

Scientia Chromatographica

Revista Trimestral do Instituto Internacional de Cromatografia

2012 | Volume 4 | Número 3



Novo Cromatógrafo a gás modular

O novo TRACE 1300 Series GC da Thermo Scientific é o primeiro e único cromatógrafo a gás com injetores e detectores que podem ser trocados pelo usuário através de conexões instantâneas. Esta característica exclusiva torna o TRACE 1300 um sistema capaz de satisfazer todas as necessidades do laboratório de forma simples e eficiente. Seu projeto modular facilita o acesso aos injetores e detectores, elimina a necessidade de interrupção das atividades para manutenção e permite ao usuário configurar rapidamente o instrumento conforme suas aplicações específicas e rotina diária. Conheça o desempenho e a produtividade incomparáveis do sistema TRACE 1300 Series GC

redefinindo a usabilidade do GC

• veja a melhor escolha para cromatografia a gás em: www.thermoscientific.com/trace1300



Trace GC 1300 Series

Eficiência incomparável para aplicações de rotina

- Injetores e detectores modulares, de conexão instantânea
- Fácil implementação de métodos
- Injetor com robustez inigualável
- Detector com sensibilidade excepcional
- Instrumento controlado por Chromeleon™ CDS



Exemplo de instalação de um módulo de conexão instantânea pelo usuário

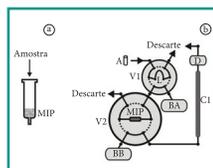


Com ferramentas extremamente funcionais e de fácil operação, o Chromeleon 7 é simplesmente inteligente



As colunas e os demais consumíveis da Thermo Scientific garantem qualidade e a produtividade do seu novo GC

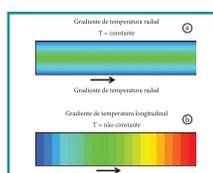
Editorial 159



PREPARO DE AMOSTRAS

Emprego de polímeros de impressão molecular em preparo de amostras para análise de compostos orgânicos: aplicações e tendências 161

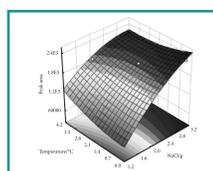
Mariane Gonçalves Santos, Lailah Cristina de Carvalho Abrão, Lissara Aparecida de Souza Freitas, Gabriel de Oliveira Isac Moraes, Marcela Marília de Lima, Eduardo Costa Figueiredo



CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (HPLC)

UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes..... 197

Liane Maldaner, Isabel Cristina Sales Fontes Jardim



CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)

Determination of benzene in beverages by solid-phase microextraction and gas chromatography..... 209

André B. Sanchez, Dilma Budziak, Edmar Martendal, Eduardo Carasek



QUALIDADE

Desvendando a medição nos ensaios químicos: 2. A Rastreabilidade da Medida 217

Oscar Bahia Filho, Patrícia Regina Prada, Carla Meneghesso, Fernando Mauro Lanças



PREPARO DE AMOSTRAS

Extração em fase sólida dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos 227

Liziara da Costa Cabrera, Manoel Leonardo Martins, Ednei Gilberto Primel, Osmar Damian Prestes, Martha Bohrer Adaime, Renato Zanella

Informação para Autores 241

HRGC

Colunas para Cromatografia Gasosa
feitas no Brasil 🇧🇷

Fases estacionárias:

NST-1, NST-5, NST-624, NST-1701, NST-50, NST-225,
NST-100, NST-FFAP, NST-VOC, NST-BIS.

Comprimento:

Todos desde 1m até 100m.

Diâmetro Interno:

0,53mm; 0,32mm; 0,25mm; 0,22mm; 0,20mm; 0,18mm;
0,15mm; 0,10mm; 0,05mm.

Espessura de Filme:

Qualquer tamanho desde 0,01µm até 5,00µm.

Colunas Empacotadas:

Empacotamos colunas em aço inox e vidro com uma
grande variedade de fases estacionárias, comprimentos
e diâmetros internos.



Representantes Sudeste:
CMS Instrumentos Analíticos Ltda.
www.cmscientifica.com.br
TEL: 19 3812.9222
cms@cmscientifica.com.br
Cosmópolis SP - Brasil

Representantes Centro-Oeste:
JPChrom Com. de Prod. Lab. Ltda.
TEL: 61 8114.1800
junior.jpchrom@gmail.com
Brasília DF - Brasil

Demais Regiões:
www.nstonline.com.br
TEL: 16 3376.9914
info@nstonline.com.br
São Carlos SP - Brasil

nst
Nano Separation Technologies

Com o lançamento do *Scientia Chromatographica*, durante o COLACRO XII (2008), a comunidade Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (Espectrometria de Massas, Preparo de Amostras, Técnicas Eletroforéticas e outras) ganhou seu primeiro periódico na área. Com um corpo de co-Editores de primeiríssima grandeza, e com a participação de um corpo editorial de consultores internacionais de reconhecida competência, o *Scientia* rapidamente firmou-se como um periódico diferente e de excelência na América Latina. Esta qualidade foi assegurada pelos co-Editores, os quais ficaram responsáveis até o presente pela geração dos trabalhos e/ou convite a pesquisadores de destaque em suas áreas para submeterem trabalhos para publicação.

A partir do próximo ano, no volume 5 do *Scientia*, passamos a publicar também artigos provenientes da comunidade de usuários em geral, de maneira a tornar o periódico mais amplo em seu escopo e divulgar trabalhos de pesquisadores de outros grupos, formações e áreas de atuação. As normas resumidas para publicação estão contidas no final deste número; as normas detalhadas podem ser obtidas através de contacto com o *Scientia*. Aguardamos seu trabalho para avaliação pelos nossos editores e assessores.

Esperamos, com esta nova ampliação, atingir um público ainda maior de usuários da técnica, sempre visando levar a todos um periódico de alta qualidade e atual.

Críticas e sugestões serão bem recebidas pelos Editores e, sempre que possível, as soluções serão implementadas.

Fernando M. Lanças
Editor chefe

Scientia Chromatographica

O Scientia Chromatographica abre oportunidade para pesquisadores de todo o Brasil publicarem seus trabalhos no periódico.

Como funciona:

1

Pesquisadores de todo o Brasil que trabalham na área de cromatografia podem submeter seus trabalhos.



2

O Corpo Editorial do Scientia analisará os trabalhos submetidos.



3

Os trabalhos aprovados serão publicados no Scientia.



Informações:

periodico@scientiachromatographica.com



Uma publicação do
INSTITUTO INTERNACIONAL DE CROMATOGRÁFIA
www.iicweb.org

Emprego de polímeros de impressão molecular em preparo de amostras para análise de compostos orgânicos: aplicações e tendências

Mariane Gonçalves Santos, Lailah Cristina de Carvalho Abrão,
Lissara Aparecida de Souza Freitas, Gabriel de Oliveira Isac Moraes,
Marcela Marília de Lima, Eduardo Costa Figueiredo*

*Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos – LATF, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Cep 37130-000, Alfenas, MG, Brasil
e-mail: eduardocfig@yahoo.com.br*

Resumo

Os polímeros de impressão molecular são materiais sintéticos dotados de sítios específicos de reconhecimento. Esses materiais são obtidos por reações de polimerização que fixam, estrategicamente, monômeros funcionais ao redor de uma molécula modelo de acordo com os grupos ligantes e com a estereoquímica de ambas as moléculas. Os MIPs têm sido amplamente empregados em procedimentos de preparo de amostras, como extração e microextração em fase sólida, extração sortiva em barra de agitação, extração com adsorvente magnético, microextração com sorvente empacotado, entre outras. Este artigo de revisão tem como objetivo apresentar o que há de mais recente no emprego de MIP para extração de compostos orgânicos, evidenciando as vantagens de cada aplicação, bem como as mais promissoras tendências que sustentam a evolução e o aperfeiçoamento de cada técnica.

Palavras-chave

Polímeros de impressão molecular; MIP; preparo de amostras.

Molecularly imprinted polymers in sample preparation for organic compounds analysis: applications and trends

Abstract

Molecularly imprinted polymers are synthetic materials with molecular recognition ability. These materials are obtained by polymerization reactions that fix the functional monomers around the template molecule according with the binding groups and the stereochemistry of both molecules. The MIPs have been extensively used in several applications with emphasis for sample preparation procedures as solid phase extraction, solid phase microextraction, extraction by magnetic sorbents, microextraction by packed sorbent among others. So, the objective of this review is to present the novelty in MIP use for organic compounds extraction and point out the advantages of each application, as well as what is most promising in the evolution and improvement of each technique.

Keywords

Molecularly imprinted polymers; MIP; sample preparation.

1 Introdução

O preparo de amostras certamente é a etapa mais importante do processo analítico, principalmente porque é a maior fonte de erros de imprecisão e inexatidão^[1]. Essas técnicas têm como objetivos extrair, isolar e concentrar os analitos de interesse, transferindo-os para um meio que possa ser introduzido diretamente no sistema analítico^[2]. Um preparo de amostra ideal deve agregar características tais como: eliminação de interferentes da matriz, perda mínima da amostra, pré-concentração do analito, boa recuperação, compatibilidade com a técnica de detecção, simplicidade, robustez, reprodutibilidade, rapidez e, preferencialmente, baixo custo^[2]. Levantamentos realizados na década de 90 mostraram que o preparo de amostras é responsável por consumir pelo menos 61% do tempo total de uma análise, e mais de 80% desse tempo quando em associação com a etapa de amostragem^[1,3].

Apesar dos avanços alcançados no desenvolvimento de equipamentos analíticos de alta eficiência, é possível observar que o preparo de amostras ainda é pouco explorado quando comparado com as demais etapas analíticas. A complexidade e a presença de muitos concomitantes na matriz (muitas vezes em concentrações maiores do que a das substâncias de interesse) fazem com que o pré-tratamento seja indispensável e deveras difícil^[4-6].

O preparo de amostras pode ser classificado em exaustivo ou não exaustivo, de acordo com a forma usada para extrair os analitos da matriz. O processo exaustivo tem como objetivo a remoção completa dos analitos e sua transferência para a fase extratora. As técnicas não exaustivas são baseadas em princípios de equilíbrio, uma vez que a capacidade da fase extratora é pequena e insuficiente para a completa remoção dos analitos^[7].

As técnicas de preparo de amostras mais usualmente utilizadas são: extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase líquida (LPME), microextração em fase sólida (SPME), *headspace*, extração em fluido supercrítico (SFE), extração sorotiva com barras de agitação (SBSE), entre outras. Contudo, apesar de se mostrarem eficientes, estas técnicas convencionalmente podem apresentar pouca seletividade quando empregam sorventes convencionais. Além disso, as técnicas miniaturizadas como LPME e SPME normalmente apresentam baixa capacidade de pré-concentração devido à pequena quantidade de sorvente, prejudicando a identificação e a quantificação das substâncias de interesse^[8-10].

Uma possibilidade bastante explorada nas últimas décadas para solucionar estes problemas é a utilização de polímeros molecularmente impressos (MIPs). Os MIPs são considerados sorventes dotados de seletividade melhorada para certa substância ou para um grupo de substâncias estruturalmente semelhantes^[11]. A história da impressão molecular teve início com os experimentos de Polyakov^[12] em 1931, que conseguiu demonstrar que a seletividade molecular poderia ser impressa em sílica gel por pré-tratamento do ácido silícico com adsorbatos orgânicos antes de sua policondensação. Mais tarde Dickey, nas décadas de 1940 e 1950,^[13,14] realizou investigações mais extensas. Dickey precipitou ácido silícico na presença de corantes alquilo e descobriu que, após a secagem do hidrogel e removendo o excesso dos agentes impressores, o que resultou foi um xerogel com uma capacidade de adsorção grandemente aumentada para o corante em questão. Os polímeros orgânicos apareceram pela primeira vez na década de 1970, quando polímeros de vinila foram impressos covalentemente por Wulff e Sarhan^[15]. A impressão não covalente, como é

conhecida nos dias atuais, foi introduzida uma década depois, com a publicação de trabalhos sobre aplicações generalizadas dos MIPs em muitos campos diferentes^[16,17]. Desde então foi possível observar um enorme crescimento no número de publicações referentes ao uso dos MIPs, principalmente a partir da década de 1990, quando este crescimento passou a ser exponencial^[18].

Os MIPs são materiais rígidos e tridimensionais sintetizados ao redor de uma molécula modelo (MM) por meio de ligações covalentes ou não covalentes. Os sítios de reconhecimento são obtidos pelo arranjo de monômeros funcionais (MFs) polimerizáveis ao redor da MM. Os complexos são fixados através de reações de entrecruzamento de polímeros e, após a remoção da MM da matriz polimérica, os sítios específicos de reconhecimento são expostos, exibindo afinidade à MM (Figura 1)^[19-24].

Desde que o primeiro trabalho sobre MIPs para extrações em fase sólida (MISPE) foi apresentado por Sellergren em 1994,^[25] diversos artigos que tratam da utilização de MIPs no preparo

de amostras têm sido publicados para a análise de vários tipos de matrizes como fluidos biológicos, amostras de alimentos, amostras ambientais, entre outras.

Nos métodos bioanalíticos, os MIPs vêm sendo utilizados para o isolamento e pré-concentração de uma grande variedade de analitos em fluidos biológicos, tais como urina, saliva, soro, plasma^[19,26-28] e amostras de tecido, como cabelo e fígado^[29,30]. O primeiro exemplo de aplicação de MIPs em análise de amostras biológicas foi relatado por Sellergren^[25] para determinação de pentamidina em urina. Desde então, ficou claro que uma otimização cuidadosa de todas as variáveis de extração é indispensável para o sucesso do uso de MIPs em preparo de amostras.

Em análises ambientais, os polímeros impressos têm sido empregados para a extração de praguicidas, produtos farmacêuticos, compostos fenólicos, entre outros, em amostras de água, sedimento e solo^[31-34]. O primeiro trabalho que descreveu este tipo de aplicação dos MIPs

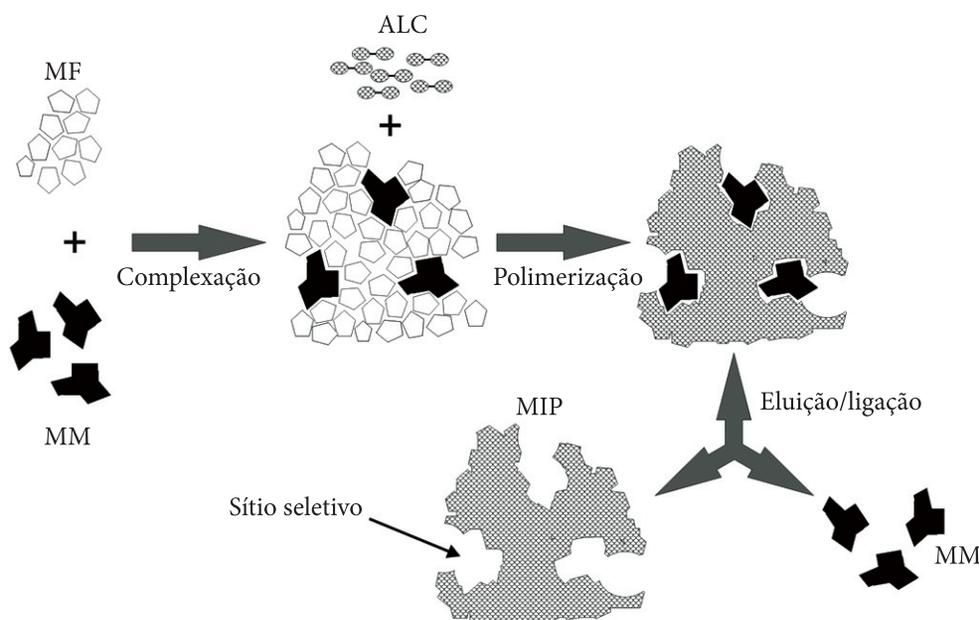


Figura 1 Esquema genérico da síntese de MIP: MF: monômero funcional; MM: molécula modelo; e ALC: agente de ligação cruzada.

relata a extração de seis clorotiazinas em amostras de água subterrânea e sedimento, utilizando um polímero impresso com terbutilazina^[35,36].

O uso de MIPs para análise de amostras de alimento ainda representa uma pequena fração em número de publicações quando comparado a análises de amostras biológicas e ambientais. Entretanto, espera-se que haja um aumento significativo dessa aplicação em virtude das já bem comentadas vantagens da utilização dos MIPs em amostras complexas. Contudo, cabe destacar alguns procedimentos de extração em fase sólida molecularmente impressa nesse tipo de matriz, incluindo: análise de praguicidas, fármacos, compostos fenólicos e toxinas em matrizes como leite, vinho, cereais, frutas, frutos do mar, entre outros^[37-42].

2 Metodologias de síntese

Os processos de síntese dos MIPs mais empregados atualmente são a polimerização por sol-gel e aqueles em que a polimerização ocorre a partir de radicais livres. O processo sol-gel tem como atrativo a combinação de compostos orgânicos e inorgânicos dando origem a uma nova classe de materiais com diferentes propriedades. Sua rota de síntese é baseada em uma transição do sistema sol (dispersão de partículas coloidais estáveis em um fluido) para um sistema gel (sistema formado por estruturas rígidas de partículas coloidais ou cadeias poliméricas). Esta metodologia de síntese vem se popularizando e tem sido empregada em polímeros para análise de amostras ambientais, fluidos biológicos e alimentos através de diferentes técnicas de extração^[43].

A formação de compostos tridimensionais pelo processo sol-gel se dá através de precursores que podem ser moléculas trifuncionais, como MeSi(OR)_3 ou tetrafuncionais, como

Si(OR)_4 , que em presença de umidade, oriundo do ar ou da própria água, sofrem uma reação de hidrólise, gerando grupos silanóis. Em seguida, ocorrem reações de condensação destes grupos silanóis com alcóxidos ($-\text{SiOR}$) ou outros silanóis ($-\text{SiOH}$), liberando álcool (R-OH) ou H_2O , respectivamente. Estas reações podem ser aceleradas por catalisadores à base de sais de alquil estanho, por exemplo. Neste processo, quando o precursor do sol-gel é um sal, a reação ocorre entre ele e o solvente, que geralmente é polar. Quando o precursor é um alcóxido metálico, é acrescentado um MF ao processo, dando especificidade aos sítios de ligação. O tetraetilortossilicato (TEOS)^[44-47] merece destaque por ser o reagente mais utilizado na síntese de MIPs pelo processo sol-gel^[43,48,49].

A síntese a partir de radicais livres, sem dúvida, é a mais utilizada para a obtenção dos MIPs. Neste sentido, há três diferentes abordagens: a covalente, a não covalente e a semicovalente. Na primeira abordagem, ocorrem ligações covalentes reversíveis entre a MM e o MF. A retirada da MM ocorre pela clivagem das ligações correspondentes. A forte ligação entre a MM e o MF é a principal vantagem desta forma de síntese, o que garante uma maior seletividade ao material, porém, dificulta o processo de eluição dos analitos, sendo necessário, em muitos casos, procedimentos drásticos de hidrólise^[36].

A síntese não covalente ocorre a partir da formação de interações relativamente fracas (ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas etc.) entre a MM e o MF. Ela oferece a possibilidade de aplicação para analitos que pertençam a uma mesma classe e, devido à facilidade de eluição dos compostos de interesse, tem sido extensamente utilizada para o preparo de amostras. Contudo, os polímeros obtidos oferecem uma menor seletividade quando comparados àqueles que foram obtidos pela síntese covalente^[50].

Buscando as vantagens que essas duas abordagens oferecem, foi criada a síntese semicovalente, que estabelece que o processo de polimerização seja mediado por ligações covalentes, garantindo maior seletividade, enquanto as demais interações, durante a utilização do material, sejam estabelecidas por ligações não covalentes, facilitando assim o processo de eluição^[51].

A abordagem não covalente é a mais empregada quando falamos de MIPs utilizados no preparo de amostras. A síntese acontece da junção de alguns componentes como a MM, o MF, o agente de ligação cruzada, o iniciador radicalar e o solvente porogênico. A escolha desses reagentes deve ser bem estudada, pois a qualidade do produto final é determinante para que haja seletividade. Ao se definir a molécula modelo e o monômero funcional, é necessário observar e estimar as possíveis interações intermoleculares que ocorrerão entre eles, a fim de que estas sejam favoráveis à retenção seletiva do analito. Relatos recentes apontam o ácido metacrílico (MAA)^[52-57] e a 4-vinilpiridina (4-VP)^[55,58] como os MFs mais utilizados. Os agentes de ligação cruzada (ALC) são os responsáveis pelo caráter tridimensional dos MIPs. Os mais utilizados são o divinilbenzeno (DVB)^[54] e o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA)^[52-55]. O iniciador radicalar é o responsável pelo início da polimerização. Esta pode ocorrer por um processo termoquímico e/ou fotoquímico. O mais empregado é o azoisobutironitrila (AIBN)^[52-58]. Com relação ao solvente utilizado, é importante lembrar que ele deve solubilizar os reagentes sem que haja reação entre eles. Neste contexto, destaque para o tolueno, metanol e clorofórmio, que são os mais utilizados^[43].

Devido ao baixo reconhecimento molecular em meio aquoso, diferentes estratégias são utilizadas para que materiais sintetizados com solventes porogênicos orgânicos apresentem boa

recuperação durante sua utilização em matrizes aquosas. Dessa forma, são apresentadas três metodologias de síntese: *in bulk*, por precipitação e por suspensão^[43].

A primeira e mais utilizada é a polimerização *in bulk*. Nesta metodologia, os reagentes são colocados em uma ampola de vidro que é lacrada, formando no final da síntese um monólito que vai ser macerado, tamisado e lavado para a retirada da MM. Devido à necessidade de maceração, as partículas finais apresentam tamanho homogêneo, porém, formato irregular^[43]. Relatos na literatura apresentam a utilização deste tipo de polimerização para a obtenção de MIPs empregados em diversas técnicas de preparo de amostras, tais como SPE, SPME, entre outras^[52,53,59].

Outro tipo de síntese radicalar é a que ocorre por precipitação. Ela se diferencia da síntese *in bulk* pelo grande volume do solvente porogênico empregado. O procedimento ocorre sob agitação e os polímeros apresentam tamanhos e formatos mais uniformes^[43]. Algumas variantes da síntese por precipitação têm sido empregadas, como, por exemplo, a polimerização controlada (RAFT). Como vantagem, ela apresenta a possibilidade de controle do início, término e da velocidade da síntese por meio do uso de um controlador^[55]. Um MIP para atrazina foi sintetizado pelo processo de RAFT utilizando nanopartículas de sílica, MAA, EGDMA, AIBN, acetonitrila e o agente controlador. O material apresentou morfologia mais uniforme e uma maior capacidade de ligação quando comparado aos MIPs obtidos por precipitação tradicional^[54]. Já em outro trabalho, um MIP, também obtido pelo processo de RAFT, foi sintetizado empregando-se um monômero hidrofílico, visando sua utilização em meio aquoso. Neste estudo, o herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético foi usado como MM. Os demais reagentes foram 4-VP, EGDMA, AIBN, metanol

e o controlador cumil ditiobenzoato (CDB). O precipitado obtido foi lavado e a síntese foi reiniciada acrescentando-se hidroxietil metacrilato (HEMA) e AIBN. Houve formação da camada hidrofílica desejada no material, possibilitando sua utilização em matrizes aquosas, sem perda de reconhecimento molecular^[55].

Já na síntese por suspensão, a reação polimérica ocorre dentro de gotas do monômero dispersas em uma fase contínua. Essas gotas ou micelas são estabilizadas por um surfactante colocado nesse meio reacional em que ocorre a polimerização^[43,48]. Como a fase contínua para a suspensão geralmente é água, existe a tendência do enfraquecimento das ligações eletrostáticas e ligações de hidrogênio que ocorrem entre a molécula modelo e o monômero funcional. Para solucionar este inconveniente, já existem relatos de suspensões que substituem a água por outros reagentes na busca de um melhor reconhecimento da molécula^[43,48]. O formato e o tamanho do MIP obtido ao final da síntese vão depender do tamanho da micela formada. Assim, a síntese de um MIP para análise de propranolol em plasma foi proposta utilizando-se MAA, trimetilpropano trimetacrilato (TRIM), AIBN e acetônitrila. Essa mistura foi colocada num frasco com óleo mineral. Posteriormente, ela foi agitada em dispersor automático e a polimerização ocorreu em um reator. Os pequenos monólitos formados foram pulverizados e tamisados para utilização^[56]. Para análise de anti-histamínicos em água, um procedimento similar foi adotado por Walsh et al., tendo como único diferencial o acréscimo de água no meio reacional^[57]. A síntese por suspensão também pode ser realizada por intermédio de polímeros com granulometria conhecida, inicialmente colocados nas gotículas da suspensão. Os demais reagentes de síntese são acrescentados passo a passo até o início da polimerização^[60]. Este processo foi empre-

gado na síntese de um polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas (RAM-MIP) para herbicidas. Para isto, uma dispersão de dibutilftalato, dodecil sulfato de sódio e óleo foi preparada. Partículas de poliestireno foram dispersas neste meio. Num segundo momento, 2,2-azobis(2,4-dimetilvaleronitrila), tolueno e álcool polivinílico foram integrados ao meio reacional. Por fim, houve a adição da atrazina (MM), MAA e EGDMA. Para evitar os problemas citados anteriormente com relação à utilização de água no meio reacional, os autores propuseram o recobrimento do MIP por uma camada protetora. Assim, glicidil monometacrilato (GMMA), glicidil dimetacrilato (GDMA) e peróxido dissulfato de potássio, foram acrescentados ao meio reacional, finalizando a síntese. O material obtido apresentou uma morfologia homogênea e, depois de lavado, mostrou-se apto para utilização como fase estacionária em cromatografia líquida^[60].

Finalmente, pode-se constatar que uma metodologia de síntese deve ser selecionada com base nas aplicações dos respectivos polímeros e levando em conta o tipo e a técnica de preparo de amostras^[61].

3 Emprego de MIP no preparo de amostras

3.1 Extração em fase sólida molecularmente impressa – MISPE

Basicamente, duas configurações de MISPE têm sido empregadas para o preparo de amostras, a *off-line* e a *on-line* (Figura 2). Os protocolos *off-line* são bem semelhantes aos procedimentos de SPE convencionais. Tipicamente, uma pequena quantidade de MIP (15-500 mg em média) é empacotada em cartuchos de polietileno ou polipropileno (Figura 2). Em seguida, realizam-se as

etapas de condicionamento, carregamento com amostra, lavagem (quando necessário) e eluição. Depois da extração, o eluato resultante é então introduzido no sistema analítico^[36].

A principal vantagem que os MIPs têm a oferecer para a SPE é uma significativa melhora na seletividade da extração, uma vez que este sorvente fornece uma maior retenção para o analito de interesse do que para o restante dos compostos também presentes na amostra. Muitas vezes os MIPs também podem extrair estruturas estreitamente relacionadas à MM (geralmente compostos da mesma classe) através de um efeito conhecido como seletividade cruzada, o que permite a obtenção de extratos limpos, facilitando assim a quantificação dos analitos de interesse^[11].

Nos últimos anos, tem-se verificado um enorme desenvolvimento de métodos que utilizam a MISPE *off-line* para uma grande variedade de analitos em diversos tipos de amostras (biológicas, ambientais e de alimentos). Javanbakht et al. desenvolveram um método que utiliza a MISPE como técnica de limpeza e pré-concentração combinada com a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (HPLC-UV) para análise de tramadol a partir de amostras de plasma e urina. Neste

estudo, o MIP foi preparado utilizando-se MAA, EGDMA, clorofórmio como solvente porogênico e tramadol como MM. O polímero impresso foi empregado como sorvente para a SPE. Vários parâmetros que afetam a eficiência da extração foram avaliados e as condições ótimas de extração foram otimizadas. A seletividade do MIP foi avaliada através de testes com várias substâncias de estrutura química semelhantes ao tramadol. Os autores conseguiram obter baixos limites de detecção e quantificação, bem como níveis de recuperação satisfatórios^[27].

Em outro estudo, um MIP com seletividade para metocarbamol foi planejado computacionalmente através de estudos de modelagem molecular com base na síntese não covalente por Gholivand & Khodadadian. A biblioteca virtual contava com 18 tipos de MFs diferentes, com os quais foi possível simular a síntese, investigar as possíveis interações entre os monômeros, a MM e o solvente ideal. Com base nos resultados computacionais, o ácido acrílico (AA) e o tetra-hidrofurano foram considerados as melhores opções de escolha como MF e solvente porogênico, respectivamente. O MIP foi então sintetizado pelo método de precipitação e utilizado como adsorvente seletivo para a SPE. Depois da extração, a determinação do metocarbamol em amostras de plasma pôde ser efetuada por voltametria de pulso diferencial (DVP) e HPLC-UV. A determinação por DVP foi mais sensível, mas ambas as técnicas apresentaram precisão e exatidão equivalentes^[28].

Um método utilizando MISPE foi desenvolvido por Yang et al. para análise de níveis de nicotina em cabelo de fumantes e não fumantes por HPLC-UV. O MIP foi sintetizado utilizando-se nicotina como MM e MAA como MF. Este método apresentou boa seletividade e sensibilidade para a nicotina, com limites de detecção e quantificação de $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ e $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$, res-

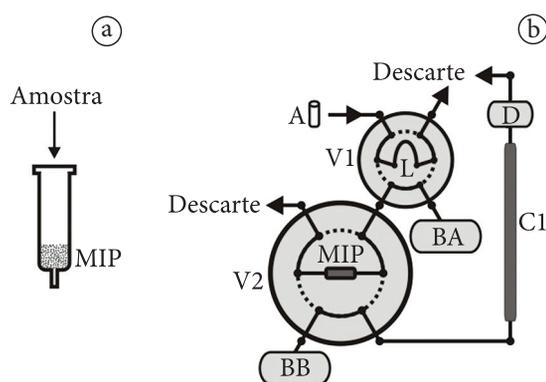


Figura 2 Cartucho de extração em fase sólida usando MIP (a) e sistema on-line de extração em fase sólida usando MIP (b). V1 e V2 são válvulas de 6 vias, A é amostra, BA e BB são bombas, C1 é coluna analítica e L é loop de amostragem.

pectivamente. O método foi linear para a faixa de 0,5-80,0 ng mL⁻¹, com coeficiente de determinação de 0,987. Este ensaio mostrou-se adequado para análise da exposição ao tabaco, com boa exatidão e precisão^[29].

Já Vitor et al. avaliaram a exposição ao tabaco a partir de um método constituído de MISPE e HPLC acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) para análise de cotinina (um metabólito da nicotina) em saliva. As variáveis da extração tais como a quantidade de amostra, condições de condicionamento, lavagem e eluição foram otimizadas. O método mostrou-se linear, com boa precisão, exatidão, robustez e baixos limites de detecção e quantificação. O estudo resultou num método confiável para a determinação de cotinina em saliva, mostrando ser um importante instrumento para acompanhar a exposição à fumaça do cigarro^[26].

Um estudo realizado por Soleimani et al. descreveu a síntese de um MIP utilizando albumina bovina como molécula modelo, fato este bem interessante, considerando que a albumina é uma proteína, molécula grande e complexa, o que poderia comprometer a seletividade do material. A MISPE foi utilizada para a extração de albumina bovina em amostras de soro sanguíneo, urina, soro de leite e leite. O material foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e análise termogravimétrica. A capacidade adsorviva máxima do polímero foi de 24 mg g⁻¹ de MIP. A faixa linear obtida variou de 20-200 mg L⁻¹ de albumina bovina e, apesar de não ser usual a utilização de MIPs para extração de substâncias como proteínas, o método mostrou-se preciso e exato para este tipo de análise com valores de recuperação em torno de 80% para as amostras avaliadas^[62].

Vieira et al. desenvolveram MIPs para a extração de ácido trans, transmucônico (AttM), um metabólito do benzeno, a partir de amostras de urina, seguido por análise com HPLC-UV^[63] e cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS)^[64]. A 4-vinilpiridina foi utilizada para a síntese por ser um monômero de características básicas. Ambos os métodos foram lineares, precisos e exatos com limites de quantificação inferiores ao limite proposto pela *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) (0,5 mg g⁻¹ de creatinina), que sugere o AttM como indicador biológico de exposição ao benzeno. Vale ressaltar que foi possível reaproveitar o mesmo cartucho de MIP por cerca de 100 ciclos. Ambos os métodos mostraram eficiência equivalente ao procedimento baseado em extração por troca iônica e podem ser alternativas interessantes para análise de AttM em laboratórios de rotina^[63,64].

Buscando inovar e melhorar a técnica, Khorrami e Rashidpur propuseram um novo *design* para cartuchos de SPE, utilizando MIP como sorvente. O aparelho é constituído de um tubo afunilado modificado para permitir a extração simultânea em uma fase orgânica e outra sólida. Para avaliar o desempenho do método proposto, este foi empregado para análise de teofilina em amostras de soro sanguíneo. Assim, uma quantidade adequada do MIP para teofilina foi acondicionado no fundo do tubo. Certa quantidade de solvente foi pipetada até que o MIP estivesse completamente entumescido. Em seguida, um *frit* de polietileno foi posicionado entre dois anéis de teflon a fim de segurar as partículas de MIP abaixo do nível da camada orgânica. Depois desta etapa, uma solução de amostra aquosa foi colocada sobre a fase orgânica e a tampa foi fechada. Depois da conclusão da extração, as fases orgânica e aquosa foram removidas e o analito adsorvido no MIP foi eluído com um

solvente mais polar. Os parâmetros de extração foram otimizados a fim de melhorar os níveis de recuperação e os extratos foram analisados por HPLC-UV. O método mostrou-se adequado, seletivo e com bons níveis de recuperação para teofilina em plasma (79%-83%). Como desvantagem, ressalta-se que a vida útil do cartucho foi de apenas 10 ciclos de extração^[65].

