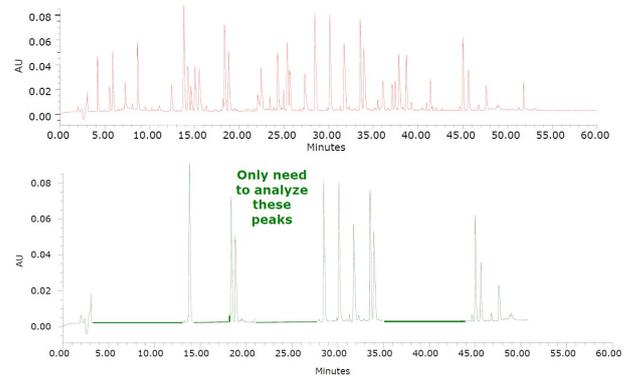


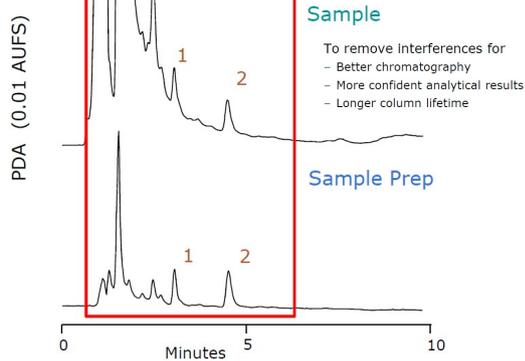
EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

MARIA EUGÊNIA QUEIROZ NASSUR

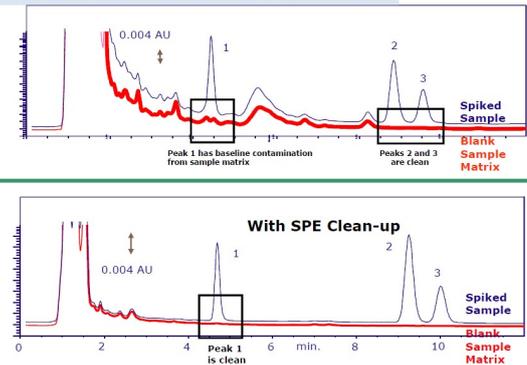
Improvement: Remove unnecessary peaks



Improvement: Remove Baseline Interferences

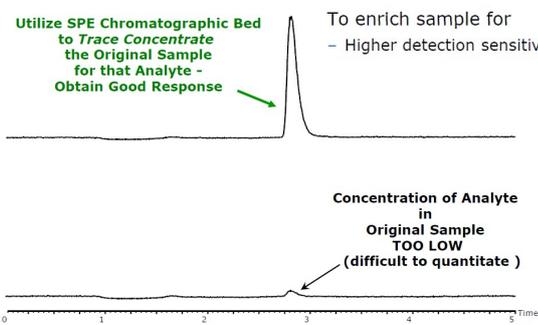


Improvement: Remove Baseline Interferences

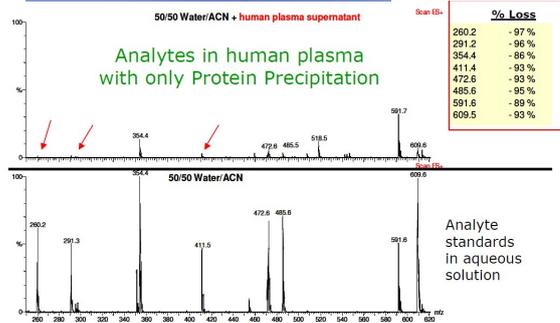


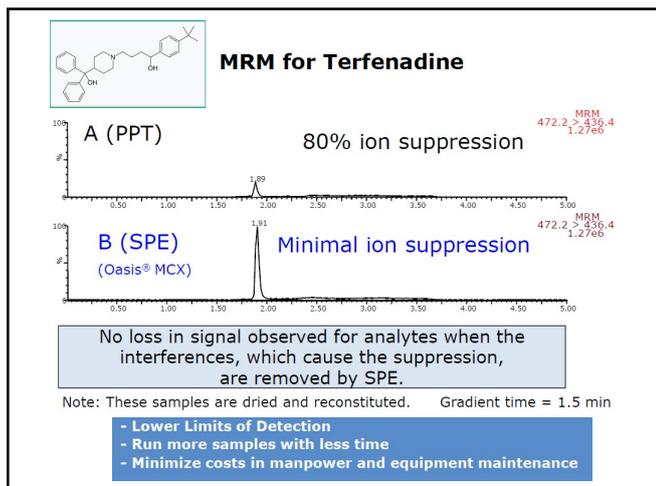
Utilize SPE Chromatographic Bed to Trace Concentrate the Original Sample for that Analyte - Obtain Good Response

