Luis Felipe Rodríguez Cabal

Microtécnicas de extração líquido-líquido: Automatização e seu acoplamento com cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

São Carlos

2019

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Luís e Rosa

por me ensinarem com o seu exemplo

e me brindarem sempre com o seu amor,

mesmo quando eu não o merecia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo plano de vida que teve para mim. Por me permitir encontrar pessoas maravilhosas nesta caminhada e me permitir encontrar essa oportunidade lá pelo ano 2012.

Aos meus pais e aos meus irmãos, por serem sempre um exemplo, por estarem sempre presentes nos momentos difíceis e pelos valiosos conselhos. Por serem o meu porto seguro.

A Erika, pelo seu amor e compreensão. Por encher a minha vida de cor, por ser o meu orgulho e a minha motivação.

Ao Brasil, por me acolher como a um filho a mais destas terras.

Ao professor Álvaro Jose dos Santos Neto, por ter me aceitado no seu grupo, ser um exemplo para todos os seus alunos, pela sua dedicação, conselhos e sobre tudo por compartilhar os seus conhecimentos sempre com respeito e humildade.

Ao Professor Fernando Mauro Lanças, por compartilhar conosco a sua paixão pela cromatografia, pelos valiosos ensinamentos e por ter sempre a disposição de ajudar mesmo sem sermos os seus orientandos diretos.

Aos técnicos do laboratório Elaine e Guilherme, por permitir que o laboratório funcione sempre da melhor forma, por fazer o seu trabalho com a melhor disposição, pelas discussões científicas, ajudas, ensinamentos e pelos momentos de café.

Aos meus colegas do grupo de cromatografia que já deixaram o grupo: Rodrigo, Maraíssa, Maura, Felipe, Carlão, Scarlet, Tanare, Meire, Leticia, Amanda, Adriel, Bruno, Lucas, Ana, Leonardo, Weliton, Vinicius e Arley. Obrigado por serem colegas, parceiros e sobre tudo os meus amigos.

Aos colegas que que ainda continuam no grupo Edvaldo, Douglas, Luis Felipe, Karen e Marcio pelas suas ajudas, discussões científicas risadas e momentos de café.

Aos meus amigos da Colômbia: Cristhian, Mônica, Don Julio, Juan Camilo, Christian, Andrea, Yina, Lina, Irwin, David Ernesto, Cesar, Alfredo, Vivian e Kike. Obrigado por tudo, pois se tornaram a minha família.

Às agências de fomento CAPES (código de financiamento 0001), CNPq (projetos #459326/2014-7, #307293/2014-9, #311300/2015-4 e #425814/2018-1) e FAPESP (projetos #2010/19910-9, #2014/03795-0, #2016/21950-5, #2017/02147-0 e #2018/00432-1), pelas bolsas concedidas e por dar condições para desenvolver esse projeto.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos por fornecerem excelentes condições para o aprendizado e desenvolvimento do país.

RESUMO

Dentre as diversas etapas de uma análise química quantitativa, o preparo de amostra é a etapa responsável por extrair o analito de interesse da matriz e concentrá-lo, preferencialmente, em um meio que seja pertinente para análise. A extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) são técnicas convencionais de preparo de amostras. O desenvolvimento de versões miniaturizadas da SPE despertou interesse para que o mesmo ocorresse com as técnicas de extração líquido-líquido. Dentre as microtécnicas de extração em fase líquida, destacam-se, mais recentemente, a microextração em gota única (SDME) e a microextração em fase líquida com membrana oca (HF-LPME). Essas técnicas apresentam como principais vantagens o baixo consumo de solvente orgânico, excelente fator de concentração da amostra, são de simples e rápida operação, não apresentam efeito de memória e são passíveis de serem automatizadas, tudo isso com um custo relativamente baixo. Sendo assim, no presente trabalho são apresentadas estratégias para a automatização de métodos de preparo de amostra e análises cromatográficas baseadas em SDME e HF-LPME utilizando ferramentas de robótica de código aberto. Como prova de conceito, essas estratégias foram empregadas no desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de antimicrobianos em esgoto, anfetaminas em urina e drogas de abuso em "*blotter papers*", todas as anteriores consideradas matrizes de alta complexidade. Para a análise de antimicrobianos em esgoto foi desenvolvido um método de preparo de amostra baseado em SDME o qual emprega gotas de grande porte (90 µL) e ciclos de extração, assemelhando-se a uma extração líquido-líquido "*multibatch"* em escala miniaturizada. No caso da análise de anfetaminas em urina, foi desenvolvido um método de preparo de amostra baseado em HF-LPME hifenado com a análise cromatográfica, onde foi possível injetar o extrato obtido por HF-LPME diretamente no sistema cromatográfico com ajuda de uma válvula solenóide de três vias. Finalmente, um método também automatizado que permitiu a análise de drogas de abuso em selos ou "*blotter papers*" foi desenvolvido. O método conseguiu extrair as drogas do interior das fibras de celulose com ajuda de um motor de vibração e injetá-las no sistema de cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas do tipo "*quadrupolo/tempo de vôo (QqTOF)".*

ABSTRACT

Among several steps required for quantitative chemical analysis, the sample preparation is the one responsible for extraction and concentration of the target analyte from the matrix, ideally, in an adequate medium for analysis. The most important sample preparation techniques are liquid-liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SPE). Thus, the advance of miniaturized versions of SPE led to increased interest in developing miniaturized forms of liquid-liquid extraction. Currently, single drop microextraction (SDME) and hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) stand out among the microtechniques used for liquid phase extraction. Their main advantages are low consumption of organic solvent, excellent sample concentration factor, simple and fast operation, no carryover effect, and possibility for automation; all at a relatively low cost. Therefore, we present herein strategies for the automation of sample preparation techniques and chromatographic analysis based on SDME and HF-LPME using open source robotics tools. As a proof of concept, these strategies were employed in the development of analytical methods for the analysis of antimicrobials in sewage, amphetamines in urine, and drugs of abuse in blotter papers, highlighting that all of them are highly complex matrices. For the analysis of antimicrobials in sewage, we developed a SDME-based sample preparation method, which employs drops with large surface area (90 µL) and extraction cycles resembling a multi batch liquid-liquid extraction. In the analysis of amphetamines in urine, we developed a sample preparation method based on HF-LPME integrated with chromatographic analysis that permitted direct injections of the extract obtained from the HF-LPME into the chromatographic system through a three way solenoid valve. Finally, we created an automated method that allowed testing for drug of abuse directly from stamps or blotter papers. This method was able to (i) extract the drugs from the cellulose fibers with the assistance of a vibration motor and (ii) inject them into a liquid chromatograph coupled with a quadrupole/time of flight mass spectrometer (TOF).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Distribuição do tempo que os químicos analíticos gastam na análise da amostra.....20

Figura 1.2 - Causas de erro em análises químicas.....21

Figura 1.3 – Classificação das principais microtécnicas de extração.....23

Figura 1.4 - Primeira configuração da extração por SDME.....23

Figura 1.5 - Representação esquemática do preparo de amostra mediante SDME..24

Figura 1.6 - Representação esquemática da configuração para HF-LPME proposta por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen.....26

Figura 1.7 – Representação esquemática dos modos de extração em HF-LPME. (a) modo ternário. (b) modo binário.....27

Figura 1.8 – Representação de duas placas comerciais de Arduino. Arduino UNO (A), Arduino MEGA (B).....33

Figura 1.9 - Ilustração geral do robô cartesiano empregado para a automatização da SDME e da HF-LPME.....34

Figura 1.10 - Estrutura geral das sulfonamidas.....35

Figura 1.11 - Estrutura geral das flouoroquinolonas.....36

Figura 1.12 - Estruturas do MDMA, MDA e MDEA.....37

Figura 1.13 - Estrutura molecular da (A) dietilamida do ácido lisérgico e do (B) ácido lisérgico.....38

Figura 1.14 – Representação dos selos ou blotter papers.....39

Figura 1.15 - Estrutura molecular dos (A) NBOMe e dos (B) NBOH. 39

Figura 2.1 – Desenho em perspectiva cavaleira do dispositivo de extração para SDME.....48

Figura 2.2 – Dispositivos de extração para a formação de gotas de grande porte....56

Figura 2.3 - Efeito do solvente de extração sobre a eficiência da extração. (A) diclorometano; (B) clorofórmio; (C) acetato de etila.....58

Figura 2.4 - Efeito da velocidade da agitação da amostra na amostra na eficiência da SDME para a determinação da SDZ, STZ, SMZ, NOR e ENR.....59

Figura 2.5 - Efeito do volume da gota na eficiência da extração da SDME para a determinação da SDZ,STZ, SMZ, NOR e ENR.....61

Figura 2.6 – Sistema automatizado desenvolvido para o preparo de amostra por SDME.....62

Figura 2.7 – Comparação entre os modos dinâmico e estático de extração (SDME) para a determinação das sulfonamidas e fluoroquinolonas estudadas.....64

Figura 2.8 – Diagramas de Pareto do planejamento experimental 2^2 para avaliar o efeito do volume total de extração da SDME. (A) SDZ; (B) STZ; (C) SMR; (D) NOR; (E) ENR.....66

Figura 2.9 - Superfícies de reposta para experimentos de otimização do tempo de exposição da gota e o número de ciclos da SDME. (A) SDZ; B (STZ); C (SMR); D (NOR); E(ENR); F (função desejabilidade).....68

Figura 2.10 – Cromatograma representativo obtido por HPLC-UV para a extração dos antimicrobianos alvo (100 µg mL^{-1}) em esgoto simulado por DI-SDME no modo dinâmico.....69

Figura 2.11 – Cromatogramas representativos após a extração por SDME de uma amostra branco seguida da fortificação com os antimicrobianos estudados.....70

Figura 2.12 – Curvas analíticas para as SAs e FQs estudadas.....71

Figura 2.13 – Localização dos pontos de coleta de água (1, 2 e 3) para a determinação de SAs e FQs na cidade de São Carlos-SP. 75

Figura 3.1 – Fotografia do acoplamento da microsseringa com a válvula solenóide de três vias.....84

Figura 3.2 - Foto dos módulos de relê usados para o controle da válvula e o início da corrida cromatográfica.....84

Figura 3.3 – Montagem experimental da fibra e o frasco de amostra para a extração por HF-LPME automatizada. 87

Figura 3.4 – Robô cartesiano configurado para o preparo de amostra por HF-LPME. 88

Figura 3.5 - Esquema ilustrativo do procedimento de extração por HF-LPME automatizada. 88

Figura 3.6 – Esquema representativo da configuração eletrônica para o acoplamento entre o robô cartesiano e o HPLC. (a) Válvula Solenóide; (b-c) Relês; (d, g-j) Pontes H L298N; (e) Motor DC; (k-n) Motores de passo. (13) 91

Figura 3.7 – Efeito do solvente extrator sobre a eficiência de extração por HF-LPME de anfetaminas em amostras de urina. 93

Figura 3.8 – Efeito da velocidade de agitação da amostra por HF-LPME de anfetaminas em amostras de urina..... 94

Figura 3.9 - Efeito da adição de NaCl sobre a eficiência de extração de anfetaminas em urina por HF-LPME..... 95

Figura 3.10 – Superfícies de resposta para experimentos de otimização do tempo de extração e o volume de extração. Analitos: (A) MDA; (B) MDEA; (C) MDMA; (D) função desejabilidade. 97

Figura 3.11 - Cromatograma representativo obtido após a extração da amostra de urina utilizada como branco fortificada na concentração 100 ng mL-1..... 98

Figura 3.12 – Gráficos de resíduos para a extração de anfetaminas em urina por HF-LPME automatizada. Esquerda: modelos sem ponderação; direita: modelos ponderados. 101

Figura 3.13 – Curvas analíticas para a extração de anfetaminas em urina por HF-LPME automatizada. 102

Figura 3.14 -Cromatogramas obtidos para a extração de anfetaminas por HF-LPME para as duas amostras reais de urina. 105

Figura 4.1 – Esquema ilustrativo para a extração automatizada de drogas de abuso em “blotter papers”. (A) Configuração empregada para a extração dos analitos; (B) Configuração empregada para injeção dos analitos no sistema cromatográfico..... 113

Figura 4.2 – Fotografia de uma das amostras usadas neste estudo no tamanho real (esquerda) e os cortes realizados para a sua análise (direita). 116

Figura 4.3 – Fotografias do acoplamento do motor de agitação na placa de 96 poços. 117

Figura 4.4 – Efeito do solvente de extração sobre a eficiência de extração de drogas de abuso em “blotter papers”. 119

Figura 4.5 – Comparação da eficiência de extração com o sistema de vibração ligado e desligado. 120

Figura 4.6 – Superfícies de resposta para a otimização do tempo e o volume de extração de (A) 25C-NBOH; (B) 25C-NBOMe; (C) 25B-NBOH; (D) 25B-NBOMe; (E) 25I-NBOH; (F) 25I-NBOMe; (G) LSD; (H); Furanilfentanilo; (I) Função desejabilidade. 121

Figura 4.7 – Gráficos de resíduos para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”. À direita os gráficos de resíduos para os modelos ponderados e à esquerda os gráficos de resíduos para os modelos sem ponderação. 127

Figura 4.8 – Curvas a analíticas para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”. 131

Figura 4.9 -Cromatograma característico do ponto de 100 µg L^{-1} das curvas de calibração. (1) 25B-NBOH (2) furanilfentanilo; (3) 25C-NBOH; (4) 25C-NBOMe; (5) 25C-NBOMe; (6) 25I-NBOH; (7) LSD; (8) 25I-NBOMe. 132

Figura 4.10 - Fotografia dos “blotter papers” analisados. (A) Avatar; (B) Beatles; (C) sol. (20) 133

Figura 4.11 - Cromatograma obtido para a amostra com o desenho do Avatar. 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição do meio (esgoto simulado) empregado nos testes de optimização do método de extração por SDME.....47

Tabela 2.2 – Planejamento experimental para estudar a interação entre os modos de extração e o volume de solvente total carregado na seringa.....51

Tabela 2.3 – Planejamento experimental para a optimização do número de ciclos e o tempo de exposição da gota.....52

Tabela 2.4 - Transições monitoradas no modo SRM e condições utilizadas no espectrômetro de massas durante a avaliação das figuras de mérito.....54

Tabela 2.5 – Resultados dos estudos de precisão intra e interdias para os três níveis de concentração avaliados.....72

Tabela 2.6 - Resultados dos estudos de exatidão intra e interdias para os três níveis de concentração avaliados.....73

Tabela 2.7 – Resultados dos estudos de fator de enriquecimento e recuperação da extração.....74

Tabela 2.8 – Valores de recuperação para as SAs e FQs alvo em amostras de águas superficiais.....76

Tabela 3.1 – Planejamento experimental para a otimização do volume do solvente extrator e o tempo de extração.....86

Tabela 3.2 – Valores do coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (R2) e a somatória dos resíduos (∑%RE) para o modelo sem ponderação (1) e os modelos ponderados ($X^{-0,5}$, X^{-1}, X^{-2}, X^{-3}, $Y^{-0,5}$,Y^{-1}, Y^{-2}, Y^{-3}) sugeridos por Almeida e colaboradores.....100

Tabela 3.3 - Resultados dos estudos de precisão intra e interdias para os três níveis de concentração avaliados.....102

Tabela 3.4 - Resultados dos estudos de exatidão intra e interdias para os três níveis de concentração avaliados.....103

Tabela 3.5 - Resultados dos estudos de fator de enriquecimento e recuperação da extração.....104

Tabela 4.1 - Planejamento experimental para a otimização do tempo de extração e o volume de solvente extrator.....115

Tabela 4.2 - Valores do coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (R^2) e a somatória dos resíduos (∑%RE) para o modelo sem ponderação (1) e os modelos ponderados ($X^{-0,5}$, X^{-1}, X^{-2}, X^{-3}, $Y^{-0,5}$,Y^{-1}, Y^{-2}, Y^{-3}) sugeridos por Almeida e colaboradores.....125

Tabela 4.3 -Resultados dos estudos de precisão intra e interdias para os níveis baixo (4 µg L-1) e alto (80 µg L-1) para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.....129

Tabela 4.4 - Resultados dos estudos de exatidão intra e interdias para os níveis baixo (4 µg L-1) e alto (80 µg L-1) para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.....130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

AcOEt – Acetato de etila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

$CHCl_3$ – Clorofórmio

DCM - Diclorometano

DI-SDME – Microextração em gota única por imersão direta

DLLME - Microextração dispersiva líquido-líquido

DPR – Desvio Padrão Relativo

ENR – Enrofloxacina

FQs - Fluoroquinolonas

GC – Cromatografia gasosa

HF-LPME - Microextração em fase líquida com membrana oca

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HS-SDME - Microextração em gota única por *headspace*

ICH – *International Conference on Harmonization*

QuEChERS – Rápido, Simples, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro (dos seus termos em inglês).

LLE – Extração líquido-líquido

LOD - Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

LPME – Microextração em fase líquida

LSD – Dietilamida do ácido lisérgico

MCB – Placa microcontroladora

MEPS - Microextração por sorvente empacotado

NOR – Norfloxacina

NPS – Novas substâncias psicoativas

PTFE – Politetrafluoroetileno

RPM – Revoluções por minuto

SBSE - Microextração em barras de agitação

SDME - Microextração em gota única

SDZ - Sulfadiazina

SFE – Extração por fluidos supercríticos

SMR - Sulfamerazina

SNs - Sulfonamidas

SOX – Soxhlet

SPE – Extração em fase sólida

SPME – Microextração em fase sólida

STZ - Sulfatiazol

UNODC - United Nations Office on Drugs and Crime

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1. Preparo de amostra.....20

1.2 Técnicas miniaturizadas de preparo de amostra.....22

1.2.1 Microextração em gota única (SDME).....23

1.2.2 Microextração em fase líquida suportada em membrana oca (HF-LPME).....25

1.3 Parâmetros a serem ajustados em SDME e HF-LPME.....28

1.3.1 Solvente de extração.....28

1.3.2 Volume do solvente extrator.....29

1.3.3 Tempo de extração.....30

1.3.4 Agitação.....30

1.3.5 Adição de sal.....31

1.3.6 Temperatura.....31

1.4 Automatização do preparo da amostra.....31

2. Antimicrobianos.....35

2.1 Sulfonamidas.....35

2.2 Fluoroquinolonas.....36

3. Anfetaminas.....37

4. LSD, NBOMe's e NBOH's.....38

Referências.....41

CAPÍTULO 2

1. Objetivos.....46

2. Materiais e métodos.....46

2.1 Padrões e reagentes.....46

2.2 Dispositivo de extração.....47

....2.3 Procedimento de extração por SDME estático e dinâmico.....49

....2.4 Otimização do procedimento de extração por SDME.....49

2.4.1 Otimização univariada do procedimento de extração por SDME.....49

2.4.2 Comparação do modo estático e dinâmico em SDME.....50

2.4.3 Efeito do volume total de solvente extrator.....50

2.4.4 Otimização do número de ciclos e o tempo de extração.....51

2.5 Instrumentação e condições cromatográficas.....52

2.6 Avaliação das figuras de mérito.....55

3. Resultados e discussão.....56

3.1 Dispositivos de extração.....56

3.2 Otimização univariada do procedimento de extração..... 57

3.2.1 Efeito do solvente de extração.....57

3.2.2 Efeito da velocidade de agitação da amostra.....58

3.2.3 Efeito da adição de sal.....59

3.2.4 Efeito do volume da gota.....60

3.3 Comparação entre os modos de extração: dinâmico vs estático.....62

3.3.1 Estudo do tempo total de extração.....63

3.3.2 Estudo do volume total de extração.....64

3.3.3 Otimização do tempo de exposição da gota e o número de ciclos em SDME dinâmico 67

3.4 Figuras de mérito para avaliação do desempenho do método.....69

3.5 Aplicação do método desenvolvido.....75

4. Conclusões.....76

Referências.....78

CAPÍTULO 3

1. Objetivos.....82

2. Materiais e métodos.....83

2.1 Padrões e reagentes.....83

2.2 Instrumentação e condições analíticas.....83

2.3 Otimização univariada do procedimento de extração.....85

2.4 Otimização multivariada do volume de solvente e do tempo de extração.....85

2.5 Procedimento de extração por HF-LPME.....86

2.6 Avaliação das figuras de mérito.....89

2.7 Amostras.....90

3. Resultados e discussão.....90

3.1 Acoplamento do robô cartesiano com o HPLC.....90

3.2 Otimização univariada do procedimento de extração.....92

3.2.1 Efeito do solvente de extração.....92

3.2.2 Efeito da velocidade de agitação da amostra na eficiência da extração por HF-LPME de anfetaminas em amostras de urina.....93

3.2.3 Efeito da adição de sal na eficiência de extração por HF-LPME de anfetaminas em amostras de urina.....94

3.3 Otimização multivariada do tempo e do volume de extração.....95

3.4 Figuras de mérito.....98

3.5 Análises de amostras reais.....104

4. Conclusões.....106

Referências.....107

CAPÍTULO 4

1. Objetivos.....111

2. Materiais e métodos.....112

2.1 Padrões e reagentes.....112

2.2 Instrumentação e condições analíticas.....112

2.3 Procedimento de extração on-line dos “blotter papers”.....113

2.4 Otimização univariada do procedimento de extração.....114

2.5 Otimização multivariada do volume de solvente e o tempo de extração.....114

2.6 Avaliação das figuras de mérito.....115

2.7 Amostras.....116

3. Resultados e discussão.....116

3.1 Acoplamento do motor de agitação na placa de 96 poços.....117

3.2 Otimização univariada do procedimento de extração.....118

3.2.1 Efeito do solvente de extração para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.....118

3.2.2 Efeito da agitação da amostra para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.....119

3.3 Otimização multivariada do tempo de extração e do volume de extração para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.....120

3.3.1 Figuras de mérito para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.....123

3.3.2 Análises de amostras reais.....132

4. Conclusões.....134

Referências.....135

CAPÍTULO 5

Conclusão geral.....139

Publicações no período.....140

Artigos submetidos.....140

Capítulo 1

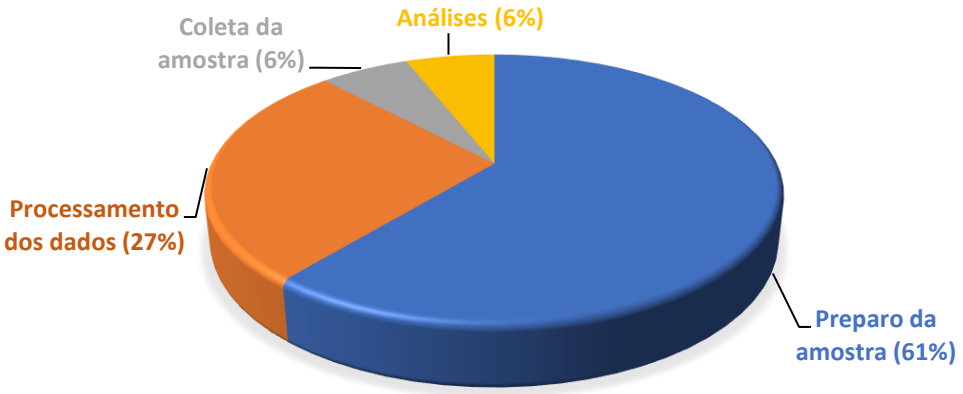
Introdução geral

1. Preparo de amostra

Geralmente, em uma análise química as amostras não são analisadas na sua forma bruta, devido à presença de contaminantes da matriz que podem interferir na análise ou mesmo danificar o equipamento, diminuindo o tempo de vida útil de vários componentes. Além disso, a natureza da amostra ou a concentração do analito de interesse podem não ser compatíveis com a técnica de análise. Assim, as análises químicas exigem uma etapa prévia à análise instrumental, ou seja, o preparo de amostra. (1,2)

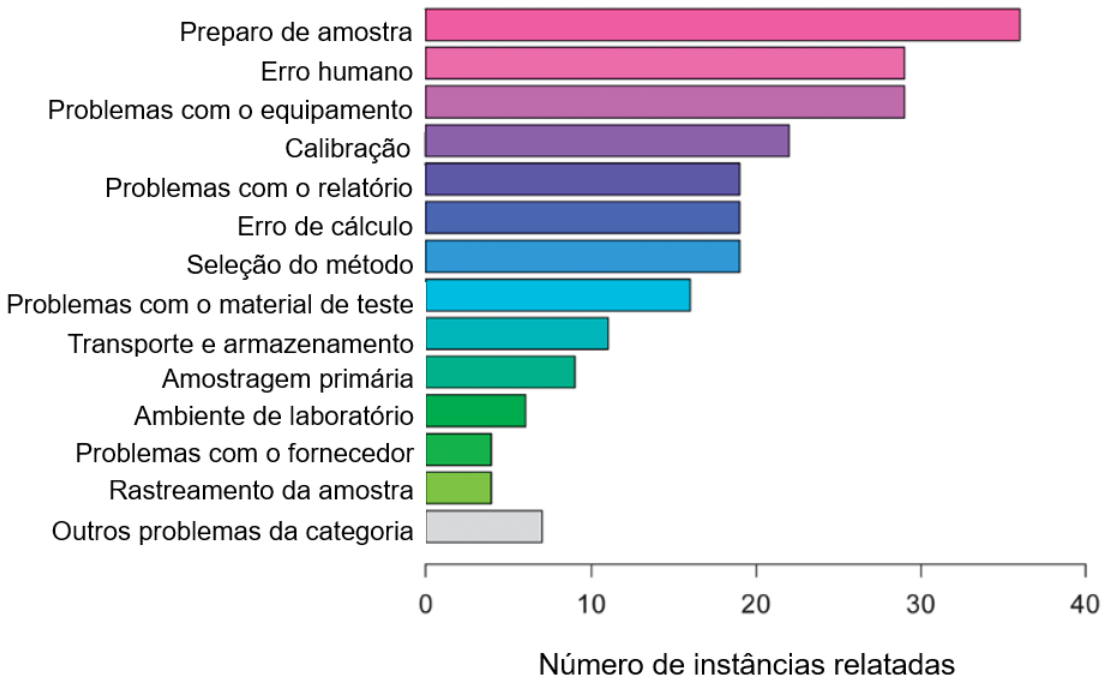
Dentre as diversas etapas de uma análise química qualitativa ou quantitativa, o preparo de amostra é especialmente crítico para garantir uma identificação inequívoca, para a confirmação e a quantificação dos analitos. Quando realizada em sistemas convencionais e manualmente, esta etapa consome até 60% do tempo da análise (Figura 1.1), além de ser considerada uma das principais fontes de erro (Figura 1.2). Em geral, quando a técnica de análise é a cromatografia, um bom preparo de amostra permite melhorar a separação e detecção dos analitos, enquanto que o preparo de amostra feito de maneira equivocada pode invalidar toda a análise. Além disso, um bom preparo da amostra diminui a necessidade por manutenção dos instrumentos e reduz o custo da análise. (3,4)

Figura 1.1 - Distribuição do tempo que os químicos analíticos gastam na análise da amostra.



Fonte: adaptado de MAJORS, 1991.

Figura 1.2 - Causas de erro em análises químicas.



Fonte: Adaptada de AMCTB, 2013.

O objetivo do preparo da amostra é extrair os analitos de interesse da matriz na sua forma mais concentrada possível e, preferivelmente, de uma forma que seja compatível com a técnica de análise. Em cromatografia gasosa, por exemplo, deve-se evitar injetar os analitos em soluções tampão e, em cromatografia líquida de fase reversa, deve-se evitar injetar os analitos em solventes com grande força eluotrópica como acetonitrila e metanol, especialmente nos casos de grande volume de injeção. (2,4,5)

Dentre as técnicas tradicionais de preparo de amostra pode-se mencionar a extração líquido-líquido (LLE), extração por soxhlet (SOX), extração em fase sólida (SPE) e a extração pelo método QuEChERS.

As técnicas mencionadas anteriormente conseguem extrair e pré-concentrar eficientemente os analitos de interesse, além de apresentar alta reprodutibilidade e grande capacidade de extração de amostras. Porém, são técnicas laboriosas, feitas em muitas etapas, e por isso consomem grande quantidade de tempo, além de requerer grandes quantidades de solventes de alta pureza e elevado custo, altamente

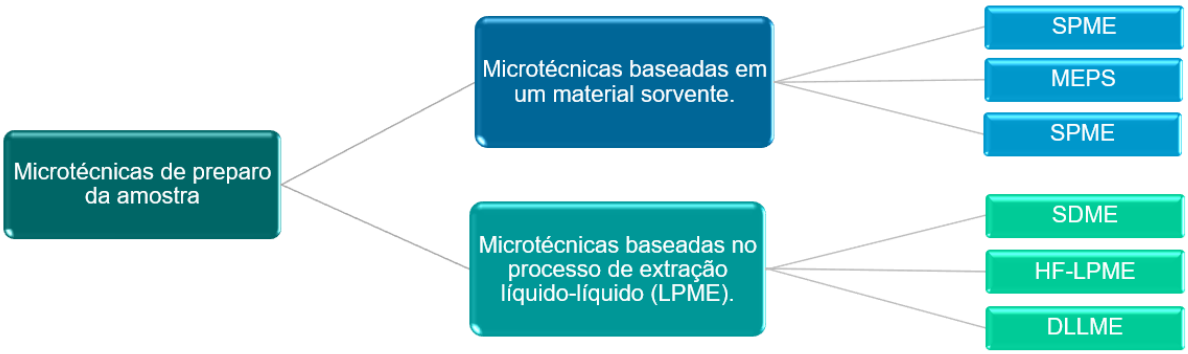
tóxicos e resultando em resíduos de laboratório perigosos e de difícil descarte. Além disso, a automatização dessas técnicas não é trivial. Dessa forma, a evolução das técnicas de preparo de amostra tem levado ao desenvolvimento de técnicas miniaturizadas, automatizadas, ou ambas combinadas. (6,7,8)

1.2 Técnicas miniaturizadas de preparo de amostra

No ano de 1990, Pawliszyn e colaboradores apresentaram a microextração em fase sólida (SPME), uma forma miniaturizada da SPE. A SPME foi a pioneira dentre as microtécnicas de extração e baseia-se na sorção dos analitos por um material sorvente. Nessa microtécnica, o consumo de solvente e amostra é consideravelmente diminuído, além disso, a miniaturização do sistema analítico permitiu a sua automatização com maior facilidade. Dentro do grupo das microtécnicas baseadas em um material sorvente se destacam também a microextração por sorvente empacotado (MEPS) e a microextração em barras de agitação (SBSE) (Figura 1.3). (9)

Um segundo grupo de microtécnicas de preparo da amostra compreende as técnicas baseadas no processo de extração em fase líquida (LPMEs). Essas técnicas se baseiam na migração dos analitos de uma amostra aquosa para um solvente orgânico, dentre as mais destacadas estão a microextração em gota única (SDME), a microextração em fase líquida com membrana oca (HF-LPME) e a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) (Figura 1.3), sendo as duas primeiras exploradas no presente trabalho.

Figura 1.3 – Classificação das principais microtécnicas de extração

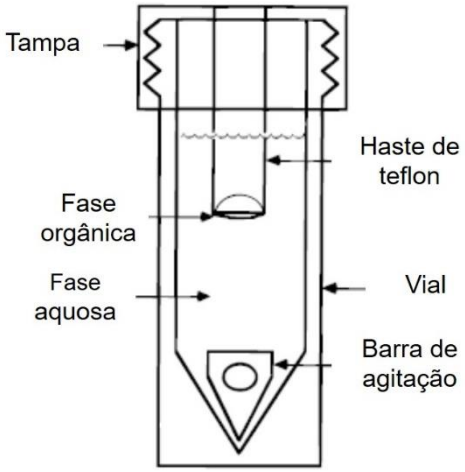


Fonte: autoria própria.

1.2.1 Microextração em gota única (SDME)

O primeiro trabalho que faz referência à técnica SDME foi publicado em 1996 por Jeannot e colaboradores. Eles empregaram uma haste de teflon usinada no extremo inferior, formando uma cavidade semiesférica de 4 mm de diâmetro. Nesta cavidade foram depositados 8 µL de n-octanol e, em seguida, o lado usinado da haste foi imerso em uma amostra aquosa, agitada magneticamente por um tempo determinado. Posteriormente, a haste de teflon foi removida e 1 µL do solvente foi retirado com uma microsseringa, sendo então injetado em um sistema de cromatografia gasosa (Figura 1.4). (8,10)

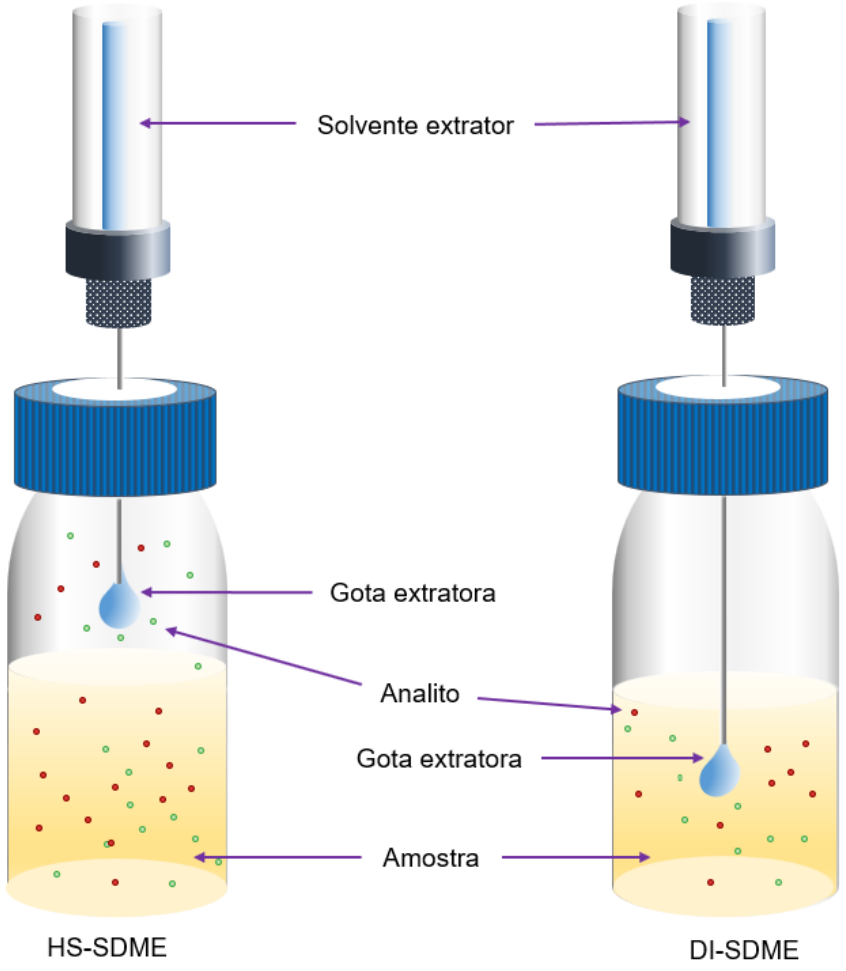
Figura 1.4 - Primeira configuração da extração por SDME.



Fonte: adaptado de JEANNOT, M. A, 1996. Reproduzida com autorização.

No ano de 1997, Le e colaboradores modificaram a configuração da técnica, que permanece como tal na atualidade. Nessa configuração uma microsseringa para GC ou HPLC é preenchida com o solvente extrator. Assim, é possível furar a tampa com septo de silicone do frasco que contém a amostra e, posteriormente, uma gota é formada na ponta da agulha da microsseringa e exposta por um tempo determinado à amostra (Figura 1.5). Depois da extração, a gota é aspirada novamente para o interior da microsseringa e levada para o cromatógrafo. (11)

Figura 1.5 - Representação esquemática do preparo de amostra mediante SDME.



A configuração empregada por Le permite que a extração e a injeção sejam feitas com a mesma microsseringa, conferindo simplicidade ao método. Além disso, a SDME não requer a compra de equipamentos, acessórios ou cartuchos de extração (os quais têm custos elevados e podem ainda apresentar variabilidade entre lotes de um mesmo fabricante). Adicionalmente, o solvente de extração é renovado em cada extração, o que previne o efeito de memória.

A SDME pode ser configurada em diferentes modos de operação, sendo os mais empregados a DI-SDME (*direct immersion single drop microextraction*) e o HS-SDME (*head space single drop microextraction*). No modo DI-SDME a gota do solvente de extração é imersa e fica em contato direto com a amostra líquida. Por sua

vez, no modo HS-SDME a gota do solvente de extração fica no espaço confinado acima da amostra, sem entrar em contato direto com a solução (Figura 1.5).

