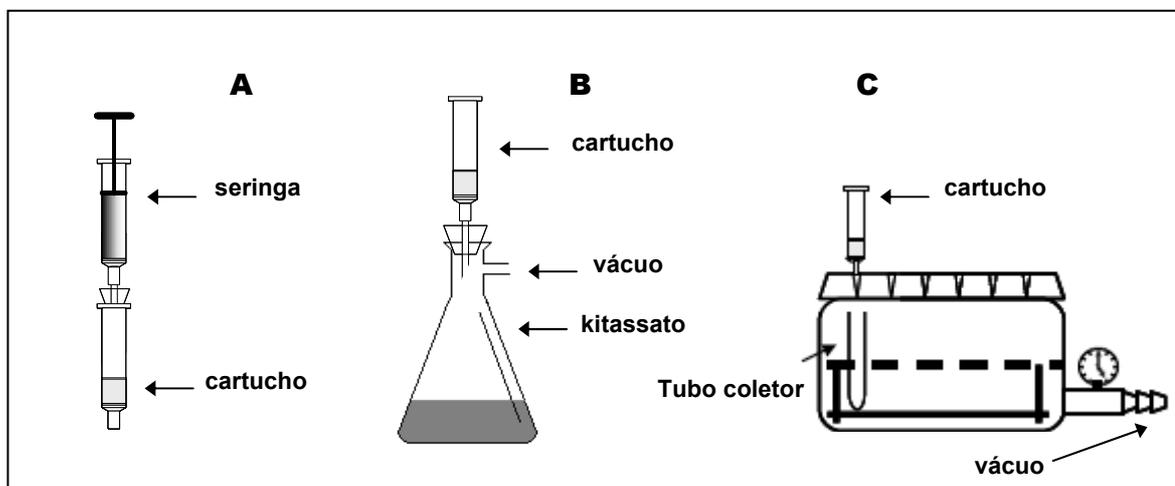


Figura 3: Representação dos dispositivos empregados na SPE. A = seringa; B = kitassato; C = sistema extrator (Snyder et al., 1997).

Originalmente a SPE, empregando discos, foi utilizada em análises de traços de compostos orgânicos em água (Hagen et al., 1990). Atualmente, ela se aplica aos mais diferentes tipos de amostras principalmente em análises biomédicas de soro, plasma e urina (Hearne & Hall, 1993). Nos discos são empregadas quantidades de materiais extratores semelhantes aos cartuchos, porém as partículas extratoras se encontram distribuídas em uma área muito maior resultando em camadas extratoras mais delgadas, o que facilita a passagem da matriz (Tabela 3). Além disso, discos empregam geralmente partículas menores e

mais homogêneas, o que também facilita a transferência de massa do analito, deixando o leito do disco com menor quantidade de caminhos preferenciais. O resultado é que os discos apresentam vazões mais altas, necessitam de menores volumes de eluente para a desorção e as extrações são mais reprodutíveis (Queiroz et al., 2001).

**Tabela 3:** Comparação entre as características de discos e cartuchos usados na SPE

<u>PARÂMETRO</u>	<u>CARTUCHO</u>	<u>DISCO</u>
<b>Dimensão (altura x diâmetro)</b>	1,1 x 1,1 cm	0,05 x 4,7 cm
<b>Área superficial</b>	0,95 cm <sup>2</sup>	11.34 cm <sup>2</sup>
<b>Massa de extrator</b>	500 mg	500 mg
<b>Vazão<sup>a</sup> a 85 kPa</b>	30 mL min <sup>-1</sup>	100 mL min <sup>-1</sup>
<b>Velocidade linear<sup>b</sup></b>	0,525 cm s <sup>-1</sup>	0,15 cm s <sup>-1</sup>

<sup>a</sup> = vazão típica; <sup>b</sup> = com o fluxo especificado (Snyder et al., 1997)

Uma grande desvantagem dos discos é que sua eficiência de extração é bastante dependente da etapa de condicionamento, o que torna sua operação mais difícil e, devido às suas partículas serem menores, os discos também estão mais sujeitos a obstrução por macromoléculas e materiais particulados, além de possuírem custo mais elevado que os cartuchos.

Cartuchos são os dispositivos mais utilizados para a SPE devido a sua facilidade de manuseio, grande disponibilidade comercial e baixo custo. Os cartuchos de extração assemelham-se a seringas hospitalares sem o êmbolo, dentro das quais se encontra o material extrator acondicionado entre dois filtros (Figura 2). A porção da seringa acima do material extrator é chamada de reservatório e serve para acondicionar a amostra. Os cartuchos disponíveis comercialmente em geral, possuem reservatórios de 0,5 a 10 mL e recheios que variam de 35 mg a 2 g (Snyder et al., 1997). O maior problema dos cartuchos é a variação apresentada entre fabricantes e mesmo entre lotes de uma mesma marca devido às diferenças de características entre as partículas extradoras empregadas. Cartuchos também apresentam eficiência mais baixa e maior consumo de solventes quando comparados aos discos.