To enrich sample for - Higher detection sensitivity



Complex Sample Matrix: Ion Suppression





Extração Líquido-Líquido: Partição*

“semelhante dissolve semelhante”

- ◆ Método baseado na solubilidade relativa do analito entre duas fases imiscíveis
- ◆ Remover interferentes
- ◆ coeluir com os analitos
- ◆ Adsorver forma irreversível FE
- ◆ Concentrar analitos (níveis de traços)

PREPARO DA AMOSTRA
PRIMEIRA ETAPA – DESENVOLVIMENTO MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Coefficiente de Distribuição ou Coeficiente de Partição

$S_{aq} \rightleftharpoons S_{org}$

$K_D = \frac{[S_{org}]}{[S_{aq}]}$

- Concentração do soluto
- Imiscíveis solventes
- [água (altamente polar e imiscível sol. Org.) / diclorometano, éter, hexano]
- Equilíbrio Partição

$K = \frac{\text{solubility of organic (g/100 mL)}}{\text{solubility of water (g/100 mL)}}$

SUBSTÂNCIAS POLARES E IÔNICAS

Fase Orgânica

- “Semelhante dissolve semelhante”
- Imiscível em água (exclui acetona e álcoois de baixa massa molecular) – formar duas fases – densidades diferentes
- Hexano, pentano, éter de petróleo, clorofórmio, diclorometano
- Puro, fácil evaporação, baixa toxicidade
- Deverão ser evitados: tetracloreto de carbono, benzeno
- Densidades próximas – emulsão – materiais gordurosos

LLE – Propriedades físico-química de alguns solventes

Solvente	Densidade (g/mL), 20°C	Ponto de Ebulição (°C)
n-Hexano	0,66	69
Isoctano	0,69	99
Tert-butil metil éter	0,74	55,3
Tolueno	0,87	110,6
Acetato de Etila	0,90	77
Água	1,00	100
Diclorometano	1,33	40
Clorofórmio	1,47	61
Tetracloreto de carbono	1,58	76,72

Solvente	Toxicidade
Etanol	Causa náuseas, vômitos, depressão, sonolência, falta de coordenação, coma e pode causar morte.
Clorofórmio	A inalação em grandes doses pode causar hipotensão, depressão respiratória, morte e pode atuar como sonífero. É cancerígeno.
Éter etílico	Suavemente irritante para a pele, olhos e membranas mucosas. Potente anestésico, podendo provocar paradas cardíacas.
p-diclorobenzeno	Vapores causam irritação à pele, garganta e olhos.
Hidróxido de sódio*	Corrosivo para todos os tecidos. A inalação do pó ou da névoa concentrada pode causar lesões no trato respiratório.
Ácido benzóico*	Causa irritação na pele, nos olhos e nas membranas mucosas.
Diclorometano	Potencial de sintoma ao expor demasiado ao cansaço, fraqueza, sonolência, náusea, irritação nos olhos e na pele.
Benzeno	Irritação aguda das membranas mucosas.(por ingestão ou inalação), inquietação, convulsões, depressão. Dificuldade respiratória.
Hexano	Potencial de sintoma ao expor demasiadamente à luz, nervosismo, náusea, dor de cabeça, fraqueza nos músculos, irritação nos olhos e nariz, pneumonia química.

LLE

LLE – FUNIL DE SEPARAÇÃO

FASE INFERIOR

FASE SUPERIOR

Fase inferior

Extração de uma solução aquosa utilizando o CH_2Cl_2 ($d = 1,33\text{g/ml}$)

A – solução aquosa contém a substância desejada.
 B - Diclorometano é usado para extrair a fase aquosa.
 C – A pipeta é colocada no frasco cônico.
 D – A fase orgânica é removida e transferida para um recipiente seco. A fase aquosa permanece no frasco original.