Em uma análise ambiental, Dai et al. sintetizaram um polímero por precipitação para análise de diclofenaco em amostras de água. O MIP apresentou excelente afinidade para esse analito, com uma capacidade máxima adsorptiva de 324,8 mg g⁻¹ de material. As análises foram feitas por HPLC-DAD. Vários parâmetros da extração foram otimizados e excelentes níveis de recuperação foram obtidos tanto para águas residuais e águas de rios, como para água de abastecimento (ca. 95%). Depois de testes de estabilidade do material, foi possível comprovar que o seu desempenho manteve-se estável por ca. de 30 ciclos de extração^[32].

Para análise simultânea de seis diferentes piretroides em águas utilizadas para cultura de frutos do mar, foram sintetizados dois diferentes MIPs, um utilizando a deltametrina como MM e, o outro, a cipermetrina. Assim, Shi et al. realizaram estudos para comparar o desempenho de ambos e dos polímeros não impressos (NIPs). Os melhores resultados foram obtidos quando o polímero que utilizou a cipermetrina como MM foi empregado na MISPE, com recuperações de 86,4%-96%. Depois da extração, as análises foram feitas por meio de cromatografia gasosa acoplada a um detector de captura de elétrons (GC-ECD)^[66].

Em alguns casos, os MIPs não são capazes de reconhecer seletivamente moléculas pequenas com um número limitado de grupos funcionais. Neste trabalho, um novo método foi proposto por El-Sheikh et al. para melhorar a capacidade

de reconhecimento do 2-clorofenol (2-CP) pelo polímero e, conseqüentemente, melhorar o processo de MISPE. Isto foi conseguido através da derivatização do 2-CP com 4-aminoantipirina (4-AAP) para ampliar e inserir sítios de reconhecimento na molécula. Para estudar a eficiência do procedimento, foram sintetizados dois polímeros, um utilizando o 2-CP sem alterações como MM e o outro usando o 2-CP derivatizado. A seletividade e os limites de detecção deixaram a desejar no primeiro caso. Já o segundo demonstrou elevada capacidade de reconhecimento e limite de detecção bem inferior. O método foi capaz de detectar a presença de 2-CP em amostras de água ambientais com bons níveis de recuperação^[31].

Para realizar um estudo acerca da presença de parabens em sedimentos marinhos, uma metodologia analítica incorporando MISPE foi desenvolvida por Nunes et al. Quatro polímeros diferentes foram preparados combinando acetonitrila e tolueno como solventes porogênicos, 4-VP e MAA como MFs e benzilparabeno como MM. Embora todos os polímeros fossem capazes de reconhecer os analitos de interesse (metil, etil, propil, butil, isopropil, isobutil e benzilparabeno), o MIP preparado com tolueno e MAA apresentou melhor desempenho quando empregado na MISPE. A análise foi realizada por HPLC-UV e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (triplo quadrupolo) (LC-MS/MS)^[33].

Barros, Martins e Rath desenvolveram um MIP para análise de fenitrotion (FNT) em tomates, levando em consideração a ampla utilização desse praguicida nesses tipos de cultura. A análise foi baseada em MISPE seguida por HPLC-DAD. Usando o FNT como MM, o polímero foi sintetizado empregando-se MAA, EGDMA e tolueno. A fim de conhecer o meio que melhor promovesse o reconhecimento molecular do FNT pelo

MIP, estudos de adsorção foram realizados em diferentes meios contendo acetonitrila e tolueno. Além do FNT, três compostos estruturalmente relacionados foram usados para avaliar a seletividade do material, que mostrou maior afinidade pela MM. A eficiência da extração foi de 96% e os limites de detecção e quantificação foram de 0,05 e 0,13 $\mu\text{g g}^{-1}$. O método desenvolvido apresentou precisão e exatidão adequadas^[67].

A análise de substâncias em amostras de alimentos que contenham lipídeos apresenta algumas limitações tais como pré-tratamentos que envolvem, entre outros procedimentos, reações de saponificação e pré-extração com solventes orgânicos. No intuito de superar este tipo de problema, Puoci et al. propuseram um método baseado em MISPE para a determinação de colesterol em amostras de queijo calabrés. A possibilidade de se obter o reconhecimento seletivo do colesterol sem interações hidrofóbicas inespecíficas é a principal vantagem desse material. Outra vantagem importante é a análise direta do eluato por HPLC-UV sem qualquer tipo de tratamento. A avaliação da seletividade foi testada comparando-se a capacidade adsortiva do MIP para colesterol em relação a outras duas moléculas estruturalmente semelhantes, a progesterona e a hidrocortisona. Boas recuperações foram obtidas para o método que se mostrou promissor para análise de colesterol em amostras de alimentos^[68].

Um novo método empregando-se MISPE e LC-MS/MS foi desenvolvido por She et al. para análise de herbicidas pertencentes à classe das sulfonilureias (clorsulfuron (CS), monossulfuron (MNS) e metiltifensulfuron (TFM)) em amostras de milho. O MIP seletivo para estes compostos foi sintetizado por precipitação usando o clorsulfuron como MM, o 2-(dietilamino) etilmetacrilato (DEAMA) como MF e o TRIM como reagente de ligação cruzada. Os parâ-

metros ideais de extração foram otimizados de modo a obter os melhores níveis de recuperação, sendo estes em torno de 75%-110%. Baixos limites de detecção foram alcançados, bem como boa linearidade, exatidão e precisão, mostrando que o método é adequado para análise de sulfonilureias em cereais^[38].

Uma sílica gel amino-funcionalizada impressa foi sintetizada por Jiang et al. para análise de dietilestilbestrol (DES), um análogo estrutural sintético do estrógeno, em amostras de peixe. O material foi obtido através da combinação das técnicas de impressão molecular com o processo de sol-gel. A sílica gel ativada foi utilizada como suporte para a síntese dos polímeros impresso e não impresso. Comparado com o material não impresso, o MIP mostrou elevada capacidade de adsorção, seletividade significativamente maior e rápida cinética de ligação para o DES. A capacidade máxima adsortiva do polímero impresso foi de 62,58 mg g^{-1} de material, enquanto que para o não impresso foi de apenas 19,89 mg g^{-1} de material. Os parâmetros cinéticos de adsorção mostraram-se bastante rápidos, de modo que o equilíbrio foi alcançado dentro de 10 minutos. A análise foi realizada por HPLC-UV e mostrou-se adequada para a determinação de DES em amostras de alimentos^[69].

Com as vantagens de se evitar a manipulação da amostra entre as etapas de pré-concentração e análise, reduzindo, portanto, riscos de perda de analitos e contaminação e, melhorando a exatidão e a reprodutibilidade, a automação do processo de MISPE pode ainda reduzir muito o tempo dispensado para o preparo da amostra^[70]. A este acoplamento do preparo de amostras em linha com a técnica cromatográfica de análise dá-se o nome de MISPE *on-line* (Figura 2).

A ciência ambiental vem despertando cada vez mais interesse em relação à análise de contaminantes das mais variadas naturezas, entre eles

disruptores endócrinos. Xu et al. relataram a síntese de microesferas de sílica gel impressas molecularmente como material altamente seletivo sintetizado por uma técnica de impressão molecular de superfície, combinada com um processo sol-gel, utilizando estrona como MM. Este material foi aplicado para separação e determinação de traços deste hormônio em amostras ambientais através da extração em fase sólida molecularmente impressa acoplada a HPLC-UV^[71].

Outra técnica associada à MISPE para análise de amostras ambientais de água foi um sistema de quimioluminescência acoplado com injeção em fluxo para determinação de 2,4-diclorofenol, desenvolvida por Feng et al. O polímero para este composto foi preparado através de técnicas não covalentes de impressão molecular, utilizando-se 4-VP e EGDMA como monômero e ALC, respectivamente. O composto 2,4-diclorofenol foi seletivamente adsorvido pelo MIP e, então, determinado pelo efeito aumentado sobre a reação de quimioluminescência entre permanganato de potássio e luminol^[72].

Figueiredo et al. descreveram o preparo e avaliação de um MIP para a pré-concentração de catecol em amostras ambientais e de refrigerantes através de polimerização *in bulk*. A determinação espectrofotométrica empregada na quantificação foi baseada na descolorimetria oriunda da redução de Mn(VII) a Mn(II) pelo catecol em meio ácido. A MISPE foi o único elemento de seletividade visto que a reação de oxirredução entre catecol e Mn(VII) é sensível a diversos compostos. Os autores obtiveram bons resultados com uma faixa analítica de 3,0 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r > 0,999$) e um limite de quantificação de 2,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ^[70]. Os mesmos autores empregaram a associação MISPE e espectrofotometria na análises de nicotina em amostras biológicas. O método se baseou na redução de Mn(VII) a Mn(VI), promovida pela

nicotina, em meio alcalino. Como se trata de uma reação inespecífica, a seletividade obtida foi atribuída ao MIP. A exatidão do método foi avaliada comparando-se a técnica de injeção em fluxo – MISPE com um método de cromatografia líquida de alta eficiência. Não foram observadas diferenças significativas, considerando-se um intervalo de confiança de 95%. É interessante ressaltar os bons resultados de frequência analítica (11 h^{-1}) e limite de quantificação (1,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) do método proposto quando comparados com os mesmos parâmetros para o método por HPLC (2 h^{-1} e 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$)^[70].

Em outro estudo, Figueiredo et al. quantificaram seis benzodiazepínicos (medazepam, nitrazepam, diazepam, clordiazepóxido, clonazepam e midazolam) em plasma humano através de um sistema que utiliza uma sonda contendo MIP como material de empacotamento, acoplada a uma fonte de eletrospray (ESI) e a um espectrômetro de massas sem pré-separação. Para a síntese do MIP, o diazepam foi empregado como MM, MAA como MF, EGDMA como ALC e AIBN como iniciador radicalar. A extração seletiva de moléculas-alvo de uma mesma classe diminuiu o fenômeno de supressão iônica e os analitos foram quantificados em um curto intervalo de tempo. O método proposto ainda apresentou bons resultados em relação à precisão, exatidão e limite de quantificação^[73].

Yan, Qiao e Row propuseram colunas monolíticas impressas sintetizadas por polimerização inicial térmica *in situ*, utilizando norfloxacin como MM, 2-hidroxiethylmetacrilato como monômero e metanol – água como solvente porogênico para quantificação de enrofloxacin e ciprofloxacina em urina de animais. A enrofloxacin é uma fluoroquinolona muito utilizada na medicina veterinária e, em várias espécies, pode ser biotransformada em ciprofloxacina, seu metabólito primário. O monólito

obtido apresentou alta afinidade por enrofloxacin e ciprofloxacina em meio ambiente aquático e foi aplicado com sucesso como sorvente especial para extração seletiva *on-line* de enrofloxacin e ciprofloxacina em amostras de urina. Estas amostras foram centrifugadas e injetadas diretamente no sistema cromatográfico sem qualquer outro pré-tratamento. O método apresentou boa linearidade (0,05-200 mg L⁻¹), valores de RSD menores que 3,1%, limite de detecção de 0,01 mg L⁻¹ e recuperações maiores que 87% em diferentes concentrações^[74].

Além das aplicações ambientais e biológicas, a técnica de MISPE é muito utilizada na área de alimentos, principalmente para determinação de resíduos das mais variadas naturezas, que normalmente estão presentes em concentrações muito baixas. Com o objetivo de concentrar e analisar estrógenos em leite, Zhao et al. sintetizaram, por irradiação ultrasônica, um polímero de impressão molecular (MIP) com atapulgita como matriz, β -naftol como MM, acrilóil- β -ciclodextrina como MF e N, N-metilenobiacrilamida como ALC. Em comparação com os polímeros preparados pelas fontes de aquecimento tradicionais, este apresentou melhor seletividade e cinética de adsorção mais rápida para estriol, estradiol, estrona e dietiestibestrol. A coluna de MIP foi preparada para acoplamento *on-line* simultâneo da SPE com o sistema de HPLC, e o método desenvolvido apresentou limites de detecção na faixa de 1-8 ng g⁻¹^[75].

Oliveira et al. propuseram uma metodologia que une a técnica de MISPE com um sistema BI-LOV (*bead injection - lab on valve*) para determinação de riboflavina em amostras de alimentos. A configuração do módulo *lab-on-valve* compreende uma estrutura monolítica com microcanais e permite a injeção e o transporte de suspensões esféricas de maneira completa-

mente automatizada. Obteve-se alta precisão ao manipular suspensões contendo partículas de MIP de formato irregular, permitindo o uso de MIP comercial como sorvente renovável. Utilizando-se este método *on-line*, foi possível extrair e quantificar riboflavina de amostras de alimentos em uma faixa de 0,450 a 5,00 mg L⁻¹ depois do processamento de 1000 μ L de amostra (leite infantil, extrato de fígado de porco e bebida energética) sem nenhum outro tratamento prévio^[76].

Zhang et al. propuseram um novo material de estrutura *core-shell* cujo núcleo *core* é uma estrutura de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e, a fase *shell* é uma camada de MIP polimerizada sobre a superfície dos nanotubos. Este material foi preparado pela técnica de impressão em superfície em combinação com a tecnologia sol-gel. Este foi utilizado como sorvente para análise de traços do corante Sudan IV em amostras de pimenta *chilli* em pó, através da extração em fase sólida *on-line* acoplada à HPLC. O material se mostrou bastante eficiente, apresentando elevado fator de enriquecimento para determinação de Sudan IV em amostras reais^[77].

Ainda na área de alimentos, Xu, Fang e Wang prepararam um polímero impresso altamente seletivo pela técnica de polimerização *in bulk* mediada por líquido iônico à temperatura ambiente, utilizando diclorvós como MM, MAA como MF e trimetilpropano trimetacrilato como ALC. Este material foi empregado como sorvente para extração em fase sólida e a técnica de pré-tratamento de amostra foi acoplada a HPLC-UV para determinação de resíduos de diclorvós em alimentos, gerando bons resultados, como limite de detecção da ordem de ng L⁻¹ para este praguicida^[78].

Em alguns trabalhos, são relatadas combinações das configurações *on-line* e *off-line* de MISPE. Dong et al. propuseram a utilização da

técnica de MISPE para determinação de resíduos de monossulfuron em amostras de solo. Foram estudados procedimentos *off-line* e *on-line*. O procedimento *off-line* foi utilizado para avaliar as diferenças entre as soluções de lavagem e eluição. A técnica *on-line*, por sua vez, foi empregada para otimizar as condições de SPE e para o processo de *clean-up* da amostra^[34].

Os MIPs também vêm sendo utilizados de forma bem sucedida como sorventes altamente seletivos para a determinação de compostos benzimidazólicos em meio orgânico. Com este propósito, Cacho, Turiel e Pérez-Conde propuseram a síntese de um MIP para compostos benzimidazólicos através de polimerização por precipitação, utilizando tiabendazol, MAA, EGDMA, DVB, acetonitrila e tolueno. O polímero de DVB apresentou capacidade de receber maiores volumes de amostra e foi, portanto, selecionado para os próximos testes. Este MIP se mostrou capaz de reter não apenas a molécula-modelo, mas também outros compostos benzimidazólicos (albendazol, benomil, carbendazim, fembendazol, flubendazol e fuberidazol). Tal material foi utilizado em um procedimento de pré-concentração *on-line* e esta metodologia se mostrou aplicável para propósitos de varredura (verificar apenas a presença dos analitos na matriz), enquanto a identificação e a quantificação de cada composto deveriam ser realizadas através da pré-concentração *off-line* em cartuchos contendo MIP seguida de análise por HPLC-DAD. O método de MISPE proposto foi aplicado para a pré-concentração *off-line* e todos os compostos benzimidazólicos puderam ser quantitativamente recuperados. Em paralelo, as amostras passaram por procedimento de pré-concentração em discos C18 e os cromatogramas mostraram linhas de base com mais ruído, além de várias espécies terem interferido na determinação de fembendazol. Observando-se todos os

resultados obtidos, a utilização de MIP como sorvente seletivo para determinação multirresidual de compostos benzimidazólicos em águas se mostrou bastante vantajosa e tanto o procedimento de pré-concentração *on-line* quanto o *off-line* apresentaram limites de detecção bem abaixo dos níveis de concentração máxima permitidos pela legislação^[79].

3.2 Extração sortiva em barra de agitação molecularmente impressa-MISBSE

Na extração sortiva em barra de agitação (SBSE), uma barra magnética revestida de polidimetilsiloxano é colocada diretamente na amostra e agitada até que o equilíbrio de partição entre os analitos e o sorvente seja atingido. Depois da extração, os analitos podem ser quantitativamente introduzidos no sistema analítico por dessorção térmica ou líquida^[80]. Um dos fatores que interfere no processo de extração e pode ser otimizado nos procedimentos de SBSE é o revestimento da barra de agitação.

Zhu e Zhu descreveram o preparo de barras de agitação revestidas por um filme molecularmente impresso de 160 μm , formado a partir de uma solução do polímero Nylon-6 em ácido fórmico e observaram o desempenho deste material para separação enantiosseletiva de aminoácidos. A barra de agitação revestida pelo polímero Nylon-6 impresso com *L*-glutamina foi preparada através de um método de inversão de fase. Soluções de Nylon-6 e *L*-glutamina foram misturadas em ácido fórmico e colocadas em frascos submetidos à agitação até a mistura se tornar um coloide. A barra de agitação magnética foi então imersa nesta solução coloide e este sistema foi colocado em banho de água purificada. Depois do processo de gelificação, a barra foi lavada com uma solução de ácido acético/metanol para remoção do solvente e da MM. O filme de MIP

apresentou alta afinidade por *L*-glutamina além de ter atingido o equilíbrio de adsorção mais rapidamente quando comparado ao polímero impresso pela forma convencional, *in bulk*. A barra de agitação impressa apresentou ainda maior seletividade pela *L*-glutamina do que por seus isômeros, diferença esta que não foi observada com o material não impresso^[81].

Também visando as enantioseparações, Barrio et al. reportaram o desenvolvimento de um MIP com afinidade pelo *S*-citalopram utilizando modelagem computacional para a seleção dos MF e da relação MM-MF. O polímero foi sintetizado por polimerização radicalar iniciada por ultravioleta sobre uma barra de agitação magnética com o objetivo de se obter um sistema de SBSE capaz de realizar o reconhecimento enantiomérico seletivo. A barra de agitação foi inserida no interior de um tubo de Teflon com uma das extremidades fechadas, na qual foi colocada, com o auxílio de uma seringa, a mistura de polimerização. Outro tubo de Teflon foi utilizado para fechar a outra extremidade do sistema, que foi então exposto à radiação ultravioleta. Em seguida, a barra foi retirada do tubo e lavada com metanol. O material desenvolvido se mostrou capaz de extrair seletivamente o *S*-citalopram da mistura racêmica em um meio aquoso com alta especificidade. O procedimento otimizado é simples, rápido e permite a detecção e quantificação da droga em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ sem a necessidade da separação cromatográfica quiral^[82].

Com o objetivo de analisar nicosulfuron em amostras de água e solo, Yang, Zhao e Zhou descreveram o preparo de uma barra de agitação recoberta por um polímero monolítico impresso molecularmente utilizando o analito como MM. O material molecularmente impresso foi preparado através de polimerização *in situ*. A mistura de reação foi colocada no interior de um tubo de

politetrafluoretileno, na qual já estava posicionada uma barra de agitação magnética. Ao final do processo de polimerização, a barra passou por etapas de lavagem com ácido acético – acetonitrila, acetonitrila apenas e água duplamente destilada. A técnica de extração em barra sortiva foi acoplada a HPLC-UV e o método apresentou bons resultados de recuperação e reprodutibilidade. Este material pôde ser reutilizado por mais de cem vezes sem perder sua eficiência^[83].

Para análise de alimentos, Wang et al. reportaram a utilização de um método para determinação de ractopamina em carne de porco utilizando eletroquimioluminescência combinada à MISBSE. Uma barra molecularmente impressa com ractopamina foi utilizada no pré-tratamento da amostra, com o objetivo de eliminar compostos coexistentes. A solução de polimerização foi colocada em uma seringa de polipropileno mantida a 60 °C por uma hora; em seguida, a barra de agitação foi imersa verticalmente no centro da mistura. O tubo foi selado e mantido a 60 °C por 20 horas. Depois da polimerização, o material foi retirado da seringa, lavado com solução de ácido acético – água e água duplamente deionizada repetidas vezes e sonificado à temperatura ambiente para remoção de substâncias remanescentes da síntese. Os resultados mostraram que o material pôde ser utilizado por pelo menos dez vezes sem perder sua capacidade de extração^[84].

Li et al. vêm desenvolvendo diversos trabalhos utilizando MISBSE em diferentes áreas de aplicação. Em geral, as barras impressas são preparadas através de ligações químicas do MIP a uma barra de vidro através da sililação da superfície do substrato e reação de copolimerização. Em 2010, o grupo desenvolveu um método para determinação de compostos β 2-agonistas em amostras de carne de porco, fígado e alimentos através da MISBSE e análise por HPLC. Sob as condições de extração otimizadas, a barra reves-

tida por MIP mostrou maior capacidade de extração que a barra revestida por NIP para os analitos ractopamina, isoxsuprina, clenbuterol e fenoterol. Além disso, as barras revestidas por MIP puderam ser usadas por pelo menos quarenta vezes sem perda de eficiência na extração. O método desenvolvido apresentou bons resultados em relação aos parâmetros de validação^[85].

Ainda em 2010, os autores descreveram o uso de MISBSE para extração seletiva de herbicidas triazínicos. A barra revestida com MIP apresentou maior seletividade e boa capacidade de pré-concentração para os compostos triazínicos estruturalmente relacionados, em comparação com a barra revestida de NIP. O material foi usado com sucesso para extração seletiva de triazinas de diversas amostras (arroz, maçã, alface e solo) com bons valores de recuperação^[86].

A técnica também ganhou destaque em 2011, quando o mesmo grupo de pesquisa relatou o uso de MISBSE para extração seletiva de sulfonamidas. A capacidade de adsorção do revestimento de MIP foi 4,6 vezes maior que a do NIP, e o material revestido com o MIP pôde extrair sulfametazina seletivamente para análise por HPLC-UV mesmo em baixas concentrações (0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$). O material apresentou excelente seletividade para moléculas análogas à MM. Houve ainda o desenvolvimento de um método utilizando a MISBSE combinada com a técnica de HPLC-UV para análise simultânea de oito sulfonamidas em amostras de carne de porco, fígado e frango^[87].

Com a finalidade de extrair e analisar fungicidas triazólicos em amostras de solo, em 2011, os autores desenvolveram um método simples e rápido utilizando MISBSE. Eles sintetizaram uma barra de agitação revestida por MIP, utilizando triadimefom como MM. O material mostrou habilidades de reconhecimento molecular não apenas para o triadimefom, mas também para

compostos estruturalmente relacionados como triadimenol, diniconazol, flutriafol, hexaconazol, tebuconazol, paclobutrazol e uniconazol. O método apresentou limites de detecção na faixa de 0,14 a 0,34 $\mu\text{g L}^{-1}$ e recuperações de 86,7% a 114,6% para amostras de solo fortificadas^[88].

3.3 Microextração em fase sólida molecularmente impressa – MISPME

A microextração em fase sólida (SPME) surgiu com o intuito de eliminar alguns problemas relacionados ao preparo de amostras pela SPE convencional, principalmente com relação ao elevado consumo de solventes orgânicos e à necessidade de utilização de grandes quantidades de amostras^[89]. O dispositivo básico de SPME consiste de um bastão de sílica fundida de aproximadamente 100 nm de diâmetro, recoberto com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente. A extração ocorre mergulhando-se a seção recoberta na amostra ou no seu *headspace*. Por afinidade, analitos orgânicos migram da matriz para a fibra, onde são concentrados de acordo com seus coeficientes de partição. Depois disso, os analitos são termicamente desorvidos diretamente no injetor de um cromatógrafo a gás ou eluídos com solventes para posterior análise por outras técnicas cromatográficas^[90,91].

Com o objetivo de melhorar a seletividade da fibra de SPME, os polímeros de impressão molecular vêm sendo empregados em conjunto com essa técnica. Isto ocorre quando os MIPs revestem a fibra comercial ou a substituem^[92]. Como consequência, muitos autores relatam o uso desta técnica para o preparo de amostras.

De acordo com Prasad et al., a utilização de um MIP para o recobrimento de uma fibra de carbono foi eficiente na determinação de ácido fólico em matrizes complexas. O recobrimento foi utilizado para melhorar a baixa porosidade, baixa estabilidade e fragilidade associadas às

fibras de MISPME. O MIP foi preparado utilizando um monômero novo, 2,4,6-trisacrilamido-1,3,5-triazina (TAT) e o ALC EGDMA (razão 1:20) em dimetilsulfóxido (DMSO) através do método de polimerização radicalar. A fibra de carbono, quando usada sem recobrimento, não foi eficiente para extrair ácido fólico das amostras; porém, quando a fibra de carbono recoberta pelo MIP foi utilizada para a extração, excelentes resultados foram obtidos^[93].

O uso de anabolizantes tem sido muito difundido para finalidades estéticas, principalmente para rápida hipertrofia muscular. Assim, Qiu et al. desenvolveram uma fibra para MISPME para a determinação de anabólicos esteroides. O MIP foi preparado pela copolimerização de MAA e TRIM, utilizando a testosterona como MM. Para a síntese do MIP, a MM foi dissolvida em acetonitrila e em MAA, e, após 12 horas, foram adicionados o TRIM e o AIBN. A fibra que receberia o revestimento de MIP passou por procedimentos de retirada de poliamida da superfície. Depois desses processos, ela foi introduzida na solução pré-polímero e colocada em um forno a 60° para executar a polimerização. Essa fibra mostrou-se altamente seletiva, quimicamente estável e robusta, podendo ser conectada diretamente ao GC-MS. Foram otimizados o tempo de polimerização, o solvente de polimerização e o ALC. A caracterização do material foi feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV), FT-IR e análise termogravimétrica. A fibra mostrou alta seletividade e habilidade de extração para quatro anabólicos esteroides em urina humana, com limite de detecção de 0,008-0,020 ng mL⁻¹^[92].

Para monitorização terapêutica de β -bloqueadores, Hu et al. sintetizaram um polímero para revestimento de fibras de SPME pelo método de copolimerização múltipla, utilizando como MM o propranolol. A fibra resultante

mostrou-se homogênea, altamente reticulada e porosa. O método foi aplicado para controle simultâneo de pindolol e propranolol em amostras de urina e de plasma humano com baixos limites de detecção e quantificação^[94].

A pesquisa de contaminantes em alimentos é de extrema importância para atestar a sua qualidade para o consumo. Assim, a síntese de uma fibra molecularmente impressa foi proposta para extração seletiva de atrazina em cebola, água e arroz, por Djozan e Ebrahimi. A fibra foi obtida utilizando atrazina como MM, MAA, EGDMA e AIBN. Para sintetizar o pré-polímero, a MM foi dissolvida em acetonitrila e, posteriormente, foram adicionados o MAA, EGDMA e o AIBN. A mistura foi desgaseificada. Então, o pré-polímero foi introduzido em um capilar e colocado em banho de água a 65 °C para ocorrer a copolimerização. A fibra foi retirada do capilar e introduzida em um *homemade* de SPME. Foi verificado que o material apresentava alta seletividade, baixo custo, estabilidade térmica e química. Fatores como pH e temperatura de extração foram otimizados. Como resultado, o método demonstrou eficiência na extração de atrazina, simazina, propazina, cianazina, ametrina, terbutrina e prometrina^[95].

Também neste sentido, Hu et al. produziram um MIP para revestir a fibra de SPME, pelo método de copolimerização múltipla, seletiva a hormônios esteroides. Esta apresentou alta porosidade, estabilidade química e térmica e pôde ser acoplada diretamente aos instrumentos de cromatografia. A fibra molecularmente impressa exibiu uma maior afinidade para o 17 β -estradiol (MM) em comparação às fibras comerciais e ao NIP. A fibra também foi seletiva aos compostos análogos ao 17 β -estradiol como estriol, estrona e 17 α -etinilestradiol. O método demons-

trou alta eficiência na extração de estrógenos em amostras de peixes, com limite de detecção 0,98-2,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ [96].

O uso de herbicidas é muito difundido em culturas agrícolas. Estes podem apresentar toxicidade para os consumidores quando presentes em concentrações maiores que os limites máximos permitidos. Neste sentido, Hu et al. sintetizaram uma fibra de SPME utilizando metolachlor como MM. Para circundar o problema de fragilidade, o MIP sintetizado revestiu a superfície de uma fibra de aço inoxidável. Para a preparação do polímero, MM, MAA, AIBN e TRIM foram adicionados a uma solução de tolueno e misturados por 12 horas com o auxílio de um oscilador. O pré-polímero foi introduzido em um tubo para a retirada de oxigênio e, posteriormente, introduziu-se a fibra de aço inoxidável para realizar a polimerização. Foram sintetizadas nove fibras de diferentes composições, variando-se os MFs, as MM e os ALCs. A fibra que apresentou melhor desempenho na extração seletiva de metolachlor em soja e milho foi aquela sintetizada a partir de tolueno, MAA e TRIM. O material apresentou rápida adsorção e dessorção, sendo seletivo para a extração de metolachlor e outros herbicidas e seus produtos de degradação. Os limites de detecção para metolachlor, propisochlor e butaclor em amostras de milho e soja, foram de 3,0; 9,6 e 38 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Foi verificado que a proporção de monômero em relação ao ALC foi de extrema importância para a seletividade do MIP[97].

Em um trabalho realizado por Barahona et al., foi desenvolvido um método empregando-se MISPME para análise de tiabendazol em amostras de suco de laranja. Para a síntese da fibra, TBZ (tiabendazol), MAA, TRIM e AIMN (2,2'-azobis-2-metilbutironitrilo) foram misturados com uma solução de tolueno:MeOH (1:1 v/v). Posteriormente, a solução do pré-polí-

mero, com a ajuda de uma seringa, preencheu o interior de capilares. Estes foram colocados em um forno a 65 °C para ocorrer a polimerização. Depois de algumas horas, o MIP foi lavado com uma solução de MeOH:ácido acético (1:1, v/v) para a remoção da molécula modelo. Visando resolver alguns problemas relacionados ao reconhecimento molecular dos analitos em meio aquoso, a fibra molecularmente impressa foi inserida dentro de um capilar de polipropileno para que uma extração prévia por LPME fosse realizada antes da SPME. A metodologia foi validada e aplicada com êxito. O método mostrou-se linear, exato, robusto e preciso, comprovando que a combinação entre MISPME e LPME foi eficiente[98].

Nesta mesma linha de pesquisa, Hu et al.[99] propuseram um método baseado em LPME e MISPME para análise de triazinas em amostras complexas (urina, lama, leite e melancia). Neste estudo, o MIP foi utilizado para revestir a fibra de sílica empregada na SPME. Antes do revestimento, essa fibra passou por um processo de sililação, que ocorreu por imersão em uma solução 10% (v/v) 3-(metacriloxi) propiltrimetoxisilano em acetona à temperatura ambiente. Para a síntese do MIP, foi utilizado terbutilazina como MM. A MM juntamente com o MAA foram dissolvidos em tolueno e incubados por 12 horas. Posteriormente, foram introduzidos o TRIM e AIBN. A solução do pré-polímero foi transferida para um tubo, no qual passou por um processo de retirada de oxigênio e polimerização. Os analitos foram extraídos primeiramente por LPME e posteriormente pela fibra SPME. Foi verificado que a união das duas técnicas melhorou a extração dos analitos alvos em comparação com a técnica de MI-SPME isoladamente. O método proposto aumentou o desempenho analítico e diminuiu o tempo de pré-tratamento da amostra.

O uso de ftalatos em indústrias é muito comum. Estes são utilizados como aditivos para deixar o plástico mais maleável. Contudo, tal classe de compostos é tida como cancerígena, podendo causar danos ao fígado, rins e pulmão, além de anormalidade no sistema reprodutivo. Dessa forma, é de extrema importância monitorar os níveis de ftalatos oriundos de resíduos industriais no meio ambiente. Neste sentido, He et al. sintetizaram uma fibra molecularmente impressa, para SPME, pelo método de polimerização *in bulk*, utilizando dibutil ftalato (DBP) como molécula modelo. A MM, juntamente com MAA, foi dissolvida em clorofórmio e, em seguida, foram adicionados o AIBN e EGDMA. A solução passou pelo processo de retirada de oxigênio. Depois do processo de degaseificação, a solução foi introduzida em um capilar de vidro, no qual ocorreu o processo de polimerização a 60 °C. A fibra sintetizada mostrou seletividade aos ftalatos e foi empregada para análise de amostras de águas ambientais. Quando comparada à fibra não impressa, a fibra impressa foi mais seletiva ao dibutilftalato (DBP) e aos seus análogos dimetilftalato (DMP), dietilftalato (DEP), diamilftalato (DAP) e dioctilftalato (DNOP). Excelentes recuperações foram observadas e atribuídas ao mecanismo de adsorção seletiva da fibra molecularmente impressa. Os limites de detecção alcançados estavam compreendidos entre 2,17 e 20,84 ng L⁻¹ e a recuperação, entre 94,54% e 105,34%^[53].

Também para análise de amostras ambientais, um novo método empregando MISPME e HPLC-UV foi desenvolvido por Feng et al. A fibra molecularmente impressa foi sintetizada utilizando-se 2,4,6-triclorofenol como MM, MAA e DVB. Esta demonstrou boa capacidade de pré-concentração e seletividade para análise de compostos fenólicos em amostras de água. As

recuperações foram de 88,9%-102,5% para amostras de água de torneira, 80,0%-94,0% para água de rio e 80,0%-90,5% para água de esgoto^[100].