Os modos DI-SDME e HS-SDME correspondem a 80% dos trabalhos publicados. A razão para isto é que esses modos de operação são simples, rápidos, de baixo custo, sem efeito de memória (já que o solvente é renovado em cada extração) e passíveis de serem automatizados. Além disso, devido ao excelente fator de enriquecimento, esses modos de operação requerem poucas quantidades de amostra e de solvente orgânico para a extração (ordem de microlitros), o que torna a SDME uma técnica que segue os princípios da Química Verde. (8)

A instabilidade e volatilidade da gota, a solubilidade parcial do solvente de extração na amostra, a baixa seletividade e, especialmente, o volume limitado de extração são as desvantagens apresentadas pela SDME. Consequentemente, os solventes mais empregados em SDME são solventes de baixa viscosidade e solubilidade em água, geralmente solventes orgânicos com baixo ponto de ebulição e compatíveis com cromatografia gasosa, a técnica de análise mais utilizada devido aos solventes empregados na extração. (12)

Para contornar alguns dos problemas anteriormente relatados da SDME, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen propuseram introduzir o solvente de extração no lúmen de uma fibra oca e porosa, assim se deu o surgimento de uma nova LPME, a microextração em fase líquida suportada em membrana oca. Além disso, várias estratégias são empregadas para facilitar a migração do analito da amostra para o solvente de extração; essas estratégias são empregadas tanto para SDME quanto para HF-LPME e serão discutidas na seção 1.3. (13)

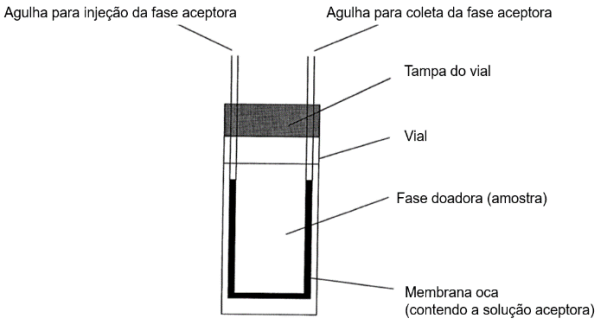
1.2.2 Microextração em fase líquida suportada em membrana oca (HF-LPME)

Apesar da SDME apresentar altos fatores de enriquecimento e uma configuração simples, a dificuldade para analisar amostras com materiais inorgânicos e orgânicos insolúveis que possam desestabilizar a gota ou, amostras com moléculas de alta massa molecular, por exemplo proteínas, que podem danificar o equipamento

de análise, fez com que, no ano de 1999, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen propusessem a HF-LPME (*Hollow fiber liquid phase microextraction*). (13)

A proposta foi preencher o lúmen de uma fibra tubular de polipropileno (oca e porosa) com o solvente de extração e, posteriormente, introduzir a fibra preenchida em um recipiente com a amostra (Figura 1.6). Dessa forma, o solvente extrator é protegido fisicamente, convertendo a HF-LPME em uma técnica mais robusta e confiável, que permite maior velocidade de agitação ou vibração mais vigorosa quando comparada com a SDME. Além disso, os poros da fibra só permitem a migração de moléculas “pequenas” o que possibilita a análise direta de amostras complexas como sangue e urina. Uma vez que, as proteínas não conseguem permear a fibra, a limpeza e extração do analito é feito em uma etapa só. (13,14)

Figura 1.6 - Representação esquemática da configuração para HF-LPME proposta por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen.



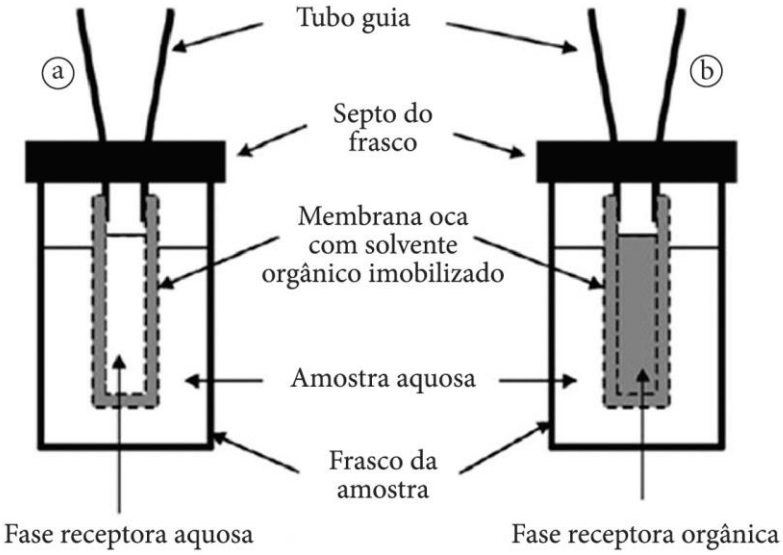
Fonte: adaptada de RASMUSSEN, 2000. Reproduzida com autorização.

Embora em HF-LPME o solvente de extração e a amostra não entrem em contato direto, os analitos migram por difusão através dos poros da fibra, partindo da fase doadora (matriz) para a fase aceptora (solvente de extração).

Na configuração mais simples da HF-LPME (denominada binária) os analitos migram da matriz (aquosa) até o solvente (insolúvel em água) imobilizado nos poros e também alocado no interior da fibra oca. Outra configuração emprega “três” solventes no processo de extração (modo ternário). Neste caso, um solvente orgânico é imobilizado nos poros da membrana oca e um solvente aquoso é alocado no lúmen da membrana. Deste modo, os analitos migram da matriz aquosa (fase doadora) até o solvente aquoso (fase aceptora) localizado no interior da membrana oca. A função

do solvente orgânico imobilizado nos poros da membrana é impedir a mistura das fases doadora e aceptora, além de proporcionar a partição dos analitos (Figura 1.7). (15)

Figura 1.7 – Representação esquemática dos modos de extração em HF-LPME. (a) modo ternário. (b) modo binário.



Fonte: Merib, 2013. Reproduzida com autorização.

Para otimizar o processo de extração por HF-LPME, alguns parâmetros como: tipo de solvente extrator, volume do solvente extrator, tempo de extração, agitação, adição de sal e temperatura precisam ser ajustados. Esses parâmetros também são ajustados em SDME e serão discutidos a seguir.

1.3 Parâmetros a serem ajustados em SDME e HF-LPME

Sendo técnicas de extração baseadas em equilíbrio, a SDME e a HF-LPME dependem significativamente da relação de volumes entre o solvente de extração e a amostra, além disso, independentemente do modo de operação em SDME e em HF-LPME, a transferência dos analitos da amostra para o solvente de extração é determinada pela difusão, transferência e distribuição das moléculas de analito entre as duas fases líquidas (amostra e solvente de extração). Em condições de repouso a

taxa de transferência dos analitos é baixa, porém, algumas estratégias como agitação magnética, vibração mecânica e o movimento do êmbolo da seringa são empregadas para facilitar a migração do analito da amostra para o solvente de extração. (8,12,15)

1.3.1 Solvente de extração

Geralmente, o princípio “semelhante dissolve o semelhante” guia a seleção do solvente de extração em LPME. Ou seja, compostos apolares devem ser extraídos por solventes apolares e vice-versa. Dentre as interações envolvidas no processo de extração as mais importantes são: as forças de dispersão de London, as interações dipolo-dipolo permanentes e as ligações de hidrogênio. (16)

No caso da SDME, se o modo de operação for imersão direta e a amostra for aquosa é indispensável que o solvente de extração seja insolúvel em água. Além disso, o solvente precisa ter um ponto de ebulição suficientemente alto para não ebulir. Adicionalmente, precisa ser viscoso o suficiente para se manter aderido na ponta da microsseringa, mas não tanto que impeça um efetivo transporte de massa do analito para o interior da gota. (7,17)

A compatibilidade do solvente de extração com a técnica de análise também deve ser considerada. No caso da cromatografia líquida em fase reversa, por exemplo, solventes pouco solúveis em água, como tolueno, devem ser evitados ou devem ser diluídos com solventes compatíveis com a técnica, como o caso da acetonitrila (ACN). (15)

1.3.2 Volume do solvente extrator

Em LPME a fração de analito extraído (E) é diretamente proporcional à razão entre o volume do solvente extrator e o volume da amostra (Ψ), de acordo com a equação 1, onde K_D corresponde à constante de distribuição. Porém, no caso da SDME gotas de maiores tamanhos apresentam maior instabilidade, permitem menores velocidades de agitação e quando a análise não é automatizada são menos

reprodutíveis, exigindo o uso de padrão interno para corrigir a variação do volume das gotas entre replicatas. (7)

$$E = \frac{K_D\,\Psi}{1 + K_D\,\Psi} \qquad \text{(equação 1)}$$

O aumento no volume do solvente extrator permite que este tenha maior área superficial, consequentemente, maiores interações entre o analito e o solvente extrator são observadas, melhorando consideravelmente o procedimento de extração tanto em SDME quanto em HF-LPME. Com o intuito de aumentar o volume e a estabilidade da gota em SDME, alguns pesquisadores acoplaram na agulha da microsseringa diversos dispositivos que permitem aumentar a superfície de contato entre a agulha e o solvente de extração, conseguindo aumentar o volume do solvente em até 20 µL. (18,19)

Aumentos nos volumes de solvente extrator têm que ser feitos de maneira criteriosa, pois aumentos excessivos podem ocasionar instabilidade da gota (no caso da SDME) e em algumas situações a diluição do analito, diminuindo o sinal analítico observado.

1.3.3 Tempo de extração

O tempo de extração é um importante parâmetro a ser optimizado em LPME, pois é importante obter um comprometimento razoável entre a eficiência da extração e o tempo da amostragem. A quantidade de analito extraído depende do tempo de extração, porém, tempos de preparo de amostra muito longos não são desejáveis. A eficiência máxima de extração pode ser obtida sob condições de equilíbrio. No entanto, as condições de equilíbrio são dificilmente alcançadas em LPME, uma vez que um tempo de extração prolongado seria necessário, sendo que a taxa de transferência de massa se reduz à medida que as concentrações na fase orgânica e na amostra se aproximam das de equilíbrio. A equação 2, na qual *k* é uma constante de taxa de extração de primeira ordem e C_o a concentração do analito no equilíbrio, prediz esse comportamento. (20)

$$C_o(t) = C_{o_{equ}}(1 - e^{-kt})$$ (equação 2)

1.3.4 Agitação

A agitação da amostra é muito importante para aumentar a quantidade de analito extraído e diminuir o tempo de extração em LPME. Geralmente, as amostras são agitadas de três formas: agitação magnética, agitação por vibração e agitação por *vortex*. A agitação magnética é, pela sua simplicidade, o modo mais encontrado na literatura. Quando o modo de operação é a imersão direta, taxas de agitação muito altas, geralmente acima de 600 rpm, podem ocasionar a queda da gota (no caso da SDME) e/ou a formação de bolhas de ar que podem diminuir a eficiência da extração. Quando a técnica de extração é HF-LPME ou SDME operada no modo *headspace*, tornam-se possíveis taxas de agitação de até 1.000 rpm. (12)

A taxa de extração de um analito por um determinado solvente extrator depende, principalmente, do coeficiente de difusão do analito e da espessura da camada estagnada ao redor do solvente. Assim, a agitação da amostra permite a renovação constante dessa camada, tornando-se um parâmetro simples para modular a transferência de massa do analito em LPME. (20)

1.3.5 Adição de sal

Usualmente, quando um eletrólito é adicionado a uma solução aquosa, a solubilidade de moléculas orgânicas diminui consideravelmente, este efeito é conhecido como "*salting out effect*" e é observado especialmente para moléculas de baixo massa molecular e polaridade média. Além disso, a adição de sal na amostra também pode diminuir a solubilidade do solvente extrator. Porém, em alguns casos, as mudanças na viscosidade e na tensão superficial da amostra aquosa podem causar instabilidade da gota em SDME e/ou diminuir a quantidade de analito extraído. (17,21)

1.3.6 Temperatura

Em LPME, quando o modo de operação é imersão direta, a constante de distribuição solvente orgânico/amostra (K_{ow}) é pouco afetada pela temperatura mas, quando o modo de operação é "*headspace*" a constante de distribuição ar/amostra (Kaw) e a constante de distribuição solvente orgânico/ar (K_{oa}) são fortemente dependentes da temperatura. Geralmente, incrementos na temperatura aumentam a concentração no "*headspace*" quando os analitos são apolares mas, quando os analitos são de polaridade média ou alta, aumentos na temperatura incrementam a solubilidade deles em amostras aquosas, diminuindo a eficiência da extração. (8,15)

Em geral, os experimentos feitos por imersão direita são feitos à temperatura ambiente, mas é indispensável para a reprodutibilidade ter-se um adequado controle da temperatura do ambiente, pois pequenas mudanças (2 ou 3°C) podem inviabilizar o experimento.

1.4 Automatização do preparo da amostra

Apesar da enorme evolução dos instrumentos de análise química nas últimas décadas, as técnicas de preparo de amostra não acompanharam esse crescimento, especialmente quando comparado com a cromatografia líquida moderna. Assim, o desenvolvimento de métodos de preparo de amostra, ambientalmente amigáveis e completamente automatizados, segue sendo uma exigência principal na química analítica moderna. (4)

Na atualidade, o preparo da amostra requer um alto grau de manipulação das amostras, o que aumenta os custos e pode acarretar em menores reprodutibilidade e precisão da análise química, convertendo o preparo da amostra no grande gargalo para a consolidação de estratégias analíticas simples, rápidas e eficientes. Assim, o desenvolvimento de técnicas de preparo de amostra automatizadas e a sua hifenização com os instrumentos analíticos continuará sendo uma exigência nos próximos anos (22,23).

A automatização das etapas do preparo da amostra não apenas acelera o processo, mas também permitem análises mais reprodutíveis e exatas, ao mesmo

tempo que reduzem a exposição do analista às amostras com potencial risco biológico e solventes tóxicos. Consequentemente, a automatização é considerada a melhor estratégia para aumentar a frequência analítica. (24)

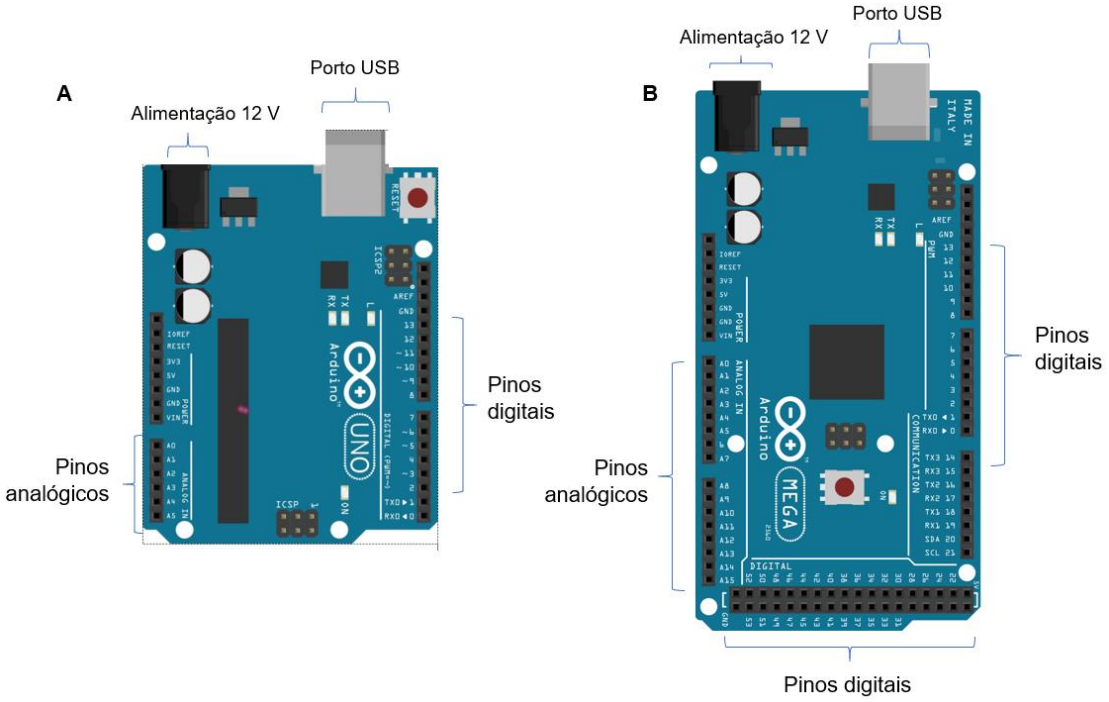
As primeiras técnicas automatizadas de preparo da amostra surgiram em meados do século XX. Desde então uma ampla variedade de técnicas automatizadas tem sido desenvolvidas, entre elas as técnicas de análise em fluxo, os sistemas microfluídicos, os sistemas de placas multipoços e os quatro modos de operação (*off-line, at-line, on-line e in-line*) da SPE e da SPME (in-tube SPME-LC). Essas são as abordagens mais comuns para automatizar e integrar o preparo da amostra com a análise química. (24)

Outra abordagem interessante é o uso de robôs, os quais vêm sendo usados nos laboratórios de química desde a década de 80 sob a forma de tituladores automáticos, auto-amostradores e coletores de frações os quais desempenharam tarefas específicas e repetitivas. Esses robôs se caracterizaram pela sua eficiência, reprodutibilidade e simplicidade de operação, porém, seu alto custo impediu sua popularização (25,26,27).

Na atualidade, a prototipagem e personalização de instrumentos científicos são facilitadas pela evolução dos dispositivos eletrônicos e, especialmente, pela popularização dos microcontroladores de código aberto, os quais são circuitos eletrônicos genéricos com o código base disponibilizado para que as pessoas possam usar, modificar, estudar e distribuir livremente.

Dentre os microcontroladores de código aberto, a plataforma *Arduino* é a mais popular. A Arduino, é uma plataforma de prototipagem eletrônica flexível e de baixo custo, que permite a pessoas com pouco conhecimento em programação criar projetos eletrônicos simples. Esses microcontroladores existem comercialmente em diferentes marcas e modelos, que se diferenciam pelo número de pinos de entrada e de saída, pelo desempenho e pelas funcionalidades adicionais. Sendo assim, seu custo pode variar de alguns dólares a centenas de dólares (Figura 1.8). Para o seu funcionamento, os microcontroladores devem ser alimentados por uma fonte de corrente contínua e, em alguns casos, usar uma placa de ensaio (*protoboard*) para o acoplamento de módulos eletrônicos adicionais.

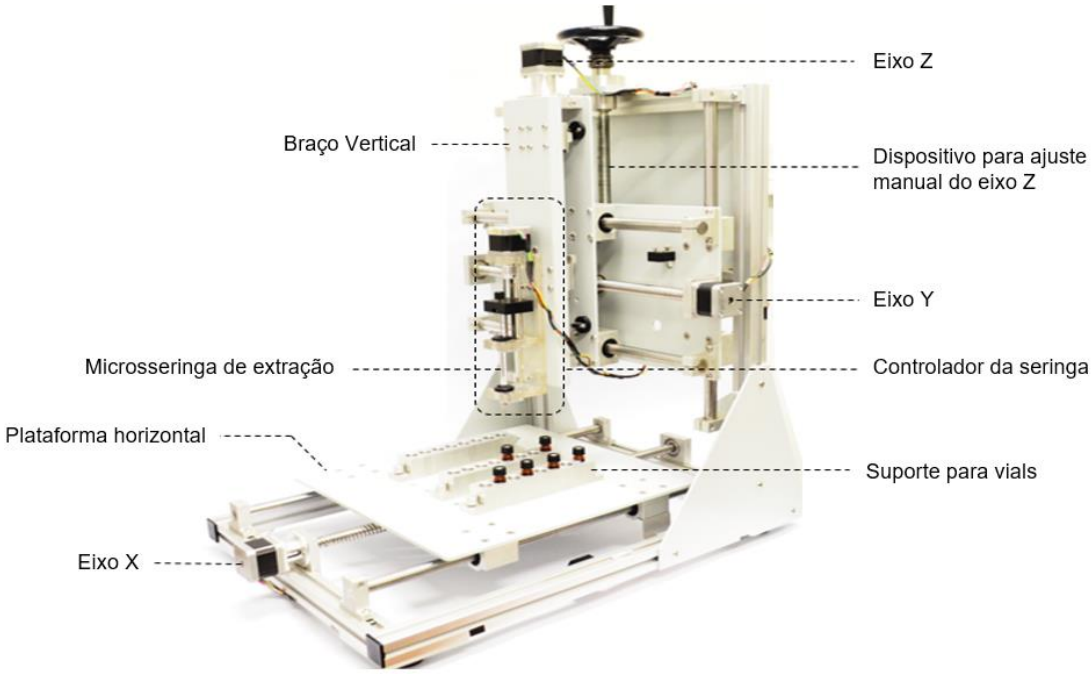
Figura 1.8 – Representação de duas placas comerciais de Arduino. Arduino UNO (A), Arduino MEGA (B).



Os microcontroladores de código aberto têm permitido a construção de uma ampla variedade de instrumentos de laboratório, entre eles, sistemas de detecção, sistemas de processamento de dados e mecanismos automatizados para diversas aplicações. No caso do preparo de amostra, os microcontroladores *open source* têm permitido a construção de plataformas microfluídicas, sistemas em fluxo e sistemas robóticos capazes de manipular, transportar e injetar amostras ou solventes, entre outros. (28,29)

Dessa forma, durante o desenvolvimento do presente trabalho, empregou-se um robô cartesiano construído com base na plataforma de Arduino. O robô é composto basicamente por motores de passo, os quais convertem os pulsos eletrônicos em movimentos circulares com alto grau de precisão. Nesse robô, fusos de esferas convertem os movimentos circulares do motor em movimentos longitudinais. Uma válvula de três portas permite a hifenação das técnicas de preparo da amostra com o cromatógrafo e o espectrômetro de massas, enquanto relês permitem controlar a válvula de três portas e disparar o funcionamento do HPLC (Figura 1.9). (24)

Figura 1.9 - Ilustração geral do robô cartesiano empregado para a automatização da SDME e da HF-LPME



Fonte: adaptado de Vargas, 2019.

A eficiência na extração, precisão, exatidão, os baixos limites de detecção alcançados, a possibilidade de automação, o baixo custo e a capacidade de eliminar os interferentes da matriz permitem que a SDME e a HF-LPME sejam excelentes alternativas para análise de antimicrobianos em águas superficiais, anfetaminas em urina e psicotrópicos impregnados em selos de papel (*blotter papers).*

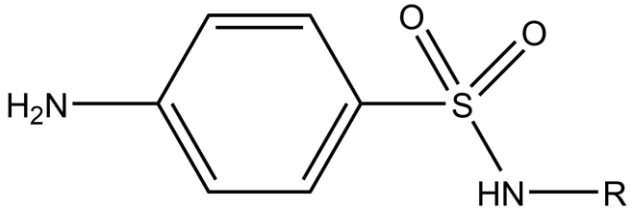
2. Antimicrobianos

2.1 Sulfonamidas

As sulfonamidas (SNs) são antimicrobianos sintéticos que contêm na sua estrutura o grupo sulfonamida (-SO_2NHR) (Figura 1.10). As SNs bloqueiam a rota sintética do ácido fólico por inibição competitiva da enzima diidropteroato sintetase. Essa enzima catalisa a síntese do precursor imediato do ácido fólico, o ácido diidropteroico, a partir do ácido *p*-amino benzoico (PABA). O ácido fólico, também chamado vitamina B9 é essencial para a sínteses de ácidos nucleicos. Sendo assim,

as SNs impedem a proliferação de bactérias que precisam sintetizar seu próprio ácido fólico. (30)

Figura 1.10 - Estrutura geral das sulfonamidas



Além de serem antibióticos de baixo custo, as SNs são usadas para combater baterias tanto gram-positivas quanto gram-negativas (antibióticos de amplo espectro) na medicina humana e veterinária. Adicionalmente, algumas são adicionadas às rações dos animais para auxiliar no seu crescimento. (31,32)

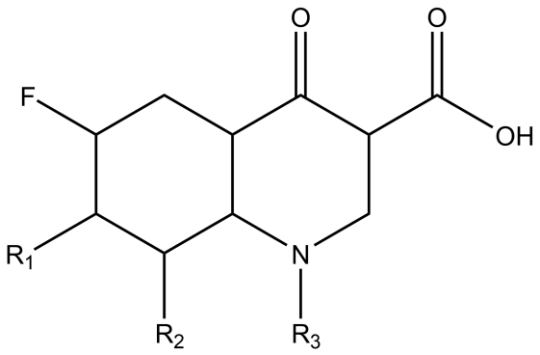
As sulfonamidas são pouco metabolizadas e absorvidas por humanos e animais. Consequentemente, chegam aos ecossistemas de forma inalterada por meio da urina e das fezes. A presença destes compostos em águas e solos pode afetar o crescimento de micro-organismos, algas e plantas aquáticas afetando a estrutura e função das comunidades microbianas. Além disso, a presença das SNs nos ecossistemas em baixas concentrações pode gerar bactérias mais resistentes, pois os microrganismos desenvolvem novas rotas para a síntese de ácido fólico, aumentam a produção de PABA ou geram uma mutação na enzima diidropteroato sintetase para que tenha pouca afinidade pelo antibiótico. Sendo assim, o desenvolvimento de métodos analíticos para o monitoramento de sulfonamidas em águas superficiais é um tema importante a ser abordado. (30,32)

2.2 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas (FQs) são uma família de antibióticos sintéticos desenvolvidos na década de 70 (século XX). Elas pertencem às quinolonas, um grupo de antibióticos baseados na estrutura do antimalárico quinino. Além disso, se caracterizam por apresentarem um átomo de flúor ligado ao sistema central de anéis

(Figura 1.11). A eficiência das FQs da primeira geração foi principalmente contra cepas de baterias gram-negativas. No entanto, uma série de modificações na sua estrutura permitiu que também se tornassem eficazes para o tratamento de baterias gram-positivas, convertendo-as em antibióticos de amplo espectro. (16)

Figura 1.11 - Estrutura geral das fluoroquinolonas



O mecanismo de ação das bactérias gram-negativas baseia-se na capacidade de inibir a enzima topoisomerase II; nas bactérias gram-positivas, baseia-se na capacidade de inibir a enzima topoisomerase IV. As topoisomerases são enzimas essenciais na replicação e na topologia do DNA e, quando inibidas, os microrganismos perdem a sua capacidade de reprodução. (33)

As FQs são usadas na medicina veterinária e humana para o tratamento de infecções na pele, no trato urinário, gastrointestinal e respiratório, além de serem úteis para o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis. Esses compostos são pouco metabolizados no corpo e, portanto, são excretados de forma inalterada. A baixa eficiência dos sistemas atuais do tratamento de esgoto para a remoção deste tipo de compostos permite que as FQs cheguem aos ecossistemas gerando ecotoxicidade direta e resistência bacteriana. (30)

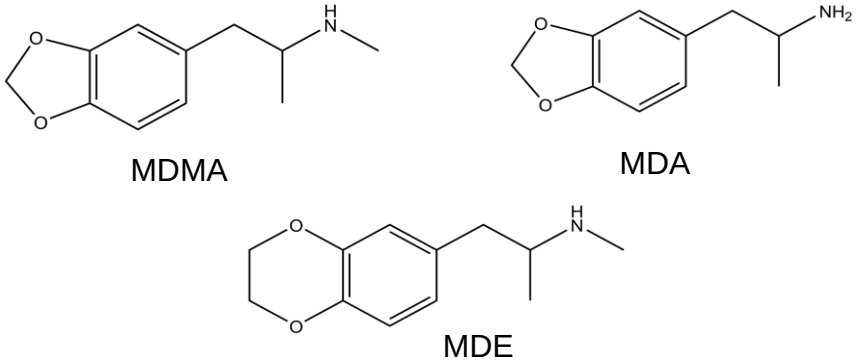
Diante desse contexto, é importante criar métodos analíticos que permitam monitorar as fluoroquinolonas em ambientes aquáticos.

3. Anfetaminas

A metilenodioximetanfetamina (MDMA) é uma droga de natureza sintética comercializada principalmente na forma de comprimidos. É conhecida popularmente como “êxtase” e faz parte das denominadas “*Designer drugs*”. Segundo o relatório de 2016 do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC) é a segunda droga mais consumida no mundo, depois da maconha. (34)

O “êxtase” é um derivado da metanfetamina que apresenta efeitos alucinógenos e estimulantes. É quimicamente identificado como 3,4-metilenodioximetanfetamina e, dentre os subprodutos da sua síntese encontra-se o 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) e o 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA). Esses três compostos são empregados como biomarcadores do consumo de êxtase. As estruturas do MDMA, MDA e MDEA são apresentadas na Figura 1.12.

Figura 1.12 - Estruturas do MDMA, MDA e MDEA



Drogas em geral são analisadas em amostras de sangue e de urina, pois estas garantem uma boa correlação entre doses administrada e os níveis detectados. No caso do êxtase, sua eliminação depende, em grande parte, do metabolismo hepático. Estudos demonstraram que aproximadamente 65% da dose ingerida é eliminada na urina sem metabolização. (35,36)

A análise de biomarcadores é de suma importância para que a polícia científica possa, por exemplo, determinar se um condutor estava sob efeito destas drogas em situações como acidentes de trânsito. Assim, o interesse pelo desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a detecção e a quantificação destes analitos e seus

respectivos metabólitos tem aumentado consideravelmente nas últimas duas décadas.

4. LSD, NBOMe's e NBOH's

Os efeitos psicotrópicos da dietilamida do ácido lisérgico (LSD) foram descobertos pelo químico suíço Albert Hofmann em 1943. Tais efeitos são ocasionados principalmente pela ativação do receptor 2A da serotonina (5-HT_{2A}). O LSD, cuja estrutura molecular é ilustrada na figura 1.13A, ficou popularmente conhecido como droga de uso recreacional em meados da década de 60 (século XX), devido a seus efeitos alucinógenos relacionados à ilusão, alteração do pensamento, da percepção corporal e alterações na memória. (37)

Na atualidade, o LSD (Figura 1.13A) e o ácido lisérgico (Figura 1.13B) encontram-se na lista de substâncias proscritas no Brasil, segundo a portaria SVS/MS n° 344, de 12 de maio de 1998 da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Apesar disso, o LSD é comercializado ilegalmente no formato de "selos", também conhecidos como *blotter papers* (Figura 1.14).

A dietilamida do ácido lisérgico é conhecida popularmente pelos nomes de LSD-25, doce, ácido ou microponto. Na sua grande maioria, é administrada por via sublingual ou absorção bucal de formulações líquidas ou via *blotter papers*.

Figura 1.13 - Estrutura molecular da (A) dietilamida do ácido lisérgico e do (B) ácido lisérgico.

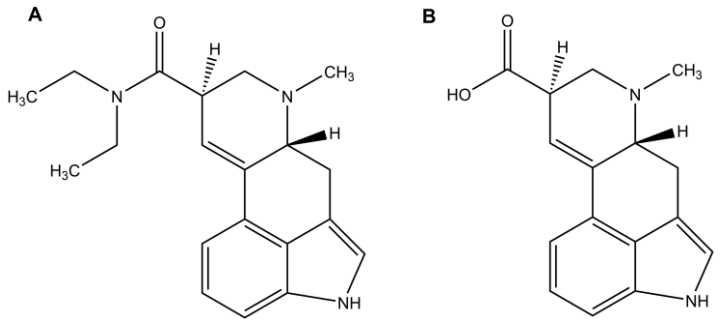
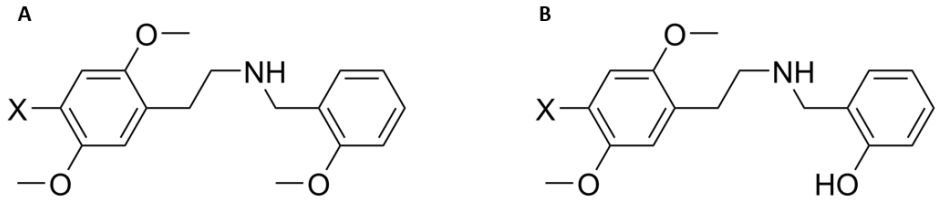


Figura 1.14 – Representação dos selos ou *blotter papers*

Com a proibição do LSD e com o intuito de contornar a lei, surgiu uma nova classe de substâncias psicoativas (NPS), os NBOMes, os quais são 2,5 dimetoxifenietilaminas com uma substituição no nitrogênio por um grupamento 2-metoxibenzila (Figura 1.15A). Esses compostos foram inicialmente sintetizados, para fins de pesquisa, para atuar como agonistas do receptor 5-HT2. No entanto, as propriedades alucinógenas semelhantes às do ácido lisérgico, fizeram com que algumas versões halogenadas desses compostos como o 2-(4-iodo-2,5-dimetoxi-4-iodofeniletilamina (25I-NBOMe) fossem empregadas com fins recreativos. (38,39)

A comercialização dos NBOMes é feita na sua maioria na forma de *blotter papers* e muitas vezes por engano sob o nome de LSD. Ao contrário do LSD o consumo de NBOMes e as suas variações tem causado numerosas mortes ao redor do mundo e atendimentos de emergência em hospitais por pessoas com comportamentos erráticos, muitas vezes violentos. Do mesmo modo, com a proibição dos NBOMes surgiram os NBOH (Figura 1.15B), compostos com efeitos similares aos NBOMes e comercializados da mesma maneira.

Figura 1.15 - Estrutura molecular dos (A) NBOMe e dos (B) NBOH.



X = Cl, Br, I

A detecção de substâncias como LSD, NBOMe's e NBOH's em *blotter papers* é muito importante para que a polícia cientifica, por exemplo, possa determinar se uma pessoa está comercializando esse tipo de substância. Consequentemente, o interesse pelo desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos e cofiáveis que permitam a detecção destes analitos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos.

Referências

1 CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1–2, p. 191–219, 2008.

2 LANÇAS, F. M. Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de Separação : uma visão pessoal. **Scientia Chromatographica**, v. 0, n. 0, p. 17–44, 2008.

3 AMCTB. What causes most errors in chemical analysis? **Analytical Methods**, v. 5, n. 12, p. 2914–2915, 2013.

4 MAJORS, R. E. Overview of sample preparation. **LCGC**, v. 9, n. 1, p. 16–20, 1991.

5 SANTOS-NETO, Á. JOSÉ. Uma visão técnica para compreensão e resolução de problemas em sistemas de cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 83–96, 2009.

6 LEE, J.; KEE, H.; RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction : A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 4, p. 253–268, 2008.

7 PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in single-drop microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 53–63, 2002.

8 PINTO, I. P. DE; PEDROSO, M. P. Microextração em gota única (SDME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 3, p. 183–198, 2015.

9 ARTHUR, CATHERINE L; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145–2148, 1990.

10 JEANNOT, M. A; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 13, p. 2236–2240, 1996.

11 HE, Y.; LEE, H. K. Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 22, p. 4634–4640, 1997.

12 JEANNOT, M. A.; PRZYJAZNY, A.; KOKOSA, J. M. Single drop microextraction - Development, applications and future trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2326–2336, 2010.

13 PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid - Liquid - Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650–2656, 1999.

14 RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; KROGH, M.; UGLAND, H. G. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 873, p. 3–11, 2000.

15 MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 249–262, 2013.

16 PEIXOTO, P. S.; TÓTH, I. V.; SEGUNDO, M. A.; LIMA, J. L. F. C. Fluoroquinolones and sulfonamides: features of their determination in water. A review. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 96, n. 2, p. 185–202, 2016.

17 PSILLAKIS, E. KALOGERAKIS, N. Application of solvent microextraction to the analysis of nitroaromatic explosives in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 907, p. 211–219, 2001.

18 YE, C.; ZHOU, Q.; WANG, X. Improved single-drop microextraction for high sensitive analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, n. 1, p. 7–13, 2007.

19 ČABALA, R.; BURSOVÁ, M. Bell-shaped extraction device assisted liquid-liquid microextraction technique and its optimization using response-surface methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1230, p. 24–29, 2012.

20 JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 235–239, 1997.

21 LÓPEZ-BLANCO, M. C.; BLANCO-CID, S.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Application of single-drop microextraction and comparison with solid-phase microextraction and solid-phase extraction for the determination of α- and β-endosulfan in water samples by gas chromatography-electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 984, n. 2, p. 245–252, 2003.

22 HU, J.-B.; CHEN, S.-Y.; WU, J.-T.; CHEN, Y.-C.; URBAN, P. L. Automated system for extraction and instantaneous analysis of millimeter-sized samples. **RSC Advances**, v. 4, n. 21, p. 10693, 2014.

23 BURNS, D. A. Automated Sample Preparation. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 1403–1418, 1981.

24 MEDINA, D. A. V.; CABAL, L. F. R.; LANÇAS, F. M.; SANTOS-NETO, Á. J. Sample treatment platform for automated integration of microextraction techniques and liquid chromatography analysis. **HardwareX**, v. 6, p. 1–16, 2019.