FASE SUPERIOR

Extração de uma solução aquosa utilizando o éter dietílico ($d = 0,7174\text{g/ml}$)

A - a solução aquosa contém a substância desejada.
 B – Éter é usado para extrair a fase aquosa.
 C – A fase aquosa é removida e transferida para um recipiente. A fase que contém éter permanece no frasco original.
 D - A camada etérea é transferida para um novo frasco. A camada aquosa é transferida de volta ao frasco original

EXTRAÇÕES SUCESSIVAS

K_d	Single Extraction	Second Sequential Extraction			Third Sequential Extraction		
	1 × 50 mL	1 × 50 mL	1 × 50 mL	2 × 50 mL	1 × 50 mL	1 × 50 mL	3 × 50 mL
	Percent Extracted	Repeat Percent Extracted	Additional Recovery	Cumulative Extraction	Repeat Percent Extracted	Additional Recovery	Cumulative Extraction
500	96.154	96.154	3.697	99.851	96.154	0.142	99.993
250	92.593	92.593	6.859	99.451	92.593	0.508	99.959
100	83.333	83.333	13.890	97.223	83.333	2.315	99.538
50	71.429	71.429	20.411	91.839	71.429	5.832	97.671
5	20.000	20.000	16.000	36.000	20.000	12.800	48.800

EMULSÃO ENTRE AS FASES

Suspensão coloidal de um líquido em outro disperso sob a forma de gotículas > 0,1µm DI

diminuição da interação proteína-proteína

Efeito da Força Iônica sobre a Solubilidade das Proteínas

Adição NaCl - “salting in”
 (baixa concentração e baixa valência de cátions e ânions)

Deixar o funil de separação em descanso por algum tempo
 Adicionar água ao sistema (destabiliza a emulsão)
 Centrifugar

Fosfolípidos, ácidos graxos, triglicerídeos, proteínas

EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

- **DESVANTAGENS**
- Consumo de solventes orgânicos de alta pureza
- Exposição do analista a solventes orgânicos (tóxicos)
- Descarte de solventes orgânicos
- Concentração da fase orgânica
- Várias etapas para sua execução
- Formação de emulsão (pequenas gotas de uma solvente misturado no outro) – adição NaCl
- Baixa seletividade

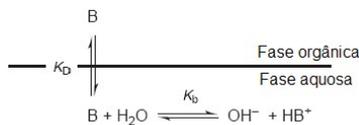
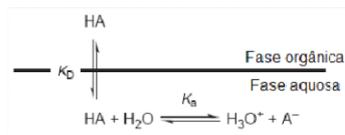
Exatção Líquido-Líquido (LLE)



- **AUMENTAR A SOLUBILIDADE DO ANALITO NA FASE EXTRATORA**
- $K_D \ll 1$
- **Analitos ácidos – solução aquosa ácida ($\text{pH} = \text{pKa} - 1$)**
- **Analitos básicos – solução aquosa alcalina ($\text{pH} = \text{pKb} + 1$)**
- **Forma não ionizada portanto solúveis na fase orgânica**

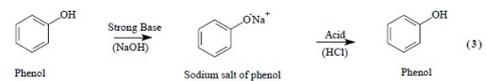
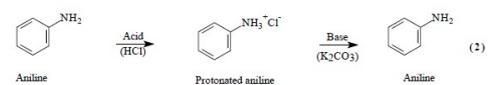
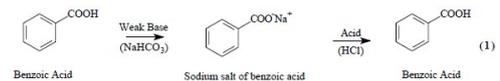
LLE – Ácidos e bases fracas

$$\text{pH} = \text{pKa} - 1$$



$$\text{pH} = \text{pKb} + 1$$

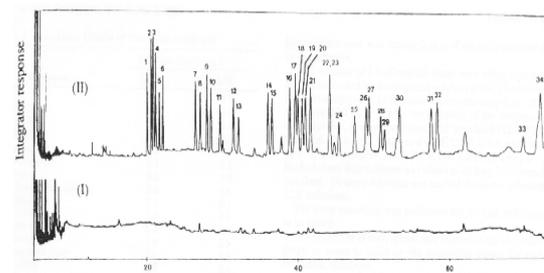
LLE – ácido/base



DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS (MULTIRESÍDUO) EM AMOSTRAS DE ÁGUA (J. Agric. Food Chem, vol 44, n.7, 1996)