3.4 Polímeros magnéticos molecularmente impressos – MIPs Magnéticos

Os polímeros molecularmente impressos têm a capacidade de reconhecimento seletivo através dos sítios formados e da força de ligações remanescentes no momento em que a MM é retirada^[101]. Quando reagentes com características magnéticas (por exemplo o Fe₃O₄) são empregados na síntese desses polímeros, o isolamento das partículas de MIP da matriz pode ocorrer simplesmente com a aplicação de um campo magnético. A rede polimérica evita a dispersão das partículas magnéticas e melhora as propriedades mecânicas dessas partículas^[102].

Em um trabalho realizado por Wang et al., foi proposta uma síntese de um polímero magnético molecularmente impresso por polimerização em suspensão com aquecimento em micro-ondas. Foi utilizado 2-amino-4 nitrofenol (4-NAP) como MM e Fe₃O₄ como partícula magnética. Como suporte para síntese, foi utilizado volastonite, o que resultou em um menor tempo de polimerização e uma melhor morfologia do polímero. Bons resultados foram obtidos, não somente com relação à boa seletividade e afinidade para 4-NAP em amostras aquosas, mas também com relação ao superparamagnetismo quando o material foi exposto a um campo magnético externo^[102].

O sesamol é um composto orgânico utilizado na síntese de alguns medicamentos. Neste sentido, Wang et al. sintetizaram um polímero magnético molecularmente impresso, empregando piperonal como MM. Para preparar o volastonite magnético, volastonite carboxilado foi dissolvido em 1-metil-2-pirrolidona sob

ação de ultrassom e, posteriormente, foi adicionado acetilacetato de ferro (III) (partícula magnética). O polímero foi utilizado para reconhecimento de sesamol (análogo ao piperonal) em amostras aquosas. Este demonstrou boa estabilidade térmica e propriedades magnéticas satisfatórias. A isoterma de adsorção mostrou melhor ajuste ao modelo de Langmuir quando comparado ao modelo de Freundlich. Por fim, o método demonstrou capacidade de reconhecer seletivamente o sesamol^[103].

Um MIP magnético com reconhecimento seletivo para 2,4-diclorofenol foi proposto por Pan et al. Para evitar a dispersão das partículas de Fe_3O_4 e a fragilidade do polímero, o material foi obtido através da coprecipitação de atapulgita/ Fe_3O_4 a partir de uma suspensão de atapulgita pré-modificada com FeCl_3 . O MIP foi sintetizado utilizando 2,4-diclorofenol como MM, MAA, AIBN e EGDMA. Em seguida, as partículas magnéticas foram revestidas com uma fina película do MIP. O polímero exibiu estabilidade térmica e propriedade magnética adequada para separação. A isoterma de adsorção foi mais bem ajustada ao modelo de Langmuir, e a capacidade máxima de adsorção do material foi de $145,79 \text{ mg g}^{-1}$. Depois de cinco extrações, o polímero ainda exibiu boa seletividade, o que deixou claro para os pesquisadores que os polímeros magnéticos são candidatos promissores para separação de poluentes^[104].

Ainda para análises de compostos fenólicos, Pan et al. desenvolveram um material que agregava nanopartículas magnéticas a um nanotubo haloíta. As partículas magnéticas foram ligadas aos ácidos carboxílicos dos nanotubos de haloíta (HNTs-COOH) por meio de uma reação de triacetilacetato férrico em 1-metil-2-pirrolidona a alta temperatura. As partículas magnéticas de nanotubo haloíta (MHNTs) foram revestidas com o polímero molecularmente

impresso para reconhecimento específico de 2,4,6-triclorofenol. O polímero exibiu boas propriedades magnéticas e alta estabilidade térmica. A isoterma de adsorção foi ajustada ao modelo de Langmuir. A capacidade de adsorção máxima foi de $246,73 \text{ mg g}^{-1}$ a 298 K. Os experimentos demonstraram que o material apresentou alta seletividade e afinidade para compostos fenólicos em amostras ambientais. Os MIPs preparados foram facilmente separados da suspensão por um campo magnético externo. Foi concluído que ligações de hidrogênio entre os compostos fenólicos e o MAA (MF) foram as principais responsáveis pelo mecanismo de reconhecimento^[105].

Wang et al. obtiveram um polímero a partir de polimerização radicalar utilizando metacriloxipropiltrimetoxisilano (MEMO) e, posteriormente, uma copolimerização, utilizando MAA, EGDMA e 17 β -estradiol como MM. Nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 foram empregadas para conferir propriedades magnéticas ao polímero que, ao final do processo, apresentou elevada seletividade, grande capacidade de adsorção e rápida capacidade de ligação para os analitos de interesse. O método foi linear, com coeficiente de correlação de 0,9996. A capacidade máxima adsortiva do MIP magnético foi de $225,68 \mu\text{mol g}^{-1}$ e do NIP magnético de $49,71 \mu\text{mol g}^{-1}$. A extração com os polímeros magnéticos molecularmente impressos em conjunto com a técnica de HPLC-UV foi útil na determinação de estrogênios em amostras de ração^[106].

Em um estudo recente realizado por Ding et al., um MIP magnético foi sintetizado para extração seletiva de sildenafil e verdanafil em suplementos alimentares à base de plantas. Depois da extração, as amostras foram analisadas por HPLC-UV. O polímero foi impresso utilizando sildenafil como MM, ácido acrílico

2-trifluorometil como MF, EGDMA como ALC e Fe_3O_4 como partícula magnética. Os dados foram ajustados conforme o modelo da isoterma de Freundlich^[107].

Para o enriquecimento seletivo de β -antagonistas em amostras de fígado e carne de porco, foi sintetizado um polímero magnético molecularmente impresso por polimerização em suspensão com aquecimento por micro-ondas. As partículas magnéticas foram sintetizadas por coprecipitação em um meio contendo FeCl_3 e FeSO_4 em solução aquosa de amoníaco (28% em peso). O aquecimento por micro-ondas foi empregado como alternativa para acelerar o processo de polimerização. A isoterma foi ajustada ao modelo de Freundlich, e a capacidade máxima adsorptiva para o MIP magnético foi de $3,24 \mu\text{g mol}^{-1}$ e para o NIP magnético foi de $1,17 \mu\text{g mol}^{-1}$, demonstrando uma maior capacidade de adsorção para o polímero impresso. O material foi utilizado com sucesso para extração de ractopamina, isoxsuprina e fenoterol em carne e fígado de porco, seguido de análise por HPLC-UV. O método proposto apresentou uma boa linearidade e baixos limites de detecção e quantificação^[108].

A determinação seletiva de antibióticos β -lactâmicos em amostras de leite por MIP magnético foi proposta em estudo feito por Zhang et al. Para a síntese do polímero, eles utilizaram penicilina V potássica (PENV) como MM, MAA, EGDMA e Fe_3O_4 como partícula magnética. O polímero sintetizado apresentou alta seletividade e afinidade para PENV e outros compostos análogos aos β -lactâmicos. O processo de extração foi realizado em uma única etapa em que foram misturados os solventes de extração, amostra de leite e o MIP magnético sob agitação em ultrassom. Depois de se completar o processo de extração, os analitos adsorvidos pelo MIP magnético foram separados da matriz

por um ímã externo. Posteriormente os analitos foram analisados por LC-MS. A partir das análises, foi possível observar bons níveis de recuperação e baixos limites de detecção e quantificação para β -lactâmicos. Em comparação com métodos convencionais, a utilização do MIP magnético permitiu, de maneira rápida e fácil, a separação e identificação dos analitos de interesse^[109].

Gai et al. sintetizaram um polímero magnético molecularmente impresso utilizando albumina de soro bovino (BSA) como MM. As partículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{NH}_2$ foram adicionadas a uma mistura de tetra-hidrofurano (30 mL) e trietilamina (1 mL). O MIP foi sintetizado baseado em polimerização radicalar na presença de N-isopropilacrilamida e N-[3-(dimetilamino)propil]-metacrilamida (MFs) para a extração de proteínas. O polímero impresso apresentou uma maior capacidade de adsorção e seletividade a BSA em comparação ao polímero não impresso^[110].

Também para análise de proteínas, um método baseado em extração com MIP magnético e análise por quimioluminescência foi desenvolvido por Jing et al. para extração seletiva de lisozima em urina humana de pacientes com problemas renais. As nanopartículas de Fe_3O_4 foram sintetizadas pelo método de coprecipitação e, em seguida, revestidas com uma fina camada de MIP. O MIP foi sintetizado usando a lisozima como MM, MAA, acrilamida e N,N-metilenebisacrilamida. O método mostrou-se rápido, de baixo custo e altamente seletivo, quando comparado aos métodos tradicionais. A extração foi completada em apenas 12 minutos, com recuperações de 90,1%-103,7% e limite de quantificação de 5 ng mL^{-1} . O método demonstrou ser confiável e muito prático, deixando claro para os pesquisadores que este poderá ser muito promissor para análises de rotina a fim de se diagnosticar doenças renais^[111].

Para análise simultânea de três esteróis (ergosterol, stigmasterol e β -sitosterol) em amostras complexas, um MIP magnético, utilizando β -sistrol como MM, foi sintetizado por Zhan et al.^[112].

A síntese das nanopartículas magnéticas foi realizada empregando-se Fe_3O_4 como partícula magnética. A MM e o MF foram dissolvidos em tolueno. Na solução do pré-polímero, foram adicionadas as partículas magnéticas, estireno, EGDMA e AIBN, sob agitação. A polimerização ocorreu sob irradiação por micro-ondas. As extrações foram realizadas em amostras de cogumelos, soro e melancia. O polímero impresso demonstrou uma recuperação 20 vezes superior ao polímero não impresso. As condições ótimas de extrações foram estudadas. As recuperações encontradas para amostras de cogumelos foram de 80,9%-86,0% para ergosterol, 75,8%-77,2% de estigmasterol e 74,2%-80,8% para β -sitosterol. Para as amostras de soro foram encontrados os seguintes valores: 86,2%-88,2% de estigmasterol e 72,4%-79,4% para β -sitosterol. Para as amostras de melancia, as recuperações encontradas foram: 71,6%-74,9 % para ergosterol, 81,0%-84,5% para estigmasterol e 71,6%-76,9% para sitosterol. Diante desses resultados, os pesquisadores concluíram que o método proposto é aplicável e confiável para análise simultânea de esteróis em amostras biológicas^[112].

Para o reconhecimento seletivo de lisozima, foi sintetizado através de copolimerização um polímero magnético em que a capacidade magnética foi transmitida através do encapsulamento de Fe_3O_4 . Neste trabalho, Jing et al. tiveram como resultado a alta capacidade de adsorção ($0,11 \text{ mg mg}^{-1}$), seletividade controlada e separação magnética ($22,1 \text{ emug}^{-1}$). Depois da pré-concentração e purificação dos analitos pelo

MIP, eles foram submetidos ao método de quimioluminescência para determinação seletiva de lisozima em amostras de soro humano^[113].

Em um estudo realizado por Wang et al., uma nanopartícula magnética de Fe_3O_4 foi revestida por polímeros molecularmente impressos, utilizando uma estratégia de impressão semiovalente para reconhecimento seletivo de estrona. A MM (estrona) revestia a sílica sobre o núcleo de óxido de ferro através de uma ligação termicamente reversível. A remoção da molécula modelo por uma simples reação térmica produziu sítios específicos na sílica para reconhecimento de estrona. A partir dos experimentos realizados, os pesquisadores acreditam que os MIPs magnéticos são candidatos promissores para separações químicas e bioquímicas^[114].

Ding et al.,^[115-117] em seus trabalhos, propuseram a síntese de polímeros magnéticos para a determinação de resíduos de fármacos em diferentes amostras. Para a determinação de fluoroquinolonas em amostras de água, foi sintetizado um MIP magnético para realizar a extração dos analitos e posterior análise por LC-MS. O ciprofloxacino foi utilizado como MM, além de MAA, EGDMA e Fe_3O_4 como partícula magnética. Bons níveis de recuperação e baixos limites de detecção e quantificação foram alcançados. Em conclusão, o método proposto teve sucesso na determinação de fluoroquinolonas incluindo ciprofloxacino, enrofloxacin, lomefloxacino, levofloxacino, fleroxacin e sparfloxacino em diferentes amostras de águas ambientais^[115]. Para determinação de sulfonamida (SAs) em mel, um MIP magnético foi sintetizado a partir de MAA, EGDMA, SMD, dimetil sulfoxido e Fe_3O_4 . A extração foi feita sob agitação e após se completar, o polímero foi capturado e separado da matriz por atração magnética externa. Os extratos foram analisados por LC-MS e o método proposto permitiu a extração de sulfonamidas e seus

análogos em diferentes amostras de mel^[116]. Para a análise de tetraciclinas em amostras de tecido e ovo, um MIP magnético foi sintetizado usando oxitetraciclina como MM, MAA, estireno e divinilbenzeno como componente da matriz polimérica e Fe₃O₄ como componente magnético. O processo de extração e limpeza ocorreu em um único passo. Depois da extração se completar, o polímero foi separado da matriz por uma atração magnética externa com posterior análise por LC-MS. Em comparação com os métodos tradicionais de preparo de amostras (LLE e SPE, por exemplo), esse método apresentou a vantagem da utilização mínima de amostras e baixo consumo de solventes, tornando-o muito promissor para determinação de resíduos de fármacos^[117].

3.5 Microextração por sorvente empacotado molecularmente impressa – MEPS-MIP

A microextração por sorvente empacotado (MEPS) é uma nova técnica miniaturizada de extração em fase sólida. Ela difere das técnicas convencionais de SPE devido ao menor tempo de extração e o menor consumo de reagentes orgânicos. Este dispositivo também pode ser utilizado por várias vezes, sem que haja substituição. Esta técnica consiste de uma seringa (100-250 µL) contendo uma pequena coluna que resguarda o sorvente^[118]. A amostra é aspirada e dispensada várias vezes para que haja a extração e, em seguida, um solvente de eluição é aspirado e dispensado diretamente no cromatógrafo. A união de MEPS com o MIP têm sido bastante promissora e útil para determinação de vários analitos em amostras complexas.

Para determinação de fluoroquinolona em amostras de água, foi sintetizado um MIP utilizando ciprofloxacino como MM. Neste trabalho, Prieto et al. empacotaram o polímero em um dispositivo de MEPS e este foi utilizado como

sorvente para extração com posterior análise por LC-MS. Para comparar a eficiência do MIP-MEPS, os analitos alvos também foram determinados por MISPE. Os pesquisadores obtiveram elevada seletividade para os analitos de interesse por ambas as técnicas. O método proposto permitiu a análise de compostos em níveis de concentração baixíssimos (ng L⁻¹) com baixo consumo de solventes orgânicos e menor tempo de análise^[118]. Já para análise de compostos que causam distúrbios endócrinos, os mesmos pesquisadores sintetizaram um polímero seletivo a alquilfenóis, bisfenol A (BPA), hormônios naturais e sintéticos em amostras de águas residuais. O 17β-estradiol foi utilizado como MM, etileno glicol dimetacrilato como monômero de reticulação, acetonitrila como solvente e uma combinação de ácido metacrílico e ácido p-vinilbenzoico como monômeros funcionais. O material foi comparado a dispositivos comerciais que utilizam C18 como adsorvente, em termos de eficiência de extração, e mostrou-se mais eficiente para análise de contaminantes emergentes^[119].

3.6 Extração por dispersão em fase sólida molecularmente impressa - MSPD-MIP

A extração por dispersão da fase sólida (MSPD- do inglês *matrix solid-phase dispersion*) tem sido aplicada principalmente para o preparo de amostras sólidas, semissólidas ou muito viscosas^[120]. Devido à complexidade dessas amostras, geralmente é necessário que se realizem várias etapas de extração, tornando o procedimento moroso e muito suscetível a erros. A MSPD tem como objeto principal minimizar o número de etapas do processo de preparo, mantendo a mesma eficiência de remoção de impurezas. Normalmente, a amostra é triturada empregando-se um solvente orgânico e, em seguida, centrifugada. O sobrenadante é colocado dire-

tamente em contato com um adsorvente (normalmente sílica) que captura os interferentes deixando os analitos livres no sobrenadante. No entanto, outra etapa de purificação normalmente é requerida devido à ineficiência dos adsorventes. No intuito de minimizar o número de etapas de extração, bem como melhorar a seletividade do processo, os MIPs têm sido utilizados como adsorventes em MSPD. Contudo, cabe ressaltar que, nessa aplicação de MSPD, o adsorvente (no caso o MIP) é utilizado para capturar os analitos e não os interferentes como descrito no MSPD convencional. A amostra é triturada juntamente com o MIP para que ocorra a adsorção dos analitos. Em seguida, o polímero é lavado para retirada dos interferentes e os analitos são dessorvidos e analisados^[121-123].

Yan et al.^[124] foram os primeiros a propor o uso do MIP na extração por dispersão da fase sólida e empregaram esta técnica no preparo de amostras para análise de fluoroquinolonas em ovo,^[124] carne^[120, 124] e em soro^[123, 125] por HPLC. As amostras foram preparadas pela homogeneização de quantidades iguais de amostra e do polímero, utilizando gral e pistilo. Posteriormente, a mistura foi transferida para um cartucho contendo o MIP sintetizado e eluído com uma solução adequada para remover o analito. Para análise em HPLC, o solvente empregado na extração da amostra foi evaporado e o resíduo foi ressuspenso com a fase móvel. A seletividade do MIP foi avaliada pelo tratamento das amostras por MSPD empregando adsorventes não seletivos como sílica, C18 e Florisil. Os MIPs apresentaram melhores resultados em termos de recuperação e seletividade se comparados aos demais adsorventes.

Yan et al. empregaram a MSPD em associação com a técnica de microextração líquido-líquido para determinação de corantes Sudan em gema de ovo. A DLLME é uma técnica

rápida, simples e com alto potencial de enriquecimento. No entanto, não pode ser empregada para extração direta de amostras sólidas ou semissólidas. Assim, a amostra foi primeiramente extraída com MIP por agitação em gral e pistilo. Posteriormente, a mistura foi transferida para um cartucho contendo 50 mg de MIP e eluída com uma solução de acetona/ácido acético (95:5-v/v). A amostra foi evaporada até um volume de 1 mL. Depois da adição de 5 mL de tetracloretileno, a solução foi agitada e centrifugada, e a fase inferior foi coletada com o auxílio de uma seringa. A análise foi feita por HPLC e os resultados demonstraram que a associação de MSPD e LLME foi satisfatória na quantificação de Sudan em alimentos^[126]. Esta técnica foi também empregada na análise de cloranfenicol em amostras de solo^[127] e carne de peixe^[121]. Os polímeros foram sintetizados utilizando MAA e 4-VP como MF e EGDMA como ALC. As amostras foram extraídas por agitação direta com o MIP, como descrito anteriormente, e analisadas por HPLC.

O MIP tem sido aplicado com sucesso na MSPD no tratamento de amostras sólidas e viscosas, a fim de obter uma melhor recuperação dos analitos. Ademais, a utilização desta técnica de extração permite uma análise mais sensível, precisa e seletiva, além de minimizar consideravelmente o tempo do processo de preparo da amostra e o consumo de solvente.

3.7 Extração por polímeros de impressão molecular restritos à ligação com macromoléculas – RAM-MIP

Devido a sua alta seletividade, os MIPs são amplamente utilizados para extração e separação de diversos tipos de amostras. No entanto, alguns interferentes geralmente presentes nas amostras, como lipídeos e proteínas, podem diminuir dras-

ticamente a seletividade destes polímeros^[128]. Por outro lado, os materiais de acesso restrito (RAMs) apresentam uma excelente capacidade de eliminar a interferência de macromoléculas apesar de serem pouco seletivos^[129]. Neste contexto, foi proposta a associação de ambas as tecnologias, a fim de se obter um polímero seletivo para purificação de amostras complexas e, ao mesmo tempo, incapaz de se ligar a macromoléculas. Esses materiais foram chamados de polímero de impressão molecular restrito à ligação com macromoléculas (RAM-MIP), os quais apresentam sítios específicos de reconhecimento molecular, bem como grupos hidrofílicos/protetores externos que bloqueiam a ligação com macromoléculas. Os RAM-MIPs são sintetizados pelos métodos tradicionais de síntese de MIP e posteriormente são revestidos para formação da camada hidrofílica, a qual impede o acesso de macromoléculas aos grupos ligantes do MIP.

Haginaka et al foram os precursores dessa tecnologia quando propuseram, em 1999, um MIP seletivo a (S)-naproxeno, empregando 4-VP e EGDMA como MF e ALC, respectivamente. Uma mistura de GMMA e GDMA na proporção de 1:1 (v/v) foi adicionada ao polímero quatro horas após o início da síntese para formação da camada hidrofílica. Para avaliar a seletividade, as amostras proteicas foram submetidas à extração com o RAM-MIP e como um MIP sintetizado pelo mesmo método, mas sem a adição dos monômeros hidrofílicos. A recuperação do analito foi a mesma em ambos os polímeros, demonstrando, portanto, que a seletividade não foi alterada pela camada hidrofílica. Além disso, após a percolação de uma solução de albumina bovina em ambos os polímeros, os autores obtiveram recuperações de 100% e <10% para o RAM-MIP e MIP, respectivamente. O RAM-MIP foi empregado com sucesso na análise direta de (S)-naproxeno em amostras de soro^[130].

Ainda nesta linha, o grupo sintetizou também um RAM-MIP empregando (S)-naproxeno ou ibuprofeno como molécula modelo, e os polímeros obtidos foram utilizados na análise direta de amostras de soro através do sistema *column-switching*^[131]. A metodologia foi empregada na obtenção de RAM-MIPs para análise de anti-inflamatórios não esteroidais,^[132] antiepiléticos^[133] e bisfenol-A^[134] em amostras de água de rio.

Outra metodologia para obtenção do RAM-MIP foi proposta por Puoci et al. Os autores obtiveram um polímero pelo método de polimerização *in bulk* utilizando cafeína como MM, MAA como MF, DVB como ALC e glicidimetacrilato (GMA) como comonômero pro-hidrofílico. A camada hidrofílica foi criada pela abertura do anel epóxido da molécula de GMA, empregando uma solução de ácido perclórico. O principal objetivo dos autores foi obter um polímero para ser empregado em ambientes fisiológicos. Os estudos demonstraram que o RAM-MIP obtido utilizando o GMA como comonômero pro-hidrofílico pode ser empregado com sucesso neste tipo de ambiente^[135]. Outros trabalhos do mesmo grupo relatam a síntese de RAM-MIPs para emprego em liberação controlada de p-aminofenol^[136], e para análise direta de sulfonamidas em leite^[137]. Cabe destacar a eficácia de ambos os polímeros na eliminação de macromoléculas.

Um RAM-MIP foi preparado através do método de polimerização por inchaço, utilizando fenobarbital como molécula modelo, 4-VP como MF, EGDMA como ALC e um glicomonômero para obtenção da camada hidrofílica. O glicomonômero foi previamente preparado empregando-se octa-acetato de lactose, HEMA e trifluoreto de boro. Na segunda etapa do processo de polimerização, o glicomonômero foi adicionado e a síntese ocorreu por mais 1 hora

à temperatura ambiente e por 24 horas a 50 °C em atmosfera de argônio. Depois da síntese, uma solução de metóxido de sódio em metanol foi utilizada para promover a alcoólise do polímero para a formação da camada hidrofílica. O polímero sintetizado apresentou boa seletividade e capacidade de eliminar as macromoléculas e foi empregado na análise de fenobarbital em amostras de soro^[138].

3.8 Outros

A extração em fase sólida em discos tem grandes aplicações principalmente na área ambiental por suportar grandes volumes de amostra. Porém, sua utilização associada a MIPs ainda parece ser pouco explorada. Alguns autores chegaram a descrever a síntese de membranas impressas, como Sergeyeva et al. Eles propuseram a modificação superficial de membranas com uma fina camada de um MIP seletivo para o herbicida triazínico terbutetona. Foi avaliada a capacidade das membranas de adsorverem a terbutetona, sendo que as membranas impressas mostraram maior capacidade de adsorção para a terbutetona do que para compostos similares (atrazina, desmetrina e metribuzina). A alta afinidade destas membranas sintéticas associada ao baixo custo do preparo delas mostraram que elas poderiam ser empregadas com sucesso em procedimentos de separação como SPE^[139].

Em outro estudo, Pap et al. descreveram um método de pré-tratamento de amostra em dois estágios para aplicação em amostras de águas de rios. Os autores propuseram a síntese de um MIP utilizando MAA como MF, EGDMA como ALC, terbutilazina como MM e tolueno como solvente porogênico. Num primeiro estágio, grandes volumes de água foram concentrados em um disco C₁₈ e, em um segundo momento, a amostra passou por uma etapa de *clean-up* sele-

tivo em MIP^[140]. O acoplamento das duas técnicas poderia mais uma vez indicar uma tendência de MISPE em disco.

Suedee et al. estudaram a possibilidade de desenvolver um MIP para reconhecimento múltiplo utilizando uma mistura de tetraciclinas e seus produtos de degradação como molécula-modelo. Um agente plasticizante de polivinilcloro e dibutilftalato foi empregado como matriz da membrana, e partículas de MIP foram incorporadas como fase de adsorção sólida para extração seletiva de tetraciclina e seus análogos (doxiciclina, clortetraciclina e oxiteraciclina) de soluções aquosas. A avaliação da extração foi realizada através de um método de diálise. Os resultados mostraram que a seletividade do polímero era específica para o grupo de compostos estruturalmente relacionados com o modelo, indicando a possibilidade de se utilizar o material preparado como fase de adsorção seletiva para remoção de tetraciclinas de ambientes aquáticos^[141]. O mesmo material poderia encontrar aplicações associado à extração em fase sólida sob a forma de discos.

Entre outros trabalhos de extração em fase sólida diferenciada, Tan et al. prepararam um MIP de prometrina sintetizado por polimerização térmica sobre a superfície de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e desenvolveram uma técnica de microextração baseada no revestimento desse material por uma membrana porosa, integrando as vantagens da MISPE impressa com a LPME (microextração em fase líquida). Um sistema de microextração, composto de um clip de papel e uma membrana contendo nanotubos impressos, foi colocado sob agitação magnética e apenas os analitos alvo e as moléculas interferentes de tamanho menor que o poro da membrana foram extraídos na sua fase orgânica, ocorrendo a adsorção seletiva dos

analitos no MIP, enquanto os interferentes permaneceram na fase orgânica e foram eluídos na etapa seguinte. O método, que combina filtração em membrana, LLE (extração líquido-líquido) e reconhecimento por impressão molecular, mostrou alta seletividade e capacidade de pré-concentração, além das vantagens de fácil operação e baixo consumo de solvente orgânico. A técnica se mostrou efetiva para a extração de herbicidas triazínicos de águas de rios, efluentes e amostras de leite^[142].

Em um estudo recente, uma fibra de sílica de 0,1 cm de diâmetro foi recoberta por um MIP sintetizado para análise de estrogênio em amostras complexas. A fibra foi sintetizada num capilar, em que os reagentes de síntese (estradiol como MM, MAA, AIBN, TRIM e acetonitrila) foram colocados para que ocorresse o processo de polimerização. Posteriormente, a fibra recoberta foi retirada do capilar, colocada em um tubo PEEK (tubo utilizado em sistemas cromatográficos) e instalada num HPLC com sistema multidimensional para que houvesse a pré-concentração dos analitos em um primeiro estágio e extração num segundo. O método apresentou bom resultado com relação à seletividade e grande potencial para análise em matrizes complexas com mínimo pré-tratamento^[143].

Figueiredo et al. propuseram o emprego de uma sonda de MIP para a extração de fenotiazínicos em amostras de plasma humano. Os autores sintetizaram um MIP seletivo à clorpromazina e promoveram a fixação do polímero em um filme de cola epóxico sobre uma espátula de vidro. Depois da secagem a sonda foi mergulhada na amostra para extração e colocada embaixo do *spray* sónico da técnica EASI (*easy ambiente sonic spray ionization*) para dessorção, ionização e análise por espectrometria de mas-

sas. Bons resultados foram obtidos para análise semiquantitativa de 5 fenotiazinas com limites de quantificação da ordem de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ^[144].

4 Conclusões

Como pôde ser visto, há hoje diversas possibilidades para o emprego de MIPs em preparo de amostras, o que certamente é resultado de avanços nas metodologias de síntese e nas configurações dos sistemas de extração. Essa constatação nos permite concluir ainda que os MIPs deixaram de ser uma tendência promissora em Ciência de Materiais para realmente se tornarem uma opção vantajosa na solução de problemas no preparo de amostras. Ademais, é certo que essa tecnologia ainda carece de evolução principalmente no sentido de melhoria da seletividade e outras características relevantes em processos de extração. Algumas aplicações ainda são restritas, como, por exemplo, o reconhecimento molecular de proteínas, devido à dificuldade de se molar sítios específicos para macromoléculas e a extração direta de analitos em fluidos proteicos devido à inevitável impregnação de proteínas no polímero. Finalmente, ousamos ainda destacar como tendência o emprego de MIP na análise direta de classes de compostos estruturalmente semelhantes por espectrometria de massas e sem separação cromatográfica, uma vez que a extração se restringe à classe, evitando assim problemas de supressão iônica.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) projetos CDS-APQ-01323-09 e CDS-APQ-01612-10, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento

de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) o suporte financeiro.

Referências

- Majores RE. An overview of sample preparation. *LC-GC* 1991; 9:16-20.
- Smith RM. Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A* 2003; 1000:3-27. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00511-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00511-9)
- Kataoka H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 2003; 22:232-244. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00402-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00402-3)
- Queiroz SCN, Collins CH, Jardim ICS. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova* 2001; 24:68-76.
- Papp R, Mullett WM, Kwong E. A method for the direct analysis of drug compounds in plasma using a single restricted access material (RAM) column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004; 36:457-464. PMID:15522518. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2004.07.029>
- Anderson JA. High performance liquid chromatography (direct injection techniques). *Clinical Chemistry* 1993; 65: 434-443.
- Pawliszyn J. Unified theory of extraction. In: Pawliszyn J, editor. *Sampling and sample preparation for field and laboratory*. Elsevier; 2002. p. 353.
- Ramos L, Smith RM. Preface. *Journal of Chromatography A* 2007; 1152:1. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.041>
- Ramos L, Smith RM. Preface. *Journal of Chromatography A* 2007; 1153:1. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.041>
- Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. New sample preparation technologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009; 393:779 <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-2493-y>
- Beltran A, Borrull F, Cormack PAG, Marce RM. Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. *Trends in Analytical Chemistry* 2010; 29:1363-1375. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2010.07.020>
- Polyakov MW. Adsorption properties and structure of silica gel. *Russian Journal of Physical Chemistry* 1931; 2: 799-804.
- Dickey FH. The Preparation of Specific Adsorbents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1949; 35:227-229. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.35.5.227>
- Dickey FH. Specific Adsorption. *The Journal of Physical Chemistry* 1955; 59:695-707. <http://dx.doi.org/10.1021/j150530a006>
- Wulff G, Sarhan A. Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung. *Angewandte Chemie* 1972; 84:341. <http://dx.doi.org/10.1002/ange.19720840838>
- Arshady R, Mosbach K. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics* 1981; 182:687-692. <http://dx.doi.org/10.1002/macp.1981.021820240>
- Norrlöw O, Glad M, Mosbach K. Acrylic polymer preparations containing recognition sites obtained by imprinting with substrates. *Journal of Chromatography A* 1984; 299:29-41. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)97819-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)97819-7)
- Alexander C, Andersson HS, Andersson LI, Ansell RJ, Kirsch N, Nicholls IA et al. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition* 2006; 19:106-180. PMID:16395662. <http://dx.doi.org/10.1002/jmr.760>
- Andersson LI, Paprica A, Arvidsson T. A highly selective solid phase extraction sorbent for pre-concentration of sameridine made by molecular imprinting. *Chromatographia* 1997; 46:57-62. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02490930>
- Walshe M, Howarth J, Kelly MT, O'Kennedy R, Smyth MR. The preparation of a molecular imprinted polymer to 7-hydroxycoumarin and its use as a solid-phase extraction material *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1997; 16:319-325. [http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085\(97\)00043-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085(97)00043-5)
- Masqué N, Marcé RM, Borrull F, Cormack PA, Sherrington DC. Synthesis and Evaluation of a Molecularly Imprinted Polymer for Selective On-Line Solid-Phase Extraction of 4-Nitrophenol from Environmental Water. *Analytical Chemistry* 2000; 72:4122-4126. <http://dx.doi.org/10.1021/ac0000628>
- Mayes AG, Mosbach K. Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry?. *Trends in Analytical Chemistry* 1997; 16:321-332. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(97\)00037-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00037-X)

- 23 Ye L, Mosbach K. The Technique of Molecular Imprinting - Principle, State of the Art, and Future Aspects. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2001; 41:107-113. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1014498404292>
- 24 Andersson LI. Molecular imprinting for drug bioanalysis: A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2000a; 739:163-173. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00432-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00432-6)
- 25 Sellergren B. Direct Drug Determination by Selective Sample Enrichment on an Imprinted Polymer. *Analytical Chemistry* 1994; 66:1578-1582. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00081a036>
- 26 Vitor RV, Martins MCG, Figueiredo EC, Martins I. Application of molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for salivary cotinine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011; 400:2109-2117. PMID:21448605. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-4870-1>
- 27 Javanbakhtha M, Attaranb AM, Namjumanesha MH, Esfandyari-Manesha M, Akbari-Aderganic B. Solid-phase extraction of tramadol from plasma and urine samples using a novel water-compatible molecularly imprinted polymer. *Journal of Chromatography B* 2010; 878:1700-1706. PMID:20452295. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.04.006>
- 28 Gholivand MB, Khodadadian M. Rationally designed molecularly imprinted polymers for selective extraction of methocarbamol from human plasma. *Talanta* 2011; 85:1680-1688. PMID:21807239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.066>
- 29 Yang J, Hu Y, Cai JB, Zhu XL, Su QD, Hu YQ et al. Selective hair analysis of nicotine by molecular imprinted solid-phase extraction: An application for evaluating tobacco smoke exposure. *Food and Chemical Toxicology* 2007; 45:896-903. PMID:17222493. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2006.11.010>
- 30 Xie J, Chen L, Li C, Xu X. Selective extraction of functional components derived from herb in plasma by using a molecularly imprinted polymer based on 2,2-bis(hydroxymethyl)butanol trimethacrylate. *Journal of Chromatography B* 2003; 788:233-242. [http://dx.doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00796-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00796-1)
- 31 El-Sheikh AH, Al-Quse RW, El-Barghouthi MI, Al-Masri FS. Derivatization of 2-chlorophenol with 4-amino-anti-pyrene: A novel method for improving the selectivity of molecularly imprinted solid phase extraction of 2-chlorophenol from water. *Talanta* 2010; 83:667-673. PMID:21111190. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.022>
- 32 Dai C, Zhou X, Zhang Y, Liu S, Zhang J. Synthesis by precipitation polymerization of molecularly imprinted polymer for the selective extraction of diclofenac from water samples. *Journal of Hazardous Materials* 2011; 198:175-181. PMID:22050930. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.027>
- 33 Núñez L, Turiel E, Martín-Esteban A, Tadeo JL. Molecularly imprinted polymer for the extraction of parabens from environmental solid samples prior to their determination by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Talanta* 2010; 80:1782-1788. PMID:20152411. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.10.023>
- 34 Dong X, Wang N, Wang S, Zhang X, Fan Z. Synthesis and application of molecularly imprinted polymer on selective solid-phase extraction for the determination of monosulfuron residue in soil. *Journal of Chromatography A* 2004; 1057:13-19. PMID:15584218. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.036>
- 35 Ferrer I, Lanza F, Tolokán A, Horvath V, Sellergren B, Horvai G et al. Selective Trace Enrichment of Chlorotriazine Pesticides from Natural Waters and Sediment Samples Using Terbutylazine Molecularly Imprinted Polymers. *Analytical Chemistry* 2000; 72:3934-3941. PMID:10959985. <http://dx.doi.org/10.1021/ac000015f>
- 36 Turiel E, Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta* 2010; 668:87-99. PMID:20493285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.019>
- 37 Baggiani C, Baravalle P, Giovannoli C, Anfossi L, Giraudi G. Molecularly imprinted polymer/cryogel composites for solid-phase extraction of bisphenol A from river water and wine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; 397:815-822. PMID:20225052. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3591-1>
- 38 She Y, Cao W, Shi X, Lv X, Liu J, Wang R et al. Class-specific molecularly imprinted polymers for the selective extraction and determination of sulfonylurea herbicides in maize samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2010; 878:2047-2053. PMID:20598653. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.05.038>
- 39 Shi X, Meng Y, Liu J, Sun A, Li D, Yao C et al. Group-selective molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the simultaneous determination of six sulfonamides in aquaculture products.