25 OLSEN, K. The First 110 Years of Laboratory Automation: Technologies, Applications, and the Creative Scientist. **Journal of Laboratory Automation**, v. 17, n. 6, p. 469–480, 2012.

26 DESSY, R. Robots in the Laboratory: Part I. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 11, 1983.

27 DESSY, R. Robots in the Laboratory: Part II. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 1100–1114, 1983.

28 URBAN, P. L. Prototyping Instruments for the Chemical Laboratory Using Inexpensive Electronic Modules. **Angewandte Chemie**, v. 57, n. 34, p. 11074–11077, 2018.

29 SIANO, G. G.; MONTEMURRO, M.; ALCARÁZ, M. R.; GOICOECHEA, H. C. Open-Source Assisted Laboratory Automation through Graphical User Interfaces and 3D Printers: Application to Equipment Hyphenation for Higher-Order Data Generation. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 20, p. 10667–10672, 2017.

30 BARAN, W.; ADAMEK, E.; ZIEMIAŃSKA, J.; SOBCZAK, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. **Journal of hazardous materials**, v. 196, p. 1–15, 2011.

31 RENEW, J. E.; HUANG, C.-H. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1042, n. 1–2, p. 113–121, 2004.

32 YU, H.; MU, H.; HU, Y.-M. Determination of fluoroquinolones, sulfonamides, and tetracyclines multiresidues simultaneously in porcine tissue by MSPD and HPLC–DAD. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 1, p. 76–81, 2012.

33 DRLICA, K.; MALIK, M.; KERNS, R. J.; ZHAO, X. Quinolone-mediated bacterial death. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 385–392, 2008.

34 NATION, U. **World drug report 2016**. . Disponível em: <https://www.unodc.org/doc/wdr2016/WORLD_DRUG_REPORT_2016_web.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2016.

35 FERNANDEZ, P.; MORALES, L.; VAZQUEZ, C.; BERMEJO, A. M.; TABERNERO, M. J. HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma. **Forensic Science International**, v. 161, n. 1, p. 31–35, 2006.

36 FERNÁNDEZ, P.; LAFUENTE, N.; BERMEJO, A M.; LÓPEZ-RIVADULLA, M.; CRUZ, A. HPLC determination of cocaine and benzoylecgonine in plasma and urine from drug abusers. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 20, n. 4, p. 224–228, 1996.

37 JANG, M.; KIM, J.; HAN, I.; YANG, W. Simultaneous determination of LSD and 2-oxo-3-hydroxy LSD in hair and urine by LC-MS/MS and its application to forensic cases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 138–143, 2015.

38 BOTCH-JONES, S.; FOSS, J.; BARAJAS, D.; KERO, F.; YOUNG, C.; WEISENSEEL, J. The detection of NBOMe designer drugs on blotter paper by high resolution time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) with and without chromatography. **Forensic Science International**, v. 267, p. 89–95, 2016.

39 DE MORAIS, D. R.; BARBOSA, I. L.; CUNHA, K. F.; TRIPODI, G. L.; ANGOLINI, C. F. F.; FRANCO, M. F.; DE AQUINO, E. M.; EBERLIN, M. N.; COSTA, J. L. EASI-IMS an expedite and secure technique to screen for 25I-NBOH in blotter papers. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 10, p. 701–706, 2017.

Capítulo 2

Microextração em gota única assistida por robô cartesiano

1. Objetivos

Desenvolver métodos automatizados de preparo de amostra baseados em SDME. Para isso foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Configurar o robô cartesiano para fazer o preparo de amostra baseado em SDME.
- Desenvolver dispositivos que permitissem a obtenção de gotas mais estáveis e de maior tamanho para serem usadas em SDME.
- Otimizar as variáveis que pudessem afetar a extração de sulfonamidas e fluoroquinolonas por SDME em amostras de águas superficiais.
- Comparar os modos de extração estático e dinâmico em SDME.
- Validar o método desenvolvido avaliando-se parâmetros como seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação.
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de águas superficiais provenientes de diferentes córregos da cidade de São Carlos/SP.

2. Materiais e métodos

2.1 Padrões e reagentes

Os padrões de sulfadiazina (SDZ) (≥ 99%), sulfatiazol (STZ) (≥ 99%), sulfamerazina (SMR) (≥ 99%), norfloxacina (NOR) (≥ 99%) e enrofloxacina (ENR) (≥ 99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para a preparação das soluções estoque, os padrões (1 mg mL^{-1}) foram solubilizados em acetonitrila contendo ácido fosfórico (0,1% em volume). As soluções de trabalho foram preparadas diariamente em água ultrapura a partir das soluções-estoque.

Metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), clorofórmio ($CHCl_3$) e acetato de etila (AcOEt), todos de grau HPLC, foram adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, USA). O ácido fórmico (grau espectrometria de massas, 98%) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O Na_2SO_4 usado nos estudos de força iônica foi

adquirido de J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA). A água ultrapura foi purificada no sistema Milli-Q da Millipore (USA).

O esgoto simulado foi preparado como descrito por Torres. Sua composição detalhada encontra-se na tabela 2.1. (1)

Tabela 2.1 – Composição do meio (esgoto simulado) empregado nos testes de optimização do método de extração por SDME.

Composição	Quantidade para 1 L
Sacarose	35 mg
Amido	114 mg
Extrato de carne	208 mg
Óleo de soja	51 mg
NaCl	250 mg
$MgCl2 \cdot 6H_2O$	7 mg
$CaCl2 \cdot 6H_2O$	4,5 mg
$NaHCO_3$	200
Detergente	3 gotas

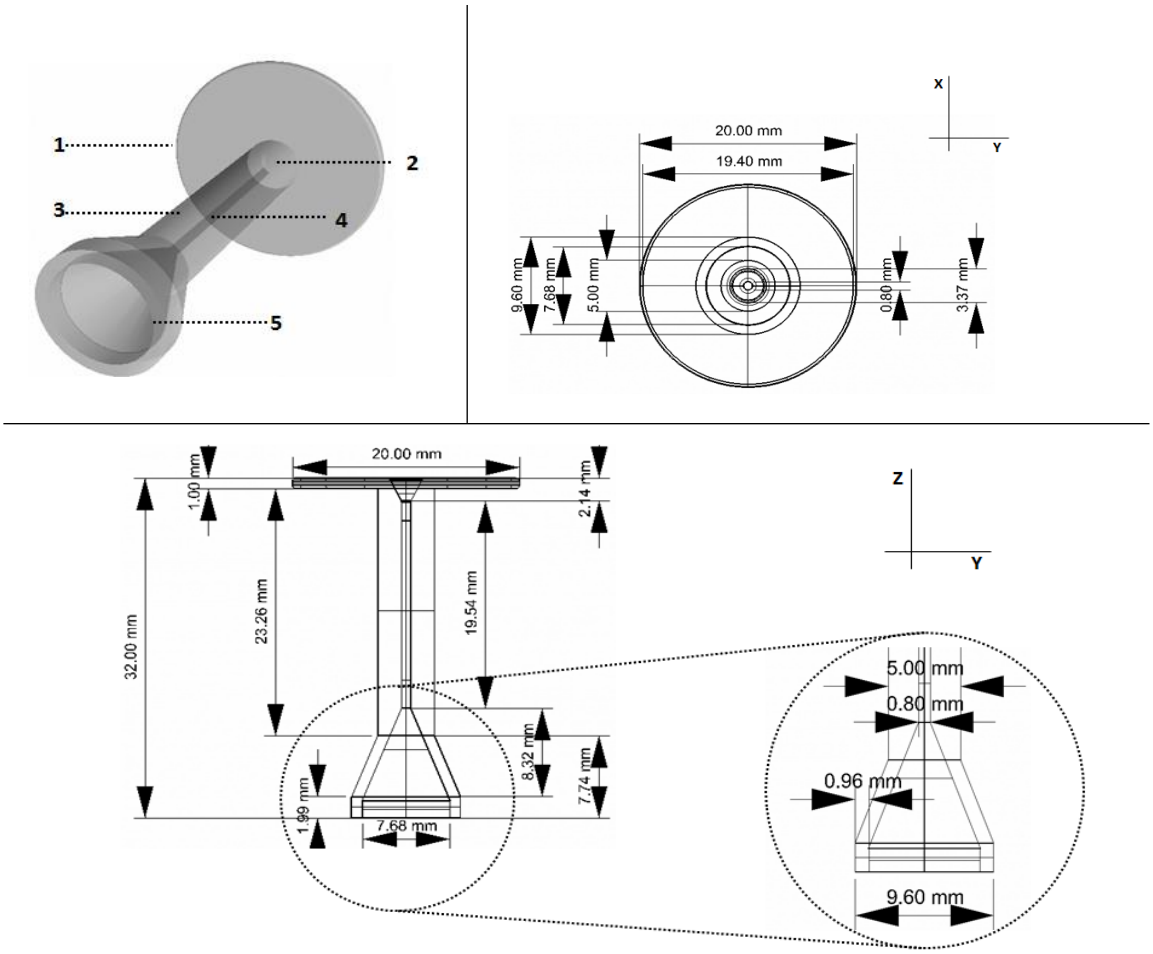
2.2 Dispositivo de extração

Com o intuito de serem obtidas gotas mais estáveis e de volumes superiores aos relatados previamente na literatura (>20 µL), foi projetado um dispositivo de extração. Diferentemente dos dispositivos previamente relatados esse dispositivo é facilmente adaptável ao reservatório da amostra, deixando a agulha livre e permitindo a automatização completa do procedimento de extração por SDME (Figura 2.1). (2)

O dispositivo foi construído em politetrafluoroetileno (PTFE) conhecido popularmente com o nome comercial de Teflon®. É composto por um disco suporte superior (20 mm de diâmetro externo e 1 mm de espessura), uma haste tubular (de 0,8 mm de diâmetro interno) e um terminal truncado em forma de cone (7,7 mm de diâmetro interno na base), o qual é conectado ao canal interno da haste (Figura 2.1).

O disco suporte permite o acoplamento do dispositivo entre a tampa e a borda do reservatório de amostra. O disco é composto por uma guia central cônica, conectada ao canal interno para permitir a entrada da agulha da seringa através da haste tubular até o ponto final cônico, onde a gota é gerada e a extração ocorre. Uma descrição mais detalhada sobre as dimensões do dispositivo desenvolvido pode ser consultada na Figura 2.1. Um segundo dispositivo para extrações por HS-SDME também foi construído, a única diferença encontra-se no comprimento da haste que passa de 23,3 mm para 15,2 mm.

Figura 2.1 – Desenho em perspectiva cavaleira do dispositivo de extração para SDME.



Autor: Vargas, D. 2018.

2.3 Procedimento de extração por SDME estático e dinâmico

Todas as etapas do procedimento de extração por SDME, incluindo o preenchimento da seringa com o solvente de extração e o descarte do extrato final no vial de injeção foram automatizados pelo robô cartesiano projetado no laboratório. Os programas de software para SDME dinâmico e estático foram escritos no ambiente de desenvolvimento integrado (IDE) do Arduino. (3)

Para o preparo da amostra por SDME estático e dinâmico, o robô foi equipado com uma microsseringa com agulha removível de 500 µL, modelo Gastight 1750 (Hamilton, EUA).

Inicialmente, o robô enche a seringa com o solvente de extração; em seguida, a agulha perfura o septo do frasco de amostra e passa através do dispositivo de extração, onde o êmbolo da seringa desce lentamente para expor a gota em 8 mL de amostra. No caso da SDME estática, após o tempo de extração definido, a gota é recolhida e, posteriormente, o extrato é dispensado em um vial com um *"insert"* cônico de 500 µL. O extrato é seco sob fluxo de nitrogênio e reconstituído em 50 µL de água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico para posterior injeção no sistema cromatográfico.

No caso da SDME dinâmica, depois do tempo de exposição da gota definido no programa, a gota é lentamente recolhida para o interior da seringa e, posteriormente, reexposta. O procedimento de retirada e de reexposição da gota é repetido por um determinado número de vezes (ciclos) estabelecido para cada experimento.

2.4 Otimização do procedimento de extração por SDME

2.4.1 Otimização univariada do procedimento de extração por SDME

Após o ajuste dos fatores operacionais do robô, avaliou-se de forma univariada o melhor solvente de extração, o melhor volume da gota, a melhor taxa de agitação e o efeito da adição de sal. Os solventes de extração avaliados foram diclorometano (DCM), clorofórmio ($CHCl_3$), acetato de etila, diclorometano/clorofórmio (50:50, em

volume), diclorometano/acetato de etila (50:50, em volume), acetato de etila/clorofórmio (50:50, em volume) e diclorometano/clorofórmio/acetato de etila (1:1:1, em volume); os volumes de gota avaliados foram 30, 50 70 e 90 µL; a influência da taxa de agitação foi avaliada em 0, 200, 400 e 600 rpm.

2.4.2 Comparação do modo estático e dinâmico em SDME

Após a escolha do melhor solvente de extração, o melhor volume de extração (volume da gota) e a melhor taxa de agitação, foi feito um estudo comparativo entre os modos de extração dinâmico e estático. Para isso foram testados quatro diferentes tempos de extração total. No caso do modo dinâmico, uma gota de 90 µL da mistura diclorometano/acetato de etila (1:1, em volume) foi exposta em 8 mL de esgoto simulado, em uma sequência de ciclos (cada ciclo de 20 segundos) de retirada-exposição, os números de ciclos avaliados foram 10, 30, 50 e 70 ciclos. No caso do modo estático, a gota foi exposta em tempos de extração equivalentes ao tempo total de extração para cada número de ciclos avaliados, ou seja, 5 min 10 s (tempo de extração para 10 ciclos), 15 min 40 s' (tempo de extração par 30 ciclos), 26 min 30 s' (tempo de extração para 50 ciclos) e 38 min 30 s (tempo de extração para 70 ciclos). Os dados foram processados pelo *software* STATISTICA 10 (StatSoftInc, Tulsa, EUA, 2011)

2.4.3 Efeito do volume total de solvente extrator

O efeito do volume total de solvente extrator carregado na seringa e sua interação com o modo de extração foram investigados por meio de um planejamento fatorial completo 2^2. Os dois níveis para cada fator foram configurados como 100 µL (-) e 300 µL (+) para o volume total de solvente extrator e, estático (-) e dinâmico (+) para o modo de extração. Uma gota de 90 µL da mistura de diclorometano/acetato de etila (1:1, em volume) foi exposta em 8 mL de esgoto simulado, em uma sequência de 70 ciclos de retirada de exposição (20 s de exposição estática para cada ciclo) em experimentos no modo dinâmico e, por um tempo equivalente de extração (38,5 min)

no modo estático. O planejamento experimental foi executado de maneira aleatória e é apresentado na tabela 2.2. Os dados foram processados pelo *software* STATISTICA 10 (StatSoftInc, Tulsa, EUA, 2011)

Tabela 2.2 – Planejamento experimental para estudar a interação entre os modos de extração e o volume de solvente total carregado na seringa.

Experimento	Número de ciclos	Volume total de solvente (µL)
1	1	100
2	1	100
3	1	100
4	70	100
5	70	100
6	70	100
7	1	300
8	1	300
9	1	300
10	70	300
11	70	300
12	70	300

2.4.4 Otimização do número de ciclos e o tempo de extração

Finalmente, o processo de extração por SDME dinâmico foi otimizado em função do número de ciclos de extração e do tempo de exposição para cada ciclo. Para isso um planejamento composto central foi realizado na região experimental, entre 30 (-√2) a 109 (+ √2) ciclos de retirada-exposição e, 5 (-√2) a 25 (+ √2) segundos como tempo de exposição da gota para cada ciclo. O planejamento experimental foi executado de maneira aleatória e é apresentado na tabela 2.3. Os dados foram processados pelo *software* STATISTICA 10 (StatSoftInc, Tulsa, EUA, 2011)

Tabela 2.3 – Planejamento experimental para a otimização do número de ciclos e o tempo de exposição da gota.

Experimento	Número de ciclos	Tempo de exposição
1	42	8
2	42	22
3	98	22
4	98	8
5	30	15
6	109	15
7	70	5
8	70	25
9(C)	70	15
10(C)	70	15
11(C)	70	15

2.5 Instrumentação e condições cromatográficas

Na otimização do método de extração foi empregado um HPLC da Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com um módulo de comunicação CBM-20A, duas bombas LC-20AD, um desgaseificador DGU-20AS, um amostrador automático SIL-20AC, um forno cromatográfico CTO-20A e um detector UV-vis SPD-20A monitorando a 270 e 290 nm. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna analítica Poroshell 120 EC-C18 (100 mm, 2,1 mm d.i., tamanho de partícula de 2,7 µm) (Agilent Technologies); com a fase móvel constituída de água ultrapura (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. Inicialmente, uma eluição isocrática foi programada com 7% de acetonitrila por 5 min. De 5 a 15 min foi realizada uma eluição em gradiente aumentando-se linearmente a porcentagem de acetonitrila de 7 a 32%; então, o gradiente retornou à condição inicial ao longo de 4 min. A temperatura do forno foi mantida a 40 °C e a vazão a 0,2 mL min^{-1}.

Para as determinações quantitativas e na avaliação das figuras de mérito foi utilizado um sistema online-SPE-LC-MS/MS composto por um HPLC da Agilent série 1260 (Palo Alto, CA), equipado com uma bomba binária, um amostrador automático ALS 1200, um forno cromatográfico 1200 acoplado a um quadrupolo-aprisionador de

íons linear modelo 5500 QTRAP (AB SCIEX, Foster, CA) com ionização por "*electrospray"* no modo positivo. O modo SRM *(selected reaction monitoring)* foi utilizado para determinação quantitativa e qualitativa. As separações cromatográficas foram feitas em uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (100 mm 2,1, mm d.i., tamanho de partícula de 2,7 µm). Água e acetonitrila foram escolhidas como a fase móvel. Para as separações na coluna analítica uma eluição isocrática com 5% de ACN foi programada durante 3,1 minutos, posteriormente, um gradiente linear foi programado aumentando-se a concentração de ACN até 65% do minuto 3,1 até o minuto 9, finalmente, um gradiente linear foi programado para reduzir a concentração de ACN a 5% ao longo de 6 minutos. A vazão da fase móvel foi ajustada em 0,6 mL min^{-1}. O software Analyst 1.6.1 foi utilizado para a aquisição e processamento de dados. Durante a etapa de pré-concentração online, os analitos foram retidos em uma coluna de SPE (2,1 × 20 mm, 25 µm) com o polímero Oasis HLB da Waters. O sistema SPE-LC on-line foi configurado conforme descrito por Gomes e colaboradores. Os íons monitorados no modo SRM estão descritos na Tabela 2.4. (4)

Tabela 2.4 - Transições monitoradas no modo SRM e condições utilizadas no espectrômetro de massas durante a avaliação das figuras de mérito.

Analito	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
SDZ	251	156	46	21	10
	251	**92**	**46**	**35**	**14***
	251	108	46	31	8
STZ	**256**	**156**	**61**	**23**	**8***
	256	92	61	37	14
	256	108	61	35	16
SMR	279	186	56	25	10
	279	**92**	**56**	**71**	**16***
	279	108	56	37	16
NOR	**320**	**302**	**66**	**29**	**14***
	320	276	66	23	14
ENR	360	316	81	37	12
	360	245	81	47	9
	360	**286**	**81**	**14**	**12***
^{13}C-SMTX	260	98	96	39	16
	260	114	96	39	16
	260	162	96	33	6

* A transição de quantificação foi ressaltada em negrito

2.6 Avaliação das figuras de mérito

Para a avaliação das figuras de mérito do método empregou-se o guia de validação do *"International Conference on Harmonization"* (ICH). Os parâmetros de validação selecionados foram: seletividade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão intra e interdias. Durante essa etapa foi empregado esgoto simulado como matriz representativa (branco).

Para avaliar a seletividade, uma amostra branco foi analisada (n=3) após o procedimento de extração por SDME e observando-se a presença ou não de interferentes no tempo de retenção dos analitos.

A linearidade foi avaliada por meio de curvas analíticas construídas por calibração externa e padronização interna. Para isso a matriz representativa foi fortificada em oito níveis de concentração (50, 100, 250, 500, 1.000, 2.000, 3.000 e 4.000 ng mL^{-1}) para as sulfonamidas e seis níveis de concentração (100, 250, 500, 1000, 2000 e 3000 ng mL^{-1}) para as fluoroquinolonas. As amostras foram submetidas ao processo de extração por SDME e posteriormente à análise cromatográfica, cada nível em triplicata. Em todos os níveis foi empregado o analito sulfametoxazol-(fenil-$^{13}C_6$) como padrão interno (PI) para as determinações quantitativas.

O LOD e o LOQ foram estabelecidos como a concentração do analito que produzisse um sinal de 3 e 10 vezes, respectivamente, em relação a amplitude do ruído da linha de base na região de eluição de cada analito.

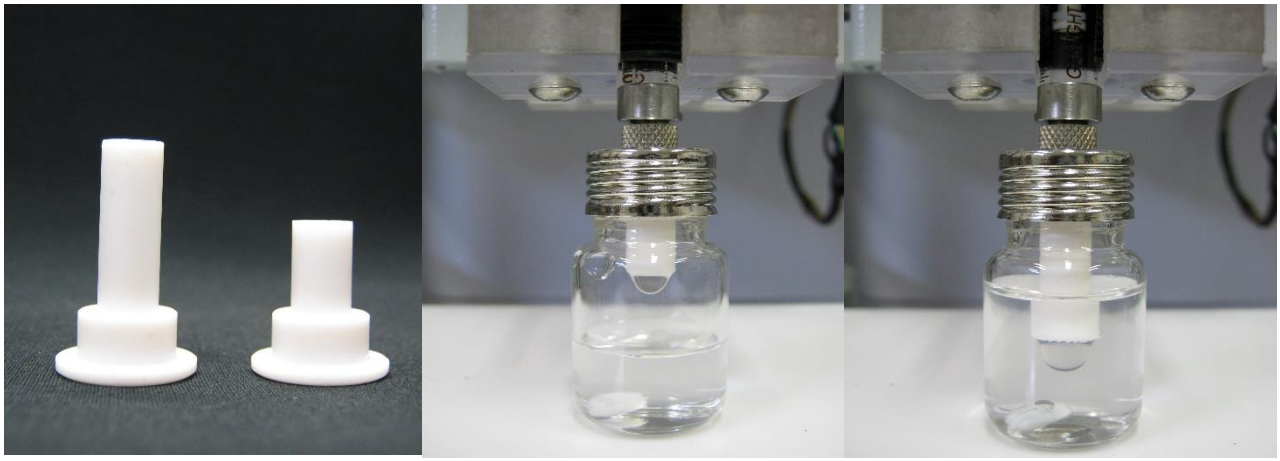
Para a avaliação da precisão e exatidão a matriz representativa foi fortificada em 80, 1500 e 3500 ng mL^{-1} para as sulfonamidas e, 150, 750 e 1500 ng mL^{-1} para as fluoroquinolonas, sendo as amostras analisadas em triplicata e em dois dias diferentes. Para expressar os resultados da precisão, foi calculado o DPR das análises intra e interdias.

3. Resultados e discussão

3.1 Dispositivos de extração

A extração em gota única é uma técnica de extração baseada no equilíbrio de partição, ou seja, a técnica envolve a distribuição dos analitos em duas fases líquidas imiscíveis. A quantidade de analito extraído é proporcional ao volume da gota. Sendo assim, foram desenvolvidos dois dispositivos (um para DI-SDME e um para HS-SDME) que permitissem a formação de gotas estáveis e de “grande porte” para serem usadas em SDME. O dispositivo foi fabricado em politetrafluoroetileno (PTFE) seguindo-se o desenho da Figura 2.1. Os dispositivos anteriormente relatados na literatura são adaptados diretamente na agulha. Em contrapartida, os dispositivos fabricados são adaptáveis ao reservatório da amostra, o que permite a automatização completa do procedimento de extração por SDME (Figura 2.2). A novidade dos dispositivos de extração permitiu que fosse solicitado o pedido de patente ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). (5,6)

Figura 2.2 – Dispositivos de extração para a formação de gotas de grande porte.



3.2 Otimização univariada do procedimento de extração

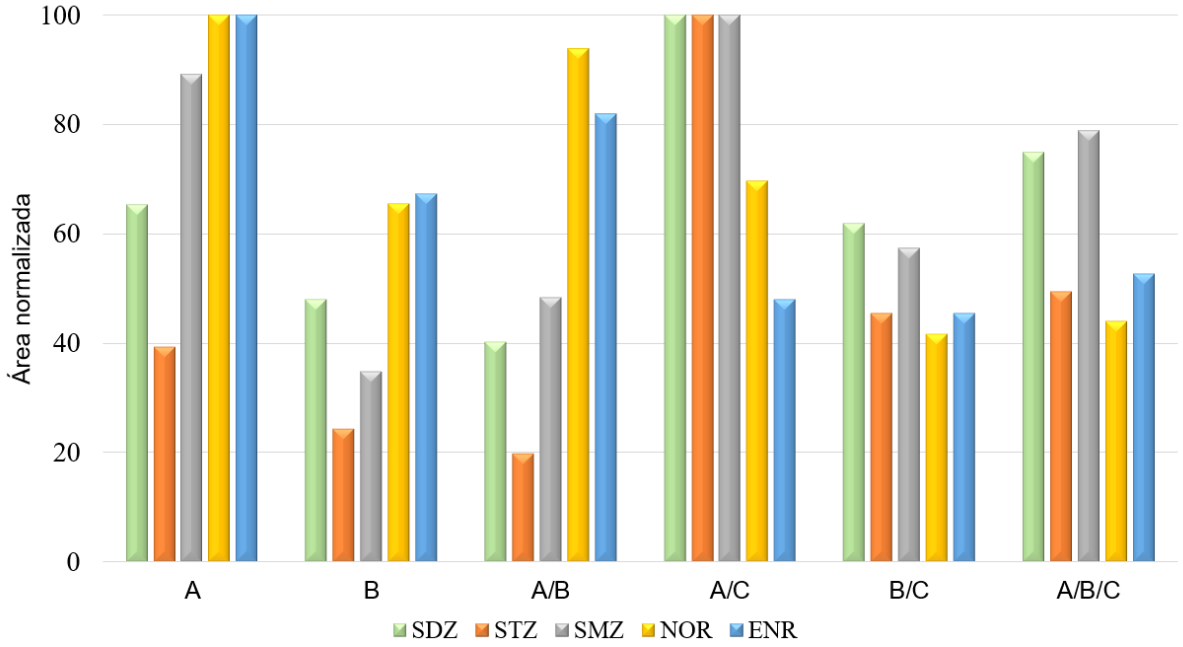
3.2.1 Efeito do solvente de extração

Um solvente de extração adequado para DI-SDME deve ser imiscível com o solvente da matriz, capaz de fornecer gotas estáveis, apresentar altos fatores de enriquecimento dos analitos-alvo e seletividade apropriada. Geralmente, o princípio “semelhante dissolve semelhante” orienta a seleção de solventes em técnicas de extração líquido-líquido. Sulfonamidas e fluoroquinolonas são compostos anfotéricos, com caráter hidrofóbico em pH 6-8, mas com diferenças notáveis na polaridade. A polaridade das sulfonamidas estudadas variam de log k_{ow} 0,09 a log k_{ow} 0,14 e, entre log k_{ow} 1,03 e log k_{ow} 1,1 para as fluoroquinolonas estudadas, assim, a determinação simultânea de SAs e FQs relatada na literatura é feita em sua maioria por técnicas de extração em fase sólida. (7,8)

As SAs foram extraídas anteriormente por DI-SDME empregando-se líquidos iônicos. Por sua vez, as FQs foram extraídas de amostras aquosas por DI-SDME empregando uma gota aquosa submersa em uma fina capa de clorofórmio ou diclorometano/tolueno. Esses sistemas apresentam maior complexidade do que os sistemas bifásicos e são conhecidos como microextrações em gota única líquido-líquido-líquido. Pesquisando-se a literatura, não se observou o relato de extrações simultâneas de SAs e FQs por SDME. (7,8,9,10)

Para a extração simultânea de SAs e FQs, foram avaliados três solventes orgânicos: DCM, $CHCl_3$, AcOEt e suas misturas equivolumétricas binárias e ternária. A melhor eficiência de extração foi obtida com a mistura DCM/AcOEt (1:1em volume), a qual foi usada como solvente extrator para os demais experimentos. Como apresentado na Figura 2.3, a mistura DCM/EtOAc (1:1, em volume) proporcionou a melhor eficiência de extração para as SAs alvo e, no caso das FQs, a eficiência de extração não foi tão prejudicada quanto seriam as SAs com o melhor solvente para as FQs. Consequentemente, a mistura DCM/AcOEt foi selecionada como o solvente de extração.

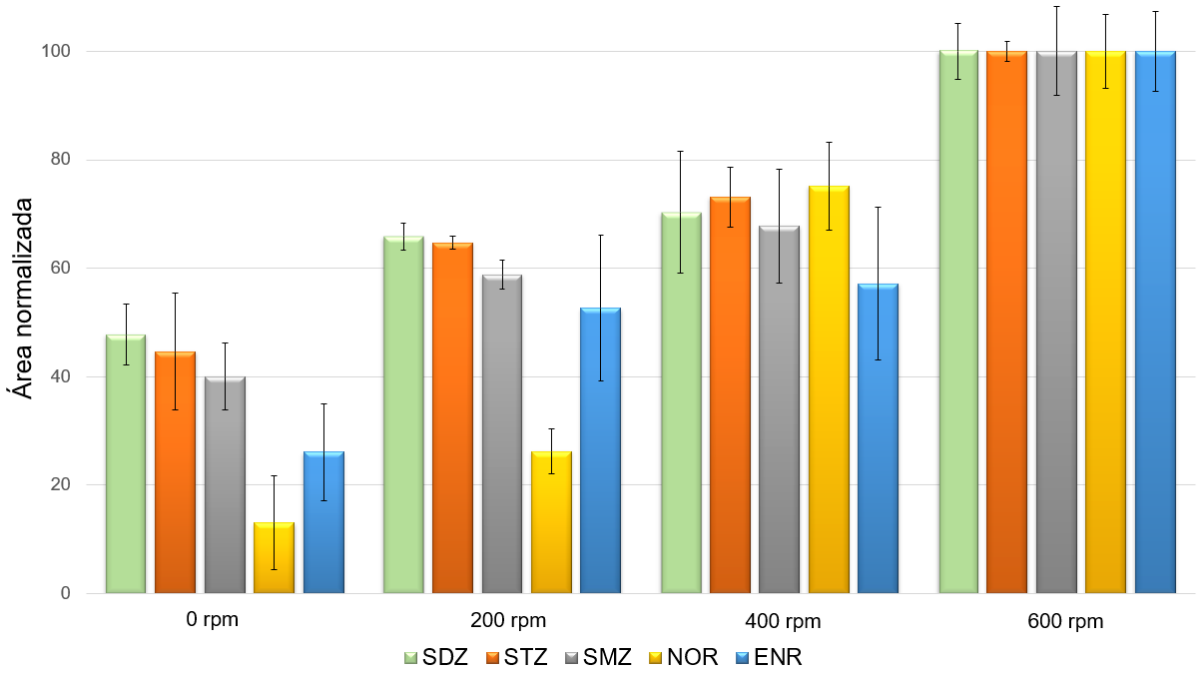
Figura 2.3 – Efeito do solvente de extração sobre a eficiência da extração da SDME para a determinação da SDZ, STZ, SMZ, NOR e ENR. (A) diclorometano; (B) clorofórmio; (C) acetato de etila.



3.2.2 Efeito da velocidade de agitação da amostra

A taxa de extração de um analito por uma gota de solvente extrator depende, principalmente, do coeficiente de difusão do analito na amostra e da espessura da camada de amostra estagnada em torno da gota. A agitação da amostra permite a renovação constante desta camada, tornando-se um parâmetro simples para modular a transferência de massa do analito em DI-SDME. Aumentos na velocidade da agitação da amostra aumentam a transferência de massa entre a amostra e a gota; mas, ao mesmo tempo, podem causar a instabilidade da mesma, prejudicando o sucesso da extração. Para a extração simultânea de SAs e FQs por DI-SDME foram avaliadas 4 velocidades de agitação: 0, 200, 400 e 600 rpm. Como apresentado na Figura 2.4, a eficiência da extração apresentou uma tendência de aumento com o aumento da agitação. No entanto, velocidades de agitação além de 600 rpm não permitiram mais do que 35 ciclos de extração, produzindo gotas instáveis. Assim, a velocidade de agitação selecionada neste estudo foi de 600 rpm. (11,12)

Figura 2.4 - Efeito da velocidade da agitação da amostra na eficiência da SDME para a determinação da SDZ, STZ, SMZ, NOR e ENR.



3.2.3 Efeito da adição de sal

Normalmente, quando um eletrólito é adicionado a uma solução aquosa a solubilidade das moléculas orgânicas diminui, o que melhora a extração dos analitos. Esse efeito é conhecido como efeito *"salting out"*. O estudo do efeito da adição de sal na amostra foi feito pela adição de Na_2SO_4. Neste caso, a adição de sal causou instabilidade das gotas, provavelmente, devido ao aumento da viscosidade da amostra. Como consequência, optou-se por extrair as sulfonamidas e as fluoroquinolonas em amostras de esgoto simulado sem a adição de sal. (13)

3.2.4 Efeito do volume da gota

Em SDME, a fração de analito extraída (E) é diretamente proporcional à relação entre as fases orgânico-aquosa (Ψ), conforme a equação 1:

$$E = \frac{K_D\,\Psi}{1 + K_D\,\Psi} \tag{1}$$

Onde K_D é a constante de distribuição. Em microextrações, os valores de Ψ geralmente variam entre 0,001 e 0,01. Embora nestas microtécnicas sejam observadas recuperações baixas dos analitos, as concentrações no extrato final costumam ser elevadas, levando a uma adequada resposta analítica. Esses valores de Ψ funcionam muito bem quando a técnica de análise é cromatografia gasosa, onde o solvente de extração (natureza e volume) é compatível com as condições de injeção. No caso da cromatografia líquida, a maioria dos solventes orgânicos utilizados na etapa de extração não é compatível com o modo de eluição em fase reversa. Portanto, os extratos orgânicos devem ser evaporados até a secura e reconstituídos para serem compatíveis com a composição inicial da fase móvel. (14,15,16,17)

Por outro lado, o uso de grandes gotas é limitado pela estabilidade. O volume máximo de uma gota suspensa na ponta de um capilar pode ser calculado segundo a equação 2. (18)

$$V_{dmax} = \frac{2\pi\sigma R_m}{\Delta\rho g} \tag{2}$$

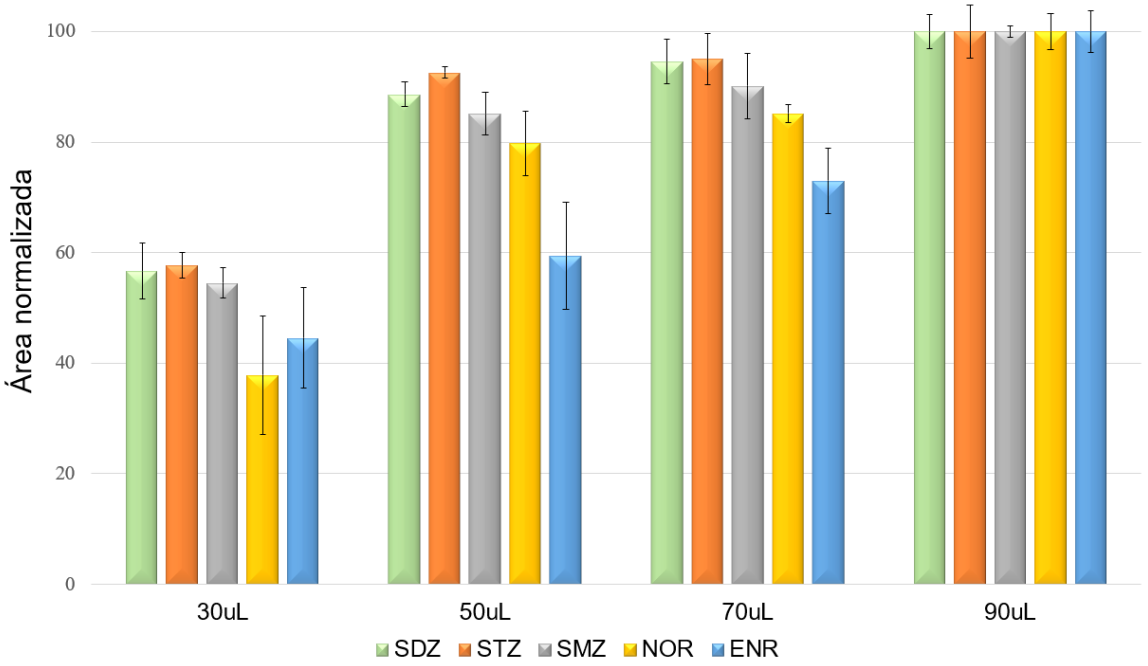
Na qual R_m é o rádio externo do capilar, σ é a tensão interfacial, $\Delta\rho$ é a diferença de densidade entre a gota e a amostra e, g é a aceleração gravitacional. Várias tentativas em aumentar o tamanho e a área superficial da gota extratora já foram relatadas na literatura. Recentemente, o uso de gotas com mais de 30 µL em SDME foi descrito em sistemas automatizados conhecidos como *"Lab-In-Syringe"*. (19)

No caso da SDME tradicional, a gota do solvente extrator tem formato esférico e fica suspensa na ponta de uma agulha. Assim, embora o volume suspenso seja baixo, existe uma grande probabilidade de perda da gota. O uso do dispositivo expansor da gota levou à formação de gotas com forma de meia esfera e com uma grande superfície de contato entre a gota e o dispositivo, o que reduziu a probabilidade

de descolamento. O expansor de gota desenvolvido tem um R_m = 0,35 cm capaz de fornecer gotas com V_{max} teórico de 125 µL, 339 µL e 592 µL para $CHCl_3$, DCM e EtAOc, respectivamente. No entanto, sob condições de agitação (600 rpm), o V_{max} experimental foi de 120 µL. A fim de se obter maior robustez e melhor compromisso entre recuperação e estabilidade da gota, estudou-se a eficiência de extração com volumes de gota variando de 30 até 90 µL. As gotas foram estáveis e adequadas para extrações dinâmicas em todos os casos. (2,6,18)

Como mostrado na Figura 2.5, as áreas dos picos das SAs e FQs aumentaram à medida que o volume da gota do extrator aumentou. As respostas analíticas aumentaram entre 40-60% quando o tamanho da gota passou de 30 para 90 µL. Como o maior desempenho de extração foi obtido com gotas de 90 µL, esse volume foi selecionado para as seguintes etapas deste estudo.

