

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

PLANEJAMENTO DE UMA ANÁLISE E OPERAÇÕES DE PREPARO DE AMOSTRAS



Prof. Dr. Mauricio Yonamine

1

PLANEJAMENTO DE UMA ANÁLISE TOXICOLÓGICA:

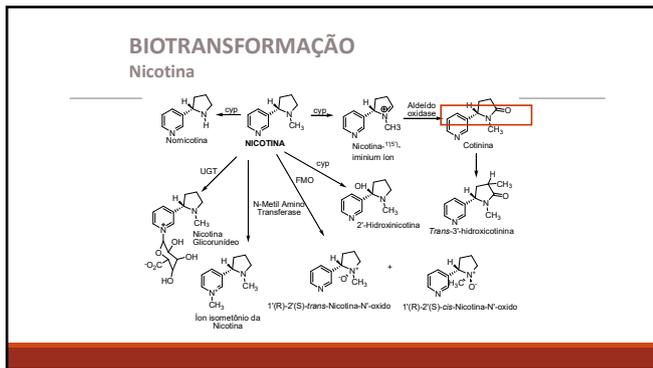
Amostras biológicas

-Que substâncias analisar/identificar?

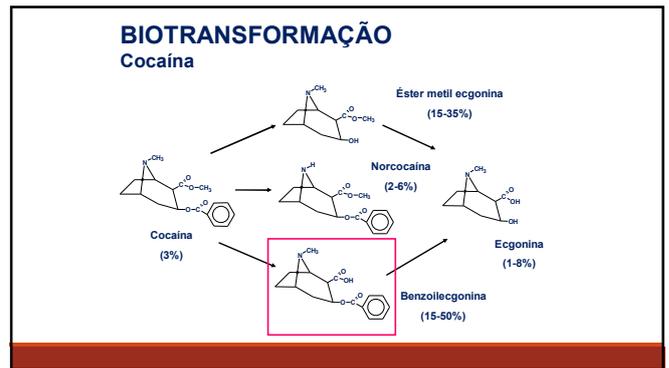
Produtos de biotransformação/ produto inalterado



2



3



4

COCAÍNA

• Chá de coca pode gerar resultado positivo no exame antidoping ?