Diferentemente da LLE e da SPME, nas quais a extração está baseada no equilíbrio, a SPE é um processo onde normalmente recupera-se quase todo o analito da matriz em uma única extração. Após a retenção do analito pelo adsorvente da coluna e eliminação dos interferentes por lavagens sucessivas, procede-se a eluição do composto de interesse com

pequenos volumes de um solvente adequado.

Uma grande vantagem da SPE é a sua capacidade de automação. Diversos trabalhos têm sido publicados nas duas últimas décadas descrevendo métodos que empregam SPE automatizada (Rossi & Zhang, 2000). A SPE automatizada confere maior capacidade e velocidade de análise ao método, aumentando sua precisão e tornando-o mais seguro e menos tedioso ao operador.

No modo "on-line", o dispositivo automatizado de SPE faz parte do sistema cromatográfico. A comutação de colunas é uma das técnicas utilizadas neste modo. Nesse caso, uma coluna faz a separação dos interferentes e pré-concentração do analito e, através de uma válvula, a fração contendo o analito é transferida para uma segunda coluna de maior eficiência que vai então realizar a separação desejada. A limitação desta técnica é que, com frequência, ocorre perda da eficiência com mudanças nos formatos dos picos e efeito memória (carryover) do analito, o que prejudica as análises seguintes (Rossi & Zhang, 2000).

Outro dispositivo utilizado no modo "on-line" são as chamadas "workstations". "Workstations" são plataformas robotizadas, com colunas de extração descartáveis, capazes de extrair, dependendo da marca e das condições de operação, até 400 amostras por hora (Smith & Lloyd, 1998).

Apesar da grande eficiência dos sistemas automatizados, eles ainda apresentam problemas de sobrecarga de analito, incompatibilidades com amostras instáveis e custos ainda muito elevados que precisam ser justificados (Rossi & Zhang, 2000).

Em geral, as principais desvantagens da SPE são o maior tempo de execução e complexidade operacional quando realizada de forma manual. Além disso, destaca-se o custo adicional dos cartuchos e discos que são utilizados geralmente uma única vez (Lord & Pawliszyn, 2000).

## **1.2.1 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ATRAVÉS DE MATERIAIS DE ACESSO**

### **RESTRITO**

As técnicas que empregam materiais de acesso restrito (RAM) são quase sempre consideradas como uma técnica distinta da técnica de SPE, entretanto, como a retenção do analito acontece (como na SPE) em um suporte sólido é conveniente apresentá-la aqui.

Os chamados materiais de acesso restrito (RAM) são materiais ligados à sílica de uma maneira que a mesma apresente caráter polar em sua superfície externa e apolar no interior dos poros da partícula. Dependendo do tipo de grupos e da maneira que esses grupos são ligações as partículas de sílica os RAM podem combinar um ou mais mecanismos de separação (Figura 4).

Os RAM encontram-se disponíveis principalmente como recheio de colunas cromatográficas metálicas, portanto, apresentam basicamente a aparência e o funcionamento de uma coluna cromatográfica analítica. Essas colunas podem ser utilizadas sozinhas ou em combinação com outras no chamado modo de comutação de colunas (column-switching).

A característica fundamental dos RAMs é que os mesmos permitem seletivamente através de meios químicos ou físicos que somente determinados tipos de compostos sofram retenção no interior dos poros das partículas retentoras (Figura 4).

Os RAMs têm sido usados para determinação de fármacos e princípios ativos em amostras bastante complexas como plasma, soro, sem a remoção prévia das proteínas (Unger, 1991; Boos & Grimm, 1999, Cassiano et al., 2002).

Atualmente existem sete categorias de RAM disponíveis comercialmente:

- RAM com barreiras físicas. Primeiro tipo a ser desenvolvido. Consiste de partículas de sílica com poros de cerca de 8 nm que excluem macromoléculas. O interior dos poros desse tipo de material é apolar e a superfície polar.

- RAM de sílica-alquildiol. Segundo RAM mais utilizado é também constituído de partículas de

- sílica com poros ainda menores (6 nm) e com interior com grupos alquila e superfície com grupos diol.

- RAM com sílica recoberta com ligante combinado. Este tipo de material é composto por partículas de sílica com poros maiores (13 nm) que possui um revestimento de um ligante com regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (e.g. poliglicidol).