Figura 2.5 - Efeito do volume da gota na eficiência da extração da SDME para a determinação da SDZ,STZ, SMZ, NOR e ENR.

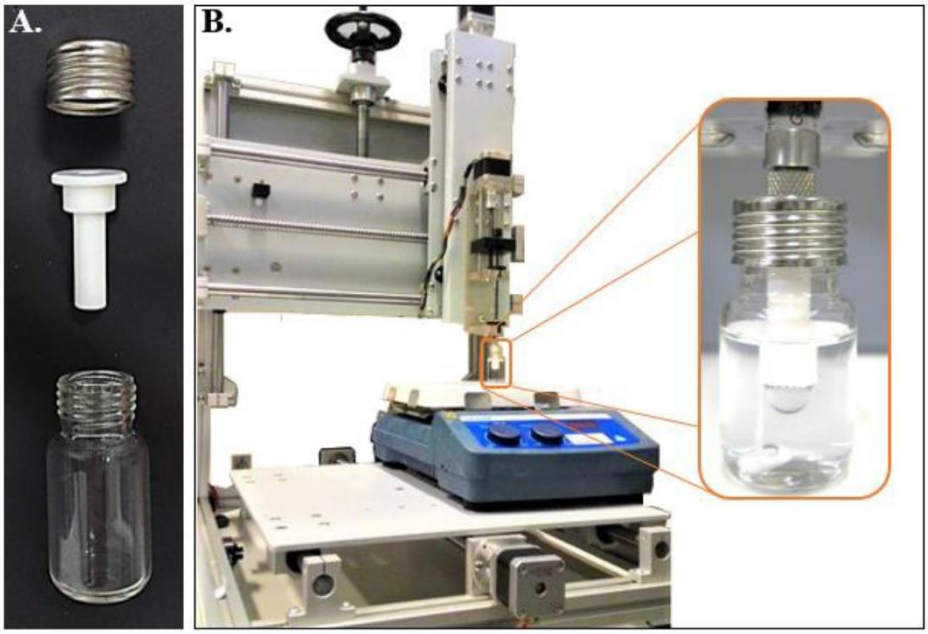


3.3 Comparação entre os modos de extração: dinâmico vs estático

Os modos de extração estático e dinâmico foram descritos anteriormente para SDME. Em procedimentos estáticos, uma gota de solvente extrator é exposta na solução da amostra (uma única vez) por um período de tempo determinado. Em experimentos dinâmicos, a gota do solvente extrator é exposta na solução da amostra por um curto período de tempo e, em seguida, é retirada para o interior da seringa. Esse procedimento é repetido em vários ciclos de extração. Tradicionalmente, a SDME tem sido executada manualmente e, consequentemente, o modo estático de extração é o mais amplamente relatado na literatura. (20,21)

No modo dinâmico, a execução da sequência de ciclos de retirada-exposição pode ser entediante e propensa a erros. A fim de superar estas dificuldades e investigar o potencial do modo de extração dinâmica, foi desenvolvido um robô cartesiano capaz de realizar um grande número de ciclos de retirada-exposição em SDME, com um controle rigoroso e reprodutível do tempo de exposição e o movimento do êmbolo (Figura 2.6). (3)

Figura 2.6 – Sistema automatizado desenvolvido para o preparo de amostra por SDME.



3.3.1 Estudo do tempo total de extração

A otimização do tempo de extração é importante para se obter um comprometimento razoável entre o desempenho da extração e o tempo da análise. A quantidade de analito extraído deve aumentar com um tempo de extração mais longo, assim, a eficiência máxima de extração pode ser obtida sob condições de equilíbrio. No entanto, as condições de equilíbrio são dificilmente atingidas em SDME, uma vez que um tempo de extração muito longo seria necessário, de acordo com a equação 3:

$$C_o(t) = C_{o_{equ}}(1 - e^{-kt}) \quad (3)$$

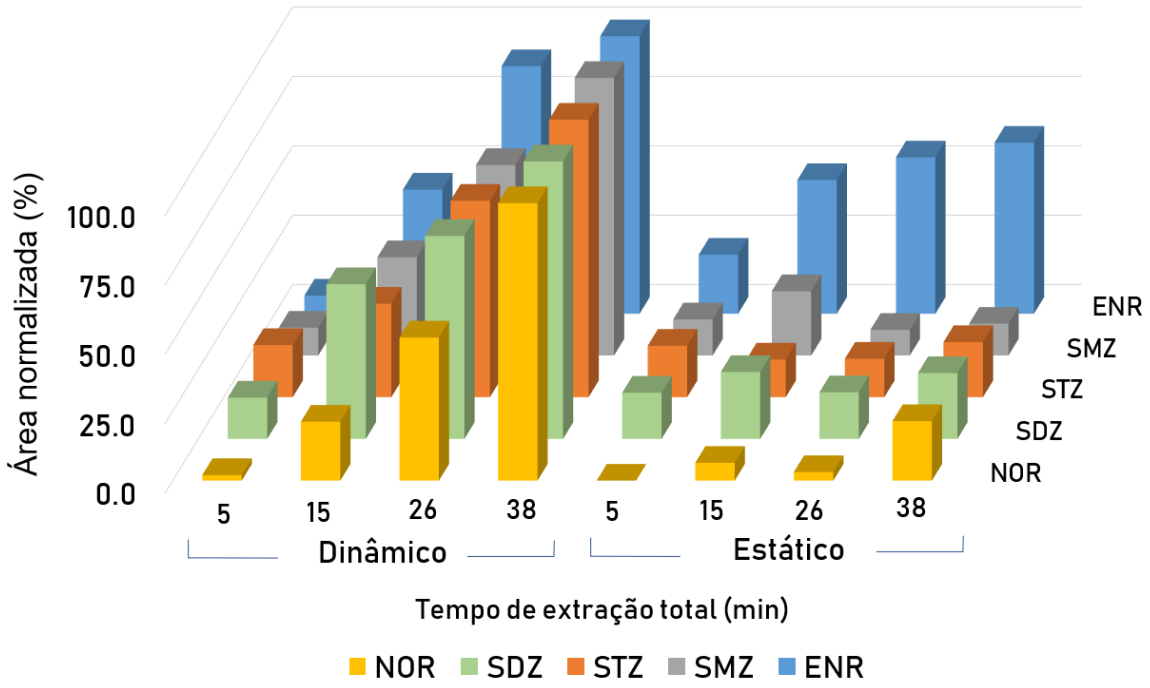
onde k é constante e depende da área da interface e dos coeficientes de transferência de massa entre a gota e a amostra. (11,12,22)

No modo estático de extração, uma relação linear entre a quantidade de analito extraído e o tempo de extração foi previamente descrita para gotas com volumes menores que 20 µL. Neste estudo, utilizando-se uma gota de 90 µL de DCM/AcOEt (1:1 em volume) e 300 µL de solvente de extração total, apenas a ENR mostrou o comportamento como previamente descrito (Figura 2.7). Para a NOR e todos as SAs alvo, a quantidade de analito extraído foi inversamente proporcional ao tempo de extração. A ENR é o mais hidrofóbico dos analitos investigados (log kow 1.1) e, dessa forma, o mais propenso a permanecer no solvente orgânico. Devido à miscibilidade parcial do AcOEt na água, o volume da gota extratora não permanece constante durante as extrações estáticas. Provavelmente, o encolhimento do volume da gota leva a re-solubilização dos analitos mais polares, impedindo seu enriquecimento em tempos de extração mais longos. Portanto, apenas os analitos mais hidrofóbicos permanecem na fase orgânica, acumulando-se ao longo do tempo. (20)

No modo de extração dinâmica, uma relação linear entre a recuperação do analito e o número de ciclos de extração também foi relatada na literatura. Neste estudo, observamos um comportamento semelhante para todos os analitos avaliados (Figura 2.7). Neste caso, o robô foi programado para compensar a perda do solvente de extração devido à solubilidade parcial, o que permitiu manter a área superficial da gota constante. Por meio da programação apropriada do robô, foi possível redefinir a

posição final do êmbolo da seringa após cada ciclo, a fim de usar o solvente remanescente no cilindro da seringa para reabastecer o solvente re-solubilizado, mantendo constante o volume da gota ao longo do tempo de extração. O resultado global apresentado na Figura 2.7 mostra uma eficiência de extração muito superior para o modo de extração dinâmica quando comparado ao modo estático, ante o mesmo tempo total de duração do experimento. (20)

Figura 2.7 – Comparação entre os modos dinâmico e estático de extração (SDME) para a determinação das sulfonamidas e fluoroquinolonas estudadas.



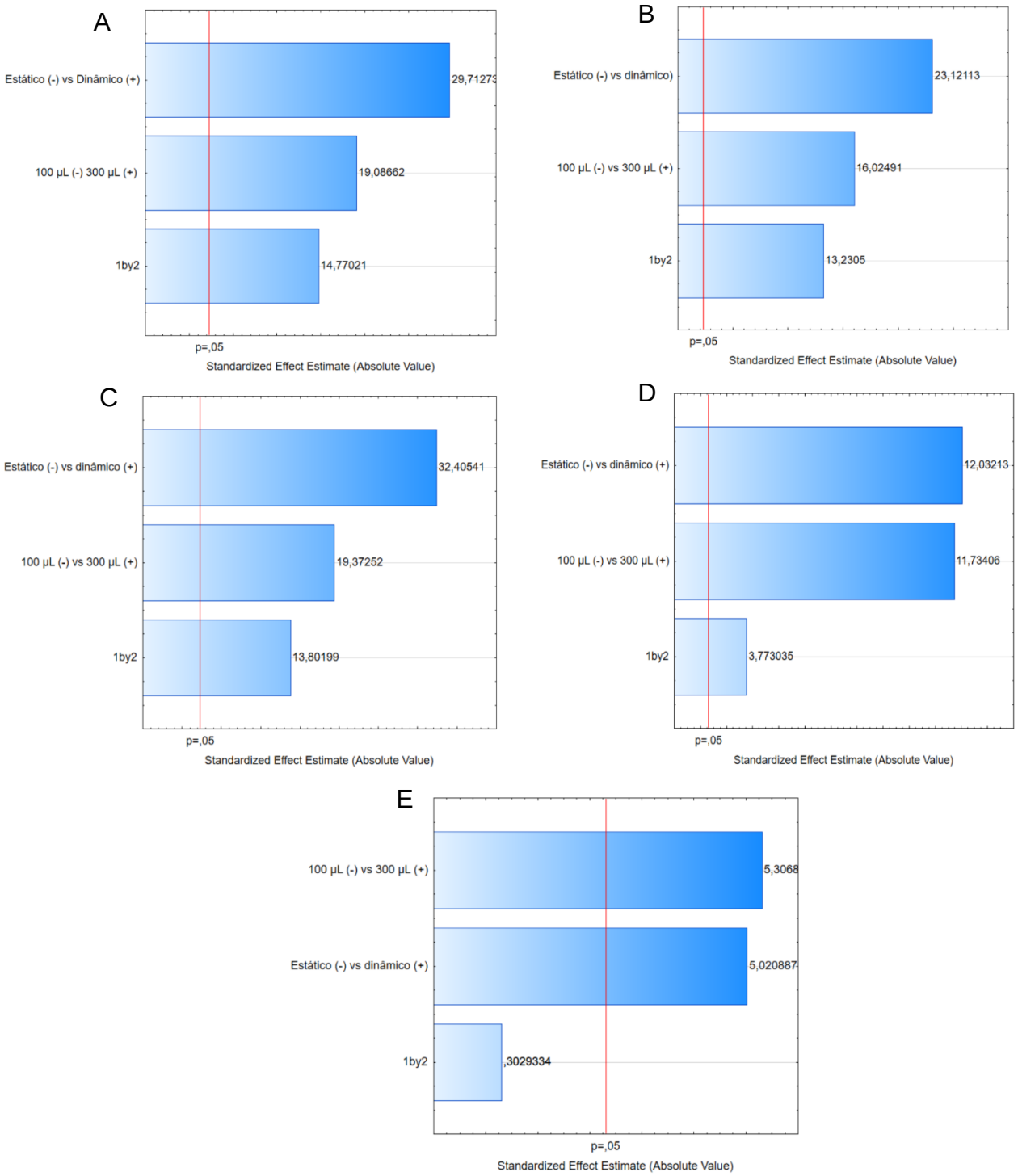
3.3.2 Estudo do volume total de extração

De acordo com a equação 1, um aumento na extração do analito pode ser alcançado aumentando-se o volume do solvente extrator. Portanto, é possível aproveitar não só o volume da gota, mas também o volume total do solvente carregado na microseringa, especialmente no modo dinâmico de extração, uma vez que a superfície da gota é renovada em cada ciclo, assemelhando-se a uma extração líquido-líquido "*multibatch*" em escala miniaturizada. Para avaliar o efeito do volume total carregado na microseringa, em associação com a extração dinâmica, dois volumes diferentes (100 e 300 µL) foram estudados e, as eficiências de extração

obtidas nos modos estático e dinâmico foram comparadas utilizando-se um planejamento fatorial completo 2^2.

A Figura 2.8 mostra os gráficos de Pareto para o planejamento experimental completo 2^2. Neles pode-se observar a significância estatística de ambos os efeitos e sua interação positiva em relação às respostas cromatográficas no nível de confiança de 95%. Os resultados mostraram que o modo de extração dinâmica consegue extrair melhor os analitos nos níveis baixo (100 µL) e alto (300 µL), do solvente total carregado na seringa. Do mesmo modo, um efeito menor, mas ainda significativo, foi observado quando o solvente total carregado na seringa passou de 100 para 300 µL no modo estático. Em resumo, o aumento do volume total do solvente carregado na microseringa levou a uma melhora na extração dos analitos, em ambos os modos de extração. A interação positiva de ambos os fatores apontou que as condições de extração mais favoráveis foram obtidas por meio da associação do modo de extração dinâmica e do volume total de extração de 300 µL.

Figura 2.8 – Diagramas de Pareto do planejamento fatorial completo 2^2 para avaliar o efeito do volume total de extração da SDME. (A) SDZ; (B) STZ; (C) SMR; (D) NOR; (E) ENR



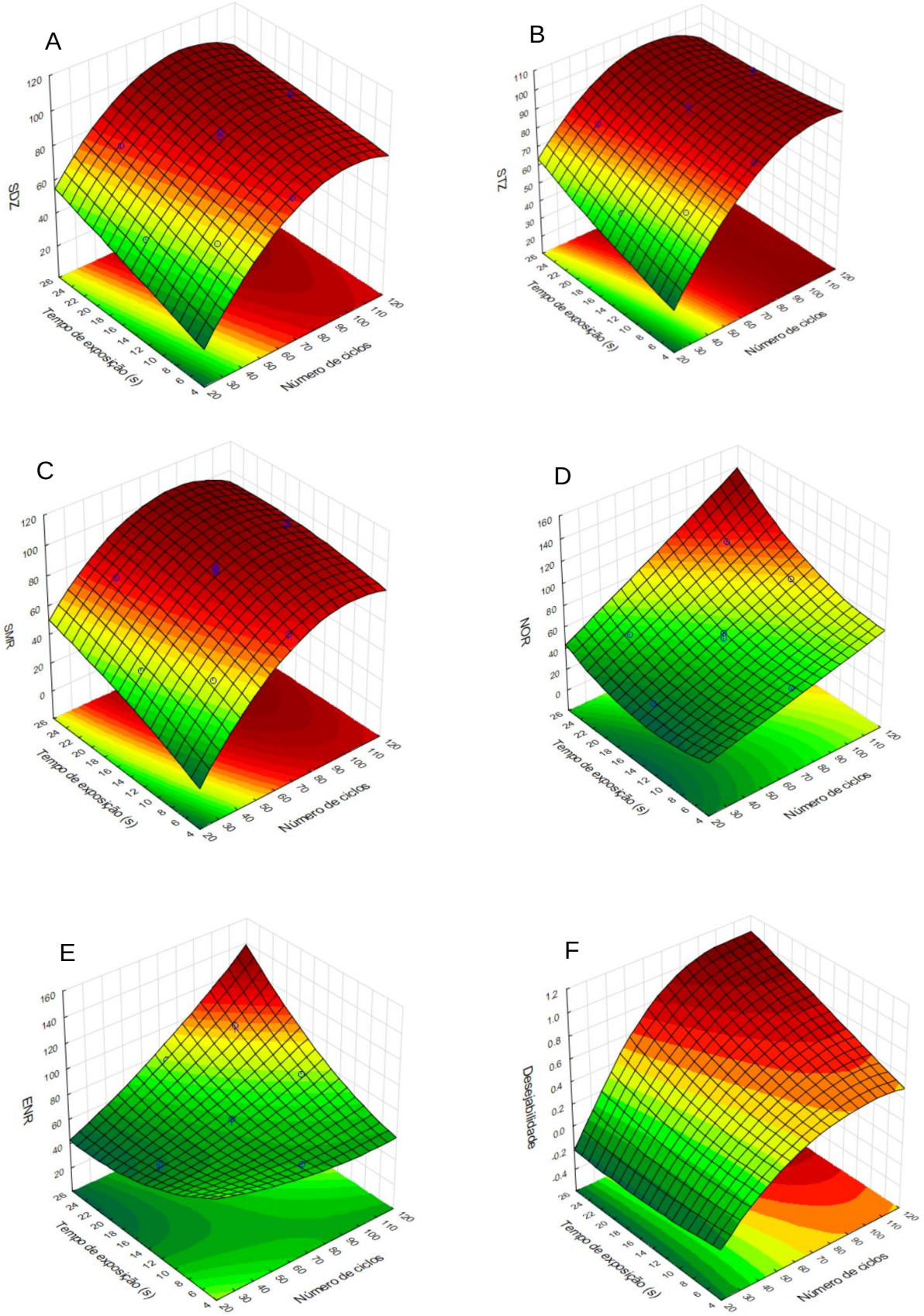
3.3.3 Otimização do tempo de exposição da gota e o número de ciclos em SDME dinâmico

Em SDME dinâmico, um tempo de extração curto, um número reduzido de ciclos de extração, ou ambos, podem afetar negativamente a eficiência da extração. No entanto, tempos de extração prolongados, ciclos de extração excessivos, ou ambos, podem causar a re-diluição dos analitos na amostra e o deslocamento da gota. Assim, o tempo de extração e o número de ciclos em que o equilíbrio de extração é atingido devem ser otimizados. Para determinação do número ótimo de ciclos e o tempo de exposição da gota, foi realizado um planejamento de composto central. Todos os experimentos foram feitos aleatoriamente e estão resumidos na Tabela 2.3.

As superfícies de resposta (Figuras 2.9A-2.9E) mostraram que o número de ciclos e o tempo de exposição ótimos foram diferentes e, estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para todos os analitos. Com o intuito de se obter uma condição geral para todos os analitos, os parâmetros foram observados usando-se uma função de desejabilidade (DF). A função DF permite prever a melhor combinação de número de ciclos e tempo de exposição da gota, e assim obter os valores máximos de resposta para os todos os analitos (Figura 2.9F). De acordo com a superfície de resposta da função desejabilidade, a resposta analítica depende linearmente do tempo de exposição e exponencialmente do número de ciclos. Além disso, a torção da superfície de resposta e os gráficos de Pareto mostraram uma interação positiva entre essas variáveis, o que significa que a melhor combinação entre os fatores deve levar em conta a sinergia do número de ciclos e o tempo de exposição.

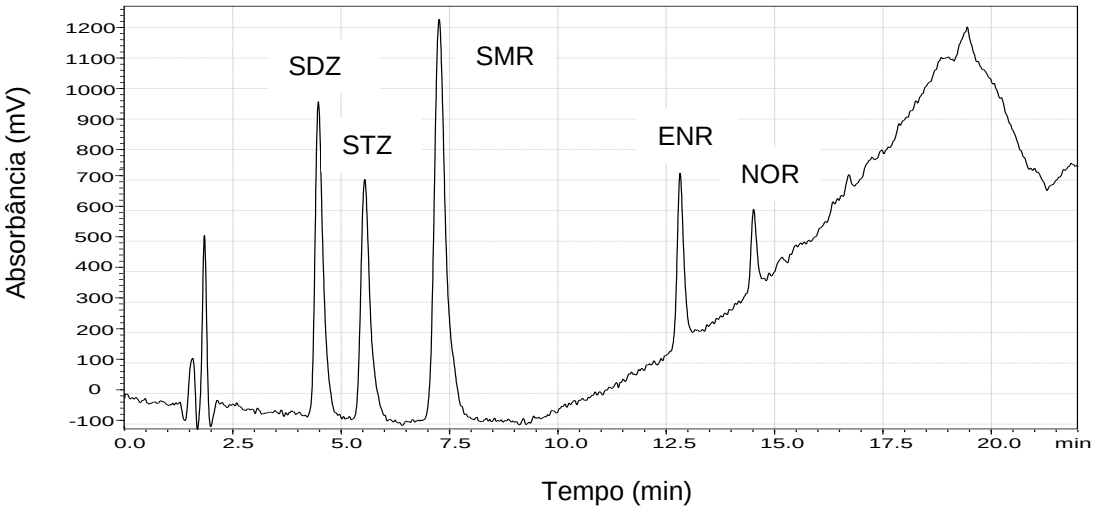
Os modelos matemáticos gerados mostraram que, para cada tempo de exposição da gota, o desempenho máximo de extração é obtido próximo dos 100 ciclos de retirada-exposição. Por outro lado, quando poucos ciclos de extração são realizados, o aumento no tempo de exposição da gota não leva a uma melhora significativa na extração do analito.

Figura 2.9 - Superfícies de reposta para experimentos de otimização do tempo de exposição da gota e o número de ciclos da SDME. (A) SDZ; B (STZ); C (SMR); D (NOR); E(ENR); F (função desejabilidade).



Nas condições experimentais testadas, a capacidade máxima de extração foi obtida após 109 ciclos de retirada-exposição da gota e 25 segundos de tempo de exposição. A fim de se evitar um tempo excessivamente longo de preparação da amostra, a condição de extração selecionada para a avaliação das figuras de mérito foi de 70 ciclos de extração e 20 segundos de tempo de exposição da gota. A Figura 2.10 apresenta um cromatograma de HPLC-UV representativo obtido a partir dessas condições de extração.

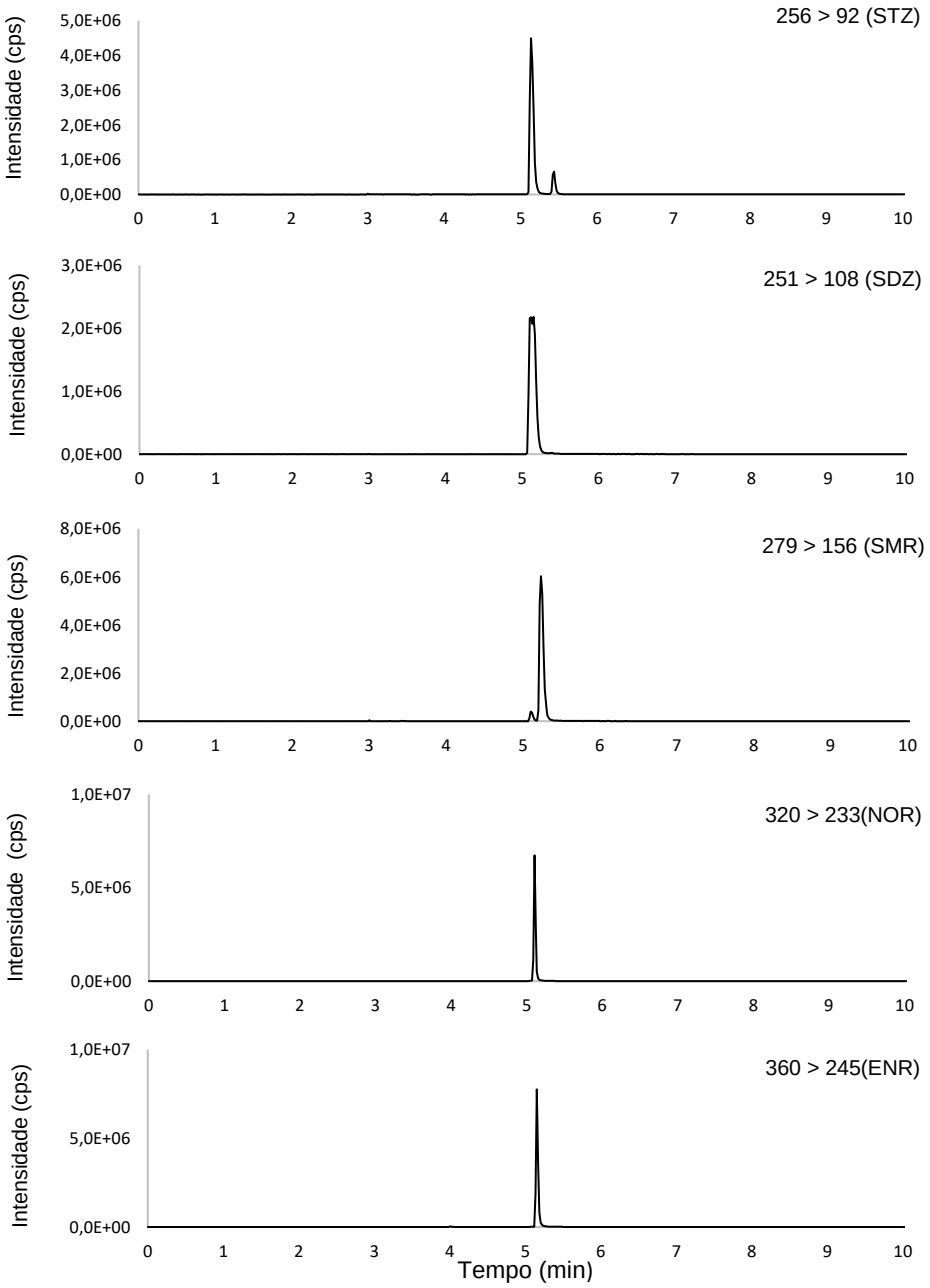
Figura 2.10 – Cromatograma representativo obtido por HPLC-UV para a extração dos antimicrobianos alvo (100 µg mL^{-1}) em esgoto simulado por DI-SDME no modo dinâmico.



3.4 Figuras de mérito para avaliação do desempenho do método

Após o desenvolvimento e otimização do método de extração por DI-SDME dinâmico, algumas figuras de mérito importantes e constantes de qualquer protocolo de validação analítica foram avaliadas em um sistema online-SPE-LC-MS/MS. Para avaliar a seletividade do método, uma amostra branco foi submetida ao processo de extração onde foi confirmada a ausência de interferentes que eluissem no mesmo tempo de retenção dos analitos. A Figura 2.11 mostra um cromatograma representativo da matriz branco fortificada com os antimicrobianos em estudo.

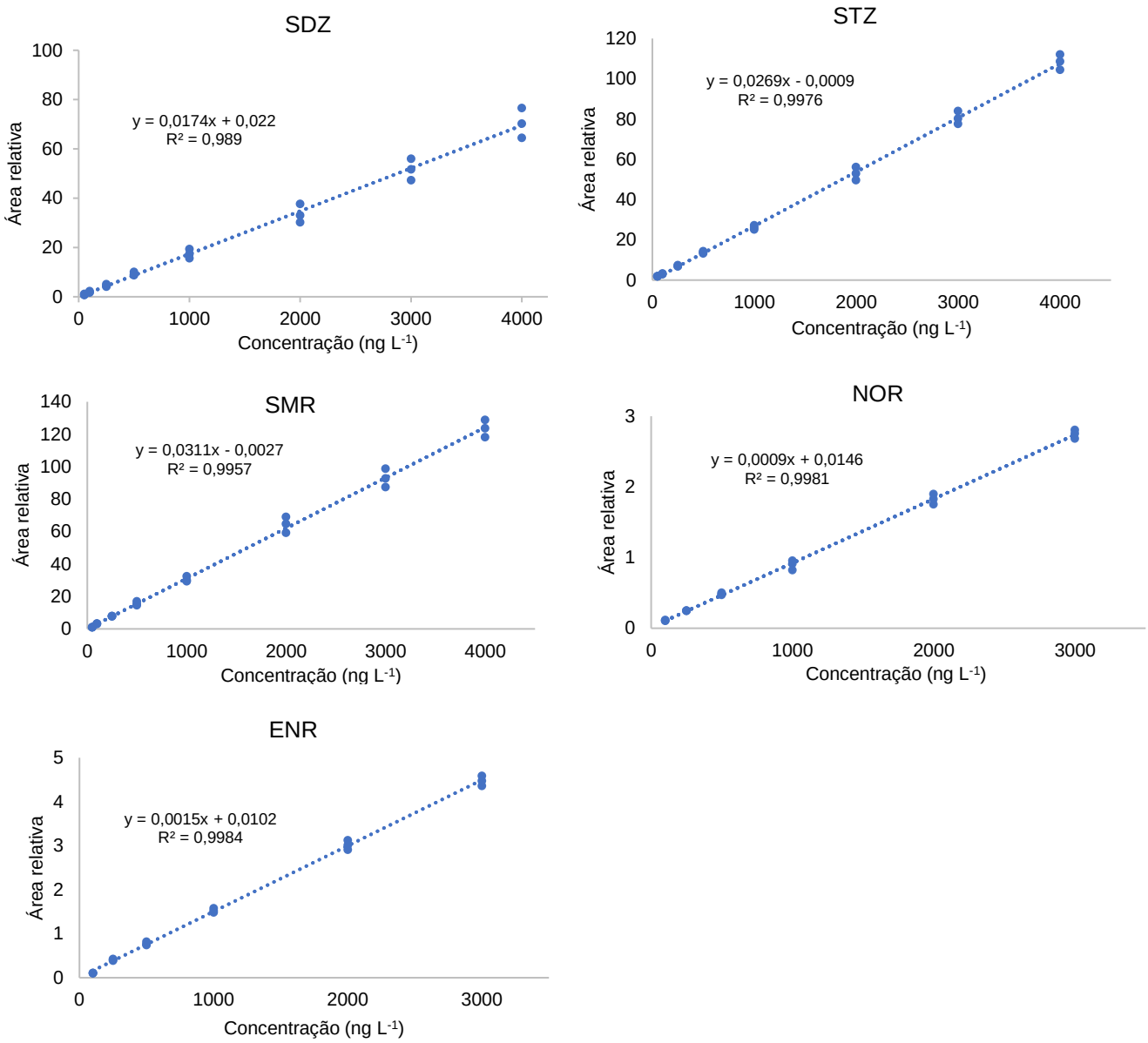
Figura 2.11 – Cromatogramas representativos após a extração por SDME de uma amostra branco seguida da fortificação com os antimicrobianos estudados.



A linearidade e a faixa de trabalho do método DI-SDME para a determinação de SAs em amostras de águas superficiais foram avaliadas entre 50 e 4.000 ng L^{-1} e, no caso das fluoroquinolonas, entre 100 e 3.000 ng L^{-1}. Os coeficientes de correlação (r^2) variaram entre 0,989 e 0,998, o que demonstra uma boa correlação entre a

concentração dos analitos e a resposta analítica. As curvas analíticas e as equações que descrevem a relação entre a concentração e o sinal analítico são apresentadas na Figura 2.12. O método apresentou um LOD de 15 ng L^{-1} e um LOQ de 50 ng L^{-1} para as sulfonamidas e, um LOD de 35 ng L^{-1} e um LOQ de 100 ng L^{-1} para as fluoroquinolonas.

Figura 2.12 – Curvas analíticas para as SAs e FQs estudadas.



A Tabela 2.5 mostra os resultados dos estudos de precisão intra e interdias os quais foram expressos em desvio padrão relativo (%DPR). Esses estudos foram feitos no nível baixo, médio e alto da curva de analítica. Para as SAs os níveis baixo, médio e alto foram 80, 1500 e 3500 ng L^{-1}, respectivamente. No caso das FQs os níveis baixo, médio e alto foram 150, 750 e 2500 ng L^{-1}, respectivamente. O método apresentou uma precisão satisfatória, a qual variou entre 2,31 e 12,58%. Foram considerados como aceitos valores menores que 20% para o nível baixo e valores menores do que 15% para os níveis médio e alto.

Tabela 2.5 – Resultados dos estudos de precisão intra e interdias para os três níveis de concentração avaliados.

Analito	**Níveis** (ng L^{-1})	**Precisão Intradia 1 DPR (%)**	**Precisão Intradia 2 DPR (%)**	**Precisão Interdia DPR (%)**
SDZ	80	7,64	12,6	9,32
	1500	3,49	10,5	7,39
	3500	10,6	9,12	7,44
STZ	80	4,38	10,7	8,11
	1500	2,31	3,49	3,05
	3500	7,38	12,6	10,1
SMR	80	4,48	8,89	6,72
	1500	1,71	5,33	4,70
	3500	5,09	2,83	5,52
NOR	150	4,33	5,37	5,56
	750	4,89	6,89	6,37
	2500	12,6	12,0	11,3
ENR	150	3,99	5,44	4,84
	750	6,43	7,15	6,82
	2500	4,35	9,35	6,83

A exatidão do método foi avaliada nos mesmos níveis de concentração avaliados na precisão. A exatidão foi satisfatória e os seus resultados foram expressos em porcentagem de desvio. Os valores considerados como aceitos foram também menores que 20% para o nível baixo e menores que 15% para os níveis médio e alto. Os resultados para os experimentos de exatidão intra e interdias encontram-se resumidos na tabela 2.6.

Tabela 2.6 - Resultados dos estudos de exatidão intra e interdias para os três níveis de concentração avaliados.

Analito	**Níveis** (ng L^{-1})	**Exatidão Intradia 1 (%)**	**Exatidão Intradia 2 (%)**	**Exatidão Interdia (%)**
SDZ	80	7,32	5,35	6,34
	1500	3,45	1,03	6,41
	3500	1,35	11,5	2,29
STZ	80	9,29	1,76	5,52
	1500	13,2	10,7	11,9
	3500	6,36	1,84	2,26
SMR	80	10,8	5,71	8,24
	1500	0,93	6,55	3,74
	3500	0,44	7,52	3,98
NOR	150	4,04	2,83	0,60
	750	4,28	1,96	1,16
	2500	2,98	1,55	0,71
ENR	150	13,8	17,7	15,7
	750	8,77	2,70	5,73
	2500	10,0	2,23	3,78

Finalmente, foram calculados o fator de enriquecimento (EF) e a recuperação da extração (ER) (Tabela 2.7). Para a determinação dos fatores de enriquecimento foram calculados a razão entre a concentração do analito na gota após o processo de extração e a concentração do analito na amostra ($EF = C_{gota}/C_{amostra}$). A concentração na gota foi avaliada com uma curva analítica feita pela injeção direta dos padrões em diclorometano/acetato de etila (50:50 em volume). A recuperação da extração foi obtida pelo produto da EF e da razão de fases ($V_{gota}/V_{amostra}$) vezes 100, conforme a equação 4.

$$ER = \left(\frac{n_{gota}}{n_{amostra}}\right) x100 = \left(\frac{C_{gota}}{C_{amostra}} \frac{V_{gota}}{V_{amostra}}\right) x100 \quad (4)$$

Tabela 2.7 – Resultados dos estudos de fator de enriquecimento e recuperação da extração.