- AMOSTRA DE ÁGUA: 1000 mL ACIDIFICADA pH 2 (HCl)
- EXTRAÇÃO: 3 VOLUMES DE 60 mL (15% HEXANO – DICLOROMETANO)
- EXTRATO – Na_2SO_4 agente secante
- EXTRATO FOI CONCENTRADO A 0,5 mL
- VOLUME INJETADO: 1 μL (SPLITLESS) GC-ECD

DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS (MULTIRESÍDUO) EM AMOSTRAS DE ÁGUA (J. Agric. Food Chem, vol 44, n.7, 1996)

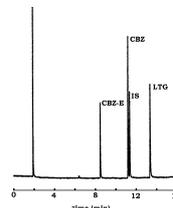


DETERMINAÇÃO DE LAMOTRIGINA E CARBAMAZEPINA EM PLASMA LLE – GC/TSD
M.E.C.Queiroz et al. (CHROMATOGRAPHIA v. 53, p. 485-488, 2001)

- 200 µL PLASMA
- 200 µL TAMPÃO BICARBONATO pH 11
- 1mL ACETATO DE BUTILA – 2,5 µg 4-METIL PRIMIDONA (PADRÃO INTERNO)
- AGITAÇÃO MECÂNICA – 10 MIN – CENTRIFUGAR
- EVAPORAR A FASE ORGÂNICA
- RESÍDUO – RECONSTITUÍDO 50 µL METANOL
- VOLUME INJETADO – 1 µL – HP5 – GC/TSD

• D = 0,887 g/mL

DETERMINAÇÃO DE LAMOTRIGINA E CARBAMAZEPINA EM PLASMA LLE – GC/TSD
M.E.C.Queiroz et al. (CHROMATOGRAPHIA v. 53, p. 485-488, 2001)



LLE – AMBIENTAL

*fungicida

cold-induced aqueous acetonitrile phase separation

Agrotóxicos*	Água de irrigação	4 mL	Acetonitrila ^b	8,0	---
Piretroides ^c	Água de irrigação e água subterrânea	100 mL	n-Hexano	0,1	10 % NaCl (m/v)
Carbamatos ^d	Água potável	2 mL	Acetonitrila ^b	4,0	1,5 % NaCl (m/v)
Herbicidas e pesticidas ^e	Águas residuais	250 mL	Diclorometano	30,0	10 mL de solução saturada de NaCl
Azul de metileno e protetor solar	Águas residuais	5,5 mL	Acetonitrila ^f	4,5	2,25 g de sulfato de amônio
82 compostos orgânicos ^g	Água potável	400 mL	Tolueno	0,5	150 g de NaCl tamponado pH 6,5-7,0
Metil-kresoxima e boscalide * (Sólido/líquido)	Frutas, vegetais e solos	10 g	Diclorometano	40	50 g de NaCl
Dioxano	Água potável	10 mL	Diclorometano	20	2 g de NaCl

* Clorpirifós, 1-clalotrina, permetrina e bifentrina; ^b LLE com partição em baixa temperatura; ^c Permetrina, resmetrina e cipermetrina; ^d Aldicarb, carbofuran e carbaril; ^e EPTC, propaclor, AD-67, aktinil e acetoclor; ^f LLE assistida pelo salting out; ^g Inseticidas organoclorados e organofosforosos, pesticidas triazinas e acetanilidas, cloroanilinas e fenóis.

LLE – DROGAS DE ABUSO (amostras biológicas)