- RAM com barreiras químicas. Neste material, partículas de sílica de fase reversa (C8 e C18) recebem um recobrimento com um polímero adequado (e.g. polioxietileno) que apresenta permeabilidade química seletiva.

- RAM de sílica recoberta de proteínas. Partículas de sílica são recobertas de proteínas e dessa forma funciona como uma barreira química como descrito anteriormente.

- RAM com materiais funcionais mistos. Combinação de dois tipos de revestimentos em uma única partícula de sílica.

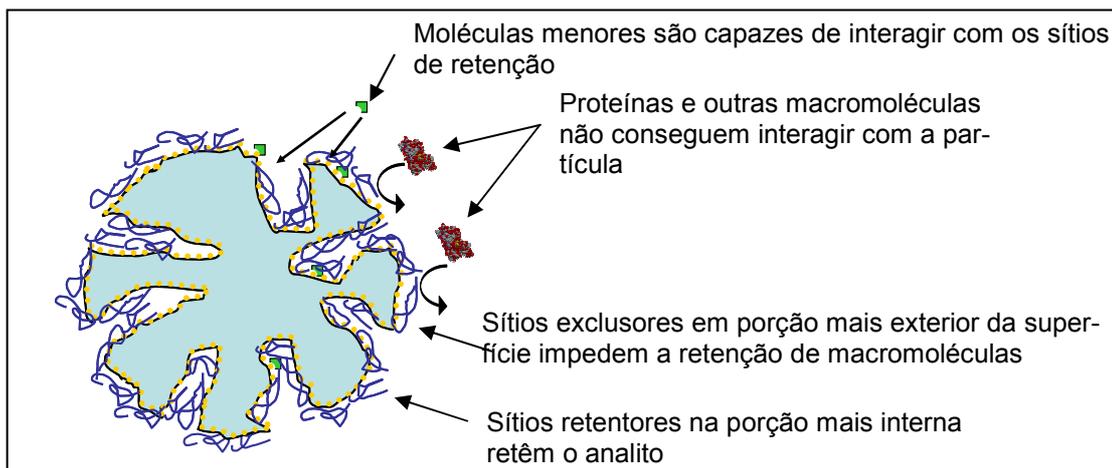
- RAM de fase hidrofóbica protegida. Este tipo de material é composto de sílica revestida com um composto apolar de cadeia longo (polioxietileno) que por sua vez é embebido com grupos fenil hidrofóbicos.

A maior promessa dos RAM é a extrema simplicidade do procedimento depois de otimizado. Os métodos utilizando RAM são todos executados em modo "on-line" e consistem na injeção direta de um determinado volume de amostra e análise cromatográfica direta normalmente em sistema de gradiente.

Em extrações utilizando colunas RAM sem comutação não deve ou não deveria ocorrer perda do analito uma vez que todo ele é injetado no sistema cromatográfico. Dessa

forma recuperações de 100% são teoricamente sempre obtidas ou mesmo a recuperação não é considerada.

Algumas desvantagens dos RAM são sua baixa vida útil e dessa forma seu custo mais elevado, além disso, RAM apresentam capacidade de receber de cada vez apenas algumas centenas de microlitros de amostra, o que muitas vezes, é insuficiente para que a massa de analito presente naquele volume atinja o limite de detecção desejado.



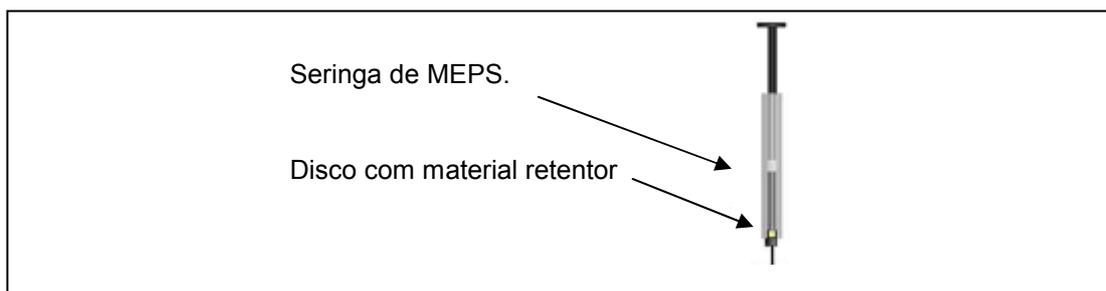
**Figura 4:** Representação do princípio de funcionamento de um material de acesso restrito.

### 1.2.2 OUTROS FORMATOS E MODOS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Além de cartuchos e discos existem outros formatos de utilizar os mesmos adsorventes da SPE.