- Journal of Chromatography B* 2011; 879:1071-1076. PMID:21459054. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.03.019>
- 40 Baggiani C, Baravalle P, Giraudi G, Tozzi C. Molecularly imprinted solid-phase extraction method for the high-performance liquid chromatographic analysis of fungicide pyrimethanil in wine. *Journal of Chromatography A* 2007; 1141:158-164. PMID:17178127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.016>
- 41 Turiel E, Tadeo JL, Cormack PAG, Martin-Esteban A. HPLC imprinted-stationary phase prepared by precipitation polymerisation for the determination of thiabendazole in fruit. *Analyst* 2005; 130:1601-1607. PMID:16284658. <http://dx.doi.org/10.1039/b511031a>
- 42 Mohamed R, Richoz-Payot J, Gremaud E, Mottier P, Yilmaz E, Tabet J-C et al. Advantages of Molecularly Imprinted Polymers LC-ESI-MS/MS for the Selective Extraction and Quantification of Chloramphenicol in Milk-Based Matrixes. Comparison with a Classical Sample Preparation. *Analytical Chemistry* 2007; 79:9557-9565. PMID:18001131. <http://dx.doi.org/10.1021/ac7019859>
- 43 Andersson HS, Nicholls IA. A historical perspective of the development of molecular imprinting. In: Sellergren B, editor. *Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies their applications in analytical chemistry*. Elsevier; 2003. p. 1.
- 44 Silva RGC, Augusto F. Sol-gel molecular imprinted ormosil for solid-phase extraction of methylxanthines. *Journal of Chromatography A* 2006; 1114:216-223. PMID:16616927. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.073>
- 45 Lin CI, Joseph AK, Chang CK, Wang YC, Lee YD. Synthesis of molecular imprinted organic-inorganic hybrid polymer binding caffeine. *Analytica Chimica Acta* 2003; 481:175-180. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00095-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00095-3)
- 46 Li F, Li J, Zhang S. Molecularly imprinted polymer grafted on polysaccharide microsphere surface by the sol-gel process for protein recognition. *Talanta* 2004; 74:1247-1255. PMID:18371777. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2007.08.032>
- 47 Queirós RB, Silva SO, Noronha JP, Frazão O, Jorge P, Aguilar G et al. Microcystin-LR detection in water by the Fabry-Pérot interferometer using an optical fibre coated with a sol-gel imprinted sensing membrane. *Biosensors and Bioelectronics* 2011; 26:3932-3937. PMID:21489775. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.03.015>
- 48 Li T, Chena PY, Niena PC, Lina CY, Vittal R, Lingb TR et al. Preparation of a novel molecularly imprinted polymer by the sol-gel process for sensing creatinine. *Analytica Chimica Acta* 2012; 711:83-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.10.031>
- 49 Golesefidia MA, Es'Haghia Z, Sarafraz-Yazdic A. Design, synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for hollow fiber-solid phase microextraction of chlorogenic acid in medicinal plants. *Journal of Chromatography A* 2012; 1229:24-29. PMID:22307151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.019>
- 50 Hu C-H, Chou T-C. Albumin molecularly imprinted polymer with high template affinity - Prepared by systematic optimization in mixed organic/aqueous media. *Microchemical Journal* 2009; 91:53-58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2008.07.005>
- 51 Navarroa V, Romeroa MG, Sánchez JFF, Cormack PAG, Carretero AS, Gutiérrez AF. Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and high-performance liquid chromatography evaluation of their sorption properties. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:7289-7296. PMID:21889151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.043>
- 52 Thibert V, Legeay P, ChapuisHugon F, Pichon V. Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of cocaine and its metabolite benzoylecgonine from hair extract before LC-MS analysis. *Talanta* 2012; 88:412-419. PMID:22265519. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.009>
- 53 He J, Lv R, Zhan H, Wang H, Cheng J, Lu K et al. Preparation and evaluation of molecularly imprinted solid-phase micro-extraction fibers for selective extraction of phthalates in an aqueous sample. *Analytica Chimica Acta* 2010; 674:53-58. PMID:20638499. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.018>
- 54 Xu S, Liab J, Chen LJ. Molecularly imprinted core-shell nanoparticles for determination of trace atrazine by reversible addition-fragmentation chain transfer surface imprinting. *Journal of Materials Chemistry* 2011; 21:4346-4351. <http://dx.doi.org/10.1039/c0jm03593a>
- 55 Pan G, Ma Y, Zhang T, Guo X, Li C, Zhang H. Controlled synthesis of water-compatible molecularly imprinted polymer microspheres with ultrathin hydrophilic polymer shells via surface-initiated reversible addition-fragmentation chain transfer

- polymerization. *Soft Matter* 2011; 7:8428-8439. <http://dx.doi.org/10.1039/c1sm05497j>
- 56 Kempe H, Kempe M. Development and Evaluation of Spherical Molecularly Imprinted Polymer Beads. *Analytical Chemistry* 2006; 78:3659-3666. PMID:16737221. <http://dx.doi.org/10.1021/ac060068i>
- 57 Walsh R, Osmani Q, Hughes H, Duggan P, McLoughlin P. Synthesis of imprinted beads by aqueous suspension polymerisation for chiral recognition of antihistamines. *Journal of Chromatography B* 2011; 879:3523-3530. PMID:21982909. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.036>
- 58 López MMC, Pérez MCC, García MSD, Vilariño JML, Rodríguez MVG, Losada LFB. Preparation, evaluation and characterization of quercetin-molecularly imprinted polymer for preconcentration and clean-up of catechins. *Analytica Chimica Acta* 2012; 721:68-78. PMID:22405302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.049>
- 59 Balamurugan K, Gokulakrishnan K, Prakasam T. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymer liquid chromatography column for the separation of Cathine enantiomers. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2012; 20:53-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2011.06.004>
- 60 Sambe H, Hoshina K, Haginaka J. Molecularly imprinted polymers for triazine herbicides prepared by multi-step swelling and polymerization method: Their application to the determination of methylthiotriazine herbicides in river water. *Journal of Chromatography A* 2007; 1152:130-137. PMID:16999969. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.003>
- 61 Haginaka J. Molecularly imprinted polymers as affinity-based separation media for sample preparation. *Journal of Separation Science* 2009; 32:1548-1565. PMID:19472278. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200900085>
- 62 Soleimani M, Ghaderi S, Afshar MG, Soleimani S. Synthesis of molecularly imprinted polymer as a sorbent for solid phase extraction of bovine albumin from whey, milk, urine and serum. *Microchemical Journal* 2012; 100:1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2011.06.026>
- 63 Vieira AC, Zampieri RA, Siqueira MEPB, Martins M, Figueiredo EC. Molecularly imprinted solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of urinary trans,trans-muconic acid: a comparison with ionic exchange extraction. *Analyt* 2012; 137:2462-2469. PMID:22479697. <http://dx.doi.org/10.1039/c2an16215f>
- 64 Franqui LS, Vieira AC, Maia PP, Figueiredo EC. Extração de ácido trans-trans mucônico urinário com polímeros de impressão molecular e análise por cromatografia gasosa - espectrometria de massas. *Química Nova*. In press. PMID:11618007.
- 65 Khorrami AR, Rashidpur AJ. Design of a new cartridge for selective solid phase extraction using molecularly imprinted polymers: Selective extraction of theophylline from human serum samples. *Biosensors and Bioelectronics* 2009; 25:647-651. PMID:19157845. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2008.11.033>
- 66 Shi X, Liu J, Sun A, Li D, Chen J. Group-selective enrichment and determination of pyrethroid insecticides in aquaculture seawater via molecularly imprinted solid phase extraction coupled with gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Chromatography A* 2012; 1227:60-66. PMID:22265776. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.012>
- 67 Barros LA, Martins I, Rath S. A selective molecularly imprinted polymer-solid phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; 397:1355-1361. PMID:20333363. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3629-4>
- 68 Puoci F, Curcio M, Cirillo G, Iemma F, Spizzirri UG, Picci N. Molecularly imprinted solid-phase extraction for cholesterol determination in cheese products. *Food Chemistry* 2008; 106:836-842. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.043>
- 69 Jiang X, Zhao C, Jiang N, Zhang H, Liu M. Selective solid-phase extraction using molecular imprinted polymer for the analysis of diethylstilbestrol. *Food Chemistry* 2008; 108:1061-1067. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.039>
- 70 Figueiredo EC, Oliveira DM, Siqueira MEPB, Arruda MAZ. On-line molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective spectrophotometric determination of nicotine in the urine of smokers. *Analytica Chimica Acta* 2009; 635:102-107. PMID:19200485. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.045>
- 71 Xu Z, Chen S, Huang W, Fang G, Pingzhu H, Wang S. Study on an on-line molecularly imprinted solid-phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for separation and determination of trace estrone in environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009; 393:1273-1279.

- PMid:19104786. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-2544-4>
- 72 Feng Q, Zhao L, Yan W, Ji F, Wei Y, Lin J. Molecularly imprinted solid-phase extraction and flow-injection chemiluminescence for trace analysis of 2,4-dichlorophenol in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008; 391:1073-1079. PMid:18425501. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-2059-z>
- 73 Figueiredo EC, Sparrapan R, Sanvido GB, Santos MG, Arruda MAZ, Eberlin MN. Quantitation of drugs via molecularly imprinted polymer solid phase extraction and electrospray ionization mass spectrometry: benzodiazepines in human plasma. *Analyst* 2011; 136:3753-3757. PMid:21776492. <http://dx.doi.org/10.1039/c1an15198c>
- 74 Yan H, Qiao F, Row KH. Molecularly Imprinted Monolithic Column for Selective On-Line Extraction of Enrofloxacin and Ciprofloxacin from Urine. *Chromatographia* 2009; 70:1087-1093. <http://dx.doi.org/10.1365/s10337-009-1244-3>
- 75 Zhao C, Guan X, Liu X, Zhang H. Synthesis of molecularly imprinted polymer using attapulgite as matrix by ultrasonic irradiation for simultaneous on-line solid phase extraction and high performance liquid chromatography determination of four estrogens. *Journal of Chromatography A* 2012; 1229:72-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.042>
- 76 Oliveira HM, Segundo MA, Lima JLFC, Miró M, Cerdà V. Exploiting automatic on-line renewable molecularly imprinted solid-phase extraction in lab-on-valve format as front end to liquid chromatography: application to the determination of riboflavin in foodstuffs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; 397:77-86. PMid:20191267. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3522-1>
- 77 Zhang Z, Zhang H, Hu Y, Yao S. Synthesis and application of multi-walled carbon nanotubes-molecularly imprinted sol-gel composite material for on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography determination of trace Sudan IV. *Analytica Chimica Acta* 2010; 661:173-180. PMid:20113732. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.024>
- 78 Xu Z, Fang G, Wang S. Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for determination of trace dichlorvos residues in vegetables. *Food Chemistry* 2010; 119:845-850. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.047>
- 79 Cacho C, Turiel E, Pérez-Conde C. Molecularly imprinted polymers: An analytical tool for the determination of benzimidazole compounds in water samples. *Talanta* 2009; 78:1029-1035. PMid:19269468. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.01.007>
- 80 Melo LP, Queiroz MEC. Simultaneous analysis of parabens in cosmetic products by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 2010; 33:1849-1855. PMid:20491059. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201000024>
- 81 Zhu X, Zhu Q. Molecular imprinted Nylon-6 stir bar as a novel extraction technique for enantioseparation of amino acids. *Journal of Applied Polymer Science* 2008; 109:2665-2670. <http://dx.doi.org/10.1002/app.27557>
- 82 Gomez-Caballero A, Guerreiro A, Karim K, Piletsky S, Goicolea MA, Barrio RJ. Chiral imprinted polymers as enantiospecific coatings of stir bar sorptive extraction devices. *Biosensors and Bioelectronics* 2011; 28:25-32. PMid:21831628. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.06.048>
- 83 Yang L, Zhao X, Zhou J. Selective enrichment and determination of nicosulfuron in water and soil by a stir bar based on molecularly imprinted polymer coatings. *Analytica Chimica Acta* 2010; 670:72-77. PMid:20685419. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.041>
- 84 Wang S, Wei J, Hao T, Guo Z. Determination of ractopamine in pork by using electrochemiluminescence inhibition method combined with molecularly imprinted stir bar sorptive extraction. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2012; 664:146-151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.11.011>
- 85 Xu Z, Hu Y, Hu Y, Li G. Investigation of ractopamine molecularly imprinted stir bar sorptive extraction and its application for trace analysis of β 2-agonists in complex samples. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217:3612-3618. PMid:20399437. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.03.046>
- 86 Hu Y, Li J, Hu Y, Li G. Development of selective and chemically stable coating for stir bar sorptive extraction by molecularly imprinted technique. *Talanta* 2010; 82:464-470. PMid:20602921. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.04.057>
- 87 Xu Z, Song C, Hu Y, Li G. Molecularly imprinted stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography for trace analysis of sulfa drugs in complex samples. *Talanta* 2011; 85:97-

103. PMID:21645676. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.03.041>
- 88 Hu Y, Li J, Li G. Synthesis and application of a novel molecularly imprinted polymer-coated stir bar for microextraction of triazole fungicides in soil. *Journal of Separation Science* 2011; 34:1190-1197. PMID:21491601. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201100068>
- 89 Zhang Z, Yang MJ, Pawliszyn J. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. *Analytical Chemistry* 1994; 66:844A-853A. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00089a001>
- 90 Tamayo FG, Turiel E, Esteban AM. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *Journal of Chromatography A* 2007; 1152:32-40. PMID:17010356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.095>
- 91 Djozan D, Ebrahimi B, Mahkam M, Farajzadeh MA. Evaluation of a new method for chemical coating of aluminum wire with molecularly imprinted polymer layer. Application for the fabrication of triazines selective solid-phase microextraction fiber. *Analytica Chimica Acta* 2010; 674:40-48. PMID:20638497. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.006>
- 92 Qiu L, Liua W, Huangb M, Zhanga L. Preparation and application of solid-phase microextraction fiber based on molecularly imprinted polymer for determination of anabolic steroids in complicated samples. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217:7461-7470. PMID:20965510. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.056>
- 93 Prasad BB, Tiwari MP, Madhuri R, Sharma PS. Development of a highly sensitive and selective hyphenated technique (molecularly imprinted micro-solid phase extraction fiber-molecularly imprinted polymer fiber sensor) for ultratrace analysis of folic acid. *Analytica Chimica Acta* 2010; 662:14-22. PMID:20152260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.037>
- 94 Hu X, Pana J, Hua Y, Li G. Preparation and evaluation of propranolol molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for trace analysis of β -blockers in urine and plasma samples. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216:190-197. PMID:19084232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.064>
- 95 Djozan D, Ebrahimi B. Preparation of new solid phase micro extraction fiber on the basis of atrazine-molecular imprinted polymer: Application for GC and GC/MS screening of triazine herbicides in water, rice and onion. *Analytica Chimica Acta* 2008; 616:152-159. PMID:18482598. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.04.037>
- 96 Hu Y, Wang Y, Chen X, Hu Y, Li G. A novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber coupled with high performance liquid chromatography for analysis of trace estrogens in fishery samples. *Talanta* 2010; 80:2099-2105. PMID:20152458. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.015>
- 97 Hu X, Daia G, Huanga J, Yea T, Fanb H, Youwena T et al. Molecularly imprinted polymer coated on stainless steel fiber for solid-phase microextraction of chloroacetanilide herbicides in soybean and corn. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217:5875-5882. PMID:20708736. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.011>
- 98 Barahona F, Turiel E, Esteban AM. Supported liquid membrane-protected molecularly imprinted fibre for solid-phase microextraction of thiabendazole. *Analytica Chimica Acta* 2011; 694:83-89. PMID:21565306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.052>
- 99 Hu Y, Wang Y, Hu Y, Li G. Liquid-liquid-solid microextraction based on membrane-protected molecularly imprinted polymer fiber for trace analysis of triazines in complex aqueous samples. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216:8304-8311. PMID:19819459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.063>
- 100 Feng Q, Zhaoa L, Linb J. Molecularly imprinted polymer as micro-solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* 2009; 650:70-76. PMID:19720176. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.016>
- 101 Tarley CRT, Sotomayor LT, Kubota LT. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. *Química Nova* 2005; 28:1087-1101. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000600025>
- 102 Wang X, Maoa H, Huang W, Guan W, Zoub X, Pan J et al. Preparation of magnetic imprinted polymer particles via microwave heating initiated polymerization for selective enrichment of 2-amino-4-nitrophenol from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal* 2011; 178:85-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2011.10.015>

- 103 Wang X, Pan J, Guan W, Zou X, Huo P, Yan Y et al. Selective recognition of sesamol using molecularly imprinted polymers containing magnetic wollastonite. *Journal of Separation Science* 2011; 34:3287-3294. PMID:21997999. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201100358>
- 104 Pan J, Xu L, Dai J, Li X, Hang H, Huo P et al. Magnetic molecularly imprinted polymers based on attapulgite/Fe₃O₄ particles for the selective recognition of 2,4-dichlorophenol. *Chemical Engineering Journal* 2011; 174:68-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2011.08.046>
- 105 Pan J, Yao H, Xu L, Ou H, Huo P, Li X, Yan Y. Selective Recognition of 2,4,6-Trichlorophenol by Molecularly Imprinted Polymers Based on Magnetic Halloysite Nanotubes Composites. *The Journal of Physical Chemistry C* 2011; 115:5440-5449. <http://dx.doi.org/10.1021/jp111120x>
- 106 Wang S, Li Y, Ding M, Wu X, Xu J, Wang R et al. Self-assembly molecularly imprinted polymers of 17 β -estradiol on the surface of magnetic nanoparticles for selective separation and detection of estrogenic hormones in feeds. *Journal of Chromatography B* 2011; 879:2595-2600. PMID:21820977. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.017>
- 107 Ding M, Wu X, Yuan L, Wang S, Li Y, Wang R et al. Synthesis of core-shell magnetic molecularly imprinted polymers and detection of sildenafil and vardenafil in herbal dietary supplements. *Journal of Hazardous Materials* 2011; 191:177-183. PMID:21555181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.058>
- 108 Hu Y, Li Y, Liu R, Tan W, Li G. Magnetic molecularly imprinted polymer beads prepared by microwave heating for selective enrichment of β -agonists in pork and pig liver samples. *Talanta* 2011; 84:462-470. PMID:21376974. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.01.045>
- 109 Zhang X, Chena L, Xua Y, Wanga H, Zenga Q, Zhaoa Q et al. Determination of β -lactam antibiotics in milk based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2010; 878:3421-3426. PMID:21095165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.10.030>
- 110 Gai QQ, Qua F, Zhanga T, Zhang Y. J. The preparation of bovine serum albumin surface-imprinted superparamagnetic polymer with the assistance of basic functional monomer and its application for protein separation. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:3489-3495. PMID:21511265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.069>
- 111 Jing T, Xiaa H, Guanb Q, Lu W, Dai Q, Niu J et al. Rapid and selective determination of urinary lysozyme based on magnetic molecularly imprinted polymers extraction followed by chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta* 2011; 692:73-79. PMID:21501714. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.057>
- 112 Zhang Z, Tan W, Hu Y, Li G. Simultaneous determination of trace sterols in complicated biological samples by gas chromatography-mass spectrometry coupled with extraction using β -sitosterol magnetic molecularly imprinted polymer beads. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:4275-4283. PMID:21632061. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.022>
- 113 Jing T, Du H, Dai Q, Xia H, Niu J, Hao Q et al. Magnetic molecularly imprinted nanoparticles for recognition of lysozyme. *Biosensors and Bioelectronics* 2010; 26:301-306. PMID:20829022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.044>
- 114 Wang X, Wanga L, Hea X, Zhanga Y, Chena L. A molecularly imprinted polymer-coated nanocomposite of magnetic nanoparticles for estrone recognition. *Talanta* 2009; 78:327-332. PMID:19203590. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.11.024>
- 115 Chen L, Zhanga X, Xua Y, Dub X, Sunb X, Suna L et al. Determination of fluoroquinolone antibiotics in environmental water samples based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2010; 662:31-38. PMID:20152262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.001>
- 116 Chen L, Zhang X, Sun L, Xu Y, Zeng Q, Wang H et al. Fast and Selective Extraction of Sulfonamides from Honey Based on Magnetic Molecularly Imprinted Polymer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57:10073-10080. PMID:19817457. <http://dx.doi.org/10.1021/jf902257d>
- 117 Chen L, Liu J, Zeng Q, Wang H, Yu A, Zhang H et al. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for the separation of tetracycline antibiotics from egg and tissue samples. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216:3710-3719. PMID:19268956. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.044>
- 118 Prieto A, Schrader S, Bauer C, Möder M. Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application for microextraction by packed sorbent for the

- determination of fluoroquinolone related compounds in water. *Analytica Chimica Acta* 2011; 685:146-152. PMID:21168563. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.038>
- 119 Prieto A, Vallejo A, Zuloaga O, Paschke A, Sellergen B, Schillinger E et al. Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted polymer coupled with large volume injection-in-port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2011; 703:PMid:21843673. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.00741-51>.
- 120 Qiao F, Sun H. J. Simultaneous extraction of enrofloxacin and ciprofloxacin from chicken tissue by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010; 53:795-798. PMID:20619993. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2010.06.008>
- 121 Hu Y, Liu R, Li R, Li G. Investigation of ractopamine-imprinted polymer for dispersive solid-phase extraction of trace β -agonists in pig tissues. *Journal of Separation Science* 2010; 33:2017-2025. PMID:20533342. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201000063>
- 122 Guo L, Guan M, Zhao C, Zhang H. Molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion for extraction of chloramphenicol in fish tissues coupled with high-performance liquid chromatography determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008; 392:1431-1438. PMID:18949463. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-2454-5>
- 123 Sun H, Qiao F, Liu G, Liang S. Simultaneous isolation of six fluoroquinolones in serum samples by selective molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion. *Analytica Chimica Acta* 2008; 625:154-159. PMID:18724989. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.07.025>
- 124 Yan H, Qiao F, Row KH. Molecularly Imprinted-Matrix Solid-Phase Dispersion for Selective Extraction of Five Fluoroquinolones in Eggs and Tissue. *Analytical Chemistry* 2007; 79:8242-8248. PMID:17918913. <http://dx.doi.org/10.1021/ac070644q>
- 125 Qiao F, Yan H. Simultaneous analysis of fluoroquinolones and xanthine derivatives in serum by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled with liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 2011; 879:3551-3555. PMID:21978534. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.040>
- 126 Yan H, Wang H, Qiao J, Yang G. Molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion combined with dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of four Sudan dyes in egg yolk. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:2182-2188. PMID:21388626. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.042>
- 127 Wang T, Tong J, Sun M, Chen L. Fast and selective extraction of chloramphenicol from soil by matrix solid-phase dispersion using molecularly imprinted polymer as dispersant. *Journal of Separation Science* 2011; 34:1886-1892. PMID:21674791. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201100046>
- 128 Boos KS, Fleischer CT. Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecularly imprinted polymers (MIP). *Analytical Chemistry* 2001; 73:16-20. PMID:11605750. <http://dx.doi.org/10.1007/s002160100831>
- 129 Koeber R, Fleischer C, Lanza F, Boos KS, Sellergen B, Barcelo D. Evaluation of a Multidimensional Solid-Phase Extraction Platform for Highly Selective On-Line Cleanup and High-Throughput LC-MS Analysis of Triazines in River Water Samples Using Molecularly Imprinted Polymers. *Analytical Chemistry* 2001; 73:2437-2444. PMID:11403283. <http://dx.doi.org/10.1021/ac001483s>
- 130 Haginaka J, Takehira H, Hosoya K, Tanaka N. Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer. *Journal of Chromatography A* 1999; 849:331-339. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00570-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00570-1)
- 131 Haginaka J, Sanbe H. Uniform-Sized Molecularly Imprinted Polymers for 2-Arylpropionic Acid Derivatives Selectively Modified with Hydrophilic External Layer and Their Applications to Direct Serum Injection Analysis. *Analytical Chemistry* 2000; 72:5206-5210. PMID:11080865. <http://dx.doi.org/10.1021/ac0005215>
- 132 Hoshina K, Horiyama S, Matsunaga H, Haginaka J. Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using molecularly imprinted polymers as a pretreatment column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011; 55:916-922. PMID:21470812. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2011.03.014>
- 133 Hoshina K, Horiyama S, Matsunaga H, Haginaka J. Molecularly imprinted polymers for simultaneous

- determination of antiepileptics in river water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216:4957-4962. PMID:19439306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.071>
- 134 Sambe H, Hoshina K, Hosoya K, Haginaka J. Simultaneous determination of bisphenol A and its halogenated derivatives in river water by combination of isotope imprinting and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2006; 1134:16-23. PMID:16978634. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.072>
- 135 Parisi OI, Cirillo G, Curcio M, Puoci F, Iemma F, Spizzirri UG et al. Surface modifications of molecularly imprinted polymers for improved template recognition in water media. *Journal Of Polymer Research* 2010; 17:355-362. <http://dx.doi.org/10.1007/s10965-009-9322-7>
- 136 Puoci F, Iemma F, Cirillo G, Curcio M, Parisi OI, Spizzirri UG et al. New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. *European Polymer Journal* 2009; 45:1634-1640. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2009.01.021>
- 137 Xu W, Su S, Jiang P, Wang H, Dong X, Zhang M. Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217:7198-7207. PMID:20934183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.035>
- 138 Hua K, Zhang L, Zhang Z, Guo Y, Guo T. Surface hydrophilic modification with a sugar moiety for a uniform-sized polymer molecularly imprinted for phenobarbital in serum. *Acta Biomaterialia* 2011; 7:3086-3093. PMID:21605708. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.006>
- 139 Sergeeva TA, Matuschewski H, Piletsky SA, Bendig J, Schedler U, Ulbricht M. Molecularly imprinted polymer membranes for substance-selective solid-phase extraction from water by surface photo-grafting polymerization. *Journal of Chromatography A* 2001; 907:89-99. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01053-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01053-0)
- 140 Pap B-T, Horváth V, Tolokán A, Horvai G, Sellergren B. Effect of solvents on the selectivity of terbutylazine imprinted polymer sorbents used in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 2002; 973:1-12. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01084-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01084-1)
- 141 Suedee C-R, Srichana T, Chuchome T, Kongmark U. Use of molecularly imprinted polymers from a mixture of tetracycline and its degradation products to produce affinity membranes for the removal of tetracycline from water. *Journal of Chromatography B* 2004; 811:191-200. PMID:15522720.
- 142 Tan D-F, Deng M, Liu X, Zhao H, Li X, Quan X et al. Evaluation of a novel microextraction technique for aqueous samples: Porous membrane envelope filled with multiwalled carbon nanotubes coated with molecularly imprinted polymer. *Journal of Separation Science* 2011; 34:707-715. PMID:21312332. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201000791>
- 143 Zhong E-Q, Hu Y, Hu Y, Li G. Dynamic liquid-liquid-solid microextraction based on molecularly imprinted polymer filaments on-line coupling to high performance liquid chromatography for direct analysis of estrogens in complex samples. *Journal of Chromatography A* 2012; 1241:13-20. PMID:22554413. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.017>
- 144 Figueiredo EC, Sanvido GB, Arruda MAZ, Eberlin MN. Molecularly imprinted polymers as analyte sequesters and selective surfaces for easy ambient sonic-spray ionization. *Analyst* 2010; 135:726-730. PMID:20309446. <http://dx.doi.org/10.1039/b923289c>

Recebido: 22/06/2012

Aceito: 17/07/2012



XEVO G2-S QToF.

APRESENTANDO Xevo G2-S QToF.

Combine a revolucionária tecnologia para alta sensibilidade StepWave™ com alta durabilidade e você tem um sistema de bancada para medidas de massa exata em MS/MS como nenhum outro.

Com o Xevo® G2-S QToF agora você detecta compostos em níveis nunca antes possíveis através de um Tof de bancada.

Ao mesmo tempo mantendo a mais alta performance em UPLC®.

Isso é a espectrometria de massas no seu melhor.

Para maiores informações, visite:

www.waters.com/xevog2sqtof.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Pharmaceutical & Life Sciences | Food | Environmental | Clinical | Chemical Materials

UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes

Liane Maldaner, Isabel Cristina Sales Fontes Jardim*

*Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Cep 13083-970, Campinas, SP, Brasil
e-mail: icsfj@iqm.unicamp.br*

Resumo

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) desenvolveu-se com a introdução das partículas de fases estacionárias (FE) porosas $\leq 2 \mu\text{m}$, juntamente com a busca contínua por análises mais rápidas e eficientes, e fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Desde a sua introdução em 2004, a UHPLC vem ganhando espaço em todas as áreas de aplicação da HPLC em decorrência de suas vantagens e, desta forma, vem sendo alvo constante de novas pesquisas, principalmente no que diz respeito a novas FE e melhorias nos equipamentos. Os principais desafios no emprego da UHPLC em comparação com a HPLC já foram identificados e juntamente com os desenvolvimentos recentes serão abordados neste artigo.

Palavras-chave

UHPLC; fases estacionárias; instrumentação; UHPLC \times HPLC.

UHPLC - The present situation: developments and recent challenges

Abstract

Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) emerged with the advent of sub- $2 \mu\text{m}$ porous particles catalyzed by the continuous search for faster and more efficient analyses, and retains the same separation principles as high performance liquid chromatography (HPLC). Since its introduction in 2004, UHPLC has grown in all HPLC separation areas as a consequence of its advantages and, thus, has been a driving force for new research, especially in terms of novel stationary phases and improved equipment. The main challenges for using UHPLC, in comparison with HPLC, have already been identified and will be discussed in this paper together with recent developments in both stationary phases and instrumentation.

Keywords

UHPLC; stationary phases; instrumentation; UHPLC \times HPLC.

1 Introdução

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação bem estabelecida e é empregada nas mais diversas áreas, entre elas, química, forense, toxicológica, clínica e ambiental, para solucionar inúmeros problemas analíticos. Durante os últimos anos, muitas melhorias vêm sendo incorporadas a esta técnica, como desenvolvimentos de novas fases estacionárias (FE) e suportes cromatográficos, avanços na instrumentação, entre outros, permitindo que análises mais rápidas e mais eficientes sejam alcançadas, corroborando com a necessidade atual de aumentar o número de análises e o rendimento e reduzir os custos.