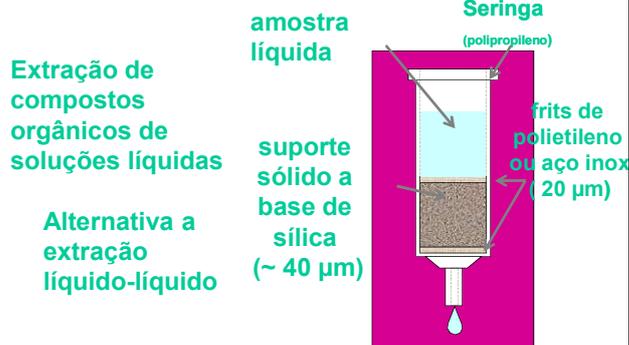
ANALITOS	AMOSTRA (mg ou mL)	SOLVENTES (mL)	ADITIVOS
THC ^a , CBN ^b e CBD ^c	Cabelo	50 mg n-Hexano/acetato de etila (75:25, v/v)	5,0 ---
Anfetaminas	Cabelo	50 mg Clorofórmio/isopropanol (4:1, v/v)	5,0 NaOH
Nicotina e cotinina	Cabelo	1 mg Diclorometano	2,0 NaOH
Cocaína, BE ^d , EME ^e , CE ^f e AEME ^g	Unhas	50 mg Clorofórmio/isopropanol/ n-Heptano (50:17:33, v/v/v)	10,0 Tampão pH 8,4
Canabinoides	Saliva	1,5 mL n-Heptano/acetato de etila (4:1, v/v)	4,0 Tampão pH 6,5 e KCl
Benzodiazepínicos e zolpidem	Saliva	1,0 mL Acetato de etila	8,0 Tampão pH 9,5
Estricnina	Plasma humano	0,1 mL Éter etílico/diclorometano (3:1, v/v)	2,0 NaOH
Esteroides anabólicos androgênicos	Urina	0,5 mL n-Hexano	1,0 ---

Analitos – não ionizados

EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA



EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA - SPE



CARACTERÍSTICAS - SPE

- PARTÍCULAS DE TAMANHO SUPERIOR ÀS DE HPLC
- VÁCUO OU PEQUENA PRESSÃO POSITIVA (SERINGA) PARA MOVIMENTAR A AMOSTRA E ELUENTES
- A AMOSTRA ISOLODA É ELUÍDA GERALMENTE NO MENOR VOLUME POSSÍVEL
- A COLUNA SPE NORMALMENTE É USADA UMA ÚNICA VEZ E DESCARTADA

VANTAGENS - SPE

- **EFICIÊNCIA**
 - EVITA FORMAÇÃO DE EMULSÕES
 - GERALMENTE DISPENSA EVAPORAÇÃO
 - EXTRATO MAIS PURO
 - MAIORES TAXAS DE RECUPERAÇÃO
 - EXTRATO CONCENTRADO

VANTAGENS - SPE

- **ECONOMIA**
 - ELIMINA VIDRARIA
 - MENORES VOLUMES DE SOLVENTES ORGÂNICOS
 - DIMINUI O TRABALHO MANUAL
- **REPETIBILIDADE**
 - EVITA TRANSFERÊNCIA DE EXTRATO
 - COEFICIENTE DE VARIAÇÃO TÍPICO 2-3%

VANTAGENS - SPE

- **RAPIDEZ**
 - MAIS RÁPIDO QUE LLE
 - PERMITE PROCESSAR MUITAS AMOSTRAS SIMULTANEAMENTE
- **SEGURANÇA**
 - MANIPULA MENORES QUANTIDADES DE SOLVENTES (E AMOSTRAS) TÓXICOS E/OU INFLAMÁVEL

SELETIVIDADE VARIEDADE DE FASES DISPONÍVEIS

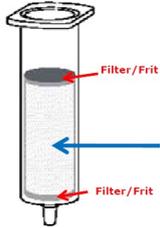


INSTRUMENTAÇÃO - SPE



Sorbent -- Chromatographic packing material (Stationary Phase)

Syringe Barrel Style



Retention Mechanisms:
1. Reversed Phase (RP)
2. Normal Phase (NP)
3. Ion-Exchange (IEX)

Sorbent

Fase reversa

Packing	Pore Size (nominal, Å)	Particle Size Range (µm)
C ₁₈	125	55-105
µC ₁₈	125	37-55
C ₈	125	37-55
µC ₂	125	37-55
NH ₂	125	55-105
CN	125	55-105
Diol	300	37-55
Silica	125	55-105
Florisil	60	50-200