Analitos	EF	ER (%)
SDZ	15,8	23,7
STZ	17,6	26,4
SMZ	12,0	18,0
NOR	10,5	15,8
ENR	9,00	13,5

3.5 Aplicação do método desenvolvido

Como prova do conceito, o método desenvolvido foi aplicado na determinação das SAs e FQs alvo em amostras de águas superficiais na cidade de São Carlos – SP, Brasil. As amostras foram coletadas em três pontos diferentes os quais estão marcados na figura 2.13. Entre os antibióticos avaliados neste estudo, apenas norfloxacina foi detectada em dois dos três pontos examinados: ponto 1 (239 ng L^{-1}) e ponto 3 (310 ng L^{-1}).

Adicionalmente, a porcentagem de recuperação foi avaliada para essas matrizes e os resultados encontram-se na Tabela 2.8. Os valores de recuperação variaram entre 76,8 e 57,2%. Esses valores têm sido considerados aceitáveis em microtécnicas de extração líquido-líquido de acordo com Rasmussen e Pedersen-Bjergaard, uma vez que valores de recuperação acima de 80% são incomuns nesse tipo de microtécnicas. (23)

Figura 2.13 – Localização dos pontos de coleta de água (1, 2 e 3) para a determinação de SAs e FQs na cidade de São Carlos-SP.

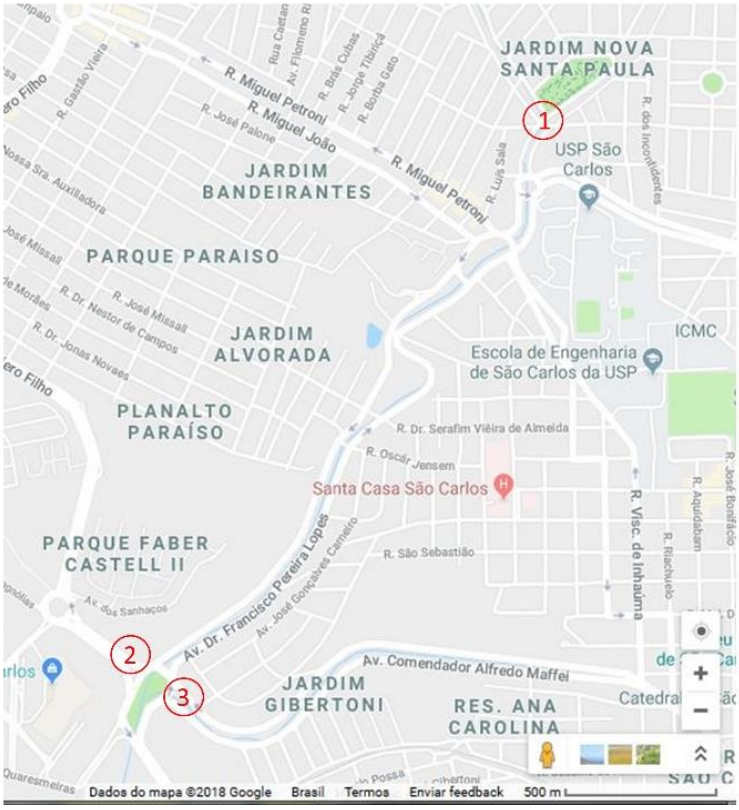


Tabela 2.8 – Valores de recuperação para as SAs e FQs alvo em amostras de águas superficiais.

Analitos	Águas superficiais		
	Teórico (µg L^{-1})	Encontrado (µg L^{-1})	Recuperação (%)
SDZ	25	18,0	72,0
STZ	25	19,2	76,8
SMZ	25	16,7	66,8
NOR	25	15,5	62,0
ENR	25	14,3	57,2

4. Conclusões

O efeito de gotas de grande porte e o modo de extração (dinâmico e estático) foi avaliado de forma abrangente no desempenho da SDME. Para este propósito, desenvolvemos um procedimento de extração por SDME automatizado, assistido por um robô cartesiano associado a um dispositivo de extração capaz de estabilizar grandes gotas de solvente. O aumento do volume da gota e do volume total do solvente (carregado na seringa) agiu sinergicamente com o modo dinâmico para aumentar a eficiência da extração de todos os analitos avaliados. O modo dinâmico interagiu positivamente com o tempo de extração e também levou a maiores eficiências de extração. Por outro lado, o modo estático não mostrou essa interação, especialmente para compostos com um coeficiente de partição menor. Em relação à eficiência de extração, foi demostrado a vantagem de se utilizar um volume total maior que o próprio volume da gota, uma vez que o procedimento dinâmico resultou na renovação gradual do solvente exposto à amostra.

A assistência do robô permitiu modular com precisão (i) o número de ciclos e (ii) a duração da exposição da gota na amostra, com a vantagem adicional de compensar o encolhimento da gota com o tempo. Finalmente, uma superfície de reposta revelou a interação dos dois últimos parâmetros (número e duração dos ciclos), permitindo selecionar uma condição ótima de análise sob um período de tempo viável. O uso de ferramentas robóticas de código aberto e a fabricação do dispositivo

de extração possibilitaram a melhoria do desempenho analítico em SDME por meio de uma abordagem inovadora que associa gotas grandes e renováveis mediante ciclos de exposição. Após a comprovação deste conceito, o método foi aplicado com precisão, exatidão, seletividade e sensibilidade apropriadas para a análise de sulfonamidas e fluoroquinolonas em amostras de águas superficiais.

Referências

1 TORRES, P. Desempenho de um reator de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintetico simulando esgoto sanitario sob diferentes condições de operação. **Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos**, 1992.

2 ČABALA, R.; BURSOVÁ, M. Bell-shaped extraction device assisted liquid-liquid microextraction technique and its optimization using response-surface methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1230, p. 24–29, 2012.

3 MEDINA, D. A. V.; CABAL, L. F. R.; LANÇAS, F. M.; SANTOS-NETO, Á. J. Sample treatment platform for automated integration of microextraction techniques and liquid chromatography analysis. **HardwareX**, v. 6, p. 1–16, 2019.

4 LIMA GOMES, P. C. F.; TOMITA, I. N.; SANTOS-NETO, Á. J.; ZAIAT, M. Rapid determination of 12 antibiotics and caffeine in sewage and bioreactor effluent by online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 29, p. 8787–8801, 2015.

5 HOU, L.; LEE, H. K. Application of static and dynamic liquid-phase microextraction in the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Chromatography A**, v. 976, n. 1–2, p. 377–385, 2002.

6 YE, C.; ZHOU, Q.; WANG, X. Improved single-drop microextraction for high sensitive analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, n. 1, p. 7–13, 2007.

7 PEIXOTO, P. S.; TÓTH, I. V.; SEGUNDO, M. A.; LIMA, J. L. F. C. Fluoroquinolones and sulfonamides: features of their determination in water. A review. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 96, n. 2, p. 185–202, 2016.

8 KIPPER, K.; LILLENBERG, M.; HERODES, K.; NEI, L.; HAIBA, E. Simultaneous Determination of Fluoroquinolones and Sulfonamides Originating from Sewage Sludge Compost. **Scientific World Journal**, v. 2017, p. 20–26, 2017.

9 GAO, W.; CHEN, G.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; YIN, Y.; HU, Z. Application of single drop liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fluoroquinolones in human urine by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 3–4, p. 291–295, 2011.

10 SPRINGER, V. H.; LISTA, A. G. In-line coupled single drop liquid–liquid–liquid microextraction with capillary electrophoresis for determining fluoroquinolones in water samples. **Electrophoresis**, v. 36, n. 14, p. 1572–1579, 2015.

11 JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 235–239, 1997.

12 MARCINKOWSKI, Ł.; PENA-PEREIRA, F.; KLOSKOWSKI, A.; NAMIEŚNIK, J. Opportunities and shortcomings of ionic liquids in single-drop microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 72, p. 153–168, 2018.

13 MAJORS, R. E. Salting-out Liquid-Liquid Extraction (SALLE). **LCGC**, v. 27, n. 7, p. 526–533, 2009.

14 MAJORS, R. E. Practical Aspects of Solvent Extraction. **Lc Gc Europe**, v. 22, n. 3, p. 143–147, 2009.

15 PROSEN, H. Applications of liquid-phase microextraction in the sample preparation of environmental solid samples. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6776–6808, 2014.

16 COBZAC, S. C.; GOCAN, S. Sample Preparation for High Performance Liquid Chromatography: Recent Progress. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 34, n. 13, p. 1157–1267, 2011.

17 SONG, A.; YANG, J. Efficient determination of amphetamine and methylamphetamine in human urine using electro-enhanced single-drop microextraction with in-drop derivatization and gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, 2018.

18 CARVAJAL, D.; LAPRADE, E. J.; HENDERSON, K. J.; SHULL, K. R. Mechanics of pendant drops and axisymmetric membranes. **Soft Matter**, v. 7, n. 22, p. 10508–10519, 2011.

19 ŠRÁMKOVÁ, I. H.; HORSTKOTTE, B.; FIKAROVÁ, K.; SKLENÁŘOVÁ, H.; SOLICH, P. Direct-immersion single-drop microextraction and in-drop stirring microextraction for the determination of nanomolar concentrations of lead using automated Lab-In-Syringe technique. **Talanta**, v. 184, n. January, p. 162–172, 2018.

20 OUYANG, G.; ZHAO, W.; PAWLISZYN, J. Automation and optimization of liquid-phase microextraction by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1138, n. 1–2, p. 47–54, 2007.

21 ALEXOVIČ, M.; HORSTKOTTE, B.; SOLICH, P.; SABO, J. Automation of static and dynamic non-dispersive liquid phase microextraction. Part 2: Approaches based on impregnated membranes and porous supports. **Analytica Chimica Acta**, v. 907, p. 18–30, 2016.

22 JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 13, p. 2236–2240, 1996.

23 PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1–2, p. 132–142, 2008.

Capítulo 3

Microextração por fibra oca on-line assistida por robô cartesiano

1. Objetivos

Desenvolver métodos de preparo de amostra automatizados baseados em HF-LPME hifenados com cromatografia líquida de alta eficiência. Para isso foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Configurar um robô cartesiano para realizar procedimentos de preparo de amostra baseados em HF-LPME.

- Acoplar ao robô cartesiano uma válvula de três vias que permitisse o acoplamento/hifenação do preparo de amostra por HF-LPME com o equipamento de cromatografia líquida (HPLC) com detecção por fluorescência.

- Configurar o robô cartesiano para que uma vez concluído o preparo de amostra fosse possível dar início à corrida cromatográfica automaticamente.

- Otimizar as variáveis que pudessem afetar a extração de MDMA, MDA e MDEA por HF-LPME em urina.

- Validar o método desenvolvido, avaliando-se parâmetros como seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação.

- Aplicar o método desenvolvido em amostras de urina cedidas pelo Laboratório de Toxicologia Analítica de Campinas (LTA-CIATox de Campinas).

2. Materiais e métodos

2.1 Padrões e reagentes

Foram utilizadas soluções-padrão de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) e 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA), todas na concentração de 1 mg mL^{-1} dissolvidas em metanol, cujos padrões foram adquiridos da Cerilliant (Round Rock, TX, USA).

Como solventes extratores foram testados 1-octanol, 1-nonanol e 1-decanol todos grau de análise cromatográfica, adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para ajustar o pH da amostra (urina) foi empregado NaOH adquirido da Mallinckrodt Chemicals (Xalostoc, Edo de Mex, México).

Para as extrações por HF-LPME foram empregadas fibras de polipropileno (Accurel® PP Q3/PP2) com tamanho nominal de poro de 0,2 µm, 70% de porosidade, até 20 centímetros de comprimento, diâmetro interno de 535 µm e uma espessura de 200 µm.

2.2 Instrumentação e condições analíticas

No acoplamento on-line da HF-LPME com a cromatografia líquida de alta eficiência foi empregado um robô cartesiano construído no Grupo de Cromatografia (CROMA) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC) o qual foi descrito recentemente por Medina e colaboradores. (1) Também, foi empregado um HPLC série Prominence 20A da Shimadzu (Kyoto-Japão). O robô cartesiano foi equipado com uma válvula solenóide de três vias da NResearch Inc. conectada à parte inferior de uma microsseringa *gastight* 1750 (Hamilton, EUA) de 100 µL através de uma porca dupla de PTFE construída no laboratório (Figura 3.1). Para controlar a válvula e dar início à corrida cromatográfica, foram empregados dois relês de 10 A (Songle ®) (Figura 3.2).

Figura 3.1 – Fotografia do acoplamento da microsseringa com a válvula solenóide de três vias.

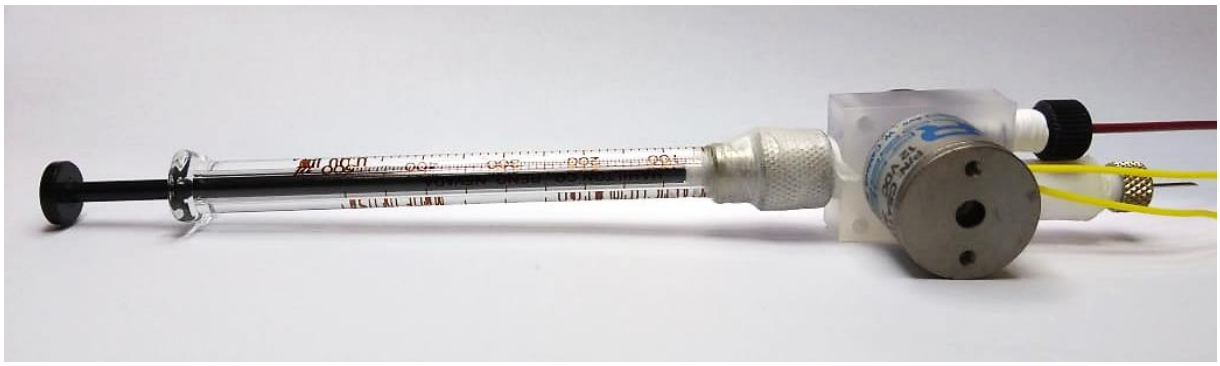


Figura 3.2 - Foto dos módulos de relê usados para o controle da válvula e o início da corrida cromatográfica.

O HPLC usado era composto por duas bombas LC-20AD, um desgaseificador DGU-20AS, um amostrador automático SIL-20AC, um forno cromatográfico CTO-20A, um detector de fluorescência RF-10A XL, um modulo de comunicação CBM-20A e uma válvula seletora de seis portas e duas posições. Os analitos foram separados em uma coluna analítica Kinetex XB-C18 (100 mm x 2,1 mm; 2,6) da Phenomenex; água ultrapura (A) e metanol (B) foram escolhidos como fase móvel. Uma eluição isocrática com 6% de metanol foi programada durante 9 minutos. De 9 a 13 minutos a concentração de metanol foi incrementada linearmente até 60%. De 13 a 14,5 minutos a concentração de metanol foi incrementada linearmente até 100% e se manteve em

100% por dois minutos, finalmente, o gradiente retornou à condição inicial em 30 segundos e se manteve assim ao longo de 4 min. A temperatura do forno foi mantida em 42°C e a vazão em 0,3 mL min^{-1}.

2.3 Otimização univariada do procedimento de extração

Após o acoplamento da válvula solenóide de três vias no robô cartesiano e dos relês que permitem o giro da válvula e o início da operação do HPLC, foram avaliados de forma univariada: o efeito do solvente de extração, o efeito da velocidade de agitação e o efeito da adição de sal. Os solventes de extração testados foram 1-octanol, 1-nonanol e 1-dodecanol; o efeito da velocidade de agitação foi avaliado em 0, 750 e 1000 rpm; para avaliar o efeito da adição de sal, foi adicionado NaCl na urina em três quantidades diferentes: 0, 25 e 50% (m/v).

2.4 Otimização multivariada do volume de solvente e do tempo de extração

A fim de garantir a melhor resposta analítica possível, o volume de solvente extrator e o tempo de extração foram otimizados com ajuda de um planejamento composto central. Os experimentos foram realizados na região experimental entre 50 ($-\sqrt{2}$) e 100 ($+\sqrt{2}$) microlitros de solvente extrator e 5 ($-\sqrt{2}$) e 20 ($+\sqrt{2}$) minutos de extração, com triplicata no ponto central. Os experimentos foram realizados de maneira aleatória e estão descritos na Tabela 3.1. Para o processamento dos dados foi empregado o *software* STATISTICA 10 (StatSoftInc, Tulsa, EUA, 2011).

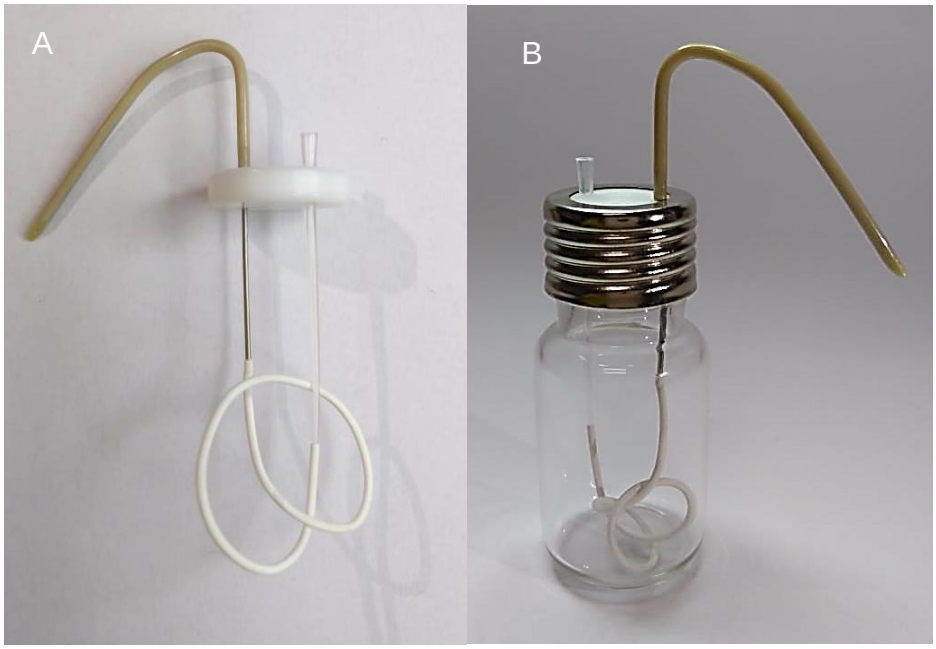
Tabela 3.1 – Planejamento experimental para a otimização do volume do solvente extrator e o tempo de extração.

Experimento	Volume (µL)		Tempo (min)	
	Normal	Real	Normal	Real
1	-1	57.4	-1	7.2
2	1	92.6	-1	7.2
3	-1	57.4	1	17.8
4	1	92.6	1	17.8
5	0	75	0	12.5
6	0	75	0	12.5
7	0	75	0	12.5
8	-1.41	50	0	12.5
9	0	75	-1.41	5
10	1.41	100	0	12.5
11	0	75	1.41	20

2.5 Procedimento de extração por HF-LPME

Inicialmente, a fibra foi cortada em pedaços de 10 cm e inserida no formato de nó como mostrado na Figura 3.3A. Para fixar a fibra no frasco de amostra foi construído um disco em politetrafluoroetileno (PTFE) de 20 mm de diâmetro externo e 1 mm de espessura. No disco, foi fixado um tubo de aço inox e, uma ponteira de micropipeta (5 a 200 µL) foi adaptada para conectar a ponta da microsseringa com a fibra de extração (Figura 3.3A). O disco encaixa-se entre a tampa e a borda do frasco da amostra o que deixa a fibra “flutuando” no interior do frasco (Figura 3.3B).

Figura 3.3 – Montagem experimental da fibra e o frasco de amostra para a extração por HF-LPME automatizada.



Para o preparo de amostra por HF-LPME, 8 mL de urina, 500 µL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 2 M e um agitador magnético (1 cm de comprimento) foram transferidos ao reservatório da amostra. Posteriormente, o robô, que estava equipado com uma microsseringa *gastight* 1750 (Hamilton, EUA) de 100 µL, encheu a seringa com o solvente de extração e o acoplamento entre a agulha da microsseringa e a ponteira da micropipeta adaptada foi feito manualmente.

Com o sistema acoplado (Figura 3.4), o robô movimentava o êmbolo da seringa para preencher a fibra com o solvente de extração. Assim, o solvente é exposto na amostra pelo tempo determinado e, uma vez que o tempo termina, o extrato é recolhido para o interior da microsseringa. Em seguida, o relê que controla a válvula solenóide é acionado e a válvula muda de posição; após essa etapa, o êmbolo da seringa desce e o extrato é direcionado para o sistema cromatográfico, onde preenche uma alça de amostragem de 2 µL que se encontra conectada na válvula de seis portas. Finalmente, o robô aciona o segundo relê e a corrida cromatográfica é iniciada. No início da corrida cromatográfica a fase móvel passa pela alça de amostragem direcionando o extrato para a coluna analítica onde os analitos são separados e finalmente detectados. Na Figura 3.5 é apresentado um esquema ilustrativo do preparo de amostra por HF-LPME automatizado.

Figura 3.4 – Robô cartesiano configurado para o preparo de amostra por HF-LPME.

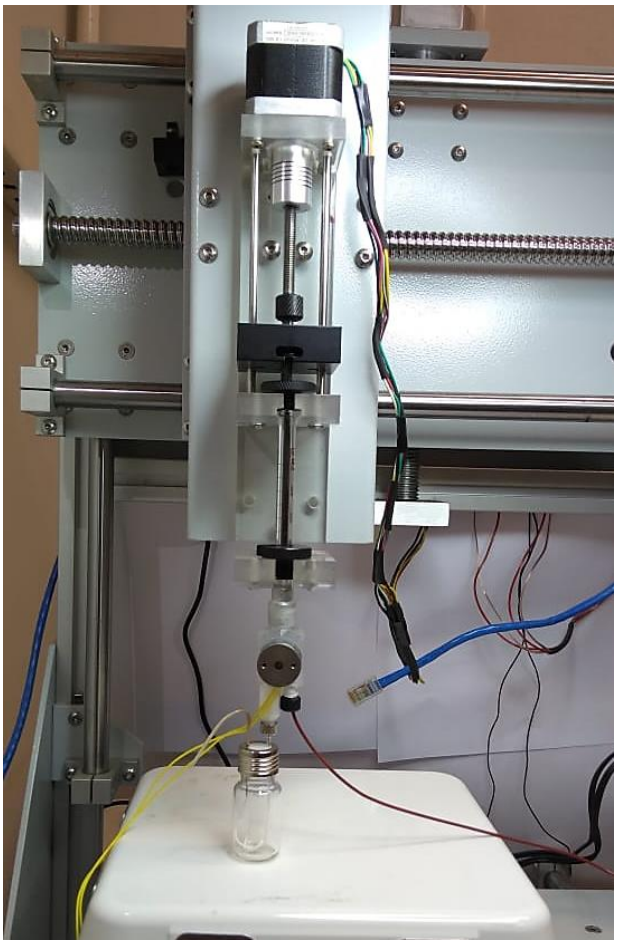
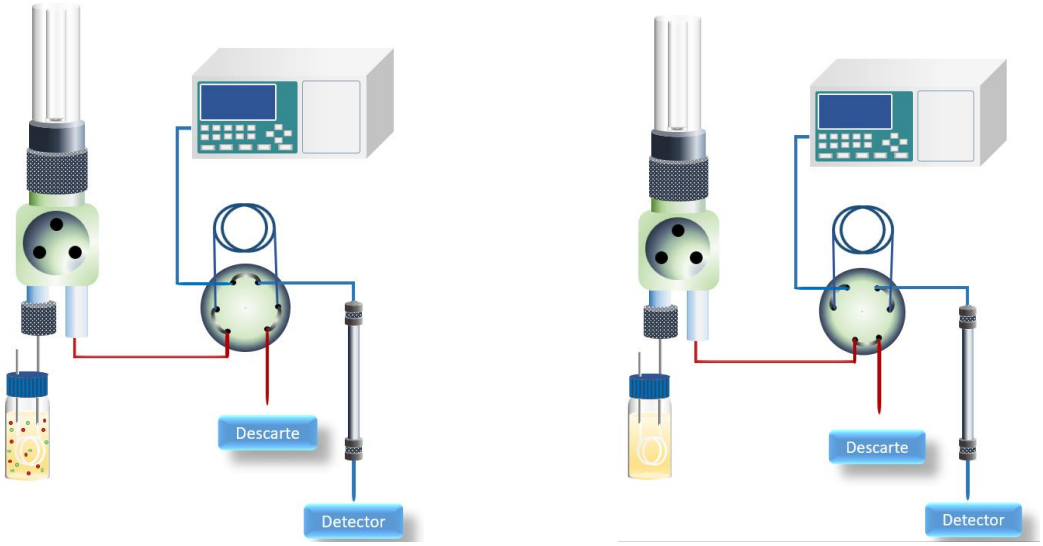


Figura 3.5 - Esquema ilustrativo do procedimento de extração por HF-LPME automatizada.



2.6 Avaliação das figuras de mérito

A avaliação das figuras de mérito foi feita seguindo-se o guia de validação do "*Scientific Working Group for Forensic Toxicology*" (SWGTOX). Os parâmetros escolhidos para avaliação foram: seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão (intra e interdias), exatidão (intra e interdias) e integridade da diluição. Durante a avaliação das figuras de mérito foi utilizada como amostra-branco uma mistura de 50 mL de urina de dez pessoas diferentes. (2)

Para a avaliação da seletividade a amostra branco foi submetida ao processo de extração por HF-LPME e posterior análise por HPLC, com o intuito de observar a presença de interferentes co-eluindo no tempo de retenção dos analitos. O LOD foi estabelecido como a concentração dos analitos que produzisse um sinal 3 vezes superior ao ruído na região do respectivo pico cromatográfico.

Para a avaliação da linearidade, a amostra-branco foi fortificada em seis níveis de concentração (30, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg L^{-1}), sendo cada nível extraído e analisado em quintuplicata no sistema HF-LPME on-line proposto. Para a escolha do melhor modelo matemático que descrevesse a relação sinal analítico-concentração foram avaliados os modelos de calibração ponderada sugeridos por Kiser e Dolan e, também por Almeida e colaboradores. A escolha do melhor modelo foi baseada na somatória dos resíduos absolutos, na avaliação visual do gráfico de resíduos e no valor do coeficiente de determinação (R^2). (3,4)

Para o cálculo da precisão (intra e interdias) e da exatidão (intra e interdias) a matriz branco foi fortificada em 3 níveis de concentração (90, 200 e 800 µg L^{-1}) as quais foram analisadas em quintuplicata e em dois dias diferentes; os dados de precisão foram expressos em termos de termos de desvio padrão relativo (%DPR).

Para a análise da integridade da diluição uma amostra-branco foi fortificada em 4000 µg L^{-1} e diluída 750 µg L^{-1}; a amostra diluída foi analisada em quintuplicata e calculada a precisão e a exatidão do método.

2.7 Amostras

Duas amostras fornecidas pelo laboratório LTA-CIATox de Campinas, da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp foram analisadas. As amostras foram congeladas durante aproximadamente seis meses (tempo do desenvolvimento do método) e analisadas em triplicata da mesma maneira que as amostras-branco fortificadas.

3. Resultados e discussão

3.1 Acoplamento do robô cartesiano com o HPLC

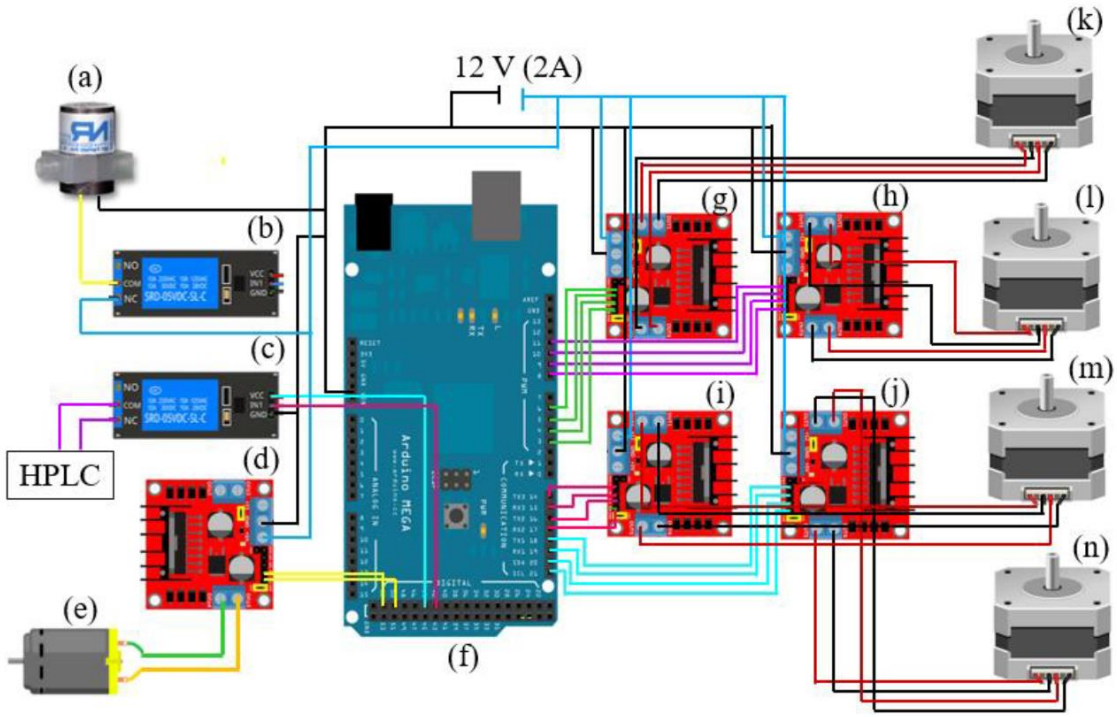
Geralmente, a extração por HF-LPME é feita manualmente e seguindo as seguintes etapas: (i) imobilização do solvente orgânico nos poros da fibra; (ii) imersão da fibra na amostra; (iii) transferência do extrato para o interior da seringa; (iv) transferência do extrato para o vial de injeção; e (v) injeção da amostra. Contudo, a execução manual de técnicas miniaturizadas de preparo de amostra além de resultar em métodos bastante trabalhosos, pode gerar também baixa reprodutibilidade, baixa confiabilidade e baixa frequência analítica. (5,6,7)

No entanto, até a década passada, automatizar e hifenar as técnicas de preparo de amostra com as técnicas de análise requeria equipamentos de alto custo e conhecimentos especializados. Assim, este tipo de desenvolvimento analítico estava restrito a grandes companhias e/ou laboratórios com a capacidade de financiar esse tipo de pesquisas. (8,9)

Na atualidade, a automatização das técnicas de preparo de amostra e a sua hifenação com as técnicas de análise tornou-se possível empregando-se diversas estratégias analíticas, destacando-se aquelas executadas com ferramentas de robótica *open source*. Essas ferramentas estão permitindo automatizar métodos analíticos de uma maneira simples e econômica, só com conhecimentos básicos de eletrônica e robótica. (1,10,11,12)

Sendo assim, para automatizar e hifenar o preparo de amostra por HF-LPME com a cromatografia líquida de alta eficiência foi instalado no robô cartesiano uma válvula solenóide de três vias e dois relês. A válvula solenóide permite direcionar o solvente de extração (depois de realizada) para o sistema cromatográfico. Por sua vez, os relês são dispositivos eletromagnéticos que quando estimulados por uma corrente elétrica permitem abrir ou fechar um circuito, permitindo, assim, o acionamento da válvula solenóide e também o início da corrida cromatográfica. Para o início da corrida cromatográfica, um dos relês foi ligado ao sistema de injeção manual da amostra no HPLC de maneira que ao acionar o relê é possível simular o sistema de injeção manual do HPLC e dar início à corrida cromatográfica. A Figura 3.6 apresenta um esquema ilustrativo da configuração eletrônica empregada para automatizar a análise e o preparo de amostra por HF-LPME. (13)

Figura 3.6 – Esquema representativo da configuração eletrônica para o acoplamento entre o robô cartesiano e o HPLC. (a) Válvula Solenóide; (b-c) Relês; (d, g-j) Pontes H L298N; (e) Motor DC; (k-n) Motores de passo. (13)



Autoria: Vargas, D. 2018.

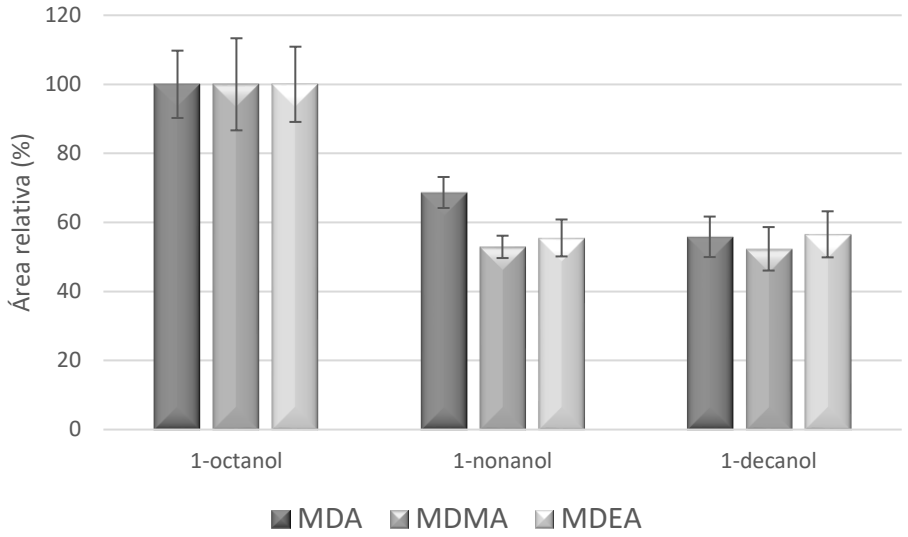
3.2 Otimização univariada do procedimento de extração

3.2.1 Efeito do solvente de extração

Dentre os parâmetros a serem otimizados em HF-LPME, o solvente de extração é determinante na eficiência da extração. No caso da configuração binária, o solvente de extração fica dentro do lúmen da fibra e nos poros da mesma. Sendo assim, um solvente adequado para a extração de anfetaminas em urina deve ser insolúvel e, apresentar boa seletividade e alta eficiência de extração dos analitos. Neste estudo, o preparo de amostra por HF-LPME e as análises cromatográficas foram acopladas usando-se uma válvula solenóide de três vias, porém, o solvente de extração precisa também ser compatível com a cromatografia líquida. (14,15,16,17)

Para a extração de anfetaminas em urina foram testados 1-octanol, 1-nonanol e 1-dodecanol. A melhor eficiência de extração foi obtida com 1-octanol e, consequentemente, este foi usado como solvente extrator. A Figura 3.7 apresenta as áreas relativas de extração para cada analito com os três solventes testados. Nela é possível se observar que a eficiência de extração com 1-octanol é aproximadamente 40% maior do que com o 1-decanol para todos os analitos. Também é possível se observar que a eficiência de extração com 1-octanol é aproximadamente 40% superior para MDMA e MDEA e, aproximadamente 30% maior para MDA quando comparada com a eficiência de extração do 1-nonanol.

Figura 3.7 – Efeito do solvente extrator sobre a eficiência de extração por HF-LPME de anfetaminas em amostras de urina.