Um desses formatos alternativos são as SPE em pipetas. O dispositivo de pipeta para SPE nada mais é que uma ponteira de pipeta a qual é acondicionado um disco de SPE. A grande vantagem desse formato é a facilidade de utilização pela simples conexão com uma pipeta semi-automática. Além disso, através da SPE no formato de pipeta, o fluxo da amostra e de solventes pode ocorrer nas duas direções (bidirecional), o volume de solvente é ainda mais reduzido e o descarte das pipetas evita contaminações cruzadas.

Outro formato muito parecido com as pipetas é a microextração com seringas recheadas (MEPS) (Figura 5). A diferença básica desse sistema para a pipeta é a sua capacidade de utilização apesar do risco de contaminação cruzada.



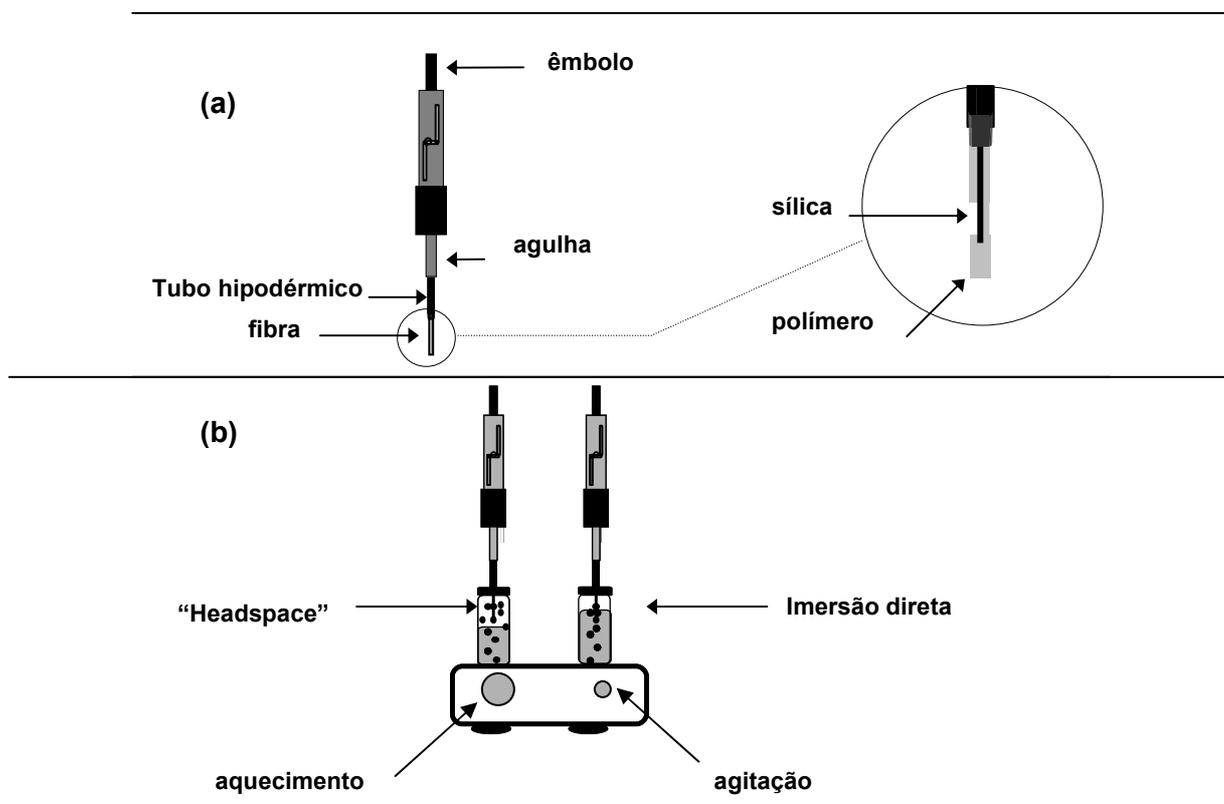
**Figura 5:** Representação da seringa de MEPS (Abdel-Rehim et al., 2005).

Existe também, além dos dispositivos de pipeta e seringa, um modo alternativo de realizar a extração em fase sólida convencional. Em vez de passar a amostra pelo cartucho a amostra (sólida) é triturada juntamente com as partículas extratoras. Este procedimento de SPE chamado de dispersão da matriz em fase sólida é conveniente para amostras sólidas, mas demonstra vantagens muito específicas para alguns casos em particular. Contudo, esta é uma alternativa que deve ser avaliada e pode ser utilizada em substituição ao procedimento convencional.