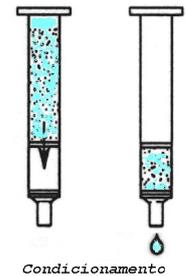
Fase Normal

NÃO POLARES		
C ₁₈	Octadecilsilano	= Si - (CH ₂) ₁₇ - CH ₃
C ₈	Octilsilano	= Si - (CH ₂) ₇ - CH ₃
C ₂	Etilsilano	= Si - CH ₂ - CH ₃
C ₁	Metilsilano	= Si - CH ₃
PH	Fenilsilano	= Si - 
CH	Ciclohexilsilano	= Si - 
POLARES		
FL	Florisil	MgO ₂ Si
AL	Alumina	Al ₂ O ₃
SI	Silica	= Si - OH
CN	Cianopropilsilano	= Si - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - CN
2OH	Diolsilano	= Si - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - O - CH ₂ - CH - CH ₂ OH OH
NH ₂	Aminopropilsilano	= Si - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - NH ₂
PSA	N-Propiltienodiaminossilano	= Si - CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ - NH - CH ₂ - CH ₂ - NH ₂

PROCEDIMENTO SPE

CONDICIONAMENTO DA COLUNA SPE

- NECESSÁRIO PARA "ATIVAR" A FASE
- Aumentar a área superficial
- Eliminar interferentes



CONDICIONAMENTO EXTRAÇÃO EM FASE REVERSA

- ANALITOS: APOLARES
- FASE ESTACIONÁRIA: C₁₈, C₈
- METANOL: 2 VEZES O VOLUME DA COLUNA, NÃO DEIXE SECAR A FASE
- ÁGUA, TAMPÃO OU OUTRO SOLVENTE (SIMILAR À SOLUÇÃO DA AMOSTRA): 1 VEZ O VOLUME DA COLUNA, NÃO DEIXE SECAR A FASE
- Remove excesso de metanol
- Superfície com solvente similar à amostra (polaridade, pH, força iônica)

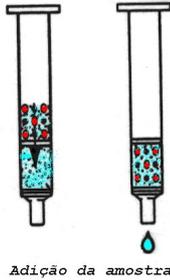
CONDICIONAMENTO EXTRAÇÃO EM FASE NORMAL

- ANALITOS: POLARES
- FASE ESTACIONÁRIA: CN, DIOL, NH₂
- SOLVENTE POLAR
- SOLVENTE SIMILAR AO DA AMOSTRA
- DESLIGUE O VÁCUO ANTES DE SECAR A COLUNA

PROCEDIMENTO SPE

ADIÇÃO DA AMOSTRA

- VOLUMES DE μL A LITROS; VOLUMES EXCESSIVOS REDUZEM A EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO
- AJUSTE DE pH
- ADIÇÃO DA AMOSTRA COM VÁCUO OU PRESSÃO POSITIVA
- FLUXO- RETENÇÃO DO ANALITO



Adição da amostra

PROCEDIMENTO - SPE

LIMPEZA DO SUPORTE SÓLIDO

- ELUIÇÃO DE MATERIAL NÃO DESEJADO OU NÃO RETIDO É LAVADO COM MESMO SOLVENTE DA AMOSTRA (~ 1 VOL.)
- PASSANDO UM SOLVENTE + FORTE QUE DA AMOSTRA PODE REMOVER ALGUMAS IMPUREZAS INDESEJÁVEIS



Lavagem

PROCEDIMENTO - SPE

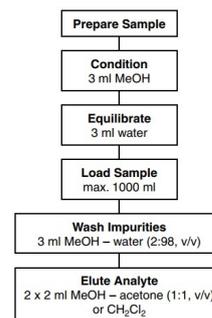
ELUIÇÃO DO COMPOSTO DE INTERESSE

- ELUIÇÃO COM PEQUENO VOLUME DE SOLVENTE ADEQUADO (FORTE)
- DUAS ALÍQUOTAS PEQUENAS SÃO MAIS EFICIENTES DO QUE UMA GRANDE
- INTERAÇÃO POR ALGUNS SEGUNDOS AUMENTAM A EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO



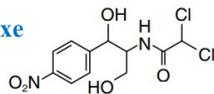
Eluição

FASE REVERSA (analitos média polaridade a apolares) – C18, 3 mL, 200 mg



Fase normal SiOH, 3 mL, 500 mg

Antibiótico – cloranfenicol em peixe



Preparo da amostra

Homogeneizar peixe tampão acetato 0,1 mol/L pH 5,2

Extração – acetato de etila

Extrato seco – DCM

Limpeza FE: DCM

Eluição: metanol

Delta 9 THC na urina

Coluna: C18, 3 mL, 500 mg

Urina: Diluir ácido acético glacial

Condicionamento: 6 mL MeOH, 6 mL HCl 0,01 mol/L

Limpeza FE: 2 x 500 μL ACN: HCl 0,01 mol/L (6:4 v/v)