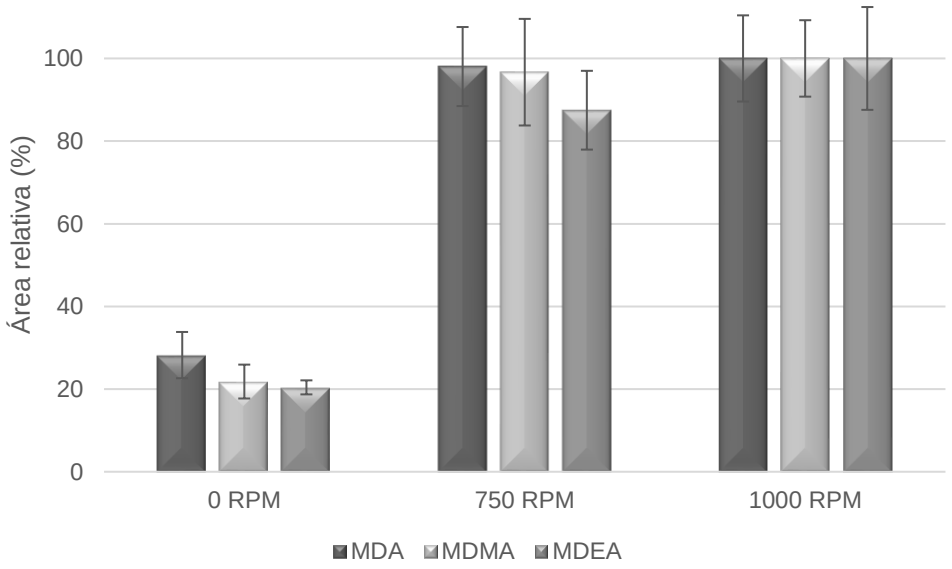
3.2.2 Efeito da velocidade de agitação da amostra na eficiência da extração por HF-LPME de anfetaminas em amostras de urina

Em HF-LPME a superfície de contato entre a amostra e o solvente extrator está limitada pela presença da fibra, isto é, a área de contato entre as duas soluções é apenas a somatória das áreas dos poros da fibra, resultando em uma superfície de contato relativamente pequena. Sendo assim, a agitação da amostra é um fator que permite não só o favorecimento da eficiência da extração, mas também a diminuição do tempo da extração. Por outro lado, a presença da fibra oca permite taxas de agitação mais vigorosas, e a renovação com maior eficiência da camada de amostra estagnada que fica ao redor da fibra, assegurando a exposição contínua de amostra "fresca" ao solvente de extração. No entanto, taxas de agitação muito elevadas podem gerar bolhas de ar que ficam aderidas na superfície da fibra e podem impedir a transferência de massa. (18,19)

Para a extração de MDA, MDEA e MDMA em urina foram avaliadas três velocidades de agitação: 0, 750 e 1000 rpm. Como apresentado na Figura 3.8 a eficiência da extração aumentou com o aumento da taxa de agitação. É possível se observar que quando a amostra é agitada a 1.000 rpm a eficiência de extração aumenta aproximadamente 80% para o MDMA e o MDEA e, aproximadamente 70%

para o MDA, quando comparado com a amostra sem agitação. Por outro lado, embora não existam diferenças significativas entre a eficiência de extração com 750 e 1.000 rpm as melhores áreas relativas foram obtidas com 1000 rpm. Consequentemente, essa foi a taxa de agitação selecionada para experimentos futuros.

Figura 3.8 – Efeito da velocidade de agitação da amostra por HF-LPME de anfetaminas em amostras de urina.

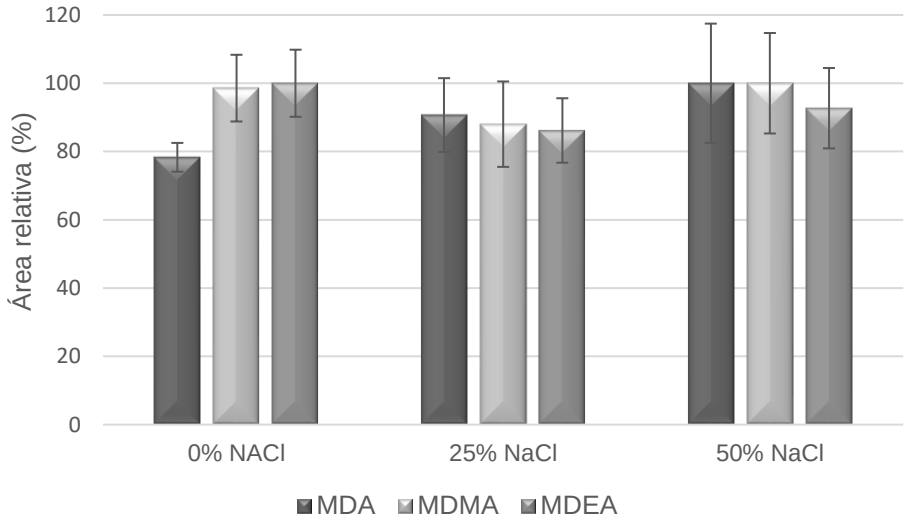


3.2.3 Efeito da adição de sal

A adição de NaCl em microextrações líquido-líquido pode gerar diferentes efeitos dependendo dos compostos-alvo e das características da amostra. Em alguns casos, a adição de sal em HF-LPME tem causado melhoras na eficiência de extração, devido ao fato de que a força iônica da amostra aumenta e, consequentemente, decresce a solubilidade dos analitos na fase aquosa e aumenta a sua partição na fase orgânica. Por outro lado, a adição de NaCl pode mudar as propriedades físicas do filme de difusão de Nernst, o que na maioria dos casos diminui a difusão dos analitos para o solvente de extração. Assim, dependendo do fator predominante, a adição de NaCl na amostra pode aumentar ou diminuir a eficiência da extração. (19)

Para se avaliar o efeito da adição de NaCl foram testadas três quantidades: 0, 25 e 50% (m/v). Como mostrado na Figura 3.9, a adição de sal não teve um impacto significativo na eficiência de extração para nenhum dos analitos, possivelmente, porque nenhum dos fatores antes mencionados foi predominante. Deste modo, os experimentos seguintes foram feitos sem a adição de sal.

Figura 3.9 - Efeito da adição de NaCl sobre a eficiência de extração de anfetaminas em urina por HF-LPME.



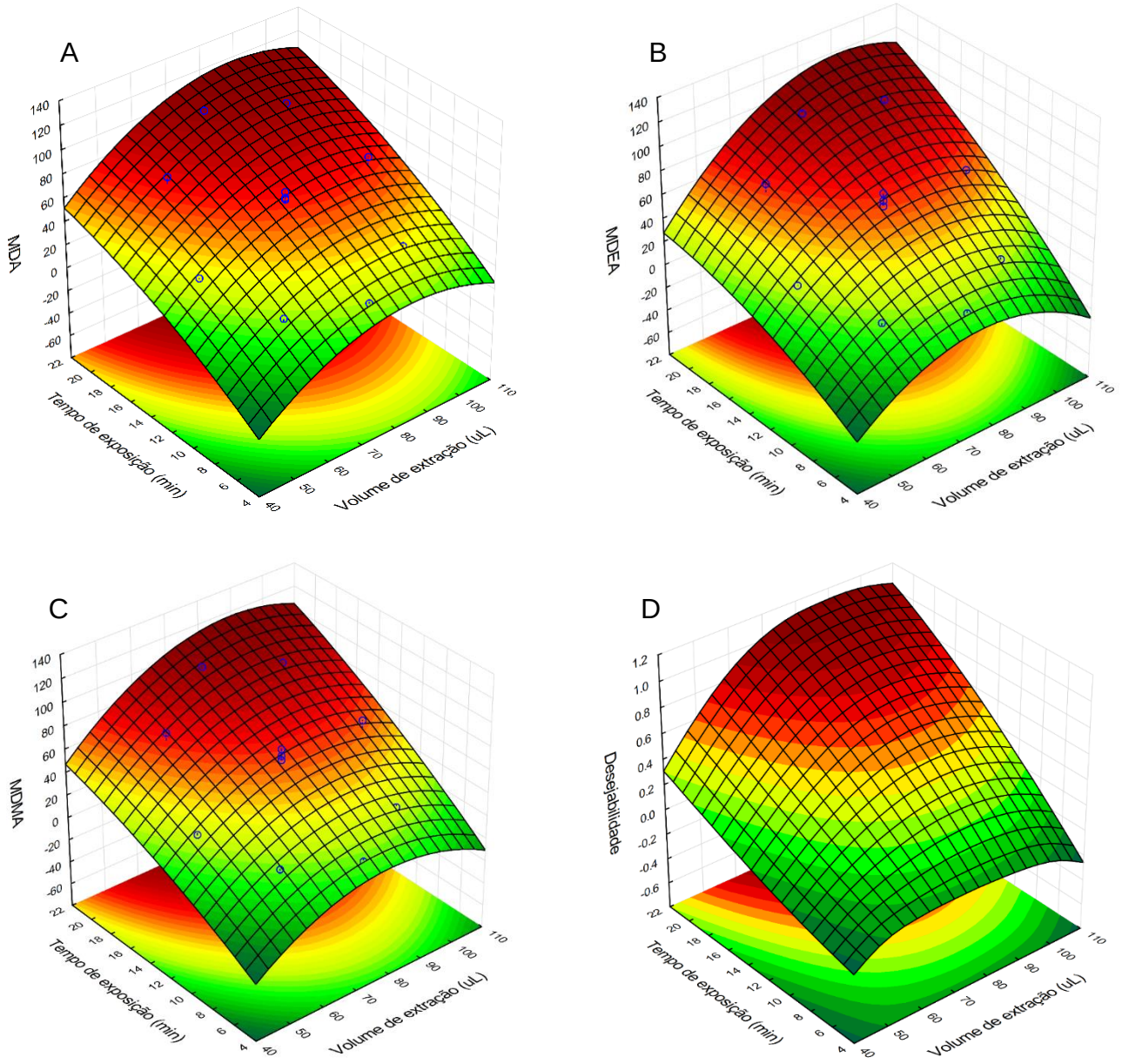
3.3 Otimização multivariada do tempo e do volume de extração

O tempo de extração e o volume de solvente extrator são fatores muito importantes em HF-LPME. Um tempo de extração muito curto pode não ser suficiente para alcançar os limites de detecção e quantificação desejados, por outo lado, tempos de extração muito longos podem ocasionar a perda do solvente e a formação de bolhas de ar que ao se depositar na fibra podem diminuir a eficiência da extração. Além disso, tempos de extração muito longos estão na contramão das técnicas de preparo de amostra modernas, as quais visam o desenvolvimento de métodos que permitam uma elevada frequência analítica. Neste estudo, procurou-se trabalhar com tempos de preparo de amostra compatíveis com a separação cromatográfica. Assim, enquanto o cromatógrafo líquido analisa uma amostra, o robô prepara a seguinte, conferindo-se ao método uma elevada frequência analítica. (20)

Geralmente, em microtécnicas de extração líquido-líquido aumentos no volume do solvente extrator incrementam a eficiência da extração. No entanto, volumes muito grandes podem causar a diluição do analito o que levaria à diminuição do fator de pré-concentração. Por outro lado, volumes muito baixos de solvente extrator podem resultar em baixos limites de detecção e quantificação, inviabilizando o método. Neste estudo, o volume e o tempo de extração foram otimizados com um planejamento composto central, no qual os experimentos realizados foram feitos de maneira aleatória e estão resumidos na Tabela 3.1.

Na Figura 3.10, são apresentadas as superfícies de resposta para o planejamento experimental realizado. Nelas é possível se observar que, na faixa experimental, o melhor sinal analítico é obtido com o maior volume de solvente extrator, ou seja 100 µL. Ao mesmo tempo as superfícies de resposta mostraram que 20 minutos é o tempo ótimo para a extração dos analitos. A função desejabilidade confirma que a condição ótima de extração é de 100 µL de solvente extrator e 20 minutos de extração. Porém, sendo que os analitos são separados cromatograficamente em 14 minutos, não é muito conveniente ter preparos de amostra com tempos superiores. Assim, o tempo de extração foi definido em 14 minutos e o volume de solvente extrator como 100 µL.

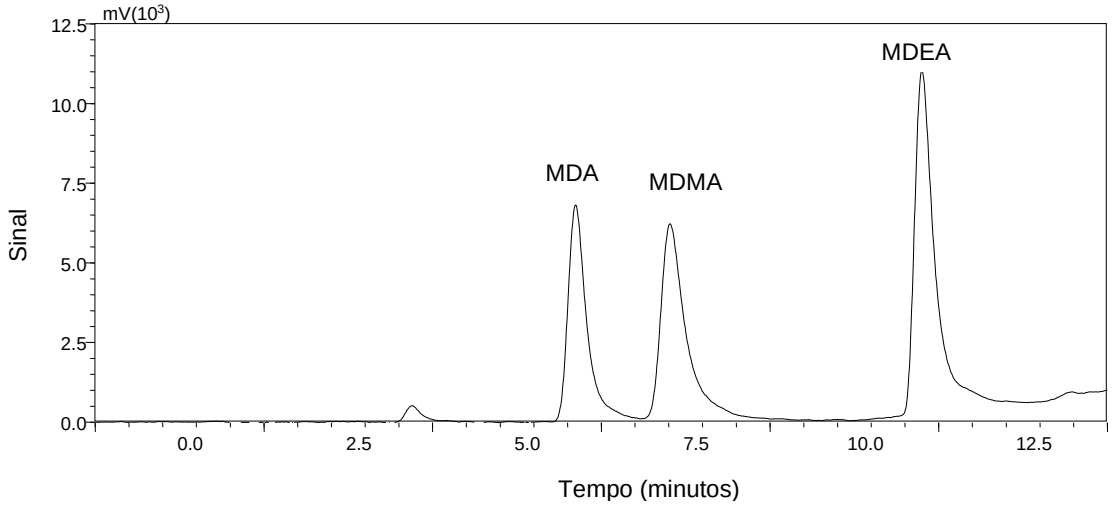
Figura 3.10 – Superfícies de resposta para experimentos de otimização do tempo de extração e o volume de extração. Analitos: (A) MDA; (B) MDEA; (C) MDMA; (D) função desejabilidade.



3.4 Figuras de mérito

Após o acoplamento do robô cartesiano com o sistema cromatográfico e a otimização do processo de extração, foram avaliadas algumas figuras de mérito comum de protocolos de validação analítica. A seletividade do método foi avaliada pela extração de uma amostra-branco a qual foi submetida ao processo de extração e onde se confirmou a ausência de interferentes co-eluindo no tempo de retenção dos analitos. Embora tenha sido observada a presença de um pico com um tempo de retenção de 3,3 minutos, isto não afetou a seletividade do método, pois o composto endógeno da urina apresenta um tempo de retenção diferente dos analitos. A Figura 3.11 mostra um cromatograma representativo da matriz utilizada como branco depois do procedimento de fortificação e extração com as anfetaminas estudadas, na concentração de 100 ng mL^{-1}.

Figura 3.11 - Cromatograma representativo obtido após a extração da amostra de urina utilizada como branco fortificada na concentração 100 ng mL^{-1}.



O método apresentou um LOD de 3 ng L^{-1} para o MDA e o MDMA e, de 2 ng mL^{-1} para o MDEA. A faixa linear do método foi avaliada entre 30 (LOQ) e 1000 ng mL^{-1}; essa faixa foi escolhida pois o "*cut off*" das anfetaminas em urina é de 200 ng mL^{-1}. O "*cut off*" é o nível de concentração definido para se determinar se uma amostra é considerada positiva ou negativa para a presença de um analito. (21)

Na avaliação da linearidade, observou-se que os resíduos para as curvas de calibração não ponderadas eram superiores a 20% para o MDA e o MDEA no primeiro nível de concentração (Tabela 3.2). Sendo assim, foram avaliados os modelos de calibração ponderada sugeridos por Almeida e colaboradores. Os modelos de calibração ponderada avaliados foram: $X^{-0,5}$, X^{-1}, X^{-2}, X^{-3}, $Y^{-0,5}$,Y^{-1}, Y^{-2} e Y^{-3}. A ponderação das curvas de calibração permitiu desenvolver equações matemáticas mais ajustadas, nas quais os resíduos que 20 e 15%, para os níveis baixo e alto, respectivamente (Figura 3.12). (3,4)

A Tabela 3.2 mostra os valores do coeficiente angular, o coeficiente linear, o coeficiente de determinação e a somatória de resíduos absolutos para cada ponderação. Para a escolha do melhor modelo (destacado em negrito na tabela 2), foi levado em conta o modelo com a menor somatória de resíduos e, o modelo no qual os resíduos estivessem abaixo de 20 e 15%, para os níveis baixos e alto, respectivamente.

Na Figura 3.12 são apresentados os gráficos de resíduos para o modelo sem ponderação e o modelo ponderado. É possível se observar que os modelos ponderados melhoram consideravelmente o valor dos resíduos para todos os analitos. Na Figura 3.13 são apresentadas as curvas analíticas para as anfetaminas analisadas, junto com as equações dos modelos ponderados escolhidos.

A precisão do método está apresentada na tabela 3.3 e é expressa em termos de desvio padrão relativo (%DPR). A precisão foi calculada em três níveis de concentração: baixo, médio e alto (90, 200 e 800 µg L^{-1}). O método apresentou valores de DPR entre 2,69 e 9,10%, os quais estão dentro dos parâmetros estabelecidos para análises toxicológicas.

A Tabela 3.4 mostra os valores de exatidão para o método desenvolvido. Segundo a SWGTOX, o valor máximo permitido para os experimentos de exatidão é de 20%; sendo assim, é possível concluir que o método apresenta exatidão adequada para análises toxicológicas. (2)

Tabela 3.2 – Valores do coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (R^2) e a somatória dos resíduos (∑%RE) para o modelo sem ponderação (1) e os modelos ponderados ($X^{-0,5}$, X^{-1}, X^{-2}, X^{-3}, $Y^{-0,5}$, Y^{-1}, Y^{-2}, Y^{-3}) sugeridos por Almeida e colaboradores. (4)

Composto	Peso (w)	a	b	R^2	∑%RE
	1	-6579,95	1844,33	0,995367	305,48
	$X^{-0,5}$	-15135,6	1865,201	0,9959	241,18
	X^{-1}	-19140,3	1883,378	0,9954	218,31
	X^{-2}	**-23525,6**	**1934,78**	**0,9862**	**197,12**
MDA	X^{-3}	-30203,8	2089,753	0,9570	242,31
	$Y^{-0,5}$	-16622	1865,34	0,9965	232,75
	Y^{-1}	-21415	1883,67	0,9954	205,55
	Y^{-2}	-26684	1944,34	0,9844	183,64
	Y^{-3}	-32674	2100,04	0,9526	244,04
	1	-24426,8	2256,79	0,9969	191,14
	$X^{-0,5}$	-28868,1	2268,09	0,9973	166,68
	X^{-1}	-30134,5	2274,53	0,9968	164,16
	X^{-2}	-30967,1	2284.29	0,9904	163,10
MDMA	X^{-3}	-34557,7	2367,62	0,9671	180,71
	$Y^{-0,5}$	-29673	2267,45	0,9974	164,58
	Y^{-1}	-31377	2272,75	0,9968	160,86
	Y^{-2}	**-33393**	**2288,48**	**0,9876**	**157,82**
	Y^{-3}	-37667	2393,49	0,9504	188,69
	1	-22822,6	2954.84	0,9983	209,41
	$X^{-0,5}$	-31505,5	2976,02	0,9983	169,14
	X^{-1}	-35568,6	2994,46	0,9978	152,43
	X^{-2}	-40048	3046,97	0,9912	146,60
MDEA	**X^{-3}**	**-47083**	**3210,22**	**0,9676**	**184,21**
	$Y^{-0,5}$	-33250	2977,58	0,9984	161,61
	Y^{-1}	-38256	2997,59	0,9978	146,09
	Y^{-2}	-44147	3066,56	0,9887	145,48
	Y^{-3}	-51550	3256,04	0,9544	195,00

Figura 3.12 – Gráficos de resíduos para a extração de anfetaminas em urina por HF-LPME automatizada. Esquerda: modelos sem ponderação; direita: modelos ponderados.

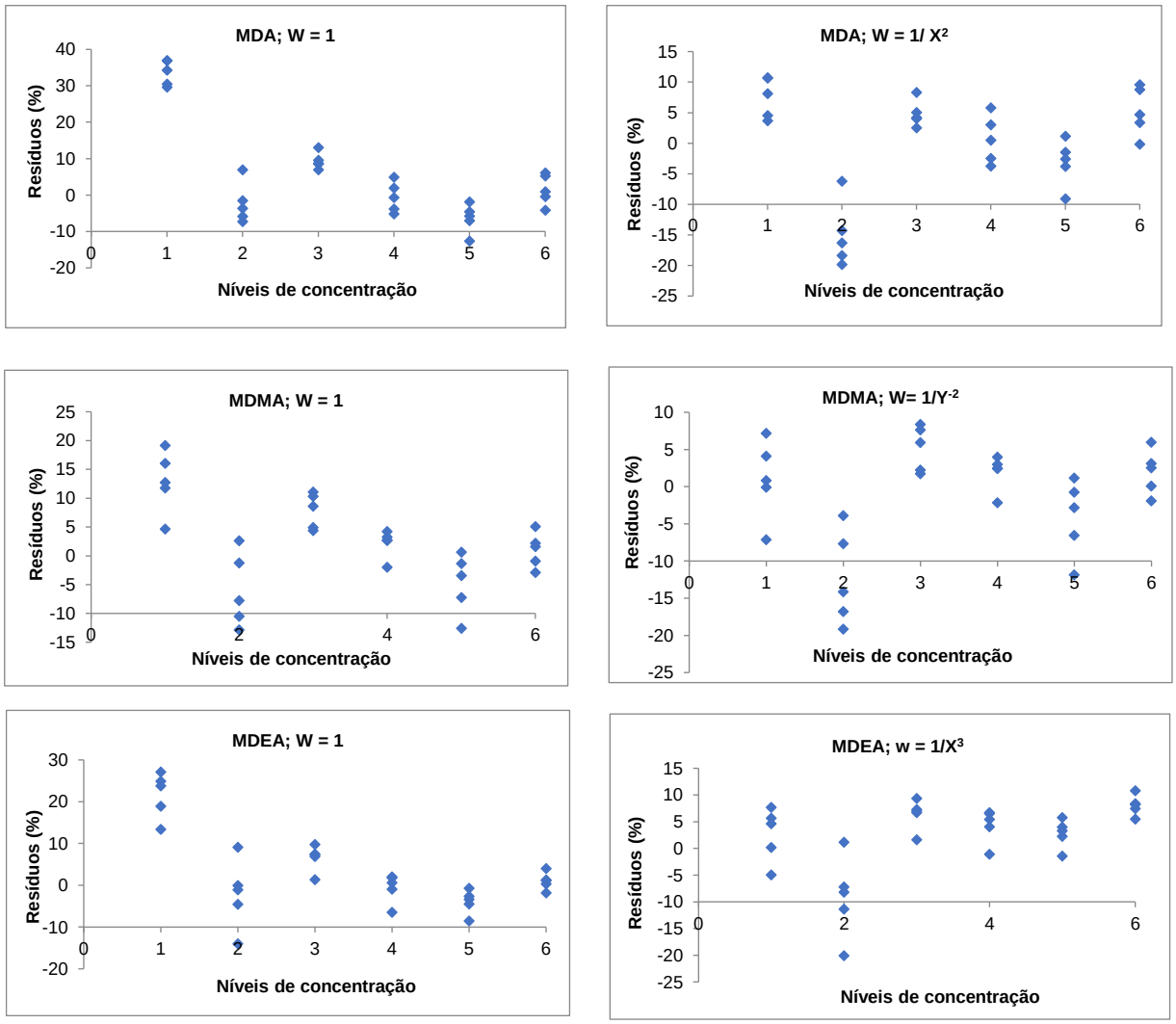


Figura 3.13 – Curvas analíticas para a extração de anfetaminas em urina por HF-LPME automatizada.

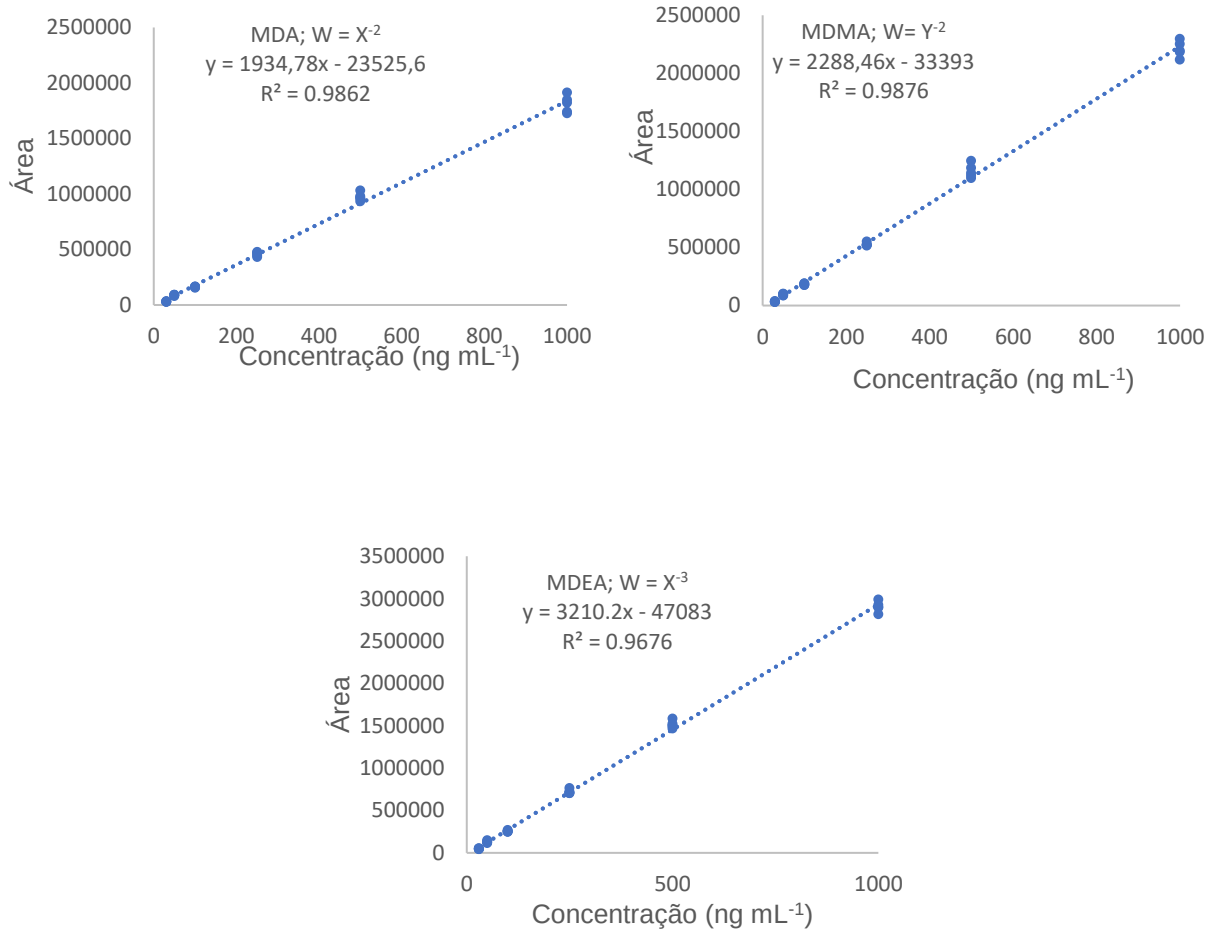


Tabela 3.3 - Resultados dos estudos de precisão intra e interdias para os três níveis de concentração avaliados.

Analito	Níveis (µg L^{-1})	Precisão Intradia 1 DPR (%)	Precisão Intradia 2 DPR (%)	Precisão Interdia DPR (%)
MDA	90	5,78	2,81	4,81
	200	6,15	3,64	4,91
	800	7,13	9,15	8.02
MDMA	90	5,55	2,69	4,61
	200	6,02	3,57	4,82
	800	7,09	9,10	7,99
MDEA	90	4,55	6,39	5,23
	200	7,25	4,05	7,27
	800	4,19	7,44	9,15

Tabela 3.4 - Resultados dos estudos de exatidão intra e inter-dias para os três níveis de concentração avaliados.

Analito	Níveis (µg L^{-1})	Exatidão Intradia 1 DPR (%)	Exatidão Intradia 2 DPR (%)	Exatidão Interdia DPR (%)
MDA	90	1,71	2,22	0,250
	200	3,83	5,87	4,85
	800	5,39	1,70	3,55
MDMA	90	10,2	13,6	11,9
	200	16,9	18,6	17,8
	800	19,5	16,3	17,9
MDEA	90	12,1	12,1	12,1
	200	9,68	17,2	13,4
	800	3,12	15,7	9,41

Para se estimar o fator de enriquecimento (EF), foi calculada a razão entre a concentração dos analitos na fibra após a extração e na urina antes do procedimento de extração. Para quantificar a concentração dos analitos na fibra, uma curva analítica foi construída pela injeção direta das soluções padrão dos analitos em 1-octanol. Para se estimar a recuperação da extração (ER), foi calculado o produto do EF e da razão entre os volumes das fases, vezes 100. Nas equações 1 e 2 são apresentados os cálculos do fator de enriquecimento e da recuperação da extração. Os valores para o ER oscilaram entre 17,7 e 19,5% e são apresentados na tabela 3.5. De acordo com Rasmussen e Pedersen-Bjegaard esses valores são considerados aceitáveis em microtécnicas de extração, incluindo SPME, SBSE, MEPS entre outras. (22)

$$EF = (C_{fibra}/C_{amostra}) \quad (1)$$

$$ER = \left(\frac{n_{fibra}}{n_{amostra}}\right) x100 = \left(\frac{C_{fibra}}{C_{amostra}} \frac{V_{fibra}}{V_{amostra}}\right) x100 \quad (2)$$

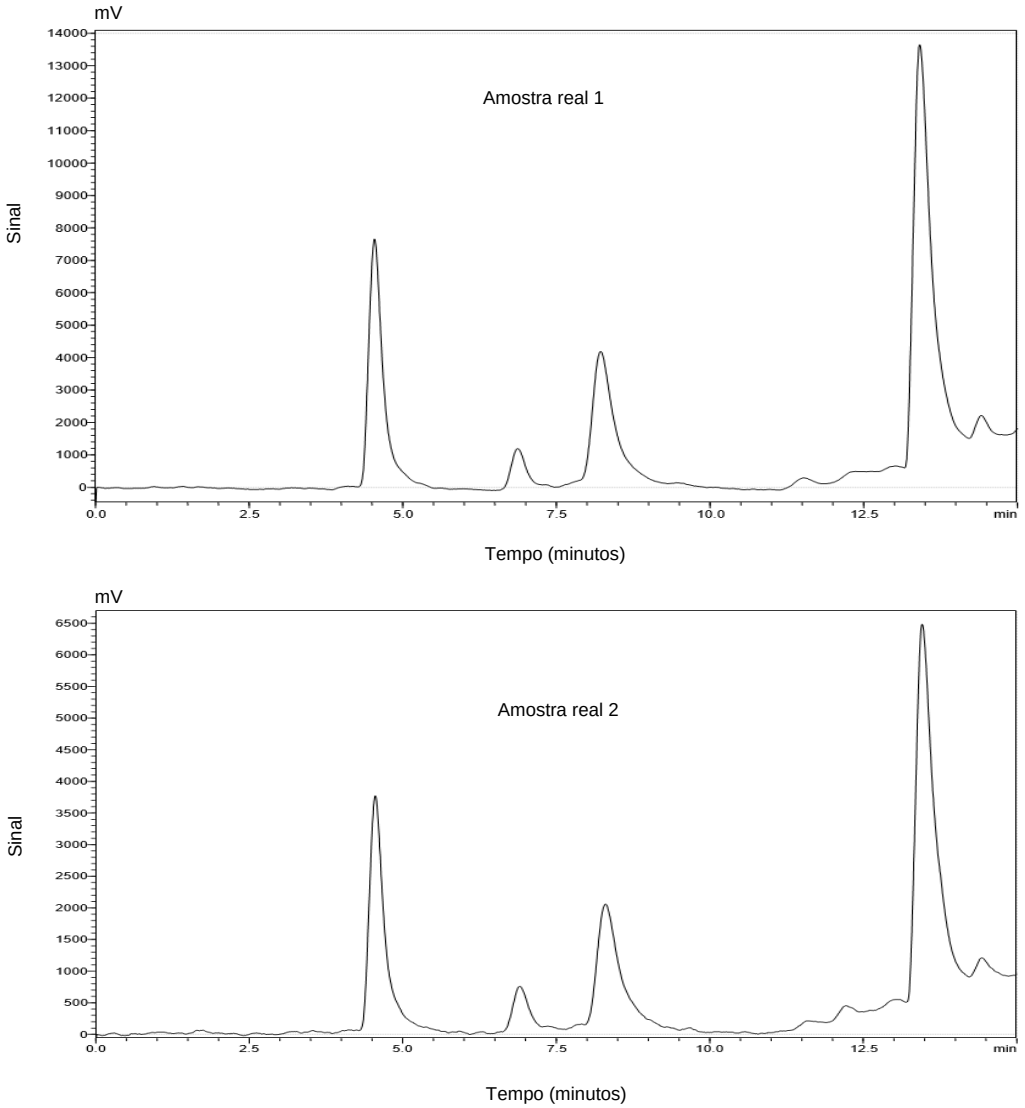
Tabela 3.5 – Estimativas do fator de enriquecimento e recuperação da extração.

Analitos	EF	RF (%)
MDA	14,2	17,7
MDEA	14,8	18,5
MDMA	15,6	19,5

3.5 Análises de amostras reais

O método desenvolvido foi testado na análise de duas amostras reais fornecidas pelo LTA-CIATox de Campinas, da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. A análise das amostras foi feita em triplicata e, embora fosse possível detectar a presença dos três analitos nas duas amostras, a concentração deles estava abaixo da faixa linear da curva analítica, ou seja, a concentração de todos os analitos foi inferior ao LOQ de 30 ng mL^{-1}. Considerando-se que o "*cut-off*" para anfetaminas é de 200 ng mL^{-1}, pode-se concluir que o teste para a determinação de anfetaminas em urina para as duas amostras reais foi considerado negativo. A Figura 3.14 mostra os cromatogramas obtidos para as duas amostras reais.

Figura 3.14 -Cromatogramas obtidos para a extração de anfetaminas por HF-LPME para as duas amostras reais de urina.



4. Conclusões

O acoplamento do preparo de amostra por HF-LPME com a cromatografia líquida de alta eficiência foi realizado com sucesso através de um robô cartesiano o qual foi adaptado uma válvula solenóide de três vias. O sistema foi testado na análise de anfetaminas em urina, a qual é considerada como uma amostra de alta complexidade. Alguns parâmetros do processo de extração foram avaliados e otimizados, resultando em um método de análise que permite a limpeza da amostra, a extração, a separação e a detecção dos analitos em aproximadamente 17 minutos.

O método desenvolvido não só permitiu uma elevada frequência analítica, como também apresentou seletividade, linearidade, exatidão e precisão adequadas para uma análise toxicológica. Assim, foi demonstrado que com o uso das atuais ferramentas de robótica e, com conhecimento básico da configuração e operação destas ferramentas é possível automatizar métodos analíticos que historicamente se caracterizaram por serem demorados, tediosos e exigirem analistas experientes, convertendo-os em métodos simples, rápidos e completamente automatizados.

Referências

1 MEDINA, D. A. V.; CABAL, L. F. R.; LANÇAS, F. M.; SANTOS-NETO, Á. J. Sample treatment platform for automated integration of microextraction techniques and liquid chromatography analysis. **HardwareX**, v. 6, p. 1–16, 2019.

2 SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY (SWGTOX). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, p. 452–474, 2013.

3 KISER, M. M.; DOLAN, J. W. Selecting the Best Curve Fit. **LCGC**, v. 22, n. 2, p. 2–5, 2004.

4 ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 774, n. 2, p. 215–222, 2002.

5 ALEXOVIČ, M.; HORSTKOTTE, B.; SOLICH, P.; SABO, J. Automation of static and dynamic non-dispersive liquid phase microextraction. Part 2: Approaches based on impregnated membranes and porous supports. **Analytica Chimica Acta**, v. 907, p. 18–30, 2016.

6 XIONG, J.; CHEN, J.; HE, M.; HU, B. Simultaneous quantification of amphetamines, caffeine and ketamine in urine by hollow fiber liquid phase microextraction combined with gas chromatography-flame ionization detector. **Talanta**, v. 82, n. 3, p. 969–975, 2010.

7 RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; KROGH, M.; UGLAND, H. G. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 873, p. 3–11, 2000.

8 OUYANG, G.; ZHAO, W.; PAWLISZYN, J. Automation and optimization of

liquid-phase microextraction by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1138, n. 1–2, p. 47–54, 2007.

9 ESRAFILI, A.; YAMINI, Y.; GHAMBARIAN, M.; EBRAHIMPOUR, B. Automated preconcentration and analysis of organic compounds by on-line hollow fiber liquid-phase microextraction-high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1262, p. 27–33, 2012i.

10 MEDINA, D. A. V.; RODRÍGUEZ CABAL, L. F.; TITATO, G. M.; LANÇAS, F. M.; SANTOS-NETO, Á. J. Automated online coupling of robot-assisted single drop microextraction and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1595, p. 66–72, 2019.

11 ŠRÁMKOVÁ, I.; HORSTKOTTE, B.; SOLICH, P.; SKLENÁŘOVÁ, H. Automated in-syringe single-drop head-space micro-extraction applied to the determination of ethanol in wine samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 828, p. 53–60, 2014.