### **1.3 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica relativamente nova (Arthur & Pawliszyn, 1990) que apresenta vantagens como a economia de tempo e solvente, resumindo o processo de extração em praticamente um único passo. A princípio, essa técnica foi desenvolvida para análise de compostos voláteis por GC. Com o desenvolvimento de novos materiais de extração, a SPME foi sendo adaptada à HPLC e aos mais diversos tipos de matrizes e classes de compostos (Alpendurata, 2000). Atualmente, esta técnica é aplicada em análises ambientais de ar, solo e água, estudos toxicológicos com cabelo, saliva, soro, sangue e outros tecidos, além da análise de alimentos, análises forenses e estudos com células e organismos vivos (Alpendurata, 2000; Augusto & Valente, 2002).

A SPME é uma microtécnica de extração de amostras, tanto pelas dimensões do suporte de extração empregado como pelos volumes de matrizes e solventes necessários. Na SPME utiliza-se uma fibra ótica de sílica fundida, recoberta com um adsorvente adequado (Figura 6 a). A fibra se encontra acondicionada dentro de uma espécie de agulha em um amostrador semelhante a uma seringa, ficando exposta somente no momento da extração.



**Figura 6** (a): Representação dos componentes de um amostrador e uma fibra empregados em SPME; (b): Técnicas de SPME por “headspace” e imersão direta.

O processo de extração por SPME pode ser realizado por imersão da fibra diretamente na matriz ou através da exposição no espaço confinante chamado “headspace”, onde a fibra entra em contato somente com os vapores do analito que podem ser liberados da matriz por aquecimento (Figura 6 b). A técnica de “headspace” é especialmente útil quando existe alguma incompatibilidade entre a fibra e a matriz, sendo bastante empregada na determinação de compostos voláteis por GC. Já a extração direta é utilizada para compostos menos voláteis e termossensíveis, sendo o modo mais empregado para análises por HPLC.

Após a extração pela fibra, o soluto é dessorvido empregando aquecimento (GC) ou quantidades reduzidas de um solvente adequado (HPLC). Os custos reduzidos na SPME devem-se, ainda, ao fato das fibras de extração serem utilizadas várias vezes antes de serem descartadas.

O processo de extração na SPME está baseado no coeficiente de partição do analito entre a matriz e a fibra de extração, sendo a quantidade extraída, na maioria dos casos, muito inferior à quantidade total do analito presente na amostra, permitindo que a mesma amostra seja analisada em replicata (Lord & Pawliszyn, 2000).

Como a SPME é um processo baseado no equilíbrio e a quantidade de analito extraída depende da sua concentração no estado livre, esta técnica pode ser aplicada na deter-

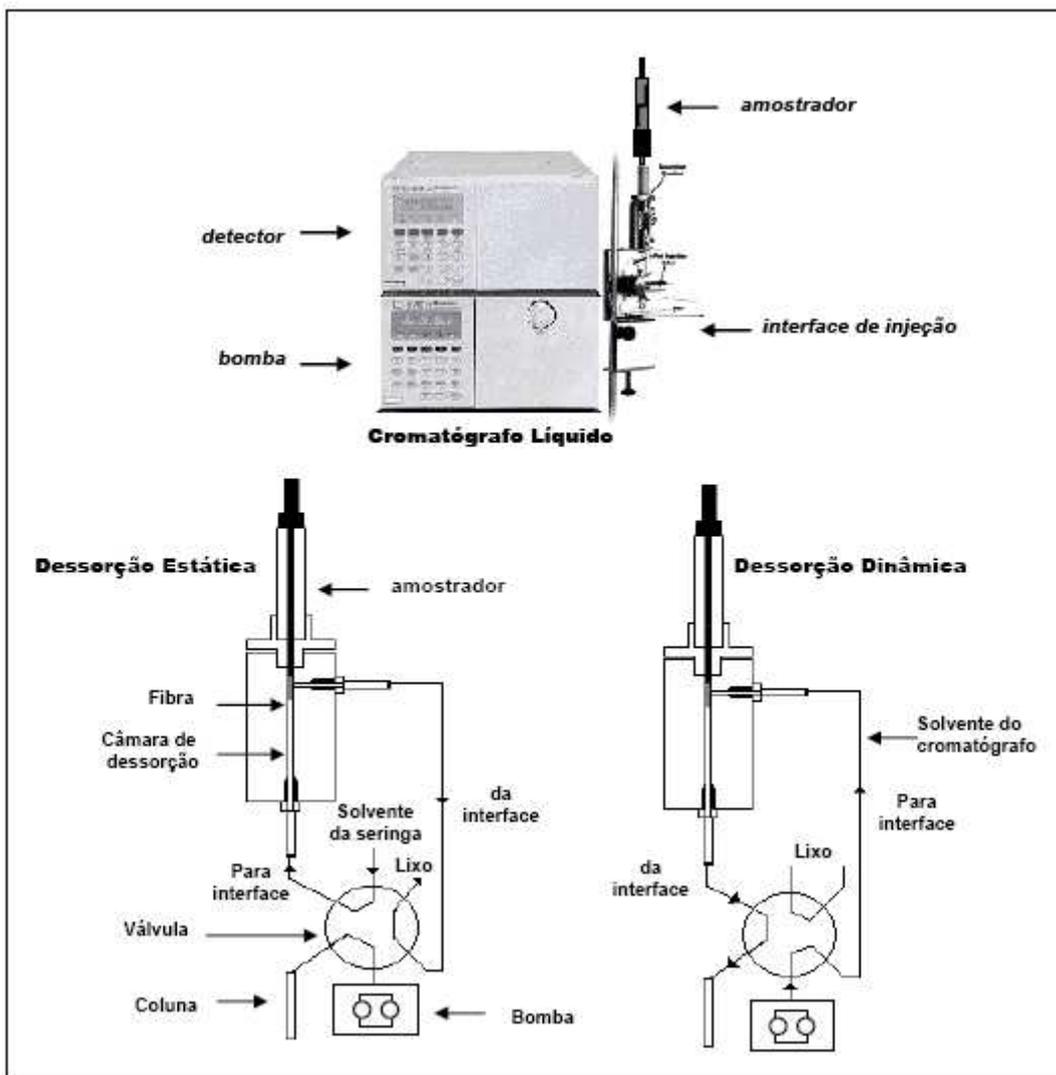
minação da ligação de fármacos às proteínas plasmáticas (Vaes et al., 1996), uma vez que a SPME não provoca a lise da ligação fármaco-proteína como no caso da LLE.