Eluição: 2 x 500 μL n-heptano: acetato de etila (85:15 v/v)

Solvent volume is directly proportional to bed mass

Sorbent per Well	Maximum Mass Capacity	Typical Sample Volume (Pre-Dilution)	Typical Elution Volume
2 mg	0.03 to 0.05 mg	5 to 200 μL	$\leq 50 \mu\text{L}$
5 mg	0.15 to 1 mg	10 to 200 μL	$\leq 150 \mu\text{L}$
10 mg	0.35 to 2 mg	50 to 400 μL	$\leq 250 \mu\text{L}$
30 mg	1 to 5 mg	100 μL to 1 mL	$> 400 \mu\text{L}$
60 mg	2 to 10 mg	200 μL to 2 mL	$> 800 \mu\text{L}$

SPE - DISCOS



SPE - DISCOS



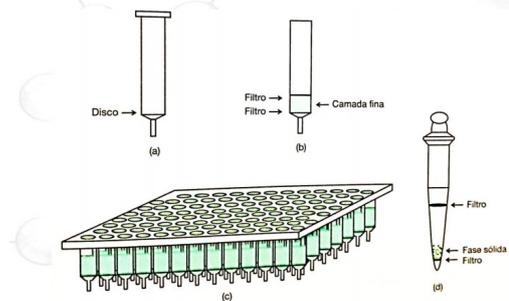
ANÁLISE DE ORGANOFOSFORADOS NO AR EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL



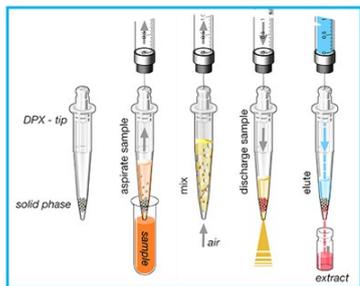
ANÁLISE DE ORGANOFOSFORADOS NO AR



Representação de formatos alternativos de dispositivos para SPE.

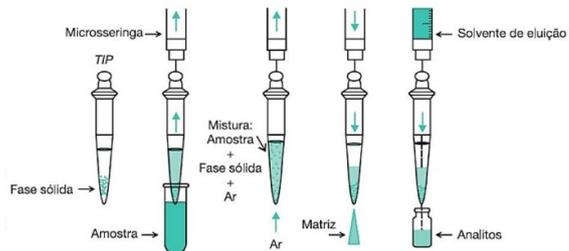


Diposable Pipette tip eXtraction (DPX)



EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Extração em ponteira de pipeta descartável (disposable pipette extraction – DPX)

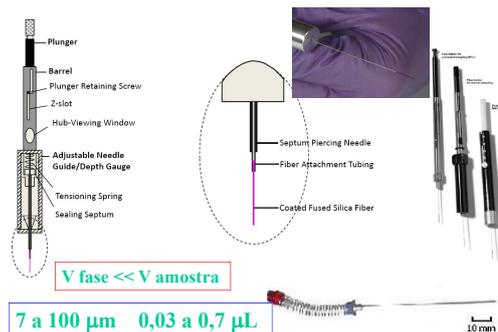


EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

SPE usando dispersão da matriz



MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SPME - JANUSZ PAWLISZYN et al. 1990



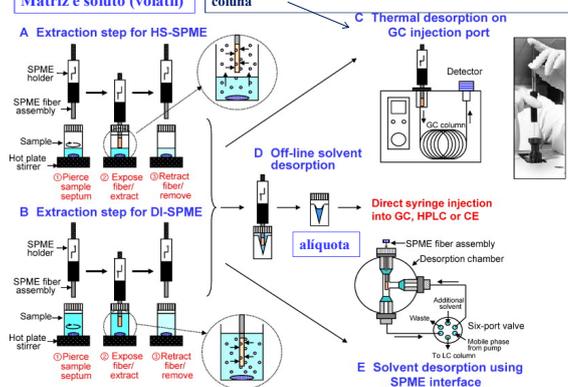
Nova geração - fibras de metal
(mais robustas) T:450°C - inerte - não contém ferro