12 ŠRÁMKOVÁ, I. H.; HORSTKOTTE, B.; FIKAROVÁ, K.; SKLENÁŘOVÁ, H.; SOLICH, P. Direct-immersion single-drop microextraction and in-drop stirring microextraction for the determination of nanomolar concentrations of lead using automated Lab-In-Syringe technique. **Talanta**, v. 184, n. January, p. 162–172, 2018.

13 MEDINA, D. A. V. Aplicações de robótica open-source na automatização do preparo de amostra para análise cromatografica de compostos organicos. **Tese (Doutorado) - Instituto de Quimica de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos**, 2019.

14 ALSHARIF, A. M. A.; TAN, G. H.; CHOO, Y. M.; LAWAL, A. Efficiency of hollow fiber liquid-phase microextraction chromatography methods in the separation of organic compounds: A review. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 3, p. 378–391, 2017.

15 MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 249–262, 2013.

16 GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Developments in hollow fiber

based liquid-phase microextraction: Principles and applications. **Microchimica Acta**, v. 177, n. 3–4, p. 271–294, 2012.

17 DA COSTA, J. L.; CHASIN, A. A. D. M. Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 811, n. 1 SPEC. ISS., p. 41–45, 2004.

18 CHAO, Y. Y.; TU, Y. M.; JIAN, Z. X.; WANG, H. W.; HUANG, Y. L. Direct determination of chlorophenols in water samples through ultrasound-assisted hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction on-line coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1271, n. 1, p. 41–49, 2013.

19 SHARIFI, V.; ABBASI, A.; NOSRATI, A. Application of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction techniques in analytical toxicology. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 2, p. 264–276, 2016.

20 REZAEI, F.; YAMINI, Y.; MORADI, M.; DARAEI, B. Supramolecular solvent-based hollow fiber liquid phase microextraction of benzodiazepines. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 135–142, 2013.

21 TASKINEN, S. et al. European guidelines for workplace drug testing in urine. **Drug Testing and Analysis**, v. 9, n. 6, p. 853–865, 2017.

22 PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1–2, p. 132–142, 2008.

Capítulo 4

Extração e análise de drogas de abuso em “blotter papers” assistida por robô cartesiano

1. Objetivos

Desenvolver um método de preparo de amostra automatizado que permita a análise qualitativa de drogas de abuso em “*blotter papers*”. Para isso foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Configurar o robô cartesiano para realizar a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.

- Acoplar no robô cartesiano um motor de vibração que permita a agitação da amostra.

- Configurar o robô cartesiano para que uma vez concluído o preparo da amostra seja possível dar início à corrida cromatográfica automaticamente, controlando a aquisição do espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo/tempo de voo através do software OTOFCONTROL versão 3.4.

- Avaliar o melhor solvente de extração e estudar o efeito da agitação da amostra para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.

- Avaliar parâmetros analíticos como seletividade, linearidade, precisão e exatidão do método desenvolvido.

- Aplicar o método desenvolvido em amostras de “*blotter papers*” cedidas pelo Laboratório de Toxicologia Analítica de Campinas (LTA-CIATox de Campinas).

2. Materiais e métodos

2.1 Padrões e reagentes

Soluções padrão com concentração de 1 mg mL^{-1} de 25C-NBOH, 25C-NBOMe, 25B-NBOH, 25B-NBOMe, 25I-NBOH, 25I-NBOMe, LSD e furanilfentanil foram adquiridas da Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Metanol adquirido da Tedia (Fairfield, OH, EUA), 1-octanol, 1-nonanol e 1-dodecanol adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MOEUA) foram os solventes avaliados na extração dos analitos. Para a simulação da matriz-branco na construção das curvas de calibração foi empregado papel filtro Whatman 903, normalmente empregado em técnicas como “*dried blood spot*”.

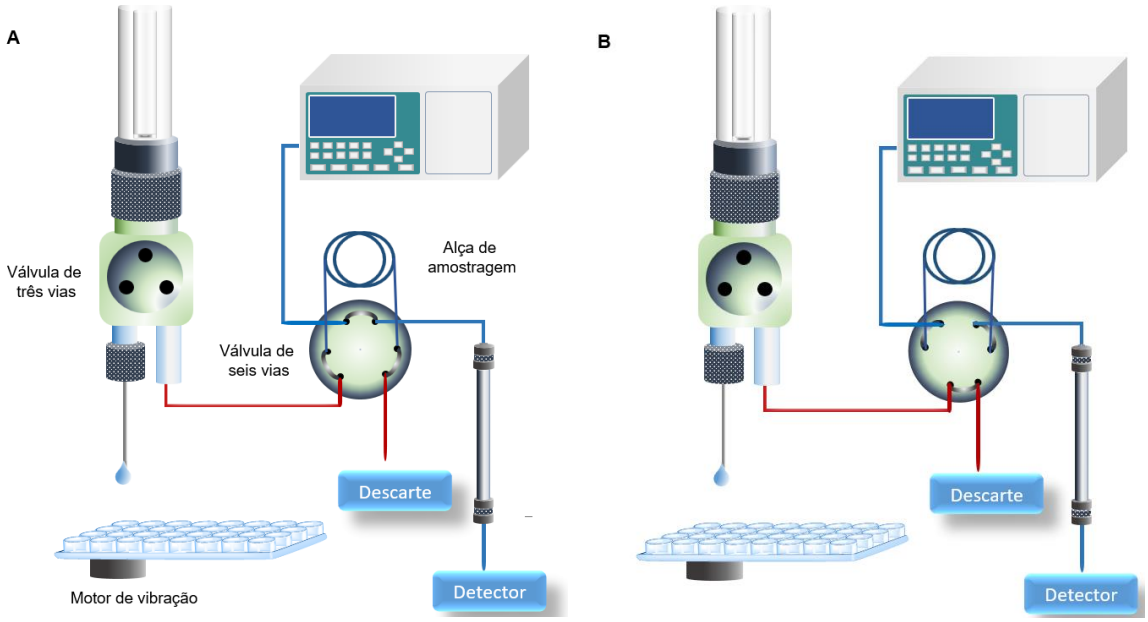
2.2 Instrumentação e condições analíticas

O sistema cromatográfico empregado na análise on-line de “blotter papers” foi um cromatógrafo líquido da Shimadzu série Prominence 20A (Kyoto-Japão) e equipado com um amostrador automático SIL 20AC, um desgaseificador DGU-20A5, duas bombas LC-20AD, uma interface CBM-20A acoplado a um espectrômetro de massas híbrido do tipo quadrupolo/tempo de voo (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha), modelo microTOF-Q II. Para as separações cromatográficas foi empregada uma coluna analítica Kinetex XB-C18 (100 mm x 2,1 mm; 2,6 µm) da Phenomenex. Como fases móveis foram escolhidos metanol e água, ambas com 0,1% de ácido fórmico (em volume). A proporção inicial dos solventes foi metanol/água (30:70) durante os primeiros 3 minutos; do 3º ao 6º minuto a concentração de metanol aumentou linearmente até 100%. Finalmente, a proporção de metanol diminui em um gradiente linear para 30% em 1 minuto e se manteve assim por mais 3 minutos para recondicionar a coluna. O ESI operou no modo positivo e os cromatogramas foram obtidos no modo MS, com o quadrupolo operando em RF em uma faixa de 50-2000 Da. Os analitos foram identificados através das massas exatas de suas formas protonadas, com um erro médio de 2 ppm.

2.3 Procedimento de extração on-line dos “blotter papers”

Inicialmente, o robô cartesiano deposita o solvente de extração em um dos poços de uma placa de 96 poços usada para acondicionar a amostra. Seguidamente, um motor de vibração extraído de um telefone celular e acoplado na placa de 96 poços é acionado durante o tempo da extração. Após isso, o robô cartesiano recolhe o extrato, a válvula solenóide muda de posição e o extrato é direcionado para o sistema cromatográfico onde preenche uma alça de amostragem conectada a uma válvula de seis pórticos. Finalmente, o robô cartesiano dá início à corrida cromatográfica, a válvula de seis pórticos muda de posição e a fase móvel passa pela alça de amostragem direcionando os analitos para a coluna analítica e posteriormente para o espectrômetro de massas (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Esquema ilustrativo para a extração automatizada de drogas de abuso em “blotter papers”. (A) Configuração empregada para a extração dos analitos; (B) Configuração empregada para injeção dos analitos no sistema cromatográfico.



2.4 Otimização univariada do procedimento de extração

Uma vez que foi possível controlar o espectrômetro de massas pela placa de Arduino e acoplar o motor de vibração ao sistema de extração, foi avaliada de forma univariada o efeito do solvente de extração e a efetividade do sistema de agitação da amostra. Os solventes estudados foram 1-octanol, 1-nonanol, 1-dodecanol e metanol. Por outro lado, o efeito da agitação foi avaliado comparando-se três extrações feitas com o sistema de agitação ligado e três extrações feitas com o sistema de agitação desligado.

2.5 Otimização multivariada do volume de solvente e o tempo de extração

Uma otimização multivariada do tempo de extração e do volume de solvente extrator foi feita para garantir um adequado sinal analítico para os oito compostos estudados. Uma vez que experimentos prévios mostraram que a concentração dos analitos nas amostras reais são elevados e que tempos de extração curtos seriam necessários para não saturar o detector e/ou gerar efeito de memória no sistema cromatográfico, a região experimental para o tempo de extração foi definida entre 5 ($-\sqrt{2}$) a 20 ($+\sqrt{2}$) segundos de extração e 50 ($-\sqrt{2}$) a 100 ($+\sqrt{2}$) microlitros de solvente extrator, com triplicata no ponto central. Os experimentos realizados foram resumidos na Tabela 4.1 e os dados foram processados com o *software* STATISTICA 10 (StatSoftInc, Tulsa, EUA, 2011).

Tabela 4.1 - Planejamento experimental para a otimização do tempo de extração e o volume de solvente extrator.

Experimento	Volume 1-octanol (µL)		Tempo (s)	
	Codificado	Real	Codificado	Real
1	-1	57.4	-1	7.2
2	1	92.6	-1	7.2
3	-1	57.4	1	17.8
4	1	92.6	1	17.8
5	0	75	0	12.5
6	0	75	0	12.5
7	0	75	0	12.5
8	-1.41	50	0	12.5
9	0	75	-1.41	5
10	1.41	100	0	12.5
11	0	75	1.41	20

2.6 Avaliação das figuras de mérito

Devido ao fato de que não foi possível encontrar uma matriz-branco exatamente igual à empregada na confecção dos “*blotter papers*”, usou-se o papel de filtro Whatman 903 utilizado na técnica “*dried blood spot*” para simular a matriz-branco. Esse papel foi escolhido pela sua similaridade com os papéis usados nos “*blotter papers*”.

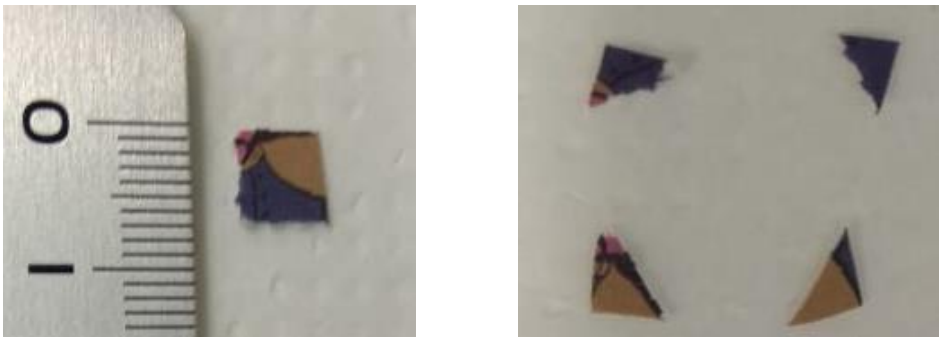
A seletividade foi avaliada extraindo-se a matriz-branco e conferindo-se a ausência de interferentes eluídos correspondendo à mesma relação massa/carga (m/z) e tempo de retenção dos compostos estudados. Para avaliar a linearidade, a matriz-branco foi fortificada depositando-se 10 µL de soluções padrão com todos os analitos em seis níveis de concentração (1, 5, 10, 25, 50 e 100 µg L^{-1}). Os papéis de filtro fortificados foram cortados usando-se um perfurador de papel, os círculos cortados foram colocados na placa de 96 poços e submetidos ao procedimento de extração.

Para a avaliação da precisão e exatidão a matriz-branco foi fortificada em 2 níveis de concentração (4 e 80 µg L^{-1}) e analisada em quintuplicata e em dois dias diferentes. A precisão foi expressa termos de desvio padrão relativo (%DPR).

2.7 Amostras

Para se avaliar o desempenho do método desenvolvido na análise de amostras reais, foram analisados três “*blotter papers*” fornecidos pelo laboratório LTA-CiATox de Campinas, da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. As amostras originalmente tinham o formato de quadrado com aproximadamente 7 milímetros de comprimento de cada lado. No entanto, devido a elevada concentração dos analitos, as amostras foram cortadas em 4 partes iguais, como mostrado na Figura 4.2.

Figura 4.2 – Fotografia de uma das amostras usadas neste estudo no tamanho real (esquerda) e os cortes realizados para a sua análise (direita).



3. Resultados e discussão

Para a identificação de drogas de abuso em “*blotter papers*” as técnicas convencionais são a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida seguida por detecção por espectrometria de massas. Essas técnicas permitem identificar inequivocamente os analitos e quantificá-los se for o caso. Porém, são técnicas que requerem preparos de amostras tediosos e em alguns casos bastante demorados. Esse tipo de análise é incompatível com a quantidade de material apreendido para testes no Brasil, o qual supera a capacidade de análises da Polícia Federal e Polícias Civis. (1,2,3,4,5)

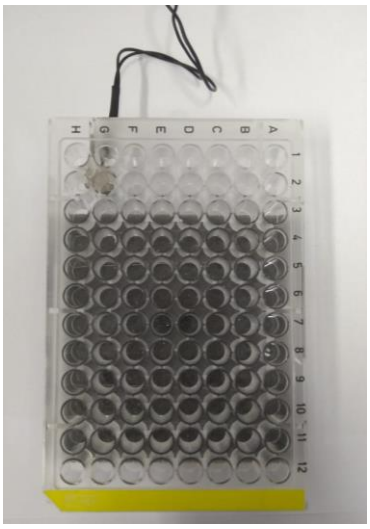
Atualmente surgiram alguns métodos alternativos que empregam técnicas espectroscópicas que, em combinação com análises multivariadas resultaram em

uma boa alternativa para a análise de drogas de abuso em “*blotter papers*”. Porém, em caso de resultados positivos é requerida a confirmação pelas técnicas tradicionais como cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas. Assim, como uma solução aos problemas apresentados no preparo da amostra na análise de drogas de abuso em “*blotter papers*” pelas técnicas tradicionais, foi desenvolvido um método de extração que envolveu o acoplamento do robô cartesiano ao sistema cromatográfico como descrito por Vargas et al. Adicionalmente, a válvula solenóide de três pórticos, descrita no capítulo 3 deste trabalho, e um motor de vibração também foram acoplados ao robô cartesiano. (6,7,8,9,10)

3.1 Acoplamento do motor de agitação na placa de 96 poços

Para auxiliar a extração dos analitos nos “*blotter papers*” o robô cartesiano foi equipado com um motor de vibração (vibracall 1027) empregado em telefones celulares. O motor foi conectado à placa de Arduino e acionado mediante programação também na interface de Arduino. Como porta amostra foi empregada uma placa de 96 poços à qual foi acoplado o motor de vibração (Figura 4.3). Além disso, a válvula solenóide de três pórticos se manteve conectada à porca dupla construída em PTFE, junto com os dois relês que permitem o controle da válvula e o início da corrida cromatográfica como relatado no capítulo 3.

Figura 4.3 – Fotografias do acoplamento do motor de agitação na placa de 96 poços.



3.2 Otimização univariada do procedimento de extração

3.2.1 Efeito do solvente de extração para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.

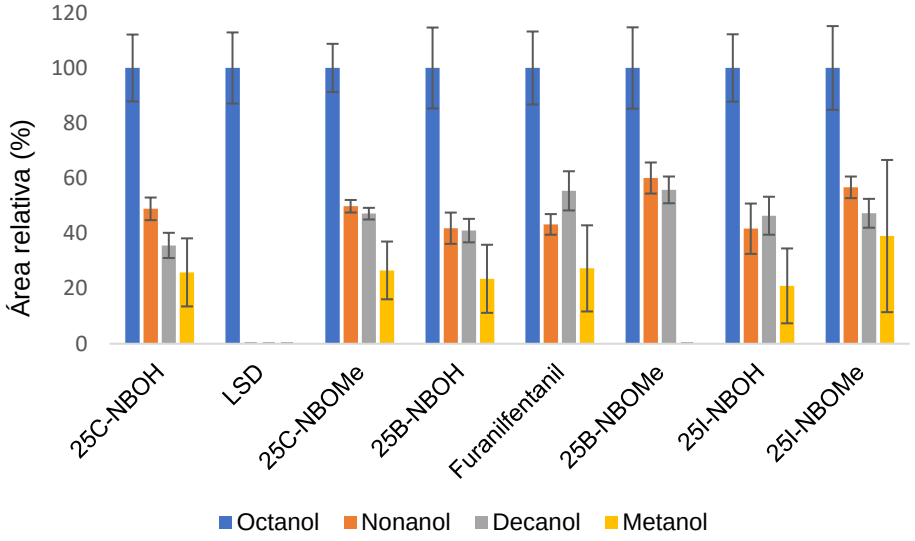
O solvente de extração é o encarregado de extrair os analitos que foram adsorvidos sobre os “blotter papers”. Neste estudo foram estudados oito analitos que embora apresentem similaridades nas suas estruturas químicas, podem apresentar diferenças significativas nas suas propriedades físico-químicas. Sendo assim, o solvente de extração deve ter uma boa afinidade por todos eles, garantindo que todos os analitos possam ser analisados em um único experimento.

Dentre os solventes avaliados o metanol aparecia como uma excelente alternativa, por ser um solvente mais compatível com a cromatografia líquida e que é frequentemente utilizado para a extração de drogas de abuso em “*blotter papers*”. Porém, a extração com metanol apresentou os maiores desvios de resultados dentre os solventes testados, possivelmente porque evapora muito mais rapidamente que os outros solventes; além disso, foi incapaz de extrair o LSD nas condições experimentais avaliadas, impedindo assim a sua utilização como solvente de extração (ver Figura 4.4). (2,4,5)

1-nonanol e 1-decanol apresentaram uma boa reprodutibilidade dentre as suas extrações e, embora não tenham sido os solventes com a melhor eficiência de extração, os analitos estudados se encontravam em elevadas concentrações nos “*blotter papers*”. Assim, 1-nonanol e 1-decanol poderiam ser uma boa alternativa para a análise. Porém, esses solventes também não conseguiram extrair eficientemente o LSD (ver Figura 4.4).

O 1-octanol foi o solvente que apresentou as melhores eficiências de extração para todos os analitos. A sua eficiência de extração foi entre 50 e 80% superior quando comparado com os outros solventes testados. Além disso, apresentou boa reprodutibilidade dentre as suas medidas e foi o único solvente que conseguiu extrair eficientemente o LSD. Consequentemente o 1-octanol foi escolhido com o solvente de extração. Na Figura 4.4 são apresentadas as eficiências de extração relativas de cada solvente para cada analito estudado.

Figura 4.4 – Efeito do solvente de extração sobre a eficiência de extração de drogas de abuso em “*blotter papers*”.



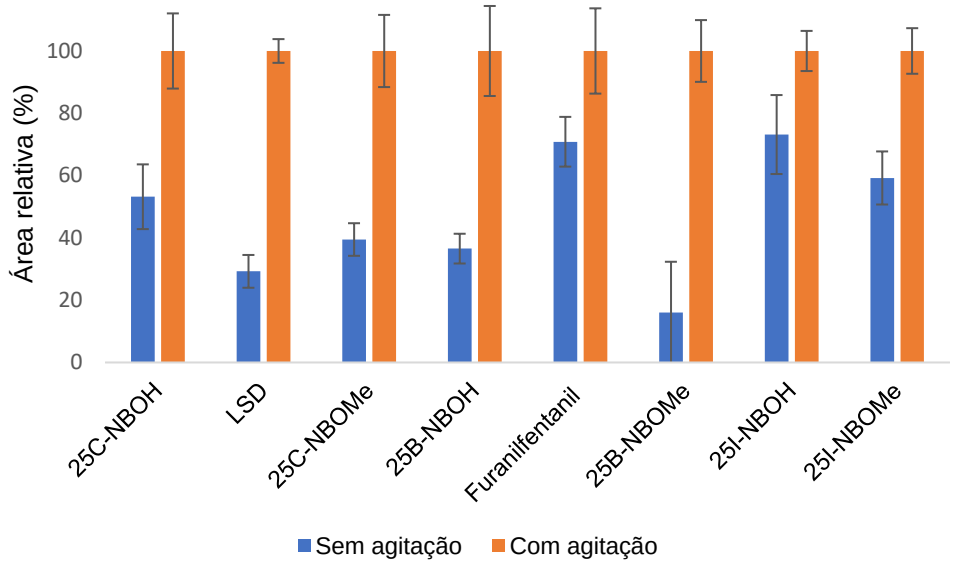
3.2.2 Efeito da agitação da amostra para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.

Nos “*blotter papers*” as drogas de abuso passam por um processo onde são adsorvidas no interior das fibras da celulose. Sendo assim, é necessário auxiliar a extração dos analitos com um sistema que permita agitar a amostra no momento que entra em contato com o solvente de extração. Com esse intuito, foi adaptado ao robô cartesiano um motor de vibração utilizado em telefones celulares como apresentado na Figura 4.3. O motor foi colado em uma placa de 96 poços, bem embaixo da amostra a extrair. Deste modo, a ondas vibracionais geradas pelo motor eram transferidas diretamente para o sistema amostra/solvente de extração.

Para demonstrar a eficiência do sistema de agitação foi comparada a extração dos analitos com e sem a ativação do sistema de agitação. Na figura 4.5, são apresentados os resultados deste experimento onde é possível observar que quando a amostra é agitada a extração dos analitos melhora consideravelmente. Sendo que para o analito que apresentou a menor influência da agitação, o 25I-NBOMe, a extração melhorou quase 25% e, para o analito mais influenciado pela vibração, o

25B-NBOMe, a extração melhorou em quase 80%. Desta forma foi demonstrado que o sistema de agitação é efetivo para auxiliar na extração de drogas de abuso em “*blotter papers*”.

Figura 4.5 – Comparação da eficiência de extração com o sistema de vibração ligado e desligado.



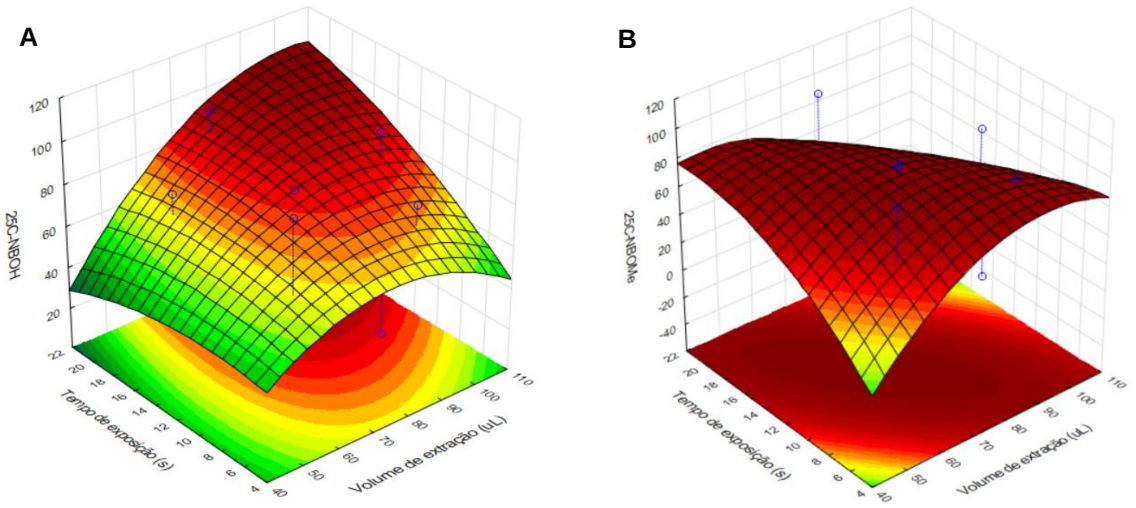
3.3 Otimização multivariada do tempo de extração e do volume de extração para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.

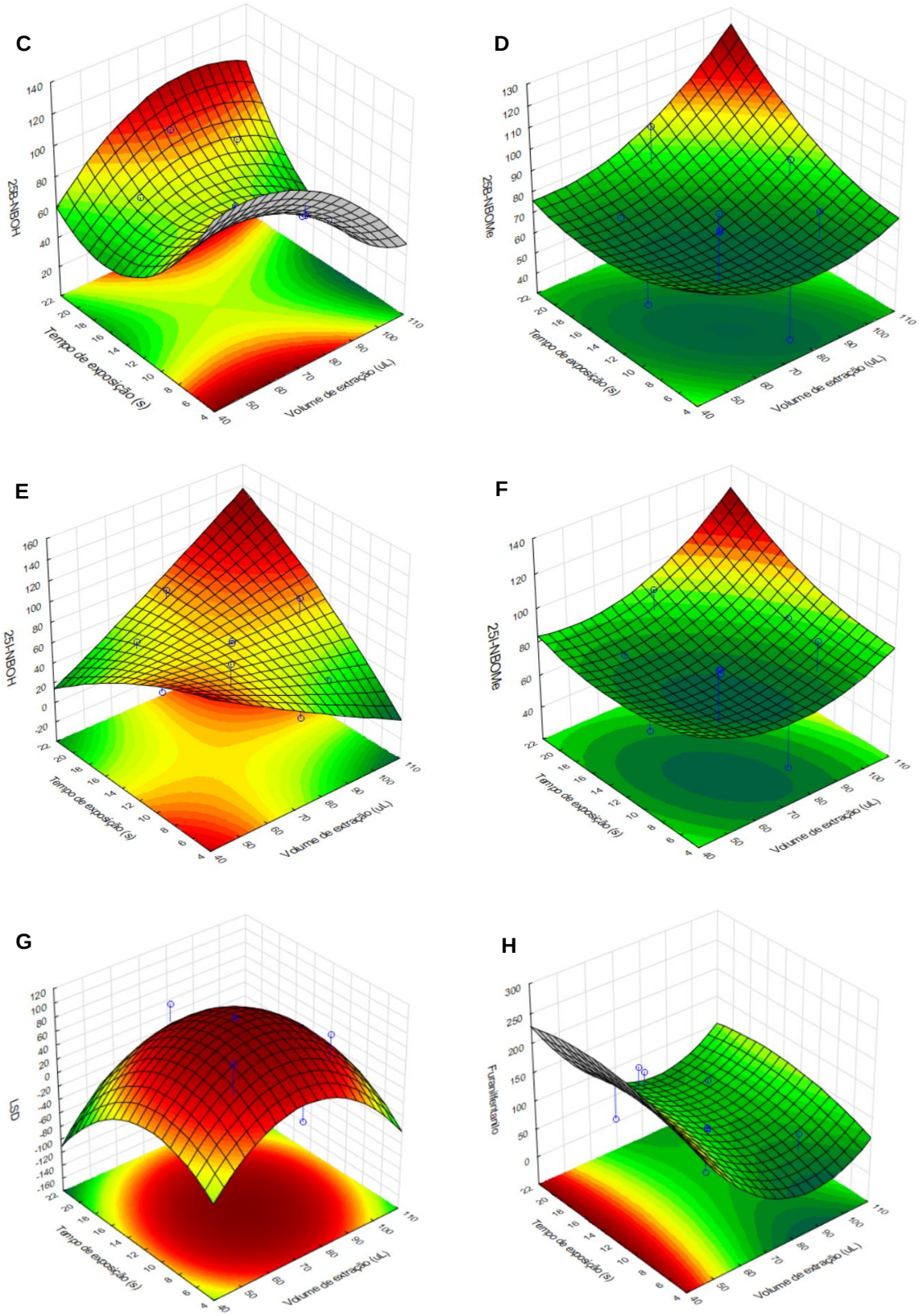
A eficiência das extrações baseadas em solventes é influenciada diretamente pelo tempo de extração e o volume de solvente extrator. Assim, estas variáveis foram otimizadas por um planejamento composto central. Análises preliminares permitiram observar que a concentração dos analitos nos “*blotter papers*” era elevada e que tempos de extração muito longos causariam “*carryover*” no sistema e também levariam à saturação do detector. Consequentemente, a faixa experimental foi definida entre 5 (-√2) a 20 (+ √2) segundos para o tempo de extração e, 57,5 (-√2) a 100 (+ √2) microlitros para o solvente de extração. As superfícies de resposta foram construídas calculando-se a área para cada analito. (11)

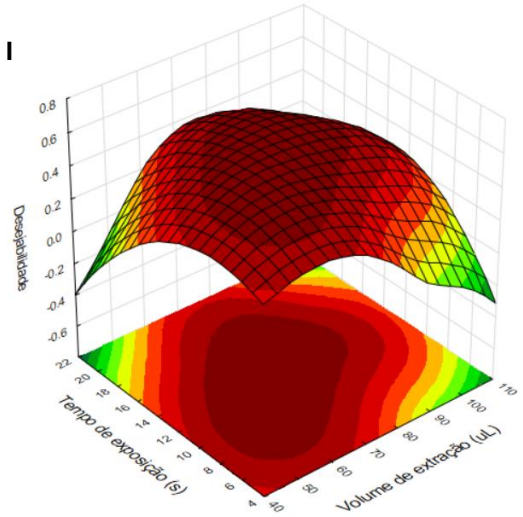
A Figura 4.6 mostra as superfícies de resposta para todos os analitos estudados. Nelas é possível se observar que os tempos ótimos de extração são diferentes para cada composto. Para o 25C-NBOH, o 25B-NBOMe, o 25I-NBOH e o 25I-NBOMe a condição ótima fica acima de 100 µL de 1-octanol e 20 segundos de

extração; por outro lado, a condição ótima para o *25C-NBOMe* e o LSD fica entre 10 e 16 segundos de extração e, entre 60 e 90 µL de solvente extrator. O furanilfentanil por sua vez, apresentou um comportamento diferente aos dos outros compostos estudados e a sua condição ótima de extração é quando tempos curtos de extração são empregados. Assim, com o intuito de se obter uma condição de extração que permita analisar todos os analitos com a eficiência adequada, foram escolhidas as condições experimentais sugeridas pela função desejabilidade. Ou seja, 70 µL de 1-octanol e 12 segundos de extração. Por sua vez, a função desejabilidade é uma função matemática que permite encontrar condições experimentais onde é atingido o valor ótimo de extração para todas as variáveis experimentais avaliadas e todos os analitos estudados simultaneamente. (12,13)

Figura 4.6 – Superfícies de resposta para a otimização do tempo e o volume de extração de (A) 25C-NBOH; (B) 25C-NBOMe; (C) 25B-NBOH; (D) 25B-NBOMe; (E) 25I-NBOH; (F) 25I-NBOMe; (G) LSD; (H); Furanilfentanilo; (I) Função desejabilidade.




C
25B-NBOH
Tempo de exposição (s)
Volume de extração (uL)
D
25B-NBOMe
Tempo de exposição (s)
Volume de extração (uL)
E
25I-NBOH
Tempo de exposição (s)
Volume de extração (uL)
F
25I-NBOMe
Tempo de exposição (s)
Volume de extração (uL)
G
LSD
Tempo de exposição (s)
Volume de extração (uL)
H
Furanilfentanilo
Tempo de exposição (s)
Volume de extração (uL)



3.3.1 Figuras de mérito para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.

Embora o objetivo deste trabalho fosse desenvolver análises qualitativas que permitissem a detecção e não a quantificação de drogas de abuso em “*blotters papers*”, essa configuração analítica pode ser empregada na análise de outros analitos como medicamentos ou mesmo drogas de abuso em matrizes como sangue e/ou urina empregando-se o princípio de análises utilizado na técnica “*Dried Matrix Spot”* (MDS). (14)

Nessa técnica uma pequena quantidade da amostra é coletada em um papel de filtro e secada com um jato de nitrogênio ou simplesmente a temperatura ambiente. A seguir, a amostra é extraída, geralmente com uma solução-tampão ou um solvente e, posteriormente, analisada por técnicas como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Quando a matriz empregada é sangue, a técnica é denominada “*dried blood spot*” (DBS). A técnica DBS já é empregada na análise de drogas de abuso em sangue, porém, na maioria dos casos, o preparo da amostra é feito manualmente. (15,16,17)

Deste modo, era necessário saber se o método desenvolvido seria capaz de responder linearmente a diferentes concentrações dos analitos. Além disso, saber se o método tem precisão e exatidão adequadas para esse tipo de análise. Sendo assim, foram avaliadas a linearidade, a precisão e a exatidão (intra e interdias) do método desenvolvido.

Para a avaliação da linearidade foram depositados 10 µL de soluções padrão com todos os analitos em concentrações de 1 até 100 µg L^{-1} em um papel filtro Whatman 903. O papel filtro foi cortado no formato de círculos com ajuda de um perfurador de papel. Posteriormente, o papel foi colocado na placa de 96 poços e submetido ao procedimento de extração.

Tendo em vista que as curvas de calibração sem ponderação apresentaram resíduos acima de 20% para todos os analitos, especialmente no primeiro e segundo nível de concentração, foram avaliados os modelos de calibração ponderada sugeridos por Almeida e colaboradores. Os modelos ponderados reduziram os resíduos para todos os analitos em todos os seus níveis, permitindo encontrar modelos matemáticos mais adequados para descrever a relação da concentração do analito com o sinal analítico. (18,19)

Os modelos de calibração ponderada estudados foram $X^{-0,5}$, X^{-1}, X^{-2}, X^{-3}, $Y^{-0,5}$, Y^{-1}, Y^{-2} e Y^{-3}. Na tabela 4.2 estão resumidos os valores do coeficiente angular, coeficiente linear, o coeficiente de determinação e a somatória de resíduos para cada analito em cada modelo matemático; o modelo ponderado escolhido está destacado em negrito. Para escolher o melhor modelo foi levado em conta o modelo com menor somatória de resíduos e aquele onde os resíduos não superassem desvios de 20% para os pontos baixos e 15% para os pontos altos. Na Figura 4.7, são comparados os gráficos de resíduos para o modelo sem ponderar (esquerda) e para o modelo ponderado escolhido (direita).

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas em dois níveis de concentração (4 e 80 µg L^{-1}) e são apresentados na Tabela 4.3 e na Tabela 4.4, respectivamente. A precisão, apresentada em termos de desvio padrão relativo (%DPR), mostrou valores entre 2,06 e 14,8%, coerentes com o estabelecido na SWGTOX para análises toxicológicas. Do mesmo modo, a exatidão apresentou valores entre 0,31 e 15,6%, também em concordância com o exigido para análises toxicológicas.