As fibras são, em sua maioria, constituídas de um ou mais polímeros sendo as mais utilizadas e de maior disponibilidade no mercado as de polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), carbowax (CW) e as combinadas polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), Carboxen-PDMS e Carbowax-DVB. Essas fibras possuem espessuras que variam entre 7 e 100  $\mu\text{m}$  e comprimento de normalmente 1 cm. Materiais extratores derivados de sílica porosa C8 e C18 (Liu et al., 1997a, 1997b) e sílica/carbono grafiteado (Mangani & Cerciarini 1995), empregados em cromatografia líquida, também vêm sendo recentemente utilizados.

O desenvolvimento da interface de injeção para HPLC (Chen & Pawliszyn, 1995) (Figura 8) permitiu que a dessorção fosse realizada no próprio sistema cromatográfico. Hoje, sistemas completamente automatizados são disponíveis comercialmente (Lord & Pawliszyn, 2000). A maioria das interfaces serve como uma espécie de “T” conectado entre a bomba do cromatógrafo e a coluna, fazendo assim a função do amostrador (Figura 8).

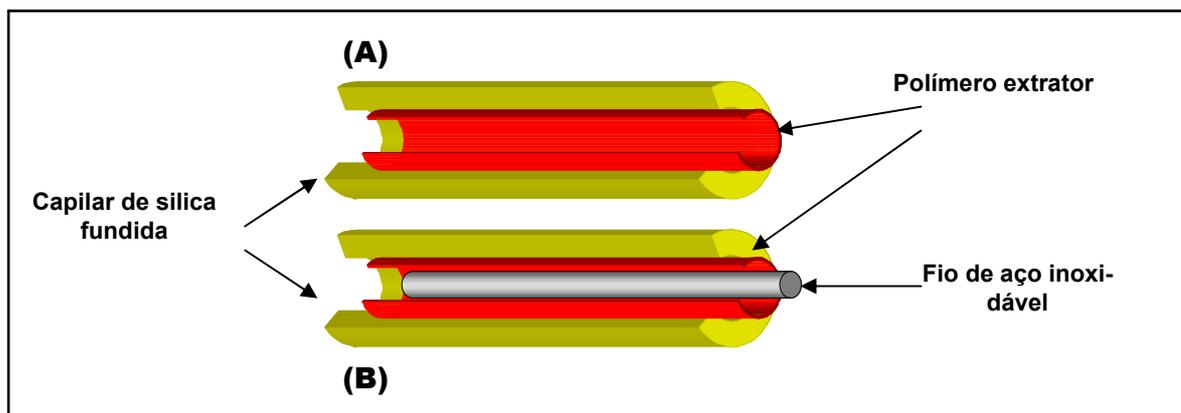
A dessorção pode ser feita no modo estático, através da injeção de um pequeno volume de solvente com uma seringa de injeção, ou no modo dinâmico, através de uma mudança da válvula fazendo o solvente do sistema cromatográfico entrar em contato contínuo com a fibra (Figura 8). No modo estático, o solvente de dessorção não precisa ser necessariamente o mesmo do sistema cromatográfico e a dessorção ocorre à pressão atmosférica. Já o modo dinâmico, é utilizado nos casos em que a transferência de massa do analito para o solvente é rápida (Lord & Pawliszyn, 2000). Além da interface para HPLC, a SPME conta também com interfaces para eletroforese capilar e cromatografia por fluido supercrítico (Li & Weber, 1997; Hirata & Pawliszyn, 1994).