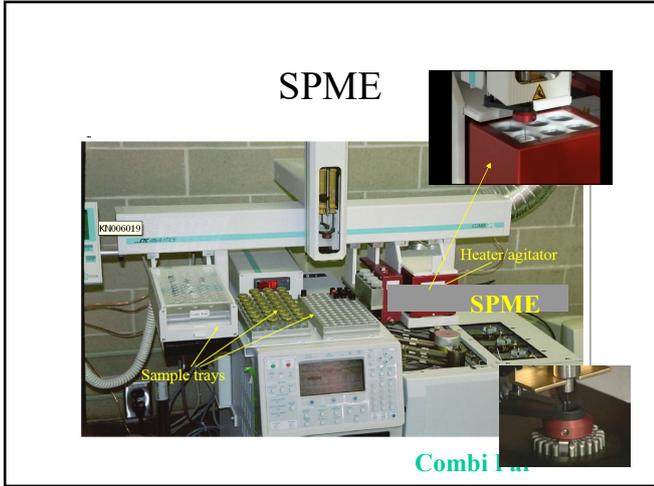
- Mais inerte do que aço inox



CombiPAL type autosampler

Matriz e soluto (volátil) Dessorção muito eficiente – todo analito é introduzido na coluna





Drogas de abuso - cabelo HS-SPME/GC-MS-MS

Headspace SPME (10mL)

- 10 mg hair
- 40 mg THC-D3
- 1 mL NaOH (1M)
- 0,3 g Na₂CO₃

90°C

Hair alkaline hydrolysis and preheating (15 min)

SPME-Device

90°C

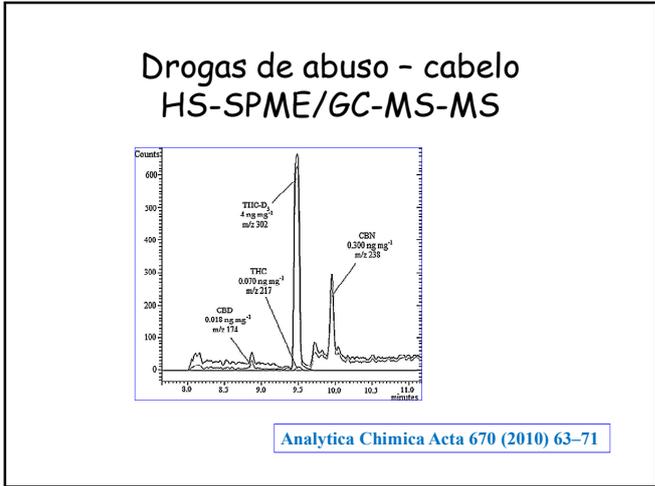
Headspace SPME (40 min)

250°C

Desorption in GC-injection port (10 min)

canabinóides

Analytica Chimica Acta 670 (2010) 63–71



IN VIVO SPME – SAMPLING OF FLOWING BLOOD

DIRECT IN VEIN SAMPLING with use of in-dwelling catheter (applicable to large animals such as dogs, pigs)

SPME extraction phase

Musteata F.M., Pawliszyn J., *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **2007**, 70(2), 181-193
 Es-haghi, A.; Zhang, X.; Musteata, F.M.; Bagheri, H.; Pawliszyn, J.; *Analyst*, **2007**, 132(7), 672-678

Blood sampling without blood draws for *in vivo* pharmacokinetic studies in rats

- Veia jugular
- Artéria carótida

Catheter Interface Y
Recirculação do sangue

J Pharm Biomed Anal 47 (2008) 907–912

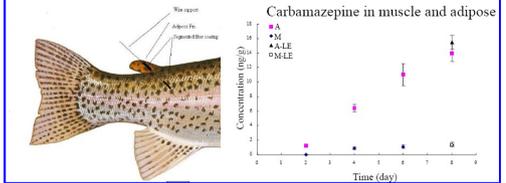
Fibras de metal – C18 quimicamente ligada



In vivo SPME

In vivo Application: Tissue-specific Bioaccumulation of Drugs in Fish

X. Zhang, J. Cai, K. Oakes, F. Breton, M. Servos and J. Pawliszyn *Anal. Chem.* 81, 7349-7356 (2009).



In-vivo lung sampling with SPME



69