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)^[1-7] (UHPLC – *ultra-high pressure liquid chromatography* ou *ultra-high performance liquid chromatography*) desenvolveu-se a partir da introdução das partículas de FE porosas $\leq 2 \mu\text{m}$, em resposta à busca contínua por análises mais rápidas e eficientes. A UHPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC, tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas empregadas que são de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), recheadas com partículas de FE $\leq 2 \mu\text{m}$, as quais, juntamente com as altas velocidades lineares de fase móvel (FM) aumentam a resolução e a detectabilidade, diminuem o tempo das análises, porém geram um aumento significativo na pressão cromatográfica. Em vista disso, um equipamento adequado, capaz de operar a altas pressões, acima de 1000 bar (~15000 psi), é empregado para extrair um desempenho cromatográfico máximo dessa técnica.

Desde a introdução do primeiro equipamento de UHPLC pela Waters Corporation em 2004, denominado de *ACQUITY UPLC® System*, que permitiu que a técnica fosse empregada além

do meio acadêmico e avaliada por usuários diversos, até os dias atuais, a UHPLC vem ganhando espaço em todas as áreas de aplicação da HPLC, em decorrência de suas principais vantagens: diminuição considerável no tempo de análise, melhor resolução e detectabilidade, economia de fase estacionária e fase móvel, pequeno volume de amostra, facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para UHPLC, grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis e menor geração de resíduos atendendo, desta forma, à Química Verde.

Em vista deste rápido crescimento e da expansão do emprego da UHPLC nas análises de rotina, esta técnica vem sendo alvo constante de novas pesquisas, principalmente no que diz respeito a novas FE e suportes cromatográficos e melhorias nos equipamentos. Os principais desafios no uso da UHPLC em comparação com a HPLC já foram identificados e, juntamente com os desenvolvimentos recentes, serão abordados neste artigo.

2 Desenvolvimentos recentes

O desenvolvimento da UHPLC se deu em virtude da introdução das partículas de FE porosas $\leq 2 \mu\text{m}$ que, associadas às colunas cromatográficas com dimensões reduzidas e às altas velocidades lineares de FM, permitiram que análises mais rápidas fossem possíveis, sem o comprometimento da eficiência e da resolução cromatográfica. Entretanto, a grande aceitação da UHPLC nos mais diversos campos de aplicação impulsionou as pesquisas em busca de novos materiais, suportes e/ou FE e novas estratégias de uso das colunas e dos equipamentos para ancorar o crescimento e também para oferecer novas alternativas aos desafios decorrentes da expansão e da ampla variedade de áreas de aplicação.

2.1 Colunas de UHPLC: novos suportes e fases estacionárias

2.1.1 Colunas recheadas com partículas porosas $\leq 2 \mu\text{m}$

As primeiras colunas recheadas com partículas de FE $\leq 2 \mu\text{m}$ disponíveis comercialmente foram as denominadas ACQUITY BEH (BEH - *ethylene bridged hybrid*) (baseadas em sílica híbrida de segunda geração de $1,7 \mu\text{m}$, a qual possui pontes de etano inseridas na sua estrutura), introduzidas em 2004 pela Waters Corporation. Hoje, 8 anos após o surgimento da técnica, mais de 30 fabricantes estão comercializando colunas de UHPLC recheadas com FE de tamanhos de partículas que variam de $1,5$ a $2,0 \mu\text{m}$, preparadas a partir de suportes de sílica ou de sílica híbrida e modificadas com diferentes grupos químicos como: C18, C8, fenil, ciano e grupos polares embutidos^[2,4,5,8,9].

Além destas FE, muitas outras estão sendo desenvolvidas e empregadas em condições de UHPLC, como as FE baseadas em suporte de sílica de elevada resistência (HSS) (HSS - *high strenght silica*) e suportes híbridos com a superfície carregada (CSH) (CSH - *charged surface hybrid*), HILIC (HILIC - *hydrophilic interaction chromatography*), fluoradas, de modo misto, entre outras, como alternativas para as separações cromatográficas mais complexas não alcançadas com as FE tradicionais de fase reversa (FR).

O suporte cromatográfico designado de HSS foi desenvolvido pela Waters Corporation como alternativa às partículas de sílica híbrida de segunda geração (BEH) de $1,7 \mu\text{m}$ ^[10]. Este suporte cromatográfico é constituído de 100% de sílica, de tamanho de partícula de $1,8 \mu\text{m}$ e, segundo o fabricante, possui uma morfologia que é capaz de aumentar o tempo de vida útil, gerar maiores eficiências e proporcionar alta resistência mecânica, podendo ser empregado em pres-

sões de até 1034 bar (~ 15000 psi). Encontram-se disponíveis comercialmente colunas HSS C18, ciano e fluorfenil.

Mais recentemente, a Waters Corporation lançou as partículas de sílica híbrida de terceira geração, que consistem de partículas de sílica híbrida (partículas BEH de $1,7 \mu\text{m}$) incorporadas com uma pequena quantidade de carga na superfície^[11]. As principais vantagens que estas partículas apresentam são a melhora na capacidade de amostra e na simetria de pico de compostos básicos quando são empregadas FM com baixa força iônica (meio ácido). Essas partículas são comercializadas pela Waters com a denominação de CSH e encontram-se disponíveis comercialmente colunas C18, fenil-hexil e fluorfenil.

As FE denominadas de HILIC são empregadas em cromatografia de interação hidrofílica (HILIC - *hydrophilic interaction chromatography*), que é uma modalidade de separação na qual é empregada uma FE polar e uma FM menos polar, sendo, desta forma, muito propícia para análise de compostos polares e iônicos^[5,12]. As principais vantagens da HILIC em relação às separações por fase reversa, que fizeram com que elas também fossem redimensionadas para serem empregadas em UHPLC são: a ordem de eluição dos compostos em HILIC é mais ou menos oposta à ordem de eluição em FR, o que indica que a HILIC retém melhor os compostos que são problemáticos de serem analisados em FR; alta detectabilidade nas análises com detecção por espectrometria de massas (EM) devido à alta porcentagem de solvente orgânico polar empregada nas FM para HILIC e separações mais rápidas, devido a menor viscosidade da FM.

Uma alternativa para aumentar a seletividade das separações por FR é a modificação ou introdução de novos grupos químicos nas cadeias da FE^[5,12]. Dentro deste contexto, as FE que vêm ganhando destaque são as FE fluoradas,

por apresentarem uma seletividade única proveniente das propriedades específicas das ligações C-F que promovem um aumento no caráter dipolar da FE, o que intensifica a interação com compostos polares, e, dessa forma, as separações não ocorrem por um mecanismo de interação simples de FR. Entre as FE fluoradas, podem ser destacados dois tipos, aquelas que possuem os átomos de flúor ligados à cadeia alquila e aquelas que possuem os átomos de flúor ligados a grupos fenil. Estas últimas, além de possuírem a seletividade influenciada pelas propriedades específicas das ligações C-F, são também influenciadas pelas interações π - π , provenientes dos grupos fenil. Em vista disso, colunas recheadas com FE fluoradas com dimensões apropriadas para UHPLC vêm sendo comercializadas por diversos fabricantes e exploradas em diferentes campos de aplicação.

2.1.2 Colunas recheadas com partículas superficialmente porosas sub-3 μm e sub-2 μm

Conforme descrito nas seções anteriores, tanto a introdução da UHPLC quanto a expansão da técnica se deu com o advento das partículas de FE porosas $\leq 2 \mu\text{m}$. Entretanto, atualmente, praticamente todos os novos desenvolvimentos e/ou artifícios em torno de novas FE ou de novas estratégias de trabalho podem também ser transferidas/aplicadas às separações realizadas por UHPLC.

Um exemplo deste fato são as partículas de sílica superficialmente porosas (SPP) (SPP – *superficially porous particles*), que são compostas por um núcleo sólido revestido por uma fina camada de sílica porosa, que foram desenvolvidas como uma alternativa às partículas de FE porosas $\leq 2 \mu\text{m}$, por fornecerem análises rápidas e com eficiências similares, porém sem um aumento significativo da pressão cromatográfica, sendo, desta forma, compatíveis com

os sistemas convencionais de HPLC^[2,5,12,13-17]. Estas vantagens são decorrentes das características destas partículas, que são produzidas com uma estreita faixa de distribuição de tamanho e, desta forma, permitem maior densidade de recheio das colunas cromatográficas, e, devido à fina camada porosa, oferecem uma baixa resistência à transferência de massa, possibilitando o emprego de maiores velocidades lineares de FM sem perdas significativas na eficiência.

Estas partículas são comercializadas por diferentes fabricantes, como: com a denominação de Halo™, pela Advanced Material Technologies; Kinetex™, pela Phenomenex; Ascentis™ Express, pela Supelco; Poroshell 120, pela Agilent Technologies; Nucleoshell®, pela Macherey-Nagel; Sunshell, pela Biotech (patenteado pela Chromanik Technologies Inc.); e Accucore, pela Thermo Scientific, com tamanhos de partículas $\leq 3 \mu\text{m}$ (sub-3 μm) e $\leq 2 \mu\text{m}$ (sub-2 μm), sendo estas últimas apenas comercializadas pela Phenomenex. Partículas superficialmente porosas $\leq 2 \mu\text{m}$ também vêm sendo desenvolvidas pela Glantreo Ltd, Ireland, com a denominação de Eiroshell™, porém ainda não se encontram disponíveis comercialmente^[13-15]. As partículas sub-3 μm são resistentes a pressões de até 600 bar (~9000 psi) e comercializadas em colunas com diâmetros internos de 4,6, 3,0 e 2,1 mm; e as partículas sub-2 μm são resistentes a pressões de até 1000 bar (~15000 psi) e comercializadas em colunas com diâmetros internos de 3,0 e 2,1 mm. Encontram-se disponíveis FE preparadas a partir das partículas superficialmente porosas, sub-3 μm e sub-2 μm , com diferentes grupos químicos como: C18, C8, fenil, flúor, grupos polares embutidos, HILIC, entre outros.

Embora sejam, na maioria das vezes, vistas como uma alternativa ao emprego da UHPLC e, conseqüentemente, das partículas de FE porosas $\leq 2 \mu\text{m}$, quando se trata de cromatografia

rápida, estas partículas superficialmente porosas, sub-3 μm ou sub-2 μm , podem ser empregadas em conjunto com a UHPLC para que análises mais seletivas e/ou com melhor ou diferente desempenho cromatográfico sejam alcançadas. Estudos comparativos a respeito das vantagens do emprego das partículas superficialmente porosas associadas ao UHPLC em relação às partículas porosas $\leq 2 \mu\text{m}$ ainda não foram concluídos, mas indicam que, em termos de eficiência, as partículas superficialmente porosas parecem ser mais vantajosas.

2.2 Condições de operação das colunas: emprego de temperatura

Uma alternativa para melhorar o desempenho cromatográfico bem como tornar as análises por cromatografia líquida mais rápidas é através do emprego de altas temperaturas ($60 < T < 200 \text{ }^\circ\text{C}$)^[2,4,5,12,18]. O emprego de temperatura mais elevada reduz a viscosidade da FM e, desta forma, a resistência à transferência de massa também diminui, permitindo o uso de maiores vazões de FM sem aumento na pressão cromatográfica, e, conseqüentemente, análises mais rápidas são alcançadas. Além disso, o emprego da temperatura pode melhorar a eficiência e a resolução cromatográfica.

O emprego da temperatura pode ser utilizado nas separações por UHPLC, assim como nas análises por HPLC, possuindo as mesmas vantagens e limitações. Entretanto, a expansão do emprego da temperatura nas separações cromatográficas fora do meio acadêmico ainda é lenta, devido ao número limitado de FE que são estáveis em temperaturas acima de $60 \text{ }^\circ\text{C}$, a necessidade de modificação do equipamento para controlar adequadamente a temperatura da FM e a possibilidade de degradação dos compostos a serem analisados.

A maioria das FE baseadas em sílica possui estabilidade térmica até $60 \text{ }^\circ\text{C}$, independentemente se for indicada para uso em HPLC ou em UHPLC. Entre as FE que vêm sendo desenvolvidas para serem empregadas em altas temperaturas ($\geq 150 \text{ }^\circ\text{C}$), como as poliméricas, as baseadas em zircônia ou em carbono grafitizado, apenas se encontram disponíveis comercialmente, com dimensões de UHPLC e recheadas com partículas $\leq 2 \mu\text{m}$, colunas baseadas em zircônia, comercializadas pela ZirCrom[®]^[19], a Zicrom[®]-PBD e a ZirCrom[®]-PHASE, sendo a primeira modificada com polibutadieno e a segunda composta por zircônia pura. As colunas baseadas em carbono grafitizado são comercializadas pela Thermo Scientific^[20] com o nome de Hypercarb e possuem dimensões de UHPLC, porém são recheadas com partículas de $3 \mu\text{m}$.

2.3 Instrumentação

Em termos de instrumentação, a UHPLC pode ser considerada uma técnica bem estabelecida, uma vez que é comercializada por praticamente todos os grandes fabricantes de equipamentos de cromatografia líquida (Waters - ACQUITY UPLC, Agilent - 1290 Infinity LC System, Thermo Scientific Dionex - UltiMate 3000 RSLC, Shimadzu - Nexera UHPLC, Thermo Scientific - Accela High Speed LC, JASCO - X-LC, Perkin-Elmer - Flexar UHPLC, Knauer - PLATINblue UHPLC e Hitachi - LaChromUltra), permitindo, dessa forma, a expansão e o emprego da UHPLC nas análises de rotina de um laboratório.

As modificações requeridas para que um equipamento de UHPLC possa ser empregado com alto desempenho cromatográfico vão além da capacidade de trabalhar a elevadas pressões^[1,4,5,13]. É necessário também possuir um sistema de bombeamento robusto, um sistema de injeção rápido, exato e preciso na faixa de

pequenos volumes, volumes internos reduzidos (conexões, alça de amostragem, cela do detector e bombas), detectores com alta taxa de aquisição de dados e colunas e FE apropriadas.

Atualmente, os novos desenvolvimentos e/ou as melhorias relacionadas aos equipamentos de UHPLC estão direcionados, principalmente, à busca pela diminuição da dispersão da banda cromatográfica, como forma de alcançar a máxima eficiência das colunas com dimensões de UHPLC, sendo necessária, desta forma, a redução do volume extracoluna e também desenvolver sistemas de injeção mais rápidos. Além disso, vem sendo expandida a faixa de temperatura do forno de coluna e também a pressão máxima na qual o equipamento é capaz de operar.

Outro fator importante que impulsionou a expansão da UHPLC foi o desenvolvimento de detectores capazes de adquirir e processar os dados suficientemente rápido para serem compatíveis com os picos estreitos resultantes destas análises cromatográficas^[1,4,5,8,21]. Desde a introdução da técnica, detectores ópticos, UV-VIS e por arranjo de diodos, com as modificações necessárias, volume da cela do detector reduzido e longo caminho óptico, foram disponibilizados e comercializados para serem empregados nas determinações por UHPLC. Atualmente, o acoplamento da UHPLC com a espectrometria de massas também já está consolidado, com espectrômetros de massas com capacidade de trabalhar com baixos tempos de residência (*dwel time*), baixos tempos de troca de canal (*inter-channel delay*) e baixos tempos de troca de varredura (*inter-scan delay*), de tal forma que forneçam uma quantidade de pontos suficientes para a construção do pico cromatográfico, permitindo que as mais diversas áreas de aplicação tenham acesso ao emprego da UHPLC.

3 Desafios atuais para o emprego da UHPLC x HPLC

Além da necessidade de instrumentos específicos (UHPLC) para o emprego eficiente das partículas $\leq 2 \mu\text{m}$ e do custo dos equipamentos e dos consumíveis serem superiores aos de HPLC, os principais desafios estão relacionados com o uso contínuo do equipamento e estão descritos a seguir.

3.1 Efeitos decorrentes da redução das tubulações e da porosidade dos filtros da coluna

Comparando-se um sistema de UHPLC com um sistema de HPLC percebe-se uma redução significativa nos diâmetros internos (d.i.) das tubulações, que possuem tipicamente d.i. de 0,175-0,125 mm em um sistema de HPLC para d.i. de 0,125-0,0625 mm em um sistema de UHPLC e, também uma redução significativa na porosidade dos filtros que retêm as partículas da FE dentro das colunas, que é tipicamente de 2,0 ou 0,5 μm para partículas de 5 ou 3 μm , respectivamente, para filtros com porosidade de 0,2 μm para partículas $\leq 2 \mu\text{m}$. A redução dos d.i. das tubulações é necessária para diminuir o volume extracoluna e, conseqüentemente, evitar o alargamento do pico cromatográfico, enquanto que a diminuição da porosidade dos filtros é necessária para reter as partículas de FE $\leq 2 \mu\text{m}$ no interior da coluna, mantendo um leito cromatográfico estável. Porém, estas alterações fazem com que as tubulações e os filtros da coluna de um sistema de UHPLC sejam muito mais suscetíveis ao entupimento que aquelas empregadas em HPLC.

Em vista disso, para evitar a entrada de qualquer tipo de material particulado, o uso rotineiro do UHPLC requer cuidados com a limpeza cromatográfica bem mais rigorosos que aqueles empregados em um sistema de HPLC, e

envolvem^[22,23]: (i) a amostra a ser injetada, deve ser filtrada com filtros de porosidade de 0,2 μm , mesmo se ela já tiver sido centrifugada, um procedimento comumente empregado, de forma satisfatória, para as amostras a serem injetadas em um sistema de HPLC. Além disso, é recomendado que seja empregado um filtro de linha com porosidade de 0,2 μm , como precaução; (ii) a fase móvel, deve ser filtrada com filtros de porosidade de 0,2 μm (que são capazes de remover as bactérias presentes na solução) e, além disso, as FM aquosas, incluindo as tamponadas, devem ser substituídas diariamente, uma vez que pode ocorrer um crescimento microbiano que é capaz de bloquear as conexões, e o reservatório da FM deve ser substituído por um limpo cada vez que a FM for reabastecida, para evitar que a contaminação microbiana presente no frasco se transfira para a nova FM. Cuidados também devem ser tomados com o possível desgaste dos selos do pistão e dos rotores da válvula de injeção, que podem introduzir material particulado no sistema em decorrência do aumento da fricção, principalmente quando são empregadas pressões elevadas, danificando-os e reduzindo-lhes o tempo de vida útil.

Em vista disso, cabe ressaltar que os cuidados necessários com a “higiene cromatográfica” em um sistema de UHPLC devem ser bem mais rigorosos que aqueles empregados em um sistema de HPLC, porém, se realizados corretamente, o emprego rotineiro do UHPLC é totalmente adequado e possível.

3.2 Efeitos decorrentes do uso de pressões elevadas

A pressão resultante do emprego de colunas recheadas com partículas $\leq 2 \mu\text{m}$ e das altas velocidades lineares de FM, à primeira vista, é apenas uma consequência para que análises mais rápidas sejam alcançadas. Entretanto, o emprego

de pressões elevadas pode gerar alguns inconvenientes durante o desenvolvimento e a aplicação do método cromatográfico, e é discutido a seguir.

3.2.1 Efeitos de alteração da pressão na coluna

Giddings^[24], há mais de 40 anos, apontou que a pressão poderia provocar mudanças no volume molar das moléculas. Em uma análise cromatográfica, isto pode implicar em mudanças na seletividade (alteração na ordem de eluição dos compostos) ou na retenção cromatográfica (provocando o deslocamento ou a sobreposição de picos cromatográficos)^[22,25,26].

Este fato, porém, somente começou a despertar interesse e atenção com o desenvolvimento e a comercialização de equipamentos de UHPLC que oferecem a possibilidade de operar em pressões elevadas, nos quais as mudanças de volume molar das moléculas estão mais propensas a ocorrerem, sendo praticamente irrelevante quando se trabalha com HPLC.

Desta forma, a seletividade derivada da pressão deve ser levada em consideração quando houver a necessidade de alterar métodos existentes, principalmente quando envolver uma modificação brusca na pressão e/ou, quando um método é desenvolvido em um UHPLC para ser, posteriormente, transferido para um sistema de HPLC. Esta prática tem sido comum em indústrias químicas e farmacêuticas, que, para a redução de custos e tempo, desenvolvem novos métodos em sistemas de UHPLC, porém, muitos deles, para serem posteriormente transferidos para sistemas de HPLC e empregados rotineiramente. Entretanto, a transferência de um método desenvolvido por UHPLC para HPLC não é tão simples, principalmente quando os métodos desenvolvidos envolvem a análise simultânea de vários compostos com picos estreitos e/ou com baixa detectabilidade, em um curto tempo de

análise, uma vez que os problemas de coeluição ou mudança de retenção dos compostos podem ocorrer.

Na Figura 1, pode ser visualizado um exemplo de como a alteração da pressão na coluna pode afetar o volume molar dos compostos e, desta forma, alterar a seletividade e a retenção cromatográfica. Nos cromatogramas apresentados, pode-se verificar que houve a inversão da ordem de eluição dos compostos 3 e 4 e 5 e 6, e um aumento significativo na retenção do composto 5, com o aumento da pressão cromatográfica de 43 para 739 bar (~620 para 11000 psi), obtido pela introdução de um capilar restritivo na saída da coluna, sendo que as demais condições cromatográficas foram semelhantes nos dois experimentos.

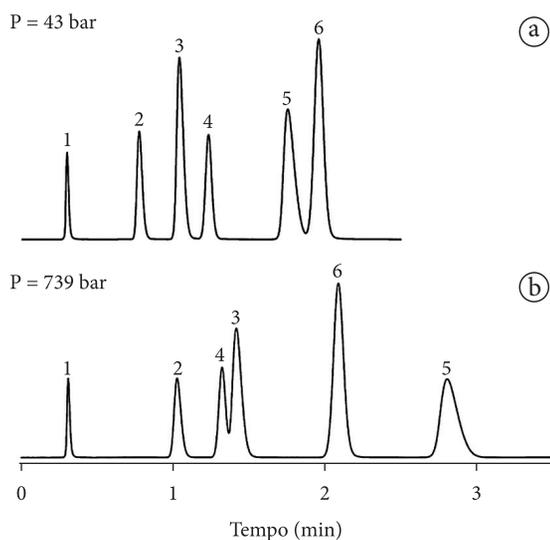


Figura 1 Cromatogramas ilustrando o efeito da pressão na seletividade e na retenção cromatográfica: (a) 43 bar e (b) 739 bar (obtida com o auxílio de um capilar restritivo de 25 cm), empregando um equipamento de UHPLC e uma coluna XBridge C18 BEH (50 mm × 2,1 mm, 5 μm) e como FM: acetonitrila: 0,025 mol/L fosfato de potássio pH 2,7 (30:70, v/v). Identificação dos picos: 1 – tioureia, 2 – propranolol, 3 – difenidramina, 4 – acetofenona, 5 – protripilina e 6 – nitrobenzeno. Adaptada de Fallas et al.^[25].

3.2.2 Efeito do aquecimento por atrito

Quando um líquido (FM) passa através de um leito cromatográfico formado de pequenas partículas de FE, o atrito entre as duas fases provoca um aquecimento^[22,27-30]. Este aquecimento é pouco significativo em se tratando de HPLC, na qual são empregadas colunas de 15-20 cm de comprimento, recheadas com partículas de FE de 3 ou 5 μm e operadas a pressões de 100-200 bar (~1400-3000 psi). Entretanto, quando são empregadas colunas de 5-10 cm de comprimento recheadas com partículas de FE ≤ 2 μm e operadas a pressões de 400-1000 bar (~6000-15000 psi), pode ser gerada uma quantidade de aquecimento que passa a ser significativa. Este calor é dissipado ao longo e através da coluna cromatográfica, resultando em gradientes de temperatura longitudinal e radial que podem influenciar na retenção e na eficiência cromatográfica e são dependentes do controle da temperatura da parede externa da coluna.

Quando a temperatura da parede externa da coluna é controlada (mantida constante), um perfil de gradiente de temperatura radial se desenvolve no interior da coluna, de tal forma que o centro da coluna torna-se mais aquecido que as laterais (Figura 2a). Esta heterogeneidade de temperatura pode provocar perda de eficiência na separação, devido ao alargamento do pico cromatográfico, uma vez que o centro da coluna estando mais aquecido faz com que as moléculas que estão no centro da banda cromatográfica se movimentem mais rapidamente que aquelas próximas da parede da coluna, resultando em um pico cromatográfico com cauda. Quando a temperatura da parede externa da coluna não é rigorosamente controlada (não é mantida constante), ocorre o desenvolvimento de um gradiente de temperatura longitudinal no interior da coluna, de tal forma que a temperatura na saída da coluna é superior a de entrada (Figura 2b). O gradiente de temperatura longitudinal pode

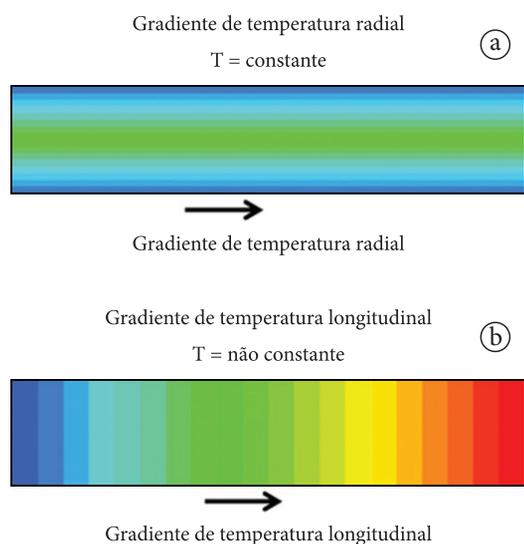


Figura 2 Ilustração dos gradientes de temperatura que se desenvolvem no interior da coluna resultantes do aquecimento por atrito. Adaptada de Gritti e Guiochon^[28].

provocar alterações nos tempos de retenção dos compostos, devido às alterações da temperatura média ao longo da coluna.

Em vista disso, cabe ressaltar que é necessário considerar a possibilidade de estar ocorrendo o aquecimento por atrito quando são desenvolvidos novos métodos de separação envolvendo pressões elevadas no UHPLC, e também quando um método é transferido do HPLC para UHPLC. Alguns artifícios que podem ser empregados para reduzir esses efeitos quando um método desenvolvido por HPLC for transferido para UHPLC são: reduzir o diâmetro interno da coluna, acoplar várias colunas em série, empregar uma temperatura de trabalho em UHPLC menor que a empregada em HPLC e, se necessário, ajustar o método para que ele seja adequado para a análise por UHPLC.

4 Considerações finais

Diante do contexto apresentado neste artigo, pode-se concluir que a UHPLC já está bem estabelecida, tanto em termos de fases esta-

cionárias como de instrumentação. É uma técnica que apresenta como vantagens a diminuição considerável no tempo de análise, a facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para UHPLC, uma grande variedade de colunas, de equipamentos e de detectores disponíveis comercialmente, indicando que, possivelmente, num futuro próximo, ela venha a superar a HPLC em análises de rotina, por também gerar menores quantidades de resíduos, atendendo aos apelos da Química Verde.

Como qualquer outra técnica, também possui as suas dificuldades ou limitações, principalmente no que diz respeito ao uso rotineiro, como a exigência de maiores cuidados com a limpeza cromatográfica e os problemas decorrentes do emprego de pressões elevadas, que podem ser superados a partir do entendimento e conhecimento dos usuários da técnica acerca deles. Entretanto, estas dificuldades não têm limitado o emprego e a expansão da UHPLC.

Agradecimentos

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

- 1 Maldaner L, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova* 2009; 32(1):214-222. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000100036>
- 2 Guillarme D, Ruta J, Rudaz S, Veuthey JL. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; 397:1069-1082. PMID:19998028. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-3305-8>
- 3 Natishan TK. Developments in fast liquid chromatographic analysis of pharmaceuticals. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2011; 34:1133-1156. <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2011.588058>

- 4 Nováková L, Vlcková H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* 2009; 656:8-35. PMID:19932811. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.004>
- 5 Núñez O, Gallart-Ayala H, Martins CPB, Lucci P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *Journal of Chromatography A* 2012; 1228:298-323. PMID:22153282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.091>
- 6 Wang Y, Ai F, Ng SC, Tan TTY. Sub-2 µm porous silica materials for enhanced separation performance in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2012; 1228:99-109. PMID:21925665. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.085>
- 7 Lanças FM. Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde? *Scientia Chromatographica* 2011; 3(1):17-23. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2011.002>
- 8 Majors RE. New chromatography columns and accessories at Pittcon 2011: Part I. *LCGC North America* 2011; 29(3):218-235.
- 9 Majors RE. New chromatography columns and accessories at Pittcon 2012: Part I. *LCGC North America* 2012; 30(4):290-310.
- 10 Waters. *HSS (High Strength Silica) Technology* [cited 2012 jul.]. Available from: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134618105>.
- 11 Waters. *CSH (Charged Surface Hybrid) Technology* [cited 2012 jul.]. Available from: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134618101>.
- 12 Maldaner L, Collins CH, Jardim ICSF. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova* 2010; 33(7):1559-1568. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000700024>
- 13 Fekete S, Oláh E, Fekete J. Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. *Journal of Chromatography A* 2012; 1228:57-71. PMID:21982449. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.050>
- 14 Wang X, Barber WE, Long WJ. Applications of superficially porous particles: High speed, high efficiency or both? *Journal of Chromatography A* 2012; 1228:72-88. PMID:21855879. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.083>
- 15 Majors RE. The increasing role of superficially porous particles in HPLC. *LCGC North America* 2010; 28(12):1014-1020.
- 16 Lanças FM. O renascimento das partículas superficialmente porosas (“core Shell particles”) em HPLC. *Scientia Chromatographica* 2010; 2(2):47-54.
- 17 Santos-Neto AJ. Como obter maior eficiência com partículas superficialmente porosas em HPLC. *Scientia Chromatographica* 2011; 3(1):65-87. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2011.005>
- 18 Borges EM, Bottoli CBG, Collins CH. Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. *Química Nova* 2010; 33(4):945-953. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000400033>
- 19 ZirChrom. *ZirCrom® UHPLC Columns* [cited 2012 jul.]. Available from: <http://www.zirchrom.com/UHPLC.asp>.
- 20 Thermo Fisher Scientific Inc. *Hypercarb High Temperature Columns* [cited 2012 jul.]. Available from: https://www.thermoscientific.com/ecommerce/servlet/productsdetail_11152_L11389_81922_11963008_-1.
- 21 Guillaume D, Schappler J, Rudaz S, Veuthey JL. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry* 2010; 29(1):15-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2009.09.008>
- 22 Dolan JW. UHPLC tips and techniques. *LCGC North America* 2010; 28(11):944-950.
- 23 Guillaume D, Veuthey JL. *Requirements for UHPLC instruments, method development in UHPLC and method transfer from regular HPLC to UHPLC* [cited 2012 jul.]. Guidelines for the use of UHPLC instruments; 2009. White Paper. Available from: http://shop.perkinelmer.com/content/applicationnotes/wht_guidelinesforuhplcinstruments.pdf.
- 24 Giddings JC. Some aspects of pressure-induced equilibrium shifts in chromatography. *Separation Science* 1966; 1(1):73-80. <http://dx.doi.org/10.1080/01496396608049435>
- 25 Fallas MM, Neue UD, Hadley MR, McCalley DV. Investigation of the effect of pressure on retention of small molecules using reversed-phase ultra-high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2008; 1209:195-205. PMID:18845303. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.021>
- 26 Fallas MM, Neue UD, Hadley MR, McCalley DV. Further investigations of the effect of pressure on retention in ultra-high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217:276-284. PMID:20015498. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.041>

- 27 Nováková L, Veuthey, JL, Guillarme, D. Practical method transfer from high performance liquid chromatography: The importance of frictional heating. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:7971-7981. PMID:21944847. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.096>
- 28 Gritti F, Guiochon, G. Optimization of the thermal environment of columns packed with very fine particles. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216:1353-1362. PMID:19150538. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.072>
- 29 Wolcott RG, Dolan JW, Snyder LR, Bakalyar SR, Arnold MA, Nichols JA. Control of column temperature in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2000; 869:211-230. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00894-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00894-8)
- 30 Villiers A, Lauer H, Szucs R, Goodall S, Sandra P. Influence of frictional heating on temperature gradients in ultra-high-pressure liquid chromatography on 2.1mm I.D. columns. *Journal of Chromatography A* 2006; 1113:84-91. PMID:16476437. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.120>

Recebido: 04/09/2012

Aceito: 24/09/2012



Velocidade sem comparação

A solução é o GCMS-TQ8030 Espectrômetro de Massa- Cromatógrafo Gasoso Triplo Quadrupolo, que proporciona velocidade, precisão e a operação fácil que todo cientista precisa.

Alta Sensibilidade e Seletividade Reforçada

- Patentado pela Shimadzu, fonte de íons de alta eficiência oferece sensibilidade inigualável
- Lentes Overdrive reduzem o ruído neutro
- Variedade de modos de medição oferecem seletividade reforçada e flexibilidade de método.

Desempenho de Alta Velocidade

- UFsweeper permite 600 transições MRM por segundo
- ASSP permite scanning de alta velocidade em 20.000u por segundo
- Medições Fast Scan/ MRM oferecem uma riqueza de informações qualitativas e quantitativas

Facilidade de Uso Definitiva

- Função AART ajusta automaticamente a mistura e tempos de retenção MRM
- Porta de Injeção Easy sTop reduz tempo inativo em manutenção
- Câmera de fonte de íons de abertura frontal torna a manutenção mais fácil



Determination of benzene in beverages by solid-phase microextraction and gas chromatography

André B. Sanchez¹, Dilma Budziak², Edmar Martendal³, Eduardo Carasek^{1*}

¹Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC,
Cep 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

²Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Campus Curitibanos, Cep 89520-000, Florianópolis, SC, Brasil

³Departamento de Química, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Cep 89219-710, Joinville, SC, Brasil
e-mail: eduardo.carasek@ufsc.br

Abstract

In this study, a simple and fast method was developed for the analysis of benzene in beverage samples using headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography (HS-SPME-GC). The influence of factors such as extraction temperature, extraction time and addition of sodium chloride on extraction yield was studied through a multivariate experimental design. Satisfactory recoveries ($\geq 73\%$) and precision, calculated as relative standard deviations ($RSD \leq 9.1\%$), were obtained. The limit of detection (LOD) of $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ was achieved for benzene along with a wide linear range of concentration. The applicability of the proposed method was demonstrated for real samples including soft-drink, juice and tea samples. Since no matrix effects were observed, quantification could readily be carried out by external calibration with standards prepared in deionized water.