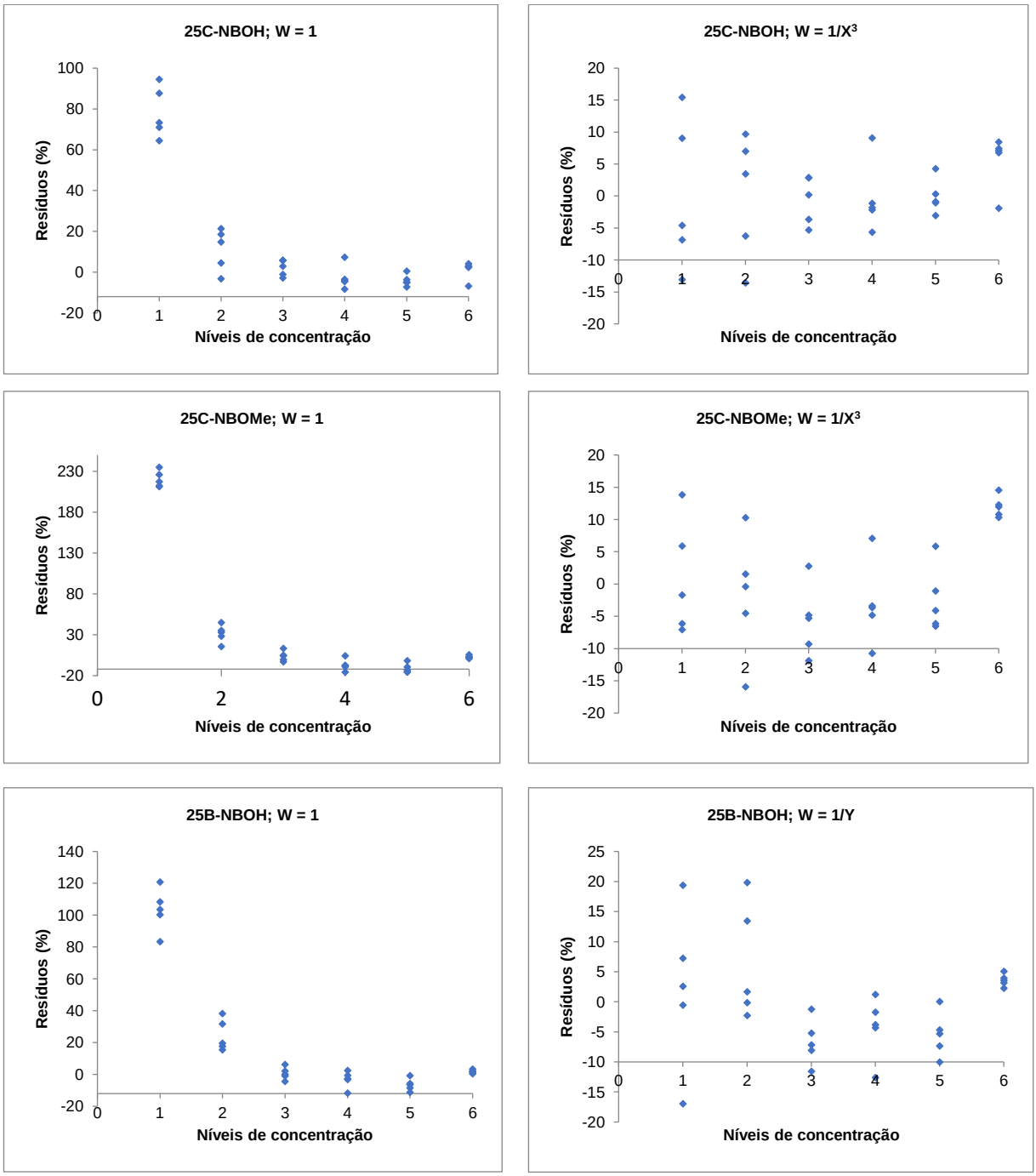
A Figura 4.8, mostra as curvas de calibração para todos os analitos estudados, além das equações que melhor descrevem a relação entre a concentração dos analitos e o sinal analítico. Do mesmo modo, é apresentado na Figura 4.9 um cromatograma característico do ponto de 100 µg L^{-1} da curva de calibração.

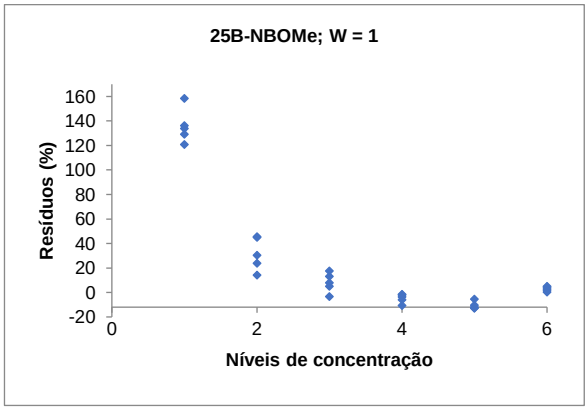
Tabela 4.2 - Valores do coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (R^2) e a somatória dos resíduos (∑%RE) para o modelo sem ponderação (1) e os modelos ponderados ($X^{-0,5}$, X^{-1}, X^{-2}, X^{-3}, $Y^{-0,5}$,Y^{-1}, Y^{-2}, Y^{-3}) sugeridos por Almeida e colaboradores. (18)

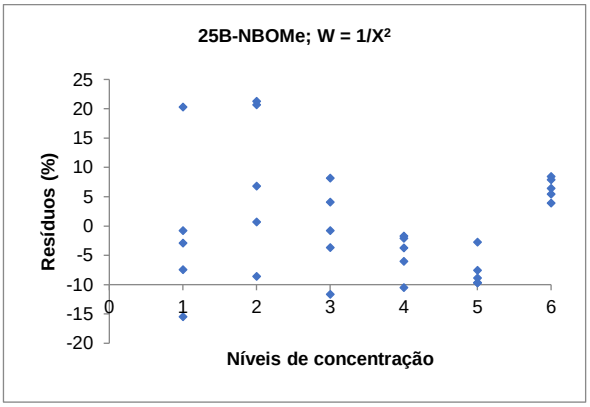
Composto	Peso (w)	a	b	R^2	∑%RE
	1	3695,622	4356,191	0,996	540,26
	$X^{-0,5}$	1443,983	4408,808	0,997	268,53
	X^{-1}	523,8661	4455,827	0,997	177,507
	X^{-2}	109,961	4550,335	0,993	168,717
25C-NBOH	**X^{-3}**	**43,726**	**4601,202**	**0,954**	**164,937**
	$Y^{-0,5}$	1423,08	4404,47	0,997	266,256
	Y^{-1}	476,397	4446,49	0,997	176,355
	Y^{-2}	22,077	4528,55	0,993	173,491
	Y^{-3}	-72,339	4556,44	0,953	172,157
	1	47049.28	19386.57	0.991	1399.72
	$X^{-0,5}$	19168.66	20036.33	0.992	598.54
	X^{-1}	7488.94	20629.3	0.991	312.71
	X^{-2}	**2036.02**	**21874.39**	**0.990**	**214.53**
25C-NBOMe	X^{-3}	1115.02	22581.68	0.971	203.62
	$Y^{-0,5}$	19506.4	19971.9	0.992	608.51
	Y^{-1}	7781.99	20474.6	0.992	322.23
	Y^{-2}	2137.35	21546.6	0.990	226.16
	Y^{-3}	1085	22202.6	0.972	210.67
	1	3176,439	2967,58	0,997	710,14
	$X^{-0,5}$	958,23	3020,00	0,997	294,88
	X^{-1}	184,76	3061,56	0,996	194,05
	X^{-2}	5,798	3102,43	0,990	183,48
25B-NBOH	X^{-3}	112,20	3030,712	0,936	201,16
	$Y^{-0,5}$	892,72	3017,75	0,997	282,88
	Y^{-1}	**106,49**	**3054,4**	**0,996**	**192,22**
	Y^{-2}	-53,444	3063,53	0,987	195,32
	Y^{-3}	127,18	2884,17	0,9323	287,10
	1	1558,98	1457,98	0,993	974,90
	$X^{-0,5}$	25,261	1494,66	0,993	364,67
	X^{-1}	-448,242	1521,03	0,993	230,78
	X^{-2}	**-516,85**	**1536,70**	**0,987**	**228,27**
25B-NBOMe	X^{-3}	-443,21	1480,14	0,931	251,16
	$Y^{-0,5}$	-73,42	1493,11	0,994	330,14
	Y^{-1}	-507,02	1514,61	0,993	239,85
	Y^{-2}	-566,34	1510,1	0,979	255,33
	Y^{-3}	-506,98	1415,8	0,798	339,38
	1	8600,33	4772,25	0,992	1013,88
	$X^{-0,5}$	3630,56	4889,16	0,993	407,90
	X^{-1}	1782,46	4886,42	0,994	203,01
	X^{-2}	**1168,97**	**5126,50**	**0,993**	**183,69**
25I-NBOH	X^{-3}	1219,10	5088,00	0,978	184,52
	$Y^{-0,5}$	3749,68	4875,27	0,993	421,46
	Y^{-1}	1875,84	4956,75	0,994	212,94
	Y^{-2}	1183,59	5072,98	0,993	186,49
	Y^{-3}	1216,71	5029,64	0,984	190,32

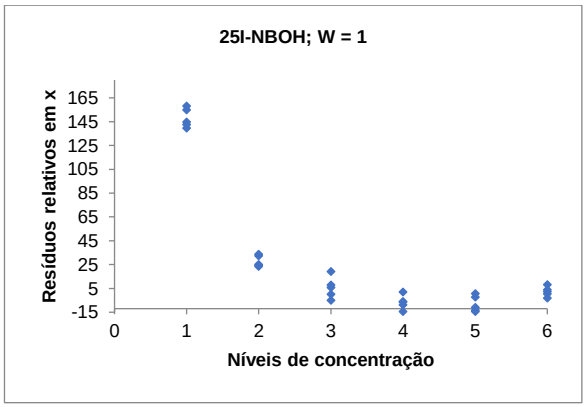
25I-NBOMe	1	7199,34	5174,78	0,996	840,62
	$X^{-0,5}$	2582,81	5284,35	0,995	326,83
	X^{-1}	1047,58	5368,03	0,996	185,20
	X^{-2}	743,22	5437,53	0,993	176,73
	X^{-3}	955,25	5274,69	0,972	185,6
	$Y^{-0,5}$	2596,03	5276,34	0,996	327,85
	Y^{-1}	1037,14	5349,57	0,996	185,38
	Y^{-2}	**712,05**	**5393,16**	**0,993**	**177,99**
	Y^{-3}	959,56	5187,37	0,9771	196,58
LSD	1	6685,55	3664,96	0,994	1227,19
	$X^{-0,5}$	2056,69	3772,92	0,994	523,66
	X^{-1}	211,63	3868,34	0,993	260,34
	X^{-2}	**-465,16**	**4022,86**	**0,992**	**202,48**
	X^{-3}	-412,14	3982,38	0,9705	207,66
	$Y^{-0,5}$	1934,78	3767,54	0,995	507,42
	Y^{-1}	140,45	3850,81	0,994	251,82
	Y^{-2}	-477,3	3977,22	0,9912	209,61
	Y^{-3}	-427,31	3906,96	0,9570	221,56
Furanilfentanilo	**1**	**849,13**	**5524,99**	**0,999**	**126,47**
	$X^{-0,5}$	541,63	5533,305	0,999	119,58
	X^{-1}	625,63	5532,01	0,999	119,95
	X^{-2}	871,16	5475,96	0,994	126,80
	X^{-3}	1041,85	5344,87	0,9342	149,99
	$Y^{-0,5}$	504,00	5532,3	0,999	119,78
	Y^{-1}	530,48	5531,11	0,999	119,61
	Y^{-2}	697,34	5478,76	0,996	121,69
	Y^{-3}	791,81	5357,52	0,959	142,74

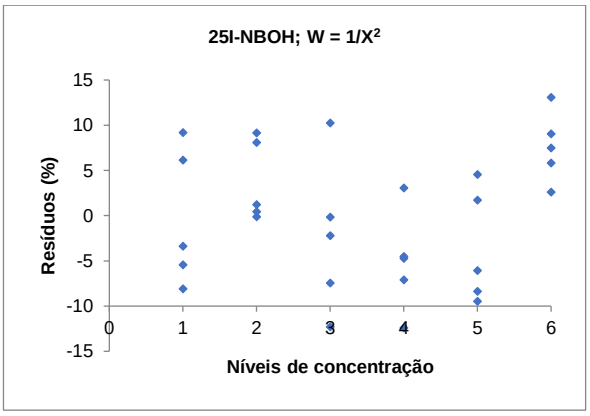
Figura 4.7 – Gráficos de resíduos para a extração de drogas de abuso em “*blotter papers*”. À direita os gráficos de resíduos para os modelos ponderados e à esquerda os gráficos de resíduos para os modelos sem ponderação.

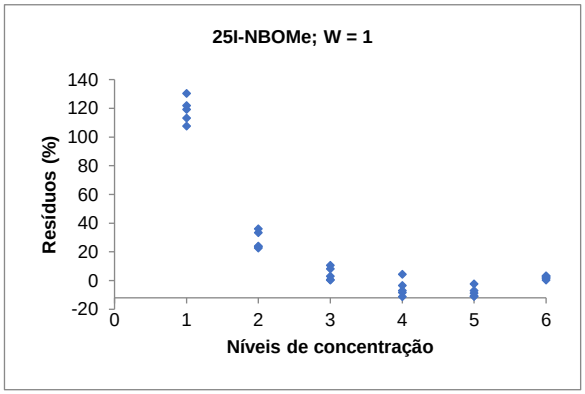


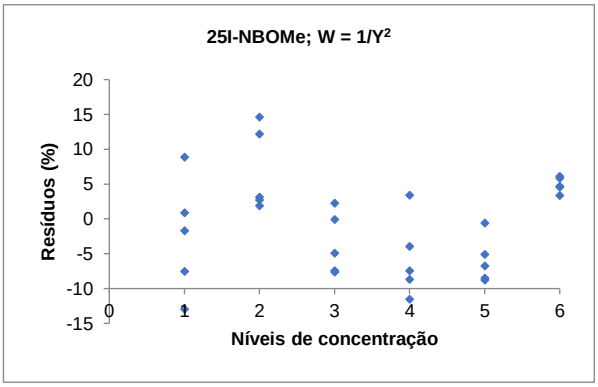

25B-NBOMe; W = 1
Resíduos (%)
Níveis de concentração

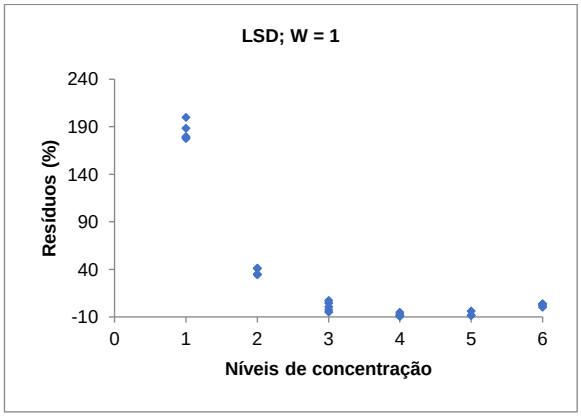

25B-NBOMe; W = 1/X²
Resíduos (%)
Níveis de concentração

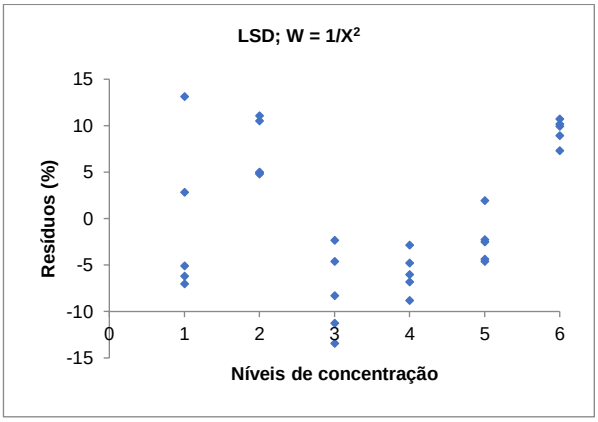

25I-NBOH; W = 1
Resíduos relativos em x
Níveis de concentração


25I-NBOH; W = 1/X²
Resíduos (%)
Níveis de concentração


25I-NBOMe; W = 1
Resíduos (%)
Níveis de concentração


25I-NBOMe; W = 1/Y²
Resíduos (%)
Níveis de concentração


LSD; W = 1
Resíduos (%)
Níveis de concentração


LSD; W = 1/X²
Resíduos (%)
Níveis de concentração

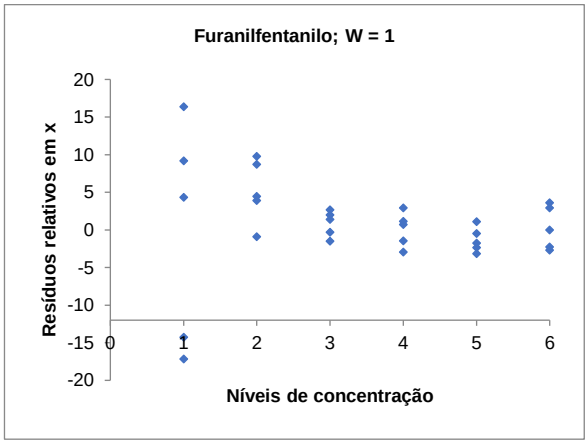


Tabela 4.3 -Resultados dos estudos de precisão intra e interdias para os níveis baixo (4 µg L^{-1}) e alto (80 µg L^{-1}) para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.

Analito	Níveis (µg L^{-1})	Precisão Intradia 1 DPR (%)	Precisão Intradia 2 DPR (%)	Precisão Interdia DPR (%)
25B-NBOH	4	6,79	10,8	8,68
	80	4,67	5,05	6,33
25B-NBMe	4	7,94	5,94	9,10
	80	2,50	4,02	3,21
25C-NBOH	4	11,2	12,9	11,4
	80	4,29	5,12	4,48
25C-NBOMe	4	8,89	8,20	8,16
	80	3,07	3,58	3,14
25I-NBOH	4	14,8	8,65	11,50
	80	2,76	1,13	2,06
25I-NBOMe	4	10,4	13,9	11,3
	80	6,86	7,14	6,78
LSD	4	10,8	6,78	8,64
	80	2,41	3,76	5,54
Furanilfentanilo	4	17,4	7,47	12,7
	80	2,81	4,15	4,66

Tabela 4.4 - Resultados dos estudos de exatidão intra e interdias para os níveis baixo (4 µg L^{-1}) e alto (80 µg L^{-1}) para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.

Analito	Níveis (µg L^{-1})	Exatidão Intradia 1 (%)	Exatidão Intradia 2 (%)	Exatidão Interdia (%)
25B-NBOH	4	2,58	5,30	3,94
	80	0,31	8,26	7,57
25B-NBMe	4	2,31	8,90	3,29
	80	4,88	5,85	6,34
25C-NBOH	4	7,54	5,19	6,37
	80	5,57	4,45	6,65
25C-NBOMe	4	5,95	3,58	4,76
	80	6,82	7,01	4,96
25I-NBOH	4	1,71	2,70	2,23
	80	3,15	2,11	13,4
25I-NBOMe	4	4,01	3,27	3,63
	80	1,09	4,08	8,81
LSD	4	9,93	14,1	12,0
	80	4,14	1,53	6,47
Furanilfentanilo	4	6,52	4,89	5,71
	80	7,93	2,15	15,6

Figura 4.8 – Curvas a analíticas para a extração de drogas de abuso em “blotter papers”.

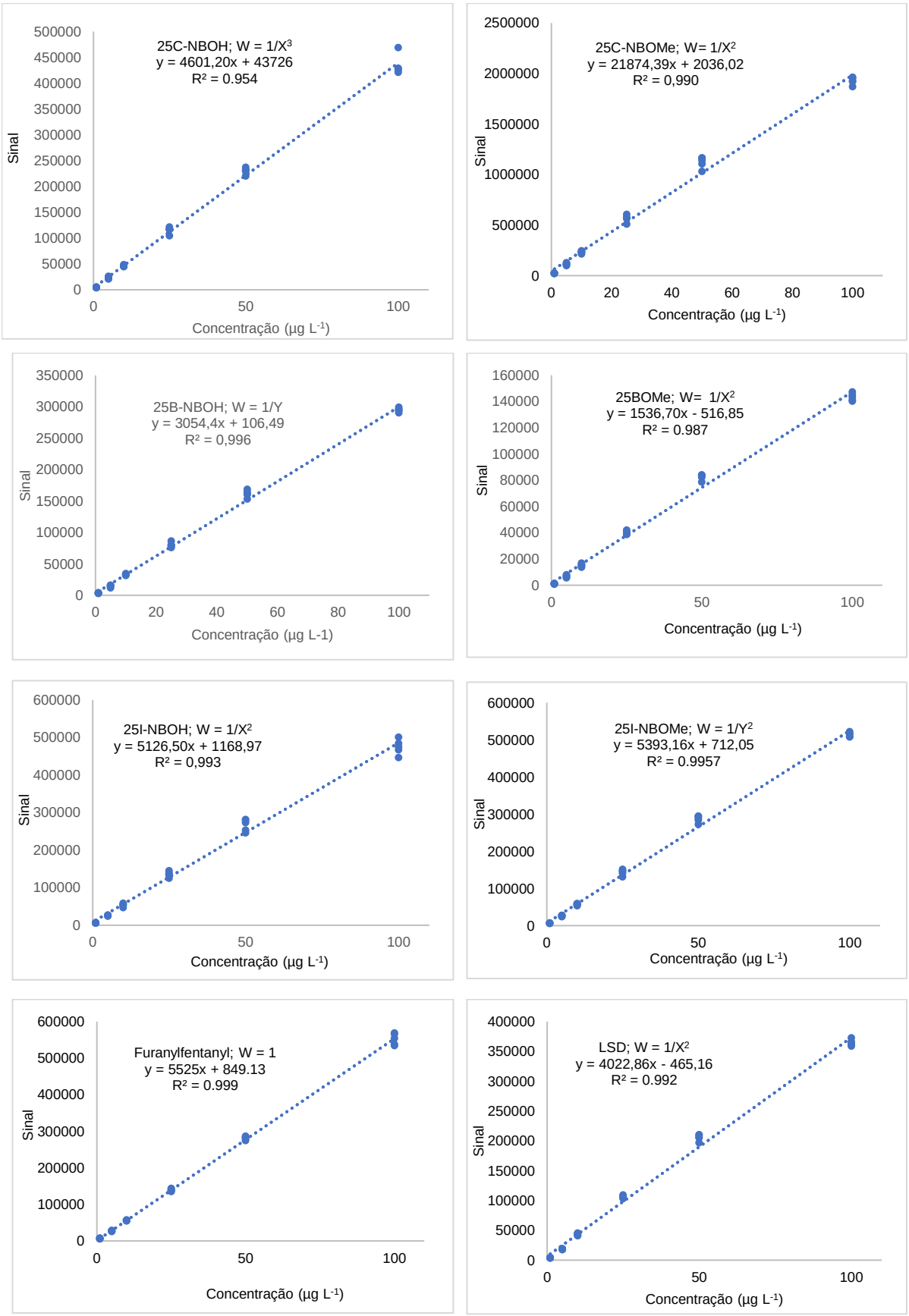
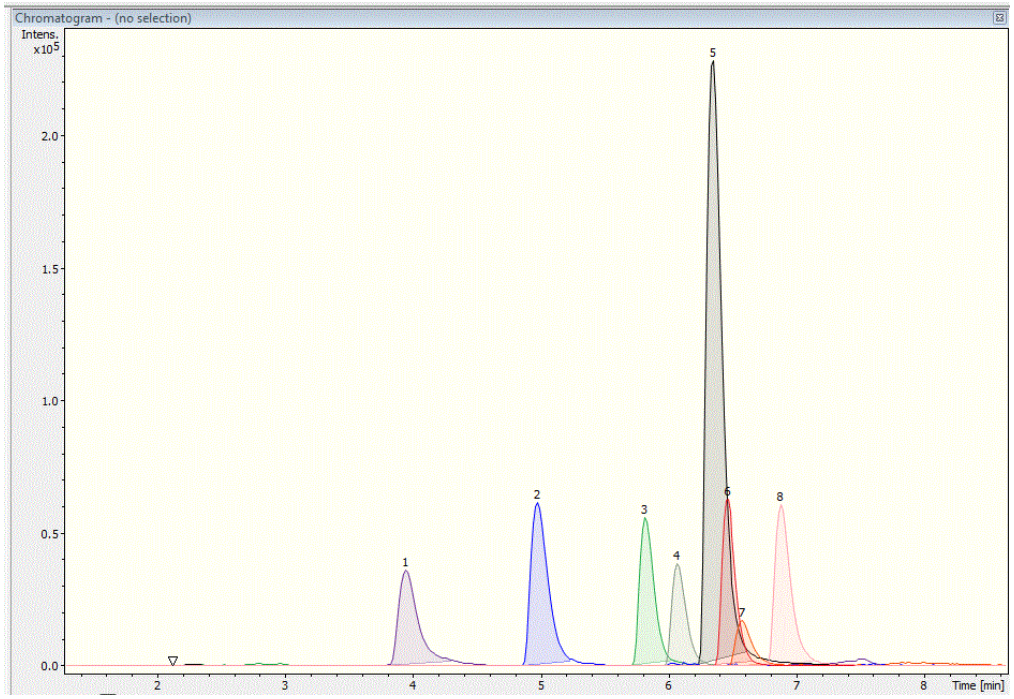


Figura 4.9 - Cromatograma característico do ponto de 100 µg L^{-1} das curvas de calibração. (1) 25B-NBOH (2) furanilfentanilo; (3) 25C-NBOH; (4) 25C-NBOMe; (5) 25C-NBOMe; (6) 25I-NBOH; (7) LSD; (8) 25I-NBOMe.



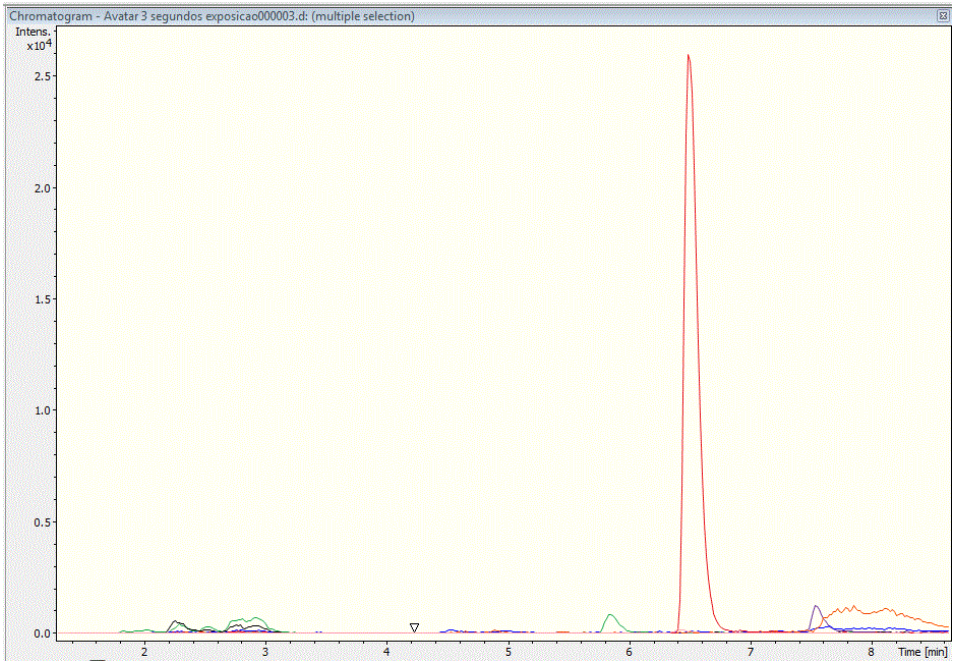
3.3.2 Análises de amostras reais

Com o método desenvolvido e otimizado, foram analisadas três amostras fornecidas pelo LTA-CIATox de Campinas, da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. As amostras eram suspeitas de conter drogas de abuso e se diferenciavam entre elas por desenhos do Avatar, Beatles e sol (ver figura 4.10). Nas três amostras foi detectado apenas o íon de relação massa carga *m/z* 414,0554, que corresponde à forma protonada para o 25I-NBOH, confirmando-se a presença de drogas de abuso nas amostras analisadas. Na Figura 4.11 é apresentado o cromatograma obtido para amostra com o desenho do Avatar, para as outras duas amostras o cromatograma obtido foi similar.

Figura 4.10 - Fotografia dos “*blotter papers”* analisados. (A) Avatar; (B) Beatles; (C) sol. (20)

Fonte: D. de Morais, 2017

Figura 4.11 - Cromatograma obtido *para a extração de drogas de abuso* para a amostra com o desenho do Avatar.



4. Conclusões

Um método automatizado para a análise qualitativa de oito drogas de abuso em “*blotter papers*” foi desenvolvido. Embora o objetivo deste trabalho não fosse desenvolver um método quantitativo, algumas figuras de mérito como seletividade, linearidade, precisão e exatidão (intra e interdias) foram avaliadas, pois a configuração analítica desenvolvida pode ser empregada também em uma análise quantitativa. Finalmente, o método foi aplicado na análise de três amostras reais.

O método desenvolvido demonstrou ser sensível a diferentes concentrações, consequentemente, tem potencial para ser empregado na análise qualitativa e quantitativa de drogas de abuso em “*blotter papers*” ou de outros analitos em matrizes como sangue e urina. Além disso, o método tem precisão e exatidão adequada para análises toxicológicas.

O acoplamento do motor de vibração ao robô cartesiano permitiu melhorar consideravelmente a extração dos analitos. No caso das drogas de abuso a concentração dos analitos é elevada e o uso do motor pode não ser tão significativo, porém, no caso de analitos em outras matrizes e em baixas concentrações, o uso do motor de vibração pode resultar em limites de quantificação e detecção consideravelmente menores.

O método desenvolvido também apresentou uma elevada frequência analítica permitindo analisar até 4,5 amostras por hora; assim, pode ser uma alternativa real para a análise de rotina em laboratórios de análises químicas. Uma vez mais foi demonstrado que é possível empregar-se a robótica de código aberto para desenvolver estratégias analíticas confiáveis, rápidas e de baixo custo.

Referências

1 ARANTES, L. C. JUNIOR, L.F.; SOUZA, L.F.; CARDOSO, A.C.; ALCANTARA, T.L.F.; LIÃO, Y.; LORDEIRO, J.C.; ANDRADE, A.F.B. 25I-NBOH: a new potent serotonin 5-HT2A receptor agonist identified in blotter paper seizures in Brazil. **Forensic Toxicology**, v. 35, n. 2, p. 408–414, 2017.

2 BARBOSA, L. DE M.; SANTOS, J. M.; DE MORAIS, D. R.; NIMTZ, A. V.; EBERLIN, M. N.; DE OLIVEIRA, M. F.; COSTA, J. L. Fast UHPLC–MS/MS method for analysis of furanylfentanyl in different seized blotter papers. **Drug Testing and Analysis**, n. April, p. 1–6, 2018.

3 BOTCH-JONES, S.; FOSS, J.; BARAJAS, D.; KERO, F.; YOUNG, C.; WEISENSEEL, J. The detection of NBOMe designer drugs on blotter paper by high resolution time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) with and without chromatography. **Forensic Science International**, v. 267, p. 89–95, 2016.

4 MCGONIGAL, M. K.; WILHIDE, J. A.; SMITH, P. B.; ELLIOTT, N. M.; DORMAN, F. L. Analysis of synthetic phenethylamine street drugs using direct sample analysis coupled to accurate mass time of flight mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 275, p. 83–89, 2017.

5 CHIANG, C. H.; LEE, H. H.; CHEN, B. H.; LIN, Y. C.; CHAO, Y. Y.; HUANG, Y. L. Using ambient mass spectrometry and LC–MS/MS for the rapid detection and identification of multiple illicit street drugs. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 2, p. 439–450, 2019.

6 MAGALHÃES, L. DE O.; ARANTES, L. C.; BRAGA, J. W. B. Identification of NBOMe and NBOH in blotter papers using a handheld NIR spectrometer and chemometric methods. **Microchemical Journal**, v. 144, n. August 2018, p. 151–158, 2019.

7 PEREIRA, L. S. A.; LISBOA, F. L. C.; NETO, J. C.; VALLADÃO, F.; SENA, M. Direct classification of new psychoactive substances in seized blotter papers by ATR-FTIR and multivariate discriminant analysis. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 96–103, 2017.

8 COELHO NETO, J. Rapid detection of NBOME’s and other NPS on blotter papers by direct ATR-FTIR spectrometry. **Forensic Science International**, v. 252, p. 87–92, 2015.

9 MEDINA, D. A. V.; CABAL, L. F. R.; LANÇAS, F. M.; SANTOS-NETO, Á. J. Sample treatment platform for automated integration of microextraction techniques and liquid chromatography analysis. **HardwareX**, v. 6, p. 1–16, 2019.

10 MEDINA, D. A. V.; CABAL, L. F.R; TITATO, G. M.; LANÇAS, F. M.; SANTOS-NETO, Á. J. Automated online coupling of robot-assisted single drop microextraction and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1595, p. 66–72, 2019.

11 TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculus de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

12 VERA CANDIOTI, L.; DE ZAN, M. M.; CÁMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014.

13 VAN GYSEGHEM, E.; JIMIDAR, M.; SNEYERS, R.; REDLICH, D.; VERHOEVEN, E.; MASSART, D. L.; VANDER HEYDEN, Y. Orthogonality and similarity within silica-based reversed-phased chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, n. 1–2, p. 117–131, 2005.

14 RESANO, M.; BELARRA, M. A.; GARCÍA-RUIZ, E.; ARAMENDÍA, M.; RELLO, L. Dried matrix spots and clinical elemental analysis. Current status, difficulties, and opportunities. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 99, p. 75–87, 2018.

15 JOYE, T.; SIDIBÉ, J.; DÉGLON,J.; KARMINE, A.; SPORKET, F.; WIDMER, C.; FAVRAT, B.; LESCUYER, P.; AUGSBURGER, A. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for broad-spectrum drug screening of dried blood spot as microsampling procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 1063, p. 110–116, 2019.

16 MERCOLINI, L.; MANDRIOLI, R.; SORELLA, V.; SOMAINI, L.; GIOCONDI, D.; SERPELLONI, G.; RAGGI, M. A. Dried blood spots: Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of Δ9-tetrahydrocannabinol and its main metabolites. **Journal of Chromatography A**, v. 1271, n. 1, p. 33–40, 2013.

17 SAUSSEREAU, E.; LACROIX, C.; GAULIER, J. M.; GOULLE, J. P. On-line liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocainics and amphetamines in dried blood spots. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 885–886, p. 1–7, 2012.

18 ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 774, n. 2, p. 215–222, 2002r.

19 KISER, M. M.; DOLAN, J. W. Selecting the Best Curve Fit. **LCGC**, v. 22, n. 2, p. 2–5, 2004.

20 DE MORAIS, D. R.; BARBOSA, I. L.; CUNHA, K. F.; TRIPODI, G. L.; ANGOLINI, C. F. F.; FRANCO, M. F.; DE AQUINO, E. M.; EBERLIN, M. N.; COSTA, J. L. EASI-IMS an expedite and secure technique to screen for 25I-NBOH in blotter papers. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 10, p. 701–706, 2017.

Capítulo 5

Conclusão geral

Conclusão Geral

A automatização das técnicas de preparo de amostra apresentadas neste trabalho permitiu estudar configurações analíticas que podem ser empregadas como alternativas às extrações manuais. Esse, por exemplo, é o caso da extração por SDME dinâmica, onde foi demonstrado que o uso de ciclos de extração em combinação com gotas de grande porte permite melhorar a eficiência da extração. Assim, o desenvolvimento de processos automatizados utilizando robôs facilita procedimentos que podem ser, muitas vezes, tediosos. Esse desenvolvimento deve ser combinado com o adequado projeto dos dispositivos de extração visando atender às necessidades de cada técnica, permitindo assim a evolução das técnicas miniaturizadas de preparo de amostra.

O acoplamento do robô cartesiano com os equipamentos de cromatografia líquida permitiu que técnicas como a HF-LPME apresentassem precisão e exatidão adequada para uma análise toxicológica e, ao mesmo tempo, uma alta frequência analítica. Assim, essas técnicas que se caracterizam pelo baixo custo e baixo consumo de solvente orgânico podem, com auxílio da automatização, ser uma realidade no dia a dia dos laboratórios de análise.

Empregando-se ferramentas de robótica de código aberto, dispositivos eletrônicos e usando-se ferramentas analíticas como a espectrometria de massas de alta resolução, foi possível desenvolver uma estratégia analítica que pode ser empregada na detecção e na quantificação de diversos analitos em diversas matrizes, tudo isso empregando-se a abordagem "*Dried Matrix Spot".*

Publicações no período

1 CABAL, L. F. R; VARGAS MEDINA, D. A.; MARTINS LIMA, A.; LANÇAS, F. M.; SANTOS-NETO, Á. J. Robotic-assisted dynamic large drop microextraction. **Journal of Chromatography A**, n. xxxx, p. 460416, 2019. doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460416

2 MEDINA, D. A. V.; CABAL, L. F. R.; TITATO, G. M.; LANÇAS, F. M.; SANTOS-NETO, Á. J. Automated online coupling of robot-assisted single drop microextraction and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1595, p. 66–72, 2019. /doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.036

3 MEDINA, D. A. V.; CABAL, L. F. R.; LANÇAS, F. M.; SANTOS-NETO, Á. J. Sample treatment platform for automated integration of microextraction techniques and liquid chromatography analysis. **HardwareX**, v. 6, p. 1–16, 2019. doi.org/10.1016/j.ohx.2019.e00056

4 MEDINA, D. A. V.; CABAL, L. F. R.; SARTORE, D. M.; LIMA, A. M.; SANTOS, Á. J. DOS. Solventes supramoleculares: Uma alternativa na microextração em fase líquida para análises cromatográficas. **Scientia Chromatographica**, v. 9, n. 2, p. 83–100, 2017. doi.org/10.4322/sc.2015.000

Trabalhos submetidos

CABAL, L. F. R; VARGAS, D. A.; COSTA, J. L.; LANÇAS, F. M.; SANTOS-NETO, Á. J. Determination of ring-substituted amphetamines through automated online hollow fiber liquid phase microextraction-liquid chromatography. **Analytical & Bioanalytical Chemistry.** 2019