Atualmente, as principais limitações da SPME são os limites de quantificação muito altos, especialmente na determinação de fármacos em fluidos biológicos; existem também variações entre diferentes lotes e marcas de polímeros extratores e o efeito memória do analito freqüentemente gera problemas na quantificação (Ulrich, 2000).



**Figura 7:** Cromatógrafo líquido acoplado a uma interface de injeção para SPME. Representação dos métodos de dessorção dinâmica e estática (Lord & Pawliszyn, 2000)

Novos dispositivos de SPME estão sendo desenvolvidos onde a extração ocorre dentro de tubos. Um desses dispositivos é o chamado de “SPME in tube” (Figura 9). Neste sistema o polímero extrator aparece revestindo o interior de um capilar de sílica fundida e a extração ocorre dentro desse sistema. Uma variação da SPME in tube é a SPME wire-in-tube. Neste dispositivo um fio de aço inoxidável é acondicionado no interior do capilar para diminuir o volume interno do mesmo e proporcionar uma extração mais eficiente.

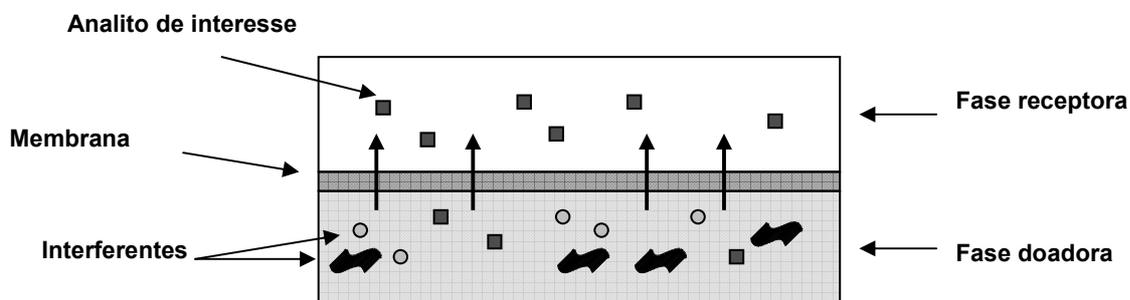


**Figura 8:** Modos de SPME in tube (A) e SPME wire-in-tube (B).

A técnica de ME (extração em membrana) é uma técnica semelhante a LLE (extração líquido-líquido) convencional mas que possui as vantagens de evitar a formação de emulsões, ter alto poder de concentração empregando quantidades reduzidas de solventes e ainda, apresentar excelente capacidade de automação (Jönsson & Mathiasson, 2001). Nesta técnica, a solução onde encontra-se o analito de interesse (matriz) é chamada de fase doadora e a fase para onde o analito irá transferir-se é chamada de fase receptora. Essas duas fases são separadas por uma membrana seletiva que irá permitir a passagem somente dos compostos que forem solúveis na mesma ou daqueles que tiverem tamanho adequado para passar entre seus poros (Figura 10). A passagem e a concentração do analito na fase aceitadora é promovida controlando-se parâmetros como pH, concentração salina, temperatura e aditivos das fases doadoras e receptoras (Jönsson & Mathiasson, 2000). A ME pode ser dividida de acordo com o tipo de membrana em ME porosa e não porosa ou, de acordo com as fases envolvidas, em mono, bi ou trifásicas (Jönsson & Mathiasson, 2001). A possibilidade da fase aceitadora ser aquosa permite que o analito extraído seja injetado diretamente no sistema cromatográfico em modo reverso e também em eletroforese capilar. A técnica de ME mais utilizada para extração de fármacos em fluidos biológicos é a chamada líquido suportado por membrana (SLM). Nesta técnica, a membrana é formada por um filme de líquido orgânico suportado em um material poroso. Os líquidos mais empregados em membranas são hidrocarbonetos de cadeias longas como n-undecano ou querosene e alguns compostos mais polares como di-hexil éter, tri-octilfosfato e outros (Jönsson & Mathiasson, 2001). As membranas compostas por esses líquidos são estáveis por até alguns

RICARDO M. ORLANDO ET AL.

meses. As limitações da ME são principalmente os tempos de extração relativamente mais longos que a LLE e a estabilidade reduzidas de membranas mais polares como di-n-hexil éter.