Keywords

Benzene; beverages; SPME; multivariate optimization.

Determinação de benzeno em bebidas por microextração em fase sólida e cromatografia gasosa

Resumo

Neste estudo, foi desenvolvido um método simples e rápido para a determinação de benzeno em amostras de bebidas, utilizando a microextração em fase sólida no modo *headspace* e cromatografia gasosa (HS-SPME-GC). Otimização multivariada foi utilizada para determinar a influência da temperatura de extração, tempo de extração e adição de cloreto de sódio sobre o rendimento da extração. Recuperações satisfatórias ($\geq 73\%$) e precisão, calculado como desvio padrão relativo ($RSD \leq 9,1\%$), foram obtidas. Limite de detecção (LOD) de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ foi obtido para benzeno, bem como uma ampla faixa linear de concentração. O método desenvolvido foi aplicado em amostras reais de refrigerantes, sucos e chás. Como não foi observado efeito de matriz, a quantificação foi realizada por calibração externa utilizando soluções padrão preparadas em água deionizada.

Palavras-chave

Benzeno; bebidas; SPME; otimização multivariada.

1 Introduction

Benzene is carcinogenic to humans and has been reported to cause leukemia and other blood-related disorders. The several possibilities for the intake of benzene include drinking water and food, both through contaminations from the environment^[1]. Beverages, especially those containing benzoate salts and ascorbic acid, are potential sources of contamination with benzene due to the decarboxylation of benzoate by a hydroxyl radical. These reactions are catalyzed by trace levels of metal ions that reduce oxygen via reactions involving ascorbic acid to form hydroxyl radicals^[2]. However, there are no legal limits for the contamination of beverages with benzene, and the maximum contaminant level established for drinking water can be used. The World Health Organization^[1] and the US Environmental Protection Agency^[3] established the limit for benzene in drinking water at 10 and 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. A more rigorous guideline is that of the European Council, which has fixed the limit for benzene in drinking water at 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^[4].

According to the maximum contaminant level for benzene in drinking water established by several agencies, it is expected that benzene exists in trace levels in beverages, thus an extraction/preconcentration technique is required. Techniques to quantify benzene in beverages make use of some form of headspace gas chromatography. Purge and trap^[5,6] and static headspace^[2,7-9] approaches have been reported for extraction of benzene from several types of beverages. Fabietti et al.^[6], using the purge and trap technique, showed levels of benzene ranging from 1.1 to 2.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ in a cola-based soft-drink and from 2.4 to 3.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ in juice samples. Cao et al.^[7] used a static headspace approach resulting in a detection limit of 0.26 $\mu\text{g L}^{-1}$, and the analysis of 124 soft-drink samples showed

that only 6 samples had benzene concentrations over 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. On the other hand, solid-phase microextraction (SPME) which offers appropriate characteristics such as a sample preparation technique^[10], has been very little explored for the determination of benzene in beverages. Only one study to determine benzene in beverages conducted by a private laboratory used SPME in headspace mode (CAR/PDMS fiber) and gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) to monitor benzene in beverage samples^[11].

The main aim of this study was to explore the potential of the SPME technique for quantification of benzene in several kinds of beverage matrices. To reach this goal a full factorial design and a Doehlert matrix were used to optimize some variables involved in the HS-SPME procedure. The optimized method validation included determination of the limits of detection and quantification of the proposed method, linearity, repeatability, accuracy and linear range. To the best of our knowledge, this is the first time that HS-SPME procedure to determine benzene in beverage samples was conducted with diligent approach. Additionally, multivariate techniques were applied to optimize the proposed HS-SPME.

2 Experimental

2.1 Instrumentation

Chromatographic analysis for optimization and validation studies were performed on a Shimadzu GC-14B gas chromatograph (Kyoto, Japan), equipped with a split/splitless injector and a flame ionization detector. Chromatographic separations were carried out in an OV-5 capillary column (5% phenyl-95% polydimethylsiloxane, 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm film thickness (OV Specialty Chemical, Marietta,

OH, USA). Ultrapure nitrogen was used as the carrier and make-up gas at initial flow-rate of 1.0 and 35 mL min⁻¹, respectively. The initial column oven temperature was 40 °C (1 minute); subsequently increasing 10 °C min⁻¹ to 100 °C and 15 °C min⁻¹ to 180 °C. The injector temperature was fixed at 300 °C, except when the CW-DVB fiber was used because the manufacturer recommends a maximum temperature of 260 °C. The detector temperature was fixed at 280 °C.

For the samples which could be quantified in gas chromatography – flame ionization detector (GC-FID) instrument, the identity of benzene was confirmed using a GC coupled with a mass spectrometer (Shimadzu GC-MS 2010 Plus). A Restek Rtx-5MS (5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane) capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) was used for the GC separation (Bellefonte, PA). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The oven temperature program and the injector temperature were the same as described previously under the GC section. The quadrupole mass detector was operated at 200 °C in the electron impact mode at 70 eV. The ion source temperature was set at 200 °C, and the transfer line was set at 280 °C. The mass acquisition range was 40-100 *m/z*. The benzene peak was identified on the basis of its fragmentation pattern using the NIST Mass Spectral Search Program 05 (NIST, Washington, D.C., USA).

A Microquímica MQAMA 301 stirrer (Santa Catarina, Brazil) was used to stir the solutions and a Microquímica MQBTC 99-20 bath system was used to control the temperature.

2.2 Chemicals and materials

The standard stock solution of 100 mg L⁻¹ benzene (Sigma–Aldrich, Milwaukee, WI, USA) was prepared in HPLC-grade methanol (Tedia, Fairfield, OH, USA). A working standard solu-

tion of 50 µg L⁻¹ was prepared in home-made orange juice to optimize the extraction procedure. Water obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used to prepare the standard solutions to construct external calibration curves. Sodium chloride (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) was used for the modification of the ionic strength of the samples.

The fibers investigated were polydimethylsiloxane (PDMS, 100 µm), divinylbenzene-polydimethylsiloxane (DVB-PDMS, 65 µm), carboxen-polydimethylsiloxane (CAR-PDMS, 75 µm), carbowax-divinylbenzene (CW-DVB, 65 µm) and divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS, 50/30 µm), all purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

2.3 Solid-phase microextraction procedures

Firstly, each investigated SPME fiber was conditioned in the injector port of the GC according to the manufacturer's specifications. For the optimization step, as well as for validation of the method, 10 mL portions of spiked orange juice were hermetically sealed in 20 mL clear vials. In accordance with the experimental optimization design, NaCl was added to the spiked orange juice for the extractions. The samples were equilibrated during the incubation time of 5 minutes in a bath device at the appropriate temperature (selected according to the experimental design optimization procedure, described below). The fiber was immediately inserted into the GC injector and the analytes were thermally desorbed from the fiber for 5 minutes. No memory effects were observed.

2.4 Optimization strategy

The choice of the SPME fiber was carried out through univariate procedures obtained in triplicate. Each available fiber was used to extract

benzene at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ from 10 mL of orange juice containing 2.0 g NaCl for 10 minutes at a temperature of $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

After the selection of the best SPME fiber, a full factorial design with one center point, including the variables ionic strength (1.0 and 3.0 g NaCl in 10 mL of sample), temperature (2 and $10 \text{ }^\circ\text{C}$) and extraction time (10 and 20 minutes), was performed to evaluate the best experimental condition to extract benzene.

According to the results obtained in the experimental design, the extraction temperature and NaCl addition were the significant factors. A Doehlert matrix was used for optimization of the extraction temperature (0; 2 and $4 \text{ }^\circ\text{C}$) and ionic strength (1.5; 2.0; 2.5; 3.0 and 3.5 g per 10 mL of sample), fixing the extraction time at 15 minutes. The experimental data were processed using the *Statsoft Statistica 6.0* software.

3 Results and discussion

3.1 Choice of fiber

Initially, the values for the efficiency of benzene extraction from orange juice using five commercially available SPME fibers (PDMS, CAR-PDMS, DVB-CAR-PDMS, DVB-PDMS and CW-DVB) were compared. The experimental parameters fixed for this study were: extraction time of 10 minutes, extraction temperature of $5 \text{ }^\circ\text{C}$, 2 g of NaCl in 10 mL sample and $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of benzene. CAR-PDMS gave the best extraction efficiency with the highest chromatographic area for benzene; it was therefore selected to continue with the optimization. This results show that combining the absorption properties of the liquid polymer (PDMS) with the adsorption properties of porous particles (carboxen) in the extract phase promotes a high retention capacity.

3.2 Optimization of extraction conditions

A total of 11 experiments were carried out, including the three replicates at the central point, to determine the significance of each variable, as well as the influence of their interactions on the preconcentration procedure using the CAR-PDMS fiber, as shown in the Pareto chart in Figure 1.

As can be seen from the Pareto chart, the factors extraction temperature and NaCl addition are statistically significant at the 95% confidence level. The results obtained indicate that by increasing the NaCl amount and decreasing the sample temperature the recovery efficiency will improve. An increase in the extraction temperature increases the diffusion of the analytes through the fiber coating. However, as the sorption step is an exothermic process, an increase in the extraction temperature leads to a reduction in the partition coefficient, consequently reducing the amount of analyte extracted at equilibrium. Therefore, the extraction temperature has an antagonistic effect, and generally an optimum extraction temperature can be observed. Since benzene is a very volatile compound, a low sample temperature does not affect its volatility. Thus, a significant increase in the amount of benzene extracted was observed even at low sample temperature. Therefore, the thermodynamic effect was found to be more significant than the kinetic effect for the benzene extraction. On the other hand, the positive value obtained for the effect of salt addition indicates that the analytical response increases when the level changes from minimum to maximum. The addition of salt to the aqueous samples increases the ionic strength of the solutions and reduces the solubility of the analytes, as the aqueous media lowers its capacity of dissolving organic compounds, favoring

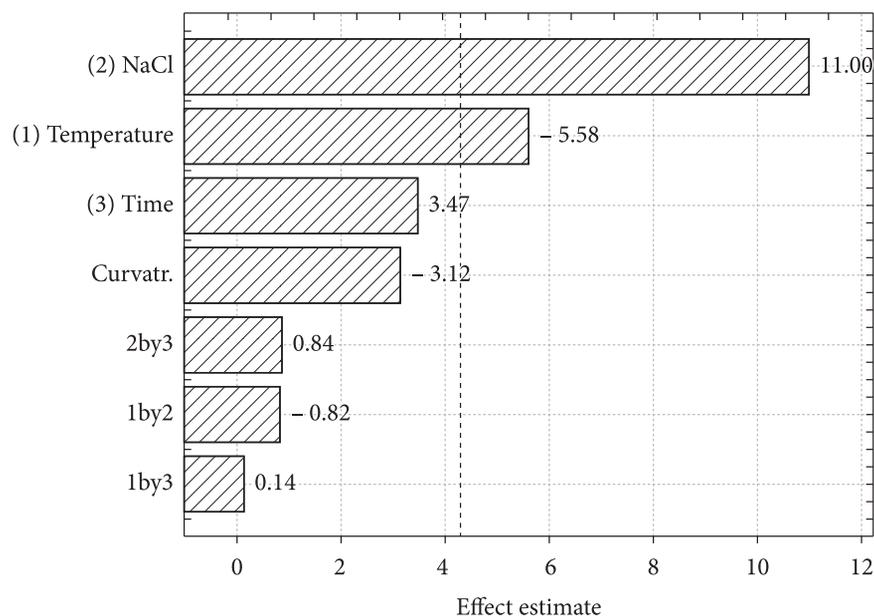


Figure 1 Pareto chart of standardized effects for the variables of the SPME procedure using the peak area as the analytical response. (1) extraction temperature, (2) NaCl addition, (3) extraction time, (1 by 2) interaction between extraction temperature and NaCl addition, (1 by 3) extraction temperature and time (2 by 3) extraction time and NaCl addition.

their partitioning between the sample and fiber coating^[12].

In contrast, by considering the conditions set within the experimental domain, neither the extraction time nor the interaction between the variables were significant, and thus the extraction time was fixed at 15 minutes for all experiments (central point value).

3.3 Doehlert design

It was observed from the results of the factorial design that the variables extraction temperature and salt addition required a final optimization. Therefore, a Doehlert matrix was constructed with these variables. Seven experiments were carried out with levels of 0, 2 and 4 °C and 1.5; 2.0; 2.5; 3.0 and 3.5 g of NaCl for the extraction temperature and salt addition, respectively.

Figure 2 shows the response surface built for the extraction temperature and NaCl addition, maintaining an extraction time of 15 minutes. By analyzing the response surface, the set of SPME conditions, within the experimental domain, that generated the best extraction recovery for benzene, was visually determined. These conditions correspond to an extraction temperature of 0 °C and addition of 3.0 g of NaCl. Experimental limitations did not allow lower extraction temperatures and the higher amount of NaCl added was close to the saturation of the solution.

3.4 Validation of the method

Table 1 shows the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), linear range, relative standard deviation (RSD) and correlation coefficient (R) for the analysis of benzene in the orange juice matrix with the CAR-PDMS fiber under

the optimized HS-SPME conditions. The limits of detection and quantification were calculated as three and ten times the standard deviation of the linear coefficient of the calibration curve divided by the slope of the calibration function, respectively. Good correlation coefficients (R) were obtained, higher than 0.999. The method showed an excellent precision, calculated as the relative standard deviation ($n = 6$) using a natural orange juice spiked with 5 and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ of benzene (Table 1).

3.5 Application of the methodology to beverage samples

The developed method was applied in the analysis of 9 commercial beverage samples purchased in Florianópolis – Brazil. All samples contained ascorbic acid and benzoic acid in their compositions, which could form benzene. These samples included soft-drinks, juices and teas ready for consumption, and concentrated juices. The concentrated juices were prepared in accordance with the information obtained from the product label before analysis. Benzene was quan-

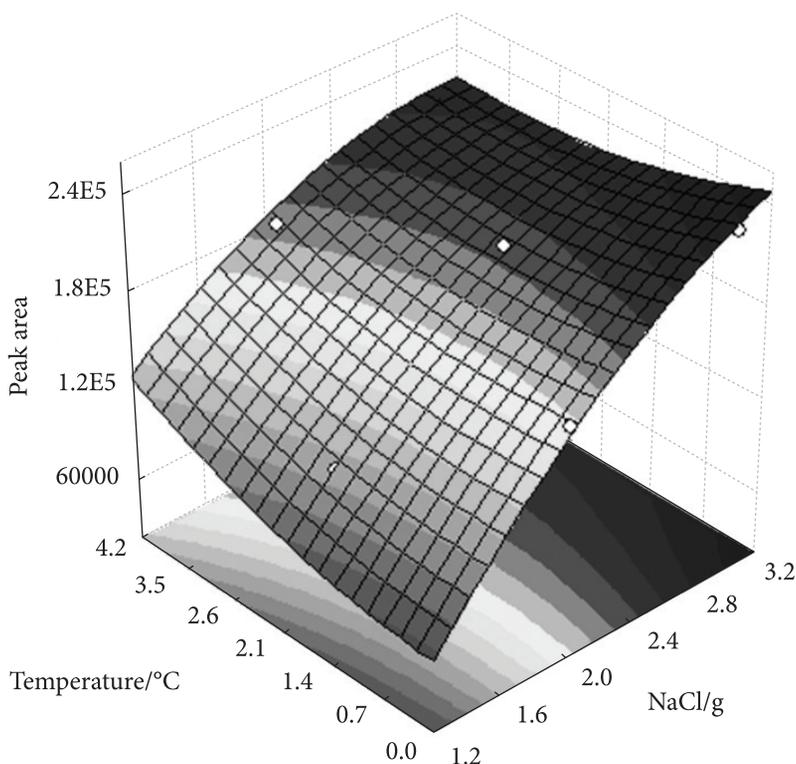


Figure 2 Response surface for optimization of extraction temperature and salt addition obtained from the Doehlert matrix.

Table 1 Linear range, correlation coefficients, and detection and quantification limits obtained for the proposed method.

Linear range / $\mu\text{g L}^{-1}$	R	LOD ^a / $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ ^b / $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD% ($n = 6$)
0.5-50	0.999	0.2	0.6	9.1 (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) 5.7 (20 $\mu\text{g L}^{-1}$)

^aLOD; limit of detection. ^bLOQ; limit of quantification.

tified using the optimized procedure. To study possible interference effects, the slopes for an external analytical curve and a standard addition curve for each sample were compared, and the relative sensitivity was calculated. This procedure shows adequate relative sensitivities for all the samples (recoveries between 73 and 99%), indicating that the sample matrix has little influence on the SPME method. Therefore, an external calibration curve can be used successfully for quantitative analysis, making the proposed method simpler and faster. The results can be observed in Table 2. In all the samples which benzene could be quantified, we performed a confirmatory study using the proposed method except we used a GC-MS instrument. All the samples analysed in GC-MS gave a positive identification of benzene, all with a similarity between obtained spectra and that from the library higher than 90%. It should be also mentioned that for none of the samples analysed a coelution occurred between flavor compounds and benzene peak, showing a satisfactory selectivity of the method.

As seen in Table 2, seven samples (78%) contained quantifiable concentrations of benzene, of which 5 were above the European limit for benzene in drinking water of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ and 4 samples were above the $5 \mu\text{g L}^{-1}$ US Environmental

Protection Agency maximum contaminant level for drinking water. Three of the samples even had a concentration higher than $10 \mu\text{g L}^{-1}$, thereby exceeding the action limit for benzene in drinking water of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ proposed by the World Health Organization^[1].

Gardner & Lawrence^[2] showed that hydroxyl radicals, generated by the metal catalyzed reduction of O_2 and H_2O_2 by ascorbic acid, can attack benzoic acid to produce benzene. Under the experimental conditions that they obtained (reaction time of 15 minutes, reaction temperature of 25°C , sample pH of 3.0, and benzoic acid, ascorbic acid, H_2O_2 , and Cu^{2+} concentrations of 760, 1400, 360 and 16 mg L^{-1} , respectively) the benzene concentration was found to be around $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$. To verify the formation of benzene in beverages, we carried out an experiment using natural orange juice and adding benzoic acid and ascorbic acid in a concentration much closer to the real quantities found in commercial products. The natural orange juice was spiked with benzoic acid at a concentration of 100 mg L^{-1} , ascorbic acid at a concentration of 20 mg L^{-1} and Cu^{2+} at a concentration of $100 \mu\text{g L}^{-1}$. H_2O_2 was not added (as this substance is not added to any commercial beverage) and the sample pH was 3. The prepared orange juice was storage at room

Table 2 Concentration and recovery values using standard addition and external calibration curve methods.

Sample	Mean concentration \pm SD/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Recovery (%)
Cola-based soft drink	0.8 ± 0.2	81.0
Citrus fruit juice	<LOD ^a	82.4
Lemon juice	0.8 ± 0.3	99.5
Isotonic juice	1.2 ± 0.7	73.2
Tea 1	15.2 ± 1.1	94.0
Tea 2	12.6 ± 1.5	86.5
Tea 3	11.4 ± 0.5	77.3
Concentrated juice 1 ^a	6.9 ± 0.6	92.3
Concentrated juice 2 ^a	<LOD ^b	86.6

^aprepared in accordance with the information obtained from the product label before analysis. ^bLOD; limit of detection.

temperature and two portions of 10 mL were analyzed after: 30 minutes and 45 days. As in the case of Gardner & Lawrence^[2], in the first analysis of this study no benzene was detected, but in the second analysis we detected a benzene concentration of 7.2 $\mu\text{g L}^{-1}$, demonstrating the formation of benzene under real conditions found in industrialized beverages and confirming that the source of benzene found in the samples we analysed can be the decarboxylation of benzoic acid used in beverage fabrication.

4 Conclusions

The optimization of the variables using full factorial design and response surface methodologies was applied with success in the determination of benzene in beverages samples. The proposed method achieved excellent detection limits, relative standard deviation and accuracy. The results of this study demonstrate the applicability of the proposed method for determination of benzene concentrations below 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, that is, the ability to quantify benzene even for the European Council, which establishes the most rigorous guidelines for benzene in drinking water.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq for their financial support.

References

- 1 World Health Organization – WHO. *Guidelines for drinking-water quality*. Available from: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf.
- 2 Gardner LK, Lawrence GD. Benzene production from decarboxylation of benzoic acid in the presence of ascorbic acid and a transition metal catalyst. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 1993; 40:693-695. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00029a001>
- 3 U.S. Environmental Protection Agency – EPA. *Consumer Factsheet on: BENZENE*. Available from: <http://www.epa.gov/safewater/dwh/c-voc/benzene.html>.
- 4 European Communities. Council Directive 98/83/EC, of 03 november 1998. *Official Journal of the European Communities*, Nov. 1998. Available from: http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/1998/l_330/l_33019981205en00320054.pdf.
- 5 McNeal TP, Nyman PJ, Diachenko GW, Hollifield HC. Survey of benzene in foods by using headspace concentration techniques and capillary gas chromatography. *Journal of AOAC International* 1993; 76(6):1213-1219. PMID:8286958.
- 6 Fabietti F, Delise M, Bocca AP. Investigation into the benzene and toluene content of soft drinks. *Food Control* 2001; 12(8):505-509. [http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00041-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00041-X)
- 7 Cao XL, Casey V, Seaman S, Tague B, Becalski A. Determination of benzene in soft drinks and other beverages by isotope dilution headspace gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 2007; 90(2):479-484.
- 8 Nyman PJ, Diachenko GW, Perfetti GA, Macneal TP, Hiatt MH, Morehouse KM. Survey results of benzene in soft drinks and other beverages by headspace gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 2008; 56(2):571-576. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0724791>
- 9 Poucke CV, Detavernier C, Bocxlaer JFV, Vermeylen R, Peteghem CV. Monitoring the benzene contents in soft drinks using headspace gas chromatography-mass spectrometry: A survey of the situation on the Belgian market. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 2008; 56(12):4504-4510. <http://dx.doi.org/10.1021/jf072580q>
- 10 Budziak D, Martendal E, Carasek E. Preparation and application of NiTi alloy coated with ZrO₂ as a new fiber for solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* 2007; 1164(1-2):18-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.001>
- 11 Food Survey Information Sheets. *Survey of benzene in soft drinks*. 2006. Available from: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/fsis0606.pdf>.
- 12 Pawliszyn J. *Solid Phase Microextraction: Theory and practice*. Wiley-VCH; 1997.

Received: 11/10/2012

Approved: 31/10/2012

Desvendando a medição nos ensaios químicos: 2. A Rastreabilidade da Medida

Oscar Bahia Filho^{1*}, Patrícia Regina Prada²,
Carla Meneghesso², Fernando Mauro Lanças²

¹TQW Consultoria em Química e Qualidade, CEP 13400-000, Piracicaba, SP, Brasil
e-mail: oscarbfilho@terra.com.br

²Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil

Resumo

Desde a adoção das diretrizes da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, o termo rastreabilidade do resultado vem sendo cobrado pelos organismos de acreditação como parte inerente dos requisitos demonstráveis durante uma avaliação. Para a metrologia física, o conceito de rastreabilidade pode ser facilmente demonstrado pela natureza da medida, já para a metrologia química, esta demonstração não é tão simples, pois, nos ensaios químicos, via de regra, as medidas são indiretas, isto é, os resultados da concentração do composto na amostra são obtidos através da medição de outras quantidades/unidades diferentes da expressa nos relatórios. Além da transformação da unidade de medida, outra característica dos ensaios químicos é a utilização de um conjunto de equipamentos utilizados em várias etapas de um único ensaio. Assim, a rastreabilidade de um ensaio químico pode ser representada pelo procedimento operacional padrão usado e a incerteza intrínseca do processo, não simplesmente pela rastreabilidade no seu conceito ortodoxo ao SI. O presente trabalho, segundo da série, visa discutir a contribuição da incerteza referente à rastreabilidade dos equipamentos usados em comparação à incerteza referente à rastreabilidade da condução do procedimento operacional, além de mostrar a forte dependência da natureza da amostra (efeito matriz) e seu impacto na incerteza do resultado, quando uma amostra é aplicada a um procedimento não adequado. Os resultados sugerem que um procedimento operacional elaborado de um método validado com controles de desempenho estabelecidos a priori e executados durante a condução dos ensaios representa a rastreabilidade do ensaio.

Palavras-chave

Rastreabilidade; incerteza da medição; procedimento operacional padrão; controle estatístico de processo; validação de métodos.

Unraveling the measurement in chemical analysis: 2. Traceability of Measurement

Abstract

Since the adoption of the guidelines of the ABNT NBR ISO/IEC 17025, the term traceability of results has been used by accreditation bodies as part of the requirements inherent demonstrable during an auditing. For metrology physical the demonstration of traceability can be easily made by the nature of

the measure, already for chemical metrology, this demonstration is not so simple, because the chemical tests, as a rule, are indirect measures, ie, results the concentration of the component in the sample is obtained by measuring other quantities / units from the different units expressed in reports. In addition the transformation of the measuring unit, another characteristic of chemical testing is the use of a set of equipment used in various steps in a single assay. Thus, the traceability of a test chemical can be represented by the standard operating procedure used and the intrinsic uncertainty of the process, not just for the traceability in its orthodox concept to the SI. This work, second of the series, aims to discuss the contribution of uncertainty concerning the traceability of equipment used in comparison to the uncertainty concerning the traceability of driving operating procedure, and shows the strong dependence of the nature of the sample (matrix effect) and its impact the uncertainty of results when a sample is applied to a non adequate procedure. The results suggest that an operational procedure produced of a validated method with controls performance established a priori and implemented during driving tests represents the traceability test.

Keywords

Traceability; measurement uncertainty; standard operating procedure; statistical process control; method validation.

1 Introdução

No primeiro artigo^[1] dessa série, foi abordado que a garantia da confiabilidade da medida nos ensaios químicos é baseada em quatro parâmetros: (i) procedimentos operacionais padrão conduzidos por (ii) pessoal habilitado utilizando (iii) equipamentos calibrados instalados em (iv) local e condições ambientais adequadas. Nele foi mostrado que a contribuição do modelo matemático que representa a curva de calibração ou analítica para a incerteza do processo analítico global é, muitas vezes, mais significativa que a incerteza associada aos equipamentos críticos usados. Neste segundo artigo, será dada ênfase à importância da rastreabilidade da medição no estabelecimento da incerteza global do processo de medida nos ensaios químicos.

No documento intitulado Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)^[2], a rastreabilidade metrológica é definida como a

[...] propriedade de um resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição. (p. 28).

Este conceito pode facilmente ser usado em medidas físicas^[3], na qual a unidade de medida será a mesma do resultado do ensaio e, comumente o processo de medição é conduzido, via de regra, em um único equipamento calibrado; medição do comprimento de um parafuso com um paquímetro, por exemplo. Desta forma, a confiabilidade da medida está assegurada pela rastreabilidade do padrão de referência utilizado para a calibração do equipamento, acrescida do processo de medição propriamente dito, qual seja: uso de procedimento operacional padrão, treinamento do operador e controle das condições ambientais que podem afetar a medida. Havendo controle sobre o treinamento do operador na condução do ensaio em conformidade ao procedimento operacional e das condições ambientais, etapas estas quase nunca críticas nessa classe de medidas (físicas), a rastreabilidade metrológica do ensaio se restringe à calibração do equipamento.

Já a medição nos ensaios químicos são invariavelmente feitas *indiretamente*^[4-6], isto é,

os resultados da concentração do composto na amostra são obtidos através da medição de outras quantidades/idades diferentes da expressa nos relatórios (tais como o peso/alíquota da amostra, resposta de sinal a partir do instrumento relativamente à concentração de uma série de soluções padrão diluídas preparadas a partir de material de referência, etc.) e transformadas por meio de modelos matemáticos na unidade de interesse do ensaio. Desta forma, a rastreabilidade das medidas nos ensaios químicos não pode ser atribuída, apenas, à rastreabilidade de seus equipamentos críticos, mas outros fatores devem ser levados em conta, como o fato da medida ter uma dependência clara da natureza da amostra^[7], sendo tal fenômeno denominado efeito matriz. Assim, o termo metrologia nos ensaios químicos necessita ser relacionado a uma grande “faixa” de rastreabilidades^[3], reconhecidamente, mais diretamente no procedimento operacional padrão utilizado, pois nele estão as variáveis mais críticas, em que quaisquer variações experimentais não validadas no procedimento, como exemplo, natureza da matriz, variações nas condições ambientais e diferentes sensibilidades de equipamentos, entre outras, podem causar impactos significativos na incerteza do resultado e, portanto, na rastreabilidade. Neste sentido, muitas adaptações do conceito ortodoxo^[3] da rastreabilidade são necessárias para o uso racional do termo quando aplicado aos ensaios químicos de rotina.

A rastreabilidade metrológica e a incerteza da medida são conceitos interligados^[8,9]. Assim, o entendimento da definição de rastreabilidade claramente sugere que apenas resultados analíticos com a “declaração” da sua incerteza podem ser rastreáveis, ou que possa ter sua rastreabilidade demonstrada. Entretanto, um engano muito comum nos laboratórios de ensaios é achar que a rastreabilidade é importante apenas porque sua demonstração reduzirá a incerteza^[7]. É necessá-

rio esclarecer que a rastreabilidade é um processo que antecede a medição e pode ser estabelecida antes da medida sequer começar. Além disso, o que torna o processo de rastreabilidade diferente da estimativa da incerteza é que a incerteza apenas poder ser estimada durante e após o ato da medição^[10]. Desta forma, para reduzir a incerteza de uma medida, será necessário “melhorar” a execução da medida, atuando principalmente na contribuição da incerteza que for mais significativa na incerteza global do processo. Ainda, é preciso entender que a rastreabilidade nos ensaios químicos é feita em dois momentos. O primeiro momento se refere à rastreabilidade da calibração do conjunto de equipamentos utilizados na medida, que representa a **exatidão** da calibração, já, no segundo momento, refere-se às operações experimentais para a condução da medida, que representa a **precisão** da medida. Estendendo este conceito, pode-se dizer que, da variação da exatidão da calibração, surgem os erros sistemáticos e, das alterações da precisão da medida, surgem os erros aleatórios^[11].

Considerando que o procedimento operacional padrão pode representar mais realisticamente a rastreabilidade nos ensaios químicos^[12], pois a abordagem sistemática para a comparabilidade dos resultados através da rastreabilidade ao SI dos ensaios químicos iniciou-se somente em 1993 e as análises químicas datam de muito antes, a validação das etapas experimentais críticas torna-se fundamental para o controle e manutenção da confiabilidade dos resultados, ou seja, a rastreabilidade do processo. Neste sentido, qualquer que seja a natureza e origem do método de ensaio, para se tornar um procedimento operacional padrão, em conformidade com as diretrizes da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025^[13], ele deve ter um mínimo de testes experimentais que confirmem que os seus resultados sejam

comparáveis, confiáveis e, principalmente, que suas etapas experimentais estejam sob controle.

Do controle das etapas experimentais se dará maior repetibilidade dos resultados, consequentemente, uma menor dispersão de valores, que levará a uma estimativa da incerteza cada vez menor. Assim, a redução da incerteza de um processo de medição reflete no conhecimento de suas etapas críticas e seu posterior controle com indicadores periódicos de seu desempenho. Sendo assim, estimar a incerteza de um procedimento sem previamente conhecê-lo, e, principalmente, não ter domínio das etapas críticas, é, no mínimo, contraprodutivo.

O presente trabalho irá abordar a importância de se estabelecer um planejamento experimental de validação do método antes de se elaborar o procedimento operacional padrão, a contribuição da incerteza da exatidão da calibração e a incerteza da precisão da operação e a contribuição de efeito matriz sobre a rastreabilidade da medida.

2 Experimental

No Laboratório de Cromatografia – CROMA, da USP de São Carlos, foram validados métodos para a determinação de Di-hidroestreptomicina em seis diferentes matrizes analíticas, a saber: (i) plasma, (ii) leite, (iii) fígado, (iv) rim, (v) músculo e (vi) gordura, por LC-MS/MS. O modelo de validação dos métodos seguiu as diretrizes da Resolução da ANVISA RE N°899^[14], de 29 de maio de 2003, tendo sido avaliados experimentalmente os itens seletividade, linearidade, repetibilidade, precisão, exatidão, LIQ (Limite Inferior de Quantificação), LD (Limite de Detecção) e recuperação. Os dados obtidos são mostrados na Tabela 1.

O procedimento analítico foi baseado nas etapas de tomada de amostra (massa ou volume,

dependendo do estado da amostra), seguido de fortificação (caso recuperação), adição de soluções extratoras, homogeneização em vórtex, separação em centrífuga, com posterior coleta do sobrenadante, fortificação (caso curva analítica), adição de reagentes (leite e plasma) ou uso de SPE (músculo, fígado, rim e gordura) para *clean-up*, homogeneização em vórtex, separação em centrífuga, tomada de alíquota, filtração e análise em LC-MS/MS. Do ponto de vista metrológico, o procedimento de ensaio é o mesmo, pois as operações unitárias são iguais, o que difere é a natureza dos solventes pelas características da matriz. Desta forma, é possível comparar os dados experimentais e analisar o efeito matriz.

Analisando os dados de validação obtidos experimentalmente para o mesmo analito, utilizando a mesma técnica analítica para as seis diferentes matrizes analíticas, é possível inferir que o desempenho do método é fortemente influenciado pela natureza da matriz, pois importantes variáveis como seletividade, a faixa analítica, a precisão dos resultados e, principalmente a sensibilidade, expressa tanto em termos de LD como LIQ, são muito diferentes. Desta forma, um dos principais mecanismos na determinação da rastreabilidade nos ensaios analíticos é o efeito matriz. Em algumas técnicas analíticas, como a emissão atômica com plasma de argônio indutivo (ICP-AES), o efeito matriz pode ser visto muito facilmente na determinação de metais em águas em que um dos elementos prepondera em concentração, como, por exemplo, água do mar. Assim, pode-se concluir que o efeito matriz é diretamente dependente da técnica analítica usada no ensaio químico.

O modelo utilizado para o cálculo da estimativa da incerteza foi descrito por Bahia Filho^[15] e baseia-se na determinação experimental de quatro fases distintas do processo analítico, a saber: (i) preparo da solução padrão, (ii) preparo da

Tabela 1 Dados experimentais do procedimento obtido para a validação das diferentes matrizes.

Parâmetro	Matriz analítica					
	Plasma	Leite	Fígado	Rim	Músculo	Gordura
Avaliação/nível	Sem interferente/95,0%	Sem interferente/90,6%	Sem interferente/87,6%	Sem interferente/92,3%	Sem interferente/100%	Sem interferente/100%
Modelo	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear
Faixa (ng/g)	10 a 200	100 a 2000	125 a 1250	250 a 2500	125 a 1250	125 a 1250
R	0,9932	0,9985	0,9932	0,9943	0,9980	0,9984
Concentração (CV - %)	Baixa: 11,9 Média: 8,2 Alta: 2,0	Baixa: 7,4 Média: 2,5 Alta: 13,3	Baixa: 13,6 Média: 6,0 Alta: 4,6	Baixa: 4,1 Média: 3,0 Alta: 1,9	Baixa: 9,8 Média: 2,6 Alta: 2,3	Baixa: 14,4 Média: 5,2 Alta: 2,7
Repetibilidade	Baixa: 14,8 Média: 6,2 Alta: 2,2	Baixa: 4,4 Média: 4,1 Alta: 14,8	Baixa: 12,6 Média: 6,8 Alta: 3,4	Baixa: 4,4 Média: 1,3 Alta: 4,2	Baixa: 6,0 Média: 2,5 Alta: 4,1	Baixa: 10,8 Média: 7,4 Alta: 3,1
Precisão	Baixa: 1,6 Média: 6,7 Alta: 1,8	Baixa: 2,7 Média: 3,6 Alta: 6,6	Baixa: 2,3 Média: 8,6 Alta: 2,5	Baixa: 1,1 Média: 8,2 Alta: 8,8	Baixa: 7,6 Média: 3,0 Alta: 3,8	Baixa: 0,0 Média: 5,4 Alta: 1,2
Exatidão	10,0	100,0	125,0	250,0	125,0	125,0
LQ	1,0	10,0	75,0	100,0	25,0	25,0
LD	Baixa: 89,9 Média: 85,3 Alta: 91,4	Baixa: 81,8 Média: 71,6 Alta: 72,1	Baixa: 100,7 Média: 102,9 Alta: 99,8	Baixa: 109,0 Média: 90,2 Alta: 106,3	Baixa: 89,5 Média: 76,5 Alta: 76,8	Baixa: 107,7 Média: 100,2 Alta: 86,6
Recuperação (%)						

curva analítica, (iii) precisão do resultado obtido e (iv) recuperação do analito adicionado à matriz.

A novidade no presente artigo é que foram separadas as contribuições da calibração de todos os equipamentos das contribuições experimentais das etapas do processo. Desta forma, foram agrupadas as incertezas provenientes das calibrações, do tipo A, conhecida como incertezas herdadas e que chamamos de incerteza da exatidão. Similarmente, foram combinadas as incertezas padrão de todas as etapas experimentais, do tipo B, conhecida como incerteza experimental e que chamamos de incerteza da precisão. Com o objetivo de comparar o nível de contribuição de ambas as incertezas padrão na incerteza combinada do processo, foram construídos gráficos e planilhas mostradas a seguir.

Para o cálculo da incerteza da precisão da operação, foram consideradas todas as fontes das etapas experimentais que contribuem para a incerteza combinada, por exemplo, operação de preenchimento de balão volumétrico, tomada de alíquotas com micropipeta, construção da curva de calibração, recuperação do analito e precisão dos resultados. Um resumo dos resultados obtidos para a matriz leite é mostrado detalhadamente na Tabela 2. Na Figura 1 é mostrado o grá-

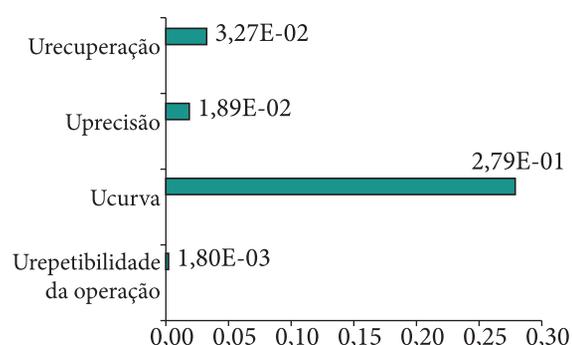


Figura 1 Contribuição das quatro fontes para a incerteza padrão combinada para a incerteza da operação para a matriz leite.

fico de barras com as contribuições individuais de cada uma das etapas na incerteza combinada.

A incerteza padrão combinada da precisão encontrada foi 0,28 ng/mL. Das quatro operações relativas à incerteza da precisão, pode-se observar que a contribuição da fonte de erro relacionada à construção da curva de calibração é a mais significativa, seguida do ensaio de recuperação do analito e da precisão do resultado.

Já para o cálculo da incerteza da exatidão, foram consideradas todas as incertezas declaradas nos certificados de calibração de cada equipamento que contribui para a incerteza combinada, por exemplo, da balança, das micropipetas e dos balões. Um resumo dos resultados obtidos para a matriz leite é mostrado detalhadamente na Tabela 3. Na Figura 2, é mostrado o gráfico de barras com as contribuições individuais de cada equipamento na incerteza combinada.

A incerteza padrão combinada da exatidão encontrada foi 0,0038 ng/mL. De todas as calibrações consideradas, a relativa à balança foi a mais significativa, seguida da micropipeta.

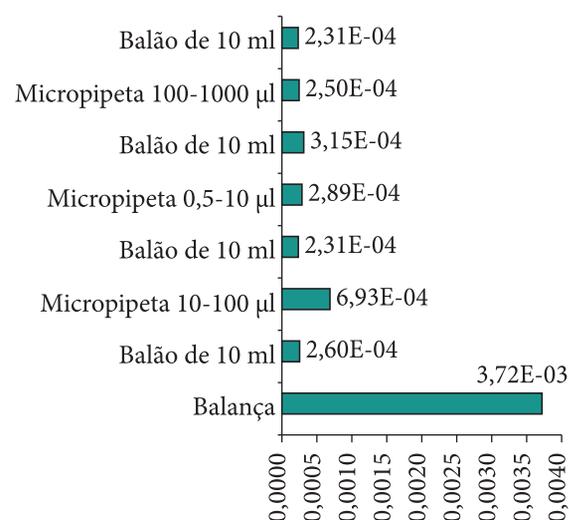


Figura 2 Contribuição das incertezas da calibração na incerteza padrão combinada para a matriz leite.

Tabela 2 Exemplo de planilha de cálculo para a incerteza combinada das operações do método. Os dados são provenientes da matriz leite.

Operação	Etapa	Unidade	Incerteza	Incerteza relativa	Incerteza relativa ao quadrado	Soma	μprecisão
Balão de 10 mL	Preenchimento	10	9,02E-03	9,02E-04	8,14E-07		
Micropipeta 10-100 μL	Tomada de alíquota	100	8,16E-05	8,16E-07	6,66E-13		
Balão de 10 mL	Preenchimento	10	9,02E-03	9,02E-04	8,14E-07		
Micropipeta 0,5-10 μL	Tomada de alíquota	10	6,19E-05	6,19E-06	3,83E-11		
Balão de 10 mL	Preenchimento	10	9,02E-03	9,02E-04	8,14E-07		
Micropipeta 100-1000 μL	Tomada de alíquota	502	5,04E-04	1,00E-06	1,01E-12	7,93E-02	2,82E-01
Balão de 10 mL	Preenchimento	10	9,02E-03	9,02E-04	8,14E-07		
Curva analítica	Construção	-	2,79E-01	-	7,78E-02		
Precisão dos resultados	Repetibilidade da amostra fortificada	-	1,89E-02	-	3,57E-04		
Recuperação do analito	Adição da fortificação	-	3,27E-02	-	1,07E-03		

Tabela 3 Exemplo de planilha de cálculo para a incerteza combinada dos certificados de calibração. Os dados são provenientes da matriz leite.

Equipamento	Identificação/certificado de calibração	Unidade	Incerteza	Incerteza relativa	Incerteza relativa ao quadrado	Soma	μxatidão
Balança	BAL-001/BAL0175/2011	0,0132	4,91E-05	3,72E-03	1,38E-05		
Balão de 10 mL	BVT-9038/ALR 0701/11	10	2,60E-03	2,60E-04	6,75E-08		
Micropipeta 10-100 μL	MIC-005/VD-08-525/10	100	6,93E-02	6,93E-04	4,80E-07		
Balão de 10 mL	BVT-9055/ALR 1403/11	10	2,31E-03	2,31E-04	5,33E-08	1,47E-05	3,84E-03
Micropipeta 0,5-10 μL	MIC-001/V-10923/10	10	2,89E-03	2,89E-04	8,33E-08		
Balão de 10 mL	BVT-9054/ALR 1395/11	10	3,15E-03	3,15E-04	9,92E-08		
Micropipeta 100-1000 μL	MIC-006/V-10924/10	502	1,26E-01	2,50E-04	6,25E-08		
Balão de 10 mL	BVT-9035/ALR 0692/11	10	2,31E-03	2,31E-04	5,33E-08		

A Figura 3 mostra um resumo dos dados obtidos na análise da contribuição de ambas as incertezas, da precisão e da exatidão, na incerteza padrão combinada do ensaio.

Observando os dados da Figura 3, pode-se inferir que a contribuição relativa à incerteza da precisão, que representa a condução de todas as etapas experimentais do ensaio químico é muito mais significativa do que a contribuição da incerteza da exatidão, que representa a calibração de todos os equipamentos críticos usados. Estes dados corroboram com o “sentimento” da grande maioria de técnicos que conduzem ensaios de que a rastreabilidade da medição nos ensaios químicos não pode ser vista de uma forma ortodoxa, ou seja, apenas nos certificados de calibração, mas deve ser considerada como um todo. Ainda, apenas a rastreabilidade aos equipamentos críticos não assegura que o ensaio analítico está sob controle e, portanto, apto a ser acreditado.

O mesmo procedimento de cálculo foi aplicado no ensaio de Dihidrostreptomina em todas as matrizes estudadas. Os dados obtidos são mostrados nas Figuras 4-8.

Analisando os dados de contribuição para as diferentes matrizes, mostrados nas Figuras 4-8, pode-se chegar à mesma conclusão no que se refere à contribuição já discutida para a matriz

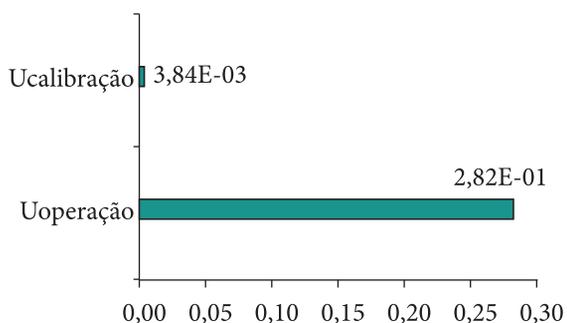


Figura 3 Incerteza associada à calibração dos equipamentos e à precisão da operação para a matriz leite.

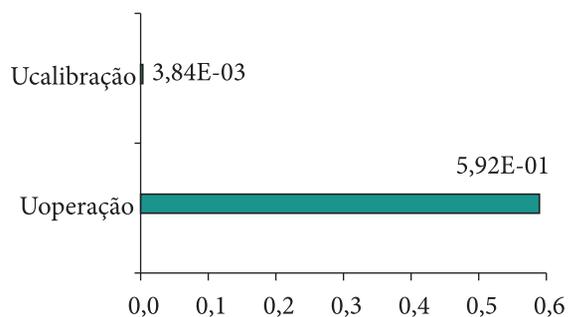


Figura 4 Incerteza associada à calibração dos equipamentos e à precisão da operação para a matriz plasma.

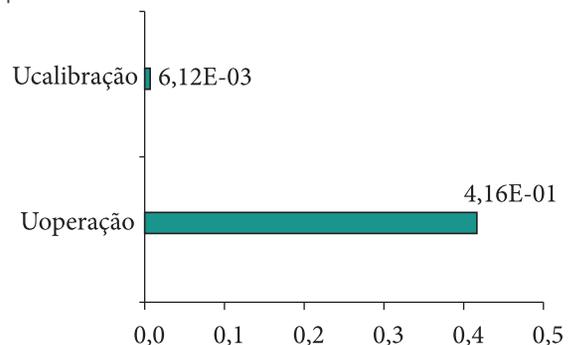


Figura 5 Incerteza associada à calibração dos equipamentos e à precisão da operação para a matriz fígado.

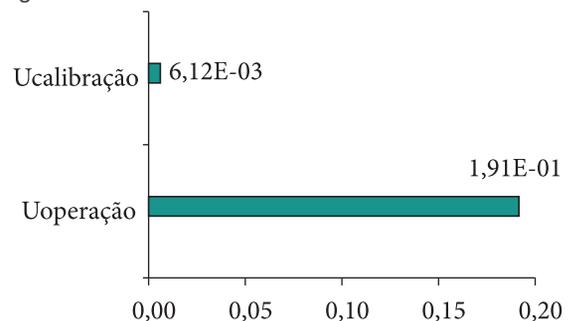


Figura 6 Incerteza associada à calibração dos equipamentos e à precisão da operação para a matriz gordura.

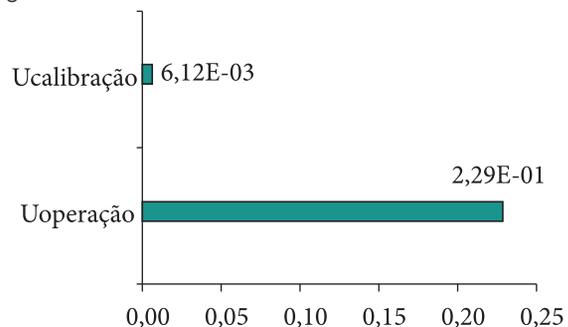


Figura 7 Incerteza associada à calibração dos equipamentos e à precisão da operação para a matriz músculo.

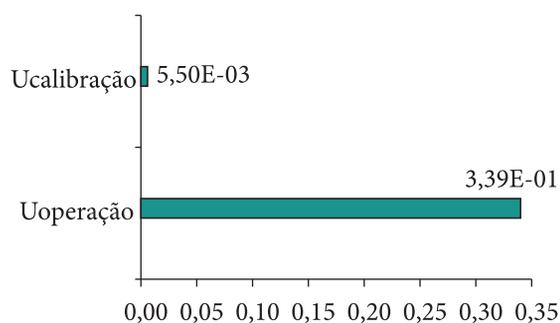


Figura 8 Incerteza associada à calibração dos equipamentos e à precisão da operação para a matriz rim.

leite, mostrada na Figura 3. O interessante aqui é que as contribuições independem da matriz, mas são dependentes do processo e, por esta razão, os valores encontrados são muito próximos. Cabe salientar ainda que a constância no processo de ensaio aqui mostrada só foi possível porque todos os ensaios para diferentes matrizes foram validados, antes de se obter os dados para este trabalho. É possível inferir que, para métodos não validados ou validados em extensão não adequada, maior variabilidade no processo provavelmente seria obtida.

3 Conclusão

Os dados obtidos corroboram para mostrar que a rastreabilidade dos ensaios químicos deve ser vista de uma forma mais abrangente, não apenas da maneira ortodoxa da metrologia descrita no documento VIM. Assim, uma corrida na definição de modo purista pode afastar os pesquisadores da real rastreabilidade da medida nos ensaios químicos.

A análise dos dados apresentados neste trabalho sugere que os controles analíticos realizados antes do surgimento do termo rastreabilidade já eram executados nos laboratórios. É salutar pensar que a introdução das diretrizes da norma NBR ABNT ISO/IEC 17025 trouxe mui-

tas contribuições aos ensaios, principalmente no que se refere à comparabilidade dos resultados de uma mesma amostra obtida em laboratórios diferentes, contudo é muito oportuno discutir que resultados diferentes encontrados por laboratórios diferentes têm muito mais a ver com a característica do método analítico e suas etapas que simplesmente uma rastreabilidade ao SI. Assim, os dados aqui apresentados sugerem que a rastreabilidade de um resultado de ensaio químico é muito mais influenciado pela condução de um procedimento operacional padrão validado, nas condições de uso, de um método consagrado do que devido apenas à rastreabilidade ortodoxa. É óbvio que a calibração dos equipamentos críticos é importante, mas não deve ser o fim determinístico para o ensaio químico.

Referências

- 1 Bahia Filho O, Prada PR, Meneghesso C, Lanças FM. Desvendando a medição nos ensaios químicos: 1. A curva analítica ou de calibração. *Scientia Chromatographica* 2011; 3(3):251-261. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2011.015>
- 2 Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. *Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados* (VIM 2012). Luso-Brasileira. Duque de Caxias: INMETRO, 2012.
- 3 Valcarcel M, Rios A. Traceability in chemical measurements for the end users. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 1999; 18(9-10).
- 4 King B. Meeting ISO/IEC 17025 traceability requirements - A new guide with worked examples. *Accreditation and Quality Assurance* 2003; 8(7-8):380-382.
- 5 Armishaw P, King B, Millar RG. Achieving traceability in chemical measurement – a metrological approach to proficiency testing. *Accreditation and Quality Assurance* 2003; 8(5).
- 6 Priel M, Amarouche S, Fiscaro P. Metrological traceability is not always a straight line. *Accreditation and Quality Assurance* 2009; 14(11):593-599. <http://dx.doi.org/10.1007/s00769-009-0540-9>

- 7 Thompson M. Traceability in perspective. *Accreditation and Quality Assurance* 2012; 17(3):353-354. <http://dx.doi.org/10.1007/s00769-011-0866-y>
- 8 Koeber R, Linsinger TPJ, Emons H. An approach for more precise statements of metrological traceability on reference material certificates. *Accreditation and Quality Assurance* 2010; 15(4):255-262. <http://dx.doi.org/10.1007/s00769-010-0644-2>
- 9 Bich W. Interdependence between measurement uncertainty and metrological traceability. *Accreditation and Quality Assurance* 2009; 14(11):581-586. <http://dx.doi.org/10.1007/s00769-009-0500-4>
- 10 De Bievre P. Traceability is not meant to reduce uncertainty. *Accreditation and Quality Assurance* 2003; 8(11):497-497. <http://dx.doi.org/10.1007/s00769-003-0704-y>
- 11 Barros Neto BB, Scarminio IS, Bruns RE. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: Unicamp; 1995. 278 p. PMID:7584822.
- 12 Kaarls R, Milton MJT. Metrology in chemistry: considerations, approaches and developments on the applicability of methods of 'higher order'. *Comptes Rendus Physique* 2004; 5(8):907-920.
- 13 Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. *NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro: ABNT; 2005.
- 14 Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- 15 Bahia Filho O, Prada PR, Xavier C, Lanzas FM. O significado da estimativa da incerteza na determinação de resíduos usando métodos cromatográficos. In: *Livro de resumos do Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins – SIMCRO*; 2010; Campos do Jordão. Campos do Jordão; 2010.

Recebido: 31/10/2012

Aceito: 13/11/2012

Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos

Liziara da Costa Cabrera¹, Manoel Leonardo Martins², Ednei Gilberto Primel¹,
Osmar Damian Prestes², Martha Bohrer Adaime², Renato Zanella^{2*}

¹Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Cep 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

²Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Cep 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil
e-mail: rzanella@base.ufsm.br

Resumo

Este artigo proporciona uma visão geral da técnica de Extração em Fase Sólida Dispersiva (D-SPE) como uma importante etapa do método QuEChERS que, com um procedimento fácil e rápido, permite obter extratos mais limpos para as análises multirresíduo. A D-SPE envolve, em geral, o uso de um ou mais sorventes, juntamente com sulfato de magnésio anidro, em um tubo de centrifuga, para remover os coextrativos do extrato orgânico. Esta técnica é prática e eficiente para limpar extratos de diferentes amostras complexas, como alimentos de origem vegetal ou animal. Alguns detalhes práticos do uso de diferentes sorventes são apresentados com as principais aplicações.

Palavras-chave

Preparo de amostra; limpeza de extratos; sorventes.

Dispersive Solid Phase Extraction in the determination of residues and contaminants in food

Abstract

This paper provide an overview of the technique Dispersive Solid Phase Extraction (D-SPE) as an important step of the QuEChERS method that permit to obtain, in a easy and quick procedure, cleaned extracts for the multiresidue analysis. The D-SPE involves, in general, the use of one or more sorbent together with magnesium sulfate anhydrous in a centrifuge tube to remove the co-extractives from the organic extract. This technique is practical and efficient to clean-up extracts from different complex samples, like foods of vegetable or animal origin. Some practical details of different sorbents are presented with principal applications.

Keywords

Sample preparation; clean-up; sorbents.

1 Introdução

Na análise de resíduos e contaminantes em alimentos, o preparo de amostra envolve a extração dos analitos e a subsequente limpeza do extrato com a finalidade de isolar os compostos de interesse e remover interferentes da matriz que afetam o sistema de análise. Estes procedimentos consistem em transferir os analitos da matriz para outra fase, empregando simultaneamente uma etapa de limpeza para remoção de substâncias interferentes (isolamento), aumentando a concentração dos analitos (enriquecimento) a um nível acima do limite de detecção da técnica analítica^[1]. Nos últimos anos, ocorreu um rápido desenvolvimento de novos métodos analíticos, visando à determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. Estes avanços tiveram como objetivo a substituição dos métodos tradicionais de análise de resíduos, que apresentavam como características a morosidade de suas diversas etapas, emprego de grandes volumes de solvente, alto custo, etc.^[2].

Geralmente, a complexidade da composição dos alimentos ocasiona dificuldades para a quantificação de resíduos e contaminantes, sendo necessária a realização de uma etapa de limpeza do extrato, após extração com solvente. Essa etapa é fundamental, uma vez que reduz as interferências e o efeito matriz, além de diminuir a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico. No sentido de melhorar a análise quantitativa, esforços foram realizados no desenvolvimento de novos métodos de extração e limpeza^[2]. O efeito matriz é observado quando uma considerável diferença de resposta é obtida entre padrões preparados no solvente e aqueles preparados no extrato da matriz, com boa precisão. Uma das maneiras de minimizar e/ou eliminar este efeito é reduzir a quantidade de com-

ponentes da matriz que coeluem com os analitos no detector e, para isto, métodos de extração mais seletivos e etapas mais eficientes de limpeza (*clean-up*) devem ser desenvolvidos. Contudo alternativas, como por exemplo, a padronização externa realizada em extrato da matriz idêntica ou similar ao da amostra é geralmente utilizada^[3]. Na Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*, GC-MS) o efeito de matriz, além de gerar porcentagens de recuperação superiores a 100%, pode causar outras alterações na análise cromatográfica, como: *i*) mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo; *ii*) erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse quando, na verdade, este está ausente, gerando resultado falso positivo; *iii*) aumento no sinal do detector, levando à superestimação do resultado. Isso ocorre quando impurezas voláteis são eluídas com o mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse; extinção do sinal no detector^[4]. Nas análises por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (*Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*, LC-MS), a presença da matriz pode resultar em mudanças na eficiência de ionização, uma vez que pode ocorrer supressão ou aumento da ionização. O mecanismo exato da supressão iônica é desconhecido, porém é causado pela presença de substâncias não voláteis e por compostos com superfície bastante ativa. O efeito matriz também é dependente da natureza química do analito, pois a eficiência de ionização dos compostos polares é mais influenciada pela presença de coextrativos provenientes da matriz quando comparada com compostos apolares. Alguns parâmetros instrumentais, como fonte de ionização e vazão da fase móvel, também influenciam na extensão do efeito matriz^[5].

As limitações na análise de resíduos e contaminantes em alimentos foram minimizadas após o desenvolvimento dos métodos multirresíduo. Estes apresentam como vantagens a possibilidade de analisar um grande número de compostos, altos percentuais de recuperação dos analitos, remoção dos possíveis interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança (utilizam pequenos volumes de solventes de baixa toxicidade)^[2].

A etapa de limpeza é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que componentes não voláteis da matriz podem ficar aderidos no sistema de injeção e também na coluna cromatográfica, alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções técnicas no equipamento^[6,7].

Tradicionalmente a etapa de limpeza nos métodos multirresíduo emprega Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE), a qual utiliza cartuchos ou colunas que contêm entre 250 e 1000 mg de sorvente^[8]. Esta técnica envolve operação manual, uso de diferentes solventes para lavagem do sorvente, etapas de evaporação e secagem. Muitos fatores afetam a precisão quando se trabalha com SPE, entre eles o ajuste do sistema de vácuo e a vazão dos solventes. Esta técnica, quando automatizada, requer manutenção frequente, além dos sistemas hoje disponíveis apresentarem um custo considerável^[8]. Nos últimos anos, técnicas alternativas foram desenvolvidas com o objetivo de melhorar a etapa de limpeza^[9]. Este artigo tem como objetivo apresentar algumas aplicações que demonstram a praticidade e a eficiência da Extração em Fase Sólida Dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, D-SPE) na limpeza de extratos para a determinação de resíduos e contaminantes em alimentos^[10-12].

2 Preparo de amostra para a determinação de resíduos e contaminantes em alimentos

Nos últimos anos, as técnicas mais amplamente utilizadas para extração de resíduos e contaminantes em alimentos foram a Extração Sólido-Líquido (*Solid Liquid Extraction*, SLE) e a Extração Líquido-Líquido (*Liquid Liquid Extraction*, LLE). A SLE e a LLE consistem na extração sucessiva de amostras sólidas e líquidas, respectivamente, com solvente orgânico empregando agitação vigorosa. Estas técnicas têm sido aplicadas para diferentes tipos de amostras, como, por exemplo, alimentos de origem vegetal ou animal^[13-15]. Em geral, a maioria dessas técnicas emprega solventes orgânicos em alguma de suas etapas. A acetonitrila é considerada um dos melhores solventes, uma vez que promove uma extração bastante eficiente (altos percentuais de recuperação) e extrai baixas concentrações de coextrativos da matriz, sendo eficaz na desnaturação de proteínas e na inativação de enzimas^[2]. Metanol e acetato de etila também são amplamente utilizados, mas extraem elevadas quantidades de coextrativos da matriz^[13-15].

Os avanços da Química Analítica em consonância com o conceito de sustentabilidade levaram ao desenvolvimento de vários métodos de preparo de amostra de alimentos^[16]. No final da década de 1980, Barker et al.^[17] propuseram a Dispersão da Matriz em Fase Sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD), a qual envolve a mistura da amostra (viscosa, sólida ou semissólida) com um sorvente, a transferência da mistura para um cartucho e uma etapa de eluição com um solvente adequado^[18, 19]. Na Extração Ultrassônica (*Ultrasonic Extraction*, USE), a amostra com solvente é submetida ao banho com ultrassom^[20]. A USE também tem sido associada a outras técnicas como a MSPD^[21]. Na Extração Líquida Pressurizada (*Pressurized Liquid Extraction*,

PLE), também chamada de Extração Acelerada por Solvente (*Accelerated Solvent Extraction, ASE*), amostra e solvente são aquecidos e submetidos a alta pressão em uma cela fechada. Com a pressão e temperatura elevadas, muda a viscosidade do solvente, aumentando a extração dos analitos^[22]. É uma técnica de extração rápida e que reduz consideravelmente a quantidade de solvente^[23]. Com a otimização de alguns parâmetros como temperatura, pressão e polaridade do solvente é possível obterem boas recuperações com a PLE^[24], no entanto as diferentes propriedades físico-químicas dos analitos dificultam o emprego em análises multirresíduo. A Extração Assistida por Micro-ondas (*Microwave-Assisted Extraction, MAE*) foi utilizada pela primeira vez para extração de compostos orgânicos por Ganzler et al.^[25], no entanto se tornou mais popular recentemente. Nesta técnica, a amostra é imersa num frasco aberto ou fechado contendo solvente e é irradiada com micro-ondas. A principal limitação da técnica é o uso de solventes que absorvam energia de micro-ondas, pois solventes não polares não absorvem essa energia^[26,27]. Além disso, em geral, é necessária uma etapa de limpeza do extrato^[28].

Os métodos de preparo de amostra que têm como base a instrumentação, sendo a extração muitas vezes automatizada, demandam analistas treinados e etapas de limpeza entre extrações, o que implica em um maior tempo de análise. Outra desvantagem geralmente apresentada é o escopo limitado de analitos que pode ser extraído em determinadas condições. Sendo assim, estes procedimentos, podem ser empregados em algumas aplicações, mas estão distantes de serem considerados ideais para um método multirresíduo^[29].

Anastassiades et al.^[10], com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos multirresíduo existentes, introduziram um novo

procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos e contaminantes denominado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). Este método tem como vantagem ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, explorando as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna^[16]. O método QuEChERS pode ser caracterizado como uma sequência das seguintes etapas: **Extração** (agitação manual ou com auxílio de vórtex da amostra de interesse com acetonitrila, geralmente na proporção 1:1); **Partição** (adição de sais para promover o efeito *salting out*, o tamponamento do pH do meio, além da remoção de água); e **Limpeza** do extrato (realizada por D-SPE). A versão original deste método apresentou excelentes resultados para diferentes tipos de amostras^[16,30,31]. Porém, algumas aplicações mostraram que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz^[11,32]. Desta forma, durante o período de otimização do método, percebeu-se que a utilização de tampões de pH (faixa de 4,8 a 5,0) promovia recuperações satisfatórias (>70%) para compostos dependentes do pH, independente da matriz utilizada^[32].

Atualmente, como o método e suas modificações são aplicados para uma grande variedade de matrizes e para vários compostos, como, por exemplo, agrotóxicos, medicamentos veterinários e micotoxinas, vários sorventes e combinações vêm sendo utilizadas, dependendo do tipo de matriz, técnica cromatográfica e dos tipos de compostos analisados. A Figura 1 apresenta as principais etapas para a execução da limpeza de extratos empregando a D-SPE.

2.1 Extração em fase sólida dispersiva

AD-SPE, proposta por Anastassiades et al.^[10], está baseada em um procedimento muito simples para ser empregado na limpeza de extratos



Figura 1 Representação das etapas de execução da D-SPE.

destinados à análise cromatográfica de resíduos e contaminantes em alimentos. Na proposta original, agita-se o extrato (1 mL) com pequena quantidade de sorvente (25 mg). A agitação tem como objetivo a distribuição uniforme do sorvente e assim facilitar o processo de limpeza. O sorvente então é separado por centrifugação, sendo uma alíquota do extrato final retirada para análise. Desta maneira, o sorvente atua como um filtro químico, retendo os coextrativos da matriz. Esta técnica pode ser comparada com a MSPD, porém a diferença entre elas está na adição do sorvente a uma alíquota do extrato e não na amostra original. O custo elevado dos sorventes limita o tamanho da amostra que pode ser usado em MSPD. Assim, a MSPD, quando utilizada, deve garantir a representatividade e homogeneidade da amostra. Por outro lado, a D-SPE está intimamente ligada à etapa de extração e fornece uma alíquota homogênea a partir de uma amostra original de qualquer tamanho. Assim, apenas uma pequena quantidade de sorvente é utilizada.

Quando comparada com a SPE tradicional, a D-SPE apresenta algumas vantagens como: o uso de uma menor quantidade de sorvente e solventes, refletindo em menor custo, além de não

haver a necessidade de trabalhar no formato de cartucho. Assim, descartam-se as etapas prévias de pré-condicionamento, sendo necessário apenas um pequeno treinamento dos analistas. Ao contrário do formato em coluna, na D-SPE, todo o sorvente interage igualmente com a matriz. Além disso, outra vantagem desta técnica é a possibilidade de realizar a fácil combinação de diferentes tipos de sorventes de acordo com a necessidade do analista, do tipo de matriz e do equipamento que será utilizado na determinação dos analitos de interesse. Soma-se a isto a possibilidade de realizar a remoção de água residual de forma simultânea com a limpeza do extrato, uma vez que os sais secantes (MgSO_4 ou Na_2SO_4) podem ser adicionados juntamente com o sorvente.

A D-SPE foi desenvolvida simultaneamente com o método QuEChERS, tendo como objetivo a obtenção de um extrato final com menor quantidade de interferentes, aliada a um menor custo quando comparada com técnicas tradicionais. Uma das principais vantagens da D-SPE é a versatilidade no estabelecimento de novos métodos, uma vez que permite a utilização de dife-

rentes quantidades e/ou misturas de sorventes, dependendo do tipo de matriz e de analitos de interesse.