**Figura 9:** Esquema representando um dispositivo de extração em membrana.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALPENDURADA, M. F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 889, p. 3-14, 2000.
- ARTHUR, C.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, Washington, v. 62, p. 2145-2148, 1990.
- AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trac-Trend Anal. Chem.*, Amsterdam, v. 21, p. 428-438, 2002.
- CHEN, J.; PAWLISZYN, J. B. Solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid-chromatography. *Anal. Chem.*, Washington, v. 67, p. 2530-2533, 1995.
- HAGEN, D. F.; MARKELL, C. G.; SCHMITT, G. A.; BLENVINS, D. D. Membrane approach to solid-phase extractions. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 236, p. 157-164, 1990.
- HEARNE, G. M.; HALL, D. O. Advances in solid-phase extraction technology. *Am. Lab.*, Shelton, v. 25, p. 28-33, 1993.

RICARDO M. ORLANDO ET AL.

HIRATA, Y.; PAWLISZYN, J. Solvent-free sample introduction for supercritical-fluid chromatography using polymer-coated fibers. *J. Microcolumn. Sep.*, Provo, v. 6, p. 443-447, 1994.

JÖNSSON, J. A. & MATHIASSEN, L. Membrane extraction in analytical chemistry. *J. Sep. Sci.*, v. 24, p. 495-507, 2001.

JÖNSSON, J. A. & MATHIASSEN, L. Membrane-based techniques for sample enrichment. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 902, p. 205-225, 2000.

LI, S.; WEBER, S. G. Determination of barbiturates by solid phase microextraction and capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, Washington, v. 69, p. 1217-1222, 1997.

LIEBICH, H. M.; XU, G.; DI STEFANO, C.; LEHMANN, R. Capillary electrophoresis of urinary normal and modified nucleosides of cancer patients. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 793, p. 341-347, 1998.

LIU, Y.; LEE, M. L.; HAGEMAN, K. J.; YANG, Y.; HAWTHORNE, S. B. Solid phase microextraction of PAHs from aqueous samples using fibers coated with HPLC chemically bonded silica stationary phases. *Anal. Chem.*, Washington, v. 69, p. 5001-5005, 1997a.

LIU, Y.; SHEN, Y. F., LEE, M. L. Porous layer solid phase microextraction using silica banded phases. *Anal. Chem.*, Washington, v. 69, p. 190-195, 1997b.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. *J. Chromatogr. A.*, Amsterdam, v. 902, p. 17-63, 2000.

MAJORS, R. E. An overview of sample preparation. *LC GC-Mag. Sep. Sci.*, Veneta, v. 9, p. 16, 1991.

MANGANI, F.; CENCIARINI, R. Solid phase microextraction using fused silica fibers coated with graphitized carbon black. *Chromatographia*, New York, v. 41, p. 678-684, 1995.

RICARDO M. ORLANDO ET AL.

MITCHELL, E. P.; EVANS, L.; SCHULTZ, P.; MADSEN, R.; YARBRO, J. W.; GEHRKE, C. W.; KUO, K. Modified nucleosides in human serum. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 581, p. 31-40, 1992.

POOLE, C. F.; GUNATILEKA, A. D.; SETHURAMAN, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 885, p. 17-39, 2000.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 24, p. 68-76, 2001.

ROSENFELD, J. M.; MOHARIR, Y.; HILL, R. Direct solid phase isolation and oximation of prostaglandin-E2 from plasma and quantitation by gas-chromatography with mass-spectrometric detection in the negative-ion chemical ionization mode. *Anal. Chem.*, Washington, v. 63, p. 1536-1541, 1991.

ROSSI, D. T.; ZHANG, N. Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 885, p. 97-113, 2000.

SMITH, G. A.; LLOYD, T. L. Automated solid-phase extraction and sample preparation – Finding the right solution for you laboratory. *LC GC-Mag. Sep. Sci.*, Veneta, v. 22, 1998.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*. 2. ed., New York: John Wiley Professio, 1997.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 902, p. 167-194, 2000.

VAES, W. H. J.; RAMOS, E. U.; VERHAAR, H. J. M.; SEINEN, W.; HERMENS, J. L. M. Measurement of the free concentration using solid-phase microextraction: Binding to protein. *Anal. Chem.*, Washington, v. 68, p. 4463-4467, 1996.