A seguir, as propriedades e as principais aplicações dos sorventes mais utilizados nesta técnica são detalhadas. A Tabela 1 apresenta aplicações da D-SPE na limpeza de extratos provenientes de diferentes tipos de matrizes de alimentos.

2.1.1 Amina primária secundária (PSA)

O sorvente etilenodiamino-N-propil é uma amina primária e secundária (PSA) que atua como um trocador aniônico e pode interagir com outros compostos através de pontes de hidrogênio ou dipolo-dipolo. Possui forte interação com os compostos da matriz, sendo usado para remoção de vários coextrativos interferentes^[10]. A estrutura bidentada do PSA (Figura 2) tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário na sua estrutura^[12]. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres, açúcares e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte, podendo ocorrer a retenção de alguns analitos que interferem no resultado da análise. Por outro lado, não é tão eficiente na remoção de gorduras. O tamanho de partícula do sorvente utilizado é, geralmente, de 40 μm . O sorvente PSA tem sido usado em associação com outros sorventes, principalmente com C_{18} ou carbono grafiteado. As diferentes versões do método QuEChERS utilizam, em geral, 25 ou 50 mg de PSA para cada mL de extrato^[12]. Para algumas matrizes, como, por exemplo, cereais, utiliza-se uma maior quanti-

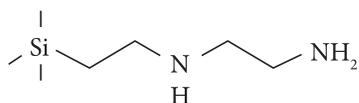


Figura 2 Estrutura do sorvente PSA.

dade de PSA na etapa de D-SPE com o intuito de remover, de forma mais eficiente, os ácidos graxos coextraídos^[33].

2.1.2 Octadecilsilano (C_{18})

Uma modificação bastante relevante na etapa de D-SPE foi a adição do sorvente octadecilsilano (C_{18}) para promover uma limpeza mais efetiva de algumas matrizes, em especial aquelas que contêm gordura^[11,15,33-35]. O sorvente C_{18} é mais utilizado para matrizes com teor de gordura maior que 2%, pois remove com boa eficiência interferentes apolares, tais como substâncias graxas e lipídios^[36]. No entanto, o sorvente C_{18} tem sido utilizado em conjunto com PSA para diferentes tipos de matrizes e analitos. O C_{18} é bastante usado na determinação de compostos orgânicos em matrizes aquosas por SPE e tem um custo inferior ao do PSA. O tamanho de partícula do sorvente C_{18} mais utilizado é o de 40 μm , que também é o mais usado em SPE.

2.1.3 Carbono grafiteado

A redução do teor de pigmentos nos extratos provenientes de amostras vegetais foi outro avanço efetuado na etapa de limpeza, obtido através da adição de uma pequena quantidade de carvão ativado ou carbono grafiteado^[15,34,37]. O carvão disponível comercialmente para fins cromatográficos, comumente chamado de carbono grafiteado (*graphitized carbon black*, GCB), possui uma grande área superficial e contém grupos altamente polares na superfície, com alto potencial para formação de pontes de hidrogênio. Em decorrência destas características, ocorre forte retenção de analitos planares que contenham um ou mais grupos ativos em sua estrutura, resultando em baixas recuperações para estes compostos^[35,38]. Entre os compostos planares que

Tabela 1 Sorventes utilizados em D-SPE e detalhes das aplicações.

Matriz	Analitos	D-SPE: mg de sorvente/mL de extrato	Ref.
Cevada	herbicidas	25 mg PSA	48
Cebola, limão, tomate e uva	agrotóxicos	25 mg PSA	49
Repolho e rabanete	agrotóxicos	25 mg PSA	50
Frutas	OCP	25 mg PSA	51
Suco de cana-de-açúcar	agrotóxicos	50 mg PSA	52
Frango	medicamentos veterinários	150 mg PSA	53
Arroz	fenoxiácidos	250 mg PSA	39
Trigo, farinha e farelo	agrotóxicos	125 mg C ₁₈	54
Ervilha e lima	agrotóxicos	12 mg PSA + 3,75 mg GCB	15
Molho de maçã-mirtilo	agrotóxicos	25 mg PSA + 25 mg C ₁₈	15
Vegetais e alimentos infantis	agrotóxicos	50 mg PSA + 100, 120 ou 140 mg C ₁₈ para matrizes com 2, 3 e 4,5% de gordura, respectivamente	55
Mel, própolis e geleia real	quinolonas	37,5 mg C ₁₈ 37,5 mg C ₁₈ + 37,5 mg PSA 100 mg C ₁₈ + 100 mg PSA 100 mg C ₁₈ + 100 mg PSA + 100 mg GCB	56
Repolho, espinafre, uva e laranja	agrotóxicos	10 mg nanotubos de carbono	47
Berinjela, pepino, couve e pimenta	OPP	16 mg nanotubos de carbono	27
Azeitonas e azeite de oliva	OCP, OPP triazinas	PSA, GCB e C ₁₈	57
Plantas medicinais	OCP	16,7 mg PSA + 33,4 mg GCB	58
Sangue	drogas	41,7 mg C ₁₈ + 41,7 mg PSA	59

OCP = agrotóxico organoclorado; OPP = agrotóxico organofosforado; PSA = amina primária secundária; GCB = carbono grafitizado.

apresentam baixa recuperação quando GCB é empregado na etapa de D-SPE, pode-se destacar hexaclorobenzeno^[39], terbufós e tiabendazol^[40].

2.1.4 Outros sorventes

Koesukwiwat et al.^[39] testaram a extração de agrotóxicos fenoxiácidos, como 2,4 D, quinclo-
raque, picloram e outros, por QuEChERS modi-
ficado, utilizando como sorvente na D-SPE alu-
mina combinada com C₁₈. A alumina ou óxido
de alumínio (Al₂O₃) tem características alcalinas,

embora possa também ser preparada para apre-
sentar características neutra ou ácida. É geral-
mente empregada na separação cromatográfica
de compostos lipofílicos e, pelo fato de poder ser
preparada com características ácida, neutra ou
alcalina, é bastante útil na separação de substân-
cias que apresentem variações dessas caracterís-
ticas.

Nos métodos mais antigos, o florisil® era
bastante empregado, sendo utilizado na forma
de colunas recheadas, nas quais os extratos das

amostras eram percolados. Neste tipo de procedimento, empregava-se um maior volume de solventes orgânicos, sucessivas percolações no leito de sorvente e etapas posteriores de concentração dos extratos. Nguyen et al.^[41] utilizaram florisil® na etapa de D-SPE para limpeza de amostra de óleo de soja, visando a determinação de resíduos de 95 agrotóxicos. Em cromatografia, o florisil® é utilizado para separação de analitos com baixa polaridade.

A terra diatomácea, também denominada diatomita, diatomita calcinada, diatomita fluxo calcinada, sílica diatomácea e sílica amorfa, destaca-se pelo seu baixo custo, alta área superficial e baixa massa específica, tendo como componente majoritário a sílica, a qual se encontra na forma hidratada. A coloração varia do branco ao cinza-escuro e o tamanho de partícula varia de 4 e 500 µm. A terra diatomácea também foi utilizada em métodos de preparo de amostra empregando MSPD para extração de agrotóxicos^[19]. Cabrera^[42] testou terra diatomácea (branca, de 64-76 µm de tamanho de partícula) como sorvente na D-SPE, empregando QuEChERS modificado, para 26 agrotóxicos em arroz, entretanto, somente 9 compostos apresentaram recuperações dentro da faixa de 70% a 120% e, na mistura com C₁₈, 14 compostos ficaram dentro dessa faixa de recuperação.

Quitosana é um polissacarídeo catiônico produzido através da desacetilação da quitina, um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos, através de um processo de alcalinização sob altas temperaturas. Quitina e quitosana são biopolímeros renováveis, de baixo custo e suscetíveis a alterações químicas para aumentar sua capacidade de adsorção^[43]. Cabrera^[42] obteve bons resultados de recuperação para 20 de 26 agrotóxicos testados em arroz, empregando D-SPE com quitosana e QuEChERS modificado.

Nos últimos anos, sorventes alternativos estão sendo utilizados na D-SPE com a finalidade de obterem melhores resultados na etapa de limpeza dos extratos gerados pelo método QuEChERS. Como alternativa para minimizar as perdas de analitos provocadas pelo sorvente GCB, tem-se o sorvente polimérico ChloroFiltr®, que remove de maneira seletiva a clorofila, não afetando as recuperações de compostos planares^[44].

Zhao et al.^[45] sintetizaram um novo sorvente para D-SPE a partir de tetraetilenopentamina. O potencial de limpeza do novo material é comparável com o do PSA. Este sorvente remove com eficiência pigmentos, ácidos orgânicos e açúcares. Além disso, outra vantagem deste novo material é a possibilidade de reutilização por mais de 5 vezes sem perder a eficiência de limpeza. Os autores obtiveram recuperações entre 75% e 114% (RSD ≤ 17%) para 29 agrotóxicos (organoclorados e organofosforados). Os resultados mostraram o potencial de aplicação deste novo material, uma vez que a precisão e a seletividade do método proposto foram satisfatórias para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

Devido à sua área superficial extremamente grande, os nanotubos de carbono possuem grande capacidade de adsorção. Assim, estão sendo utilizados como sorventes alternativos em D-SPE. Do ponto de vista estrutural, classificam-se em: nanotubos de carbono de parede simples, que podem ser considerados como uma única folha de grafite enrolada sobre si mesma para formar um tubo cilíndrico; e os nanotubos de carbono de parede múltipla, que compreendem um conjunto de nanotubos concêntricos^[46]. A utilização de nanotubos de carbono de paredes múltiplas está tendo sucesso na etapa de D-SPE para determinação multirresíduo de agrotóxicos em frutas e vegetais. Zhao et al.^[47] utilizaram o

método QuEChERS empregando nanotubos de carbono de paredes múltiplas como sorvente na etapa de D-SPE. Este método foi aplicado para determinação multirresíduo de agrotóxicos em vegetais por GC-MS. Os resultados de recuperação foram de 71% a 110% ($RSD \leq 15\%$). O método apresentou linearidade na faixa entre 20 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os limites de quantificação e os limites de detecção variaram de 3 a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 1 a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O método foi aplicado com sucesso em amostras reais sendo considerado confiável e robusto. Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas apresentam-se como uma alternativa ao sorvente PSA, uma vez que os métodos que empregam estes sorventes apresentam resultados satisfatórios nas análises de resíduos e contaminantes em alimentos. Recentemente, Zhao et al.^[27] utilizaram nanotubos de carbono na etapa de D-SPE para determinação de agrotóxicos em vegetais. A D-SPE com nanotubos de carbono foi comparada com C_{18} , PSA e GCB. A limpeza dos extratos obtida com o uso de nanotubos de carbono foi mais eficiente e foram obtidas melhores recuperações dos analitos e menor efeito de matriz. Esse material já tinha sido utilizado na limpeza de extratos empregando cartuchos SPE, também com excelentes resultados.

2.2 Combinação entre D-SPE e outras técnicas

Nos últimos anos, o método QuEChERS iniciou uma verdadeira transformação no preparo de amostra para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, uma vez que suas características de simplicidade, rapidez, baixo custo, entre outras, foram incorporadas em vários laboratórios de rotina. Porém, ao ser comparado com métodos comumente utilizados para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, observa-se que a relação entre a quantidade de amos-

tra e de solvente (1 g mL^{-1}) obtida no método QuEChERS é baixa se comparada com os valores típicos de 2 a 5 g mL^{-1} dos métodos que utilizam solventes apolares^[60]. A fim de minimizar esta limitação, Melo et al.^[61] realizaram a combinação entre os extratos provenientes da etapa de D-SPE com a técnica de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME) na análise de resíduos de agrotóxicos por HPLC-DAD. Depois da etapa de extração com acetonitrila, seguida da partição promovida pelos sais e limpeza por D-SPE, os analitos foram concentrados em triclorometano pelo procedimento DLLME. Esta combinação resultou em procedimento simples, rápido e barato, além de proporcionar baixos limites de detecção ($1,7$ a $45 \mu\text{g kg}^{-1}$) para os 13 compostos avaliados. A combinação D-SPE/DLLME e HPLC-DAD também foi empregada para determinação de 7 inseticidas neonicotinóides em amostras de arroz, painço e aveia^[62]. As vantagens da utilização em conjunto da D-SPE com DLLME incluem a versatilidade, baixo custo, tempo de análise relativamente curto e baixo consumo de solventes orgânicos. Além disso, destacam-se elevada eficiência de extração e efeito matriz pouco significativo. Neste método, na etapa de D-SPE, empregaram-se os sorventes PSA, GCB e C_{18} . Os resultados apresentaram boa linearidade ($r^2 \geq 0,99$), recuperações satisfatórias (76% a 123%), e RSD% aceitáveis ($\leq 12,6\%$). Os limites de detecção obtidos estavam entre 2 e 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os limites de quantificação entre 7 e 18 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Satpathy et al.^[26] desenvolveram um método multirresíduo para análise de 72 agrotóxicos em frutas e vegetais empregando extração por MAE, limpeza do extrato por D-SPE seguida de determinação por GC-MS. Os resultados apresentaram boa linearidade, robustez, precisão e reprodutibilidade. Esta combinação permite que

a etapa de extração seja automatizada, tornando este método uma ferramenta atrativa para a análise de rotina de agrotóxicos em frutas e vegetais. A combinação MAE e D-SPE também foi avaliada na determinação de 27 agrotóxicos por GC-MS em amostras de ervas medicinais^[63]. A técnica D-SPE simplificou o processo de limpeza e minimizou o consumo de solventes orgânicos. Os limites de detecção e quantificação variaram entre 0,2 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e entre 0,8 e 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. As recuperações de todos os analitos variaram entre 70% e 120% com os $\text{RSD} \leq 17,2\%$, atendendo aos requisitos para análise de rotina de resíduos de agrotóxicos.

A limpeza do extrato à baixa temperatura (*freeze-out* ou *low temperature clean-up*), visando a redução dos coextrativos lipídicos, tem sido empregada com sucesso na determinação de diversos compostos em diferentes matrizes. A técnica consiste na precipitação de extrativos lipídicos, dentre outros, que são congelados junto com a água, sendo retirado o extrato composto pelo solvente extrator. A combinação desta técnica com D-SPE, reduz ainda mais a quantidade de coextrativos^[15,35], possibilitando um menor consumo de solventes. No entanto, uma das principais desvantagens do congelamento é o tempo, o qual varia, geralmente, de 30 minutos a 12 horas ou mais. A maioria dos estudos utiliza mais de 12 horas^[64-67]. Contudo, quando combinado com D-SPE ou outra técnica de limpeza, o tempo necessário para a limpeza do extrato pode ser reduzido como demonstrado por Koesukiwat et al.^[35] que, em 2 horas de resfriamento, conseguiram uma adequada redução de coextrativos. Depois do congelamento foi realizada D-SPE com PSA e C_{18} . Chen et al.^[68], na análise de pesticidas organoclorados em amostras de peixe, congelaram o extrato por 20 minutos, realizando em seguida a limpeza em cartucho SPE recheado com aminopropil. Os

limites de detecção do método variaram de 0,5 a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e as recuperações entre 81,3 e 113,7% com $\text{RSD} \leq 13,5\%$. Hong et al.^[69], também analisando organoclorados em peixe, utilizaram a técnica de limpeza à baixa temperatura, congelando o extrato por 30 minutos, seguida de SPE com florisil® e obtiveram bons resultados. Os percentuais de recuperação foram $\geq 80\%$. Os limites de detecção variaram de 0,5 a 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, exceto para endossulfam que foi de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

3 Conclusões e perspectivas futuras

Nos últimos anos, várias técnicas de preparo de amostra foram desenvolvidas com o objetivo de reduzir etapas e/ou minimizar o consumo de solventes. Entre estas novas possibilidades, o método QuEChERS está ganhando popularidade na análise de resíduos e contaminantes em alimentos. Esta grande aceitação está relacionada com os resultados satisfatórios obtidos no preparo de amostra de diferentes matrizes contendo analitos com propriedades físico-químicas distintas. A D-SPE tem mostrado ser uma excelente técnica de limpeza de extratos, sua versatilidade, rapidez e baixo custo, quando comparada a outras técnicas, fazem dela uma excelente alternativa. Salienta-se que os resultados obtidos por esta técnica estão intimamente relacionados com o uso da espectrometria de massas. Trabalhos publicados recentemente mostram que a D-SPE pode ser utilizada em combinação com outras técnicas de extração. Assim, esta técnica de limpeza apresenta um futuro promissor na análise de resíduos e contaminantes, podendo estar associada ou não com o método que lhe deu origem.

Referências

- 1 Kinsella B, O'Mahony J, Malone E, Moloney M, Cantwell H, Furey A et al. Current trends in sample

- preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216(46):7977-8015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.005>
- 2 Prestes OD, Friggi CA, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova* 2009; 32:1620-1634. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600046>
 - 3 Picó Y, Blasco C, Font G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. *Mass Spectrometry Reviews* 2004; 23:45-85. PMID:14625892.
 - 4 Pinho GP, Neves AA, Queiroz MELR, Silverio FO. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Química Nova* 2009; 32:987-95. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000400030>
 - 5 Krueve A, Künnapas A, Herodes K, Leito I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2008; 1187(1-2):58-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.077>
 - 6 Saito Y, Kodama S, Matsunaga A, Yamamoto A. Multiresidue Determination of Pesticides in Agricultural Products by Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Large Volume Injection. *Journal of AOAC International* 2004; 87:1356-67. PMID:15675447.
 - 7 Ueno E, Oshima H, Saito I, Matsumoto H, Yoshimura Y, Nakazawa H. Multiresidue Analysis of Pesticides in Vegetables and Fruits by Gas Chromatography/Mass Spectrometry after Gel Permeation Chromatography and Graphitized Carbon Column Cleanup. *Journal of AOAC International* 2004; 87(4):1003-15. PMID:15295897.
 - 8 Hyötyläinen T. On-line coupling of extraction with gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 2008; 1186(1-2):39-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.066>
 - 9 Lambropoulou DA, Albanis TA. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007; 389(6):1663-83. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1348-2>
 - 10 Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 2003; 86(2):412-31. PMID:12723926.
 - 11 Lehotay SJ, Mastovská K, Lightfield AR. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. *Journal of AOAC International* 2005; 88:615. PMID:15859090.
 - 12 Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scientia Chromatographica* 2011; 3(1):51-64. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2011.004>
 - 13 Marazuela MD, Bogialli S. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. *Analytica Chimica Acta* 2009; 645(1-2):5-17. PMID:19481624.
 - 14 LeDoux M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218:1021-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.097>
 - 15 Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukiwat U, Fu W, Mastovska K et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217(16):2548-60. PMID:20144460. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044>
 - 16 Ridgway K, Lalljie SPD, Smith RM. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A* 2007; 1153(1-2):36-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.134>
 - 17 Barker SA, Long AR, Short CR. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A* 1989; 475(2):353-61. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)89689-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)89689-8)
 - 18 Barker SA. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A* 2000; 880(1-2):63-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01290-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01290-X)
 - 19 Rodrigues SA, Caldas SS, Primel EG. A simple, efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 2010; 678(1):82-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.026>

- 20 Rezić I, Horvat AJM, Babić S, Kaštelan-Macan M. Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. *Ultrasonics Sonochemistry* 2005; 12(6):477-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.07.004>
- 21 García-Valcárcel AI, Tadeo JL. A combination of ultrasonic assisted extraction with LC-MS/MS for the determination of organophosphorus pesticides in sludge. *Analytica Chimica Acta* 2009; 641:117-23. PMID:19393375.
- 22 Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P, Hernández-Méndez J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *Journal of Chromatography A* 2005; 1085(1-2):1-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.072>
- 23 Chuang JC, Hart K, Chang JS, Boman LE, Van Emon JM, Reed AW. Evaluation of analytical methods for determining pesticides in baby foods and adult duplicate-diet samples. *Analytica Chimica Acta* 2001; 444:87. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01164-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01164-3)
- 24 Cho SK, El-Aty AMA, Jeon HR, Choi JH, Shin HC, Shim JH. Comparison of different extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues in kiwi fruit using gas chromatography-mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 2008; 22:727-35. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.990>
- 25 Ganzler K, Salgó A, Valkó K. Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A* 1986; 371:299-306. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94714-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94714-4)
- 26 Satpathy G, Tyagi YK, Gupta RK. A novel optimised and validated method for analysis of multi-residues of pesticides in fruits and vegetables by microwave-assisted extraction (MAE)-dispersive solid-phase extraction (d-SPE)-retention time locked (RTL)-gas chromatography-mass spectrometry with Deconvolution reporting software (DRS). *Food Chemistry* 2011; 127:1300-08. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.087>
- 27 Zhao X, Xu X, Su R, Zhang H, Wang Z. An application of new microwave absorption tube in non-polar solvent microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from fresh vegetable samples. *Journal of Chromatography A* 2012; 1229:6-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.018>
- 28 Chen L, Ding L, Jin H, Song D, Zhang H, Li J et al. The determination of organochlorine pesticides based on dynamic microwave-assisted extraction coupled with on-line solid-phase extraction of high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 2007; 589:239-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2007.03.003>
- 29 Wardencki WM, Curylo J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *International Journal of Food Science and Technology* 2004; 39:703-17. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00839.x>
- 30 Lehotay SJ, Hiemstra M, Bodegraven P, Kok A. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International* 2005; 88:595-614. PMID:15859089.
- 31 Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe. [cited 2012 Jun]. Available from: <http://www.quechers.com>.
- 32 Payá P, Anastassiades M, Mack D, Sigalova I, Tasdelen B, Oliva J et al. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007; 389:1697-714. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1610-7>
- 33 Mastovska K, Dorweiler KJ, Lehotay SJ, Wegscheid JS, Szpylka KA. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58:5959-72. PMID:20028018.
- 34 Cunha SC, Lehotay SJ, Mastovska K, Fernandes JO, Oliveira BMPP. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *Journal of Separation Science* 2007; 30:620-32. PMID:17444232.
- 35 Koesukwiwat U, Lehotay SJ, Mastovska K, Dorweiler KJ, Leepipatpiboon N. Extension of the QuEChERS Method for Pesticide Residues in Cereals to Flaxseeds, Peanuts, and Doughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58:5950-8. PMID:20025276.
- 36 Lehotay S. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 2007; 90:485-520. PMID:17474521.

- 37 Anastassiades M, Scherbaum E, Tassdelen B, Stajnbaher D. *Crop protection, public health, environmental safety*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2007.
- 38 Hennion MC. Graphitized carbons for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 2000; 885(1-2):73-95. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00085-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00085-6)
- 39 Koesukwiwat U, Sanguankaew K, Leepipatpiboon N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2008; 626:10-20. PMID:18761116.
- 40 Wilkowska A, Biziuk M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry* 2011; 125:803-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.094>
- 41 Nguyen TD, Lee MH, Lee GH. Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid-liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Microchemical Journal* 2010; 95:113-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2009.11.009>
- 42 Cabrera L. *Estudo do efeito matriz na determinação de agrotóxicos em diferentes tipos de arroz pelo método QuEChERS modificado e LC-MS/MS*. [tese]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2012.
- 43 Dotto GL, Vieira MLG, Gonçalves JO, Pinto LAdA. Remoção dos corantes azul brilhante, amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina de soluções aquosas utilizando carvão ativado, terra ativada, terra diatomácea, quitina e quitosana: estudos de equilíbrio e termodinâmica. *Química Nova* 2011; 34:1193-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000700017>
- 44 QuEChERS ChloroFiltr. [cited 2012 Jun]. Available from: <http://unitedchem.com/product.aspx?P=276>.
- 45 Zhao YG, Shen HY, Shi JW, Chen XH, Jin MC. Preparation and characterization of amino functionalized nano-composite material and its application for multi-residue analysis of pesticides in cabbage by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218(33):5568-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.090>
- 46 Herbst MH, Macedo MIF, Rocco AM. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. *Química Nova* 2004; 27:986-92. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000600025>
- 47 Zhao P, Wang L, Zhou L, Zhang F, Kang S, Pan C. Multi-walled carbon nanotubes as alternative reversed-dispersive solid phase extraction materials in pesticide multi-residue analysis with QuEChERS method. *Journal of Chromatography A* 2012; 1225:17-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.070>
- 48 Díez C, Traag WA, Zommer P, Marinero P, Atienza J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. *Journal of Chromatography A* 2006; 1131(1-2):11-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.046>
- 49 Lesueur C, Knittel P, Gartner M, Mentler A, Fuerhacker M. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. *Food Control* 2008; 9:906-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.09.002>
- 50 Nguyen TD, Yu JE, Lee DM, Lee G-H. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. *Food Chemistry* 2008; 110:207-213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.036>
- 51 Ciešlik E, Sadowska-Rociek A, Ruiz JMM, Surma-Zadora M. Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. *Food Chemistry* 2011; 125:773-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.019>
- 52 Furlani RPZ, Marcilio KM, Leme FM, Tfouni SAV. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. *Food Chemistry* 2011; 126:1283-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.074>
- 53 Lopes RP, Reyes RC, Romero-González R, Frenich AG, Vidal JLM. Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 2012; 89:201-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.082>
- 54 Kolberg DI, Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC-MS. *Food Chemistry* 2011; 125:1436-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.041>

- 55 Georgakopoulos P, Zachari R, Mataragas M, Athanasopoulos P, Drosinos EH, Skandamis PN. Optimisation of octadecyl (C₁₈) sorbent amount in QuEChERS analytical method for the accurate organophosphorus pesticide residues determination in low-fatty baby foods with response surface methodology. *Food Chemistry* 2011; 128:536-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.042>
- 56 Lombardo-Agüí M, García-Campaña AM, Gámiz-Gracia L, Cruces-Blanco C. Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure. *Talanta* 2012; 93:193-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.02.011>
- 57 García-Reyes JF, Ferrer C, Gómez-Ramos MJ, Fernández-Alba AR, Molina-Díaz A. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *Trends in Analytical Chemistry* 2007; 26:239-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.004>
- 58 Xu R, Wu J, Liu Y, Zhao R, Chen B, Yang M et al. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in traditional Chinese medicine by gas chromatography with electron capture detection. *Chemosphere* 2011; 84:908-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.013>
- 59 Usui K, Hayashizaki Y, Hashiyada M, Funayama M. Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. *Legal Medicine* 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2012.04.008>
- 60 Hiemstra M, De Kok A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2007; 1154:3-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.123>
- 61 Melo A, Mansilha C, Pinho O, Ferreira IMPLVO. Analysis of Pesticides in Tomato Combining QuEChERS and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography. *Food Analytical Methods* 2012. In press. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-012-9469-4>
- 62 Wang P, Yang X, Wang J, Cui J, Dong AJ, Zhao HT et al. Multi-residue method for determination of seven neonicotinoid insecticides in grains using dispersive solid-phase extraction and dispersive liquid-liquid micro-extraction by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* 2012; 134:1691-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.103>
- 63 Mao X, Wan Y, Yan A, Shen M, Wei Y. Simultaneous determination of organophosphorus, organochlorine, pyrethroid and carbamate pesticides in *Radix astragali* by microwave-assisted extraction/dispersive-solid phase extraction coupled with GC-MS. *Talanta* 2012; 97:131-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.04.007>
- 64 Lentza-Rizos C, Avramides EJ, Kokkinaki K. Residues of azoxystrobin from grapes to raisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54:138-41. PMID:16390190.
- 65 Rübensam G, Barreto F, Hoff RB, Pizzolato TM. Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. *Food Control* 2013; 29:55-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.075>
- 66 Goulart SM, Alves RD, Neves AA, De Queiroz JH, De Assis TC, De Queiroz M. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. *Analytica Chimica Acta* 2010; 671:41-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.05.003>
- 67 Goulart S, Dequeiroz M, Neves A, Dequeiroz J. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. *Talanta* 2008; 75:1320-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.058>
- 68 Chen S, Yu X, He X, Xie D, Fan Y, Peng J. Simplified pesticide multiresidues analysis in fish by low-temperature cleanup and solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry. *Food Chemistry* 2009; 113:1297-300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.045>
- 69 Hong J, Kim HY, Kim DG, Seo J, Kim KJ. Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2004; 1038:27-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.03.003>

Recebido: 02/08/2012

Aceito: 21/08/2012

Normas para publicação de artigos no *Scientia Chromatographica* (as normas mais detalhadas podem ser obtidas no website do periódico <http://www.scientiachromatographica.com>).

Escopo

Scientia Chromatographica publica trabalhos em todas as áreas da Cromatografia, incluindo **GC** (colunas capilares, empacotadas, preparativas), **LC** (convencional, HPLC, U-HPLC, Prep-LC, micro-LC, nano-LC, TLC, PC), **SFC** (colunas empacotadas ou capilares), **Técnicas Acopladas** (GC-MS, LC-MS, SFC-MS, LC-GC, SFE-CE, GCxGC, LCxLC) e **Técnicas de Preparo de Amostras** (SPME, SBSE, MEPS, QuEChERS, LLE, MAE, SPE, LLE, etc.). A partir de 2012 o *Scientia* publica os seguintes formatos de artigos:

- Artigos Originais de Pesquisa
- Comunicação (“Short Communication”)
- Artigos de Revisão Crítica

Os artigos de Revisão Crítica deverão antes de sua submissão serem discutidos com um dos co-editores mais relacionados ao assunto em questão. Devem conter uma contribuição nova a respeito de um assunto de grande interesse atual, incluindo uma discussão a respeito das vantagens e desvantagens do mesmo. O *Scientia* não publica apenas relato de artigos descritos na literatura, sem uma discussão crítica sobre os mesmos.

Os artigos Originais de Pesquisa deverão conter resultados de laboratório e/ou teóricos, que signifiquem uma contribuição expressiva para a área de técnicas de separação, seja ela conceitual, na instrumentação, ou na aplicação.

Os artigos do tipo Comunicação deverão ter a mesma qualidade dos artigos Originais, porém devido a seu caráter de comunicação preliminar usualmente são de menor extensão.

Envio do Artigo

Os artigos deverão ser encaminhados para periodico@scienciachromatographica.com. Os artigos do tipo Revisão deverão antes de seu envio pelo website ter o aval de um dos co-Editores do periódico, caso contrário não serão avaliados. Todos os artigos, independentemente do formato, deverão ser submetidos exclusivamente ao *Scientia*, com o entendimento de que eles não foram anteriormente submetidos, não estão sendo e não serão posteriormente publicados em outro veículo. Autores que utilizarem tabelas, ilustrações, figuras, ou textos contendo mais de 25 palavras, anteriormente publicados em outro periódico – sendo ou não autores do artigo – deverão obter a devida permissão **por escrito** do portador dos direitos de cópia (“*Copyright*”). Esse documento deverá permanecer de posse dos autores, sendo encaminhado ao *Scientia*, quando solicitado.

Idioma

Os artigos, com exceção dos de Revisão, podem ser escritos preferencialmente em inglês, porém em Português e Espanhol também serão aceitos. Os autores cujo idioma nativo não for o empregado na redação do artigo são orientados a solicitar a colaboração de colegas fluentes no idioma, antes de enviar o artigo para o periódico.

Tipos de contribuições aceitas para publicação no Scientia

O *Scientia Chromatographica* considera para publicação quatro tipos de contribuição:

- *Artigos Originais* de pesquisa: descrevem resultados de estudos completos. Deverão conter resultados de laboratório e/ou teóricos, que signifiquem uma contribuição expressiva para a área de técnicas de separação, seja ela conceitual, na instrumentação, ou na aplicação. Este tipo de contribuição é limitado a 6.000 palavras, incluindo as legendas das figuras e as referências, e no máximo 5 tabelas e/ou figuras **somados**. No momento do envio da prova de impressão, caso isto ocorra o autor será consultado se prefere revisar o artigo para enquadrá-lo em até 7 páginas, ou se prefere pagar as páginas excedentes. O número de páginas de um artigo depende muito das figuras e tabelas do mesmo. Este critério não é aplicado aos artigos convidados, cujo número de páginas será informado ao autor no momento do convite.
- *Comunicações* (“Short Communication”): são artigos completos, porém que relatam resultados mais curtos, oportunos, e/ou cuja relevância requer sua rápida publicação. Deverão ter a mesma qualidade dos artigos *Originais* porém, devido a seu caráter de comunicação preliminar, usualmente são de menor extensão. Este tipo de publicação deve ter no máximo quatro páginas impressas, incluindo todo o artigo, ou seja, tabelas, figuras e referências. O autor deve indicar claramente que se trata de uma comunicação no topo da primeira página do artigo.
- *Artigos de Revisão crítica*: revisões críticas sobre uma area específica das técnicas cromatográficas e relacionadas são também consideradas para publicação. Esses artigos devem se limitar a no máximo 10.000 palavras, incluindo as legendas, e até 10 tabelas e figuras **somadas**. Os artigos de Revisão Crítica deverão antes de sua submissão serem discutidos com um dos co-Editores mais relacionados ao assunto em questão. Artigos não encaminhados desta forma serão antes enviados a um co-Editor da área em que se enquadre para parecer e, somente então, serão enviados aos revisores, podendo atrasar significativamente sua publicação. Devem conter uma contribuição nova a respeito de um assunto de grande interesse atual, discutindo as vantagens e desvantagens do mesmo. O *Scientia* não publica apenas relato de artigos descritos na literatura, sem uma discussão crítica sobre os mesmos.
- *Artigos de Alta Prioridade*: são publicados no primeiro número disponível do periódico, recebendo prioridade máxima de todo o sistema Editorial do periódico. Para justificar sua publicação como alta prioridade, os manuscritos deverão apresentar, de forma resumida, resultados importantes de recentes desenvolvimentos na área de cromatografia e técnicas relacionadas (espectrometria de massas, preparo de amostras, eletroforese capilar e outros). Não precisam conter resultados experimentais detalhados, sendo limitados a 2.500 palavras e três figuras e/ou tabelas **combinadas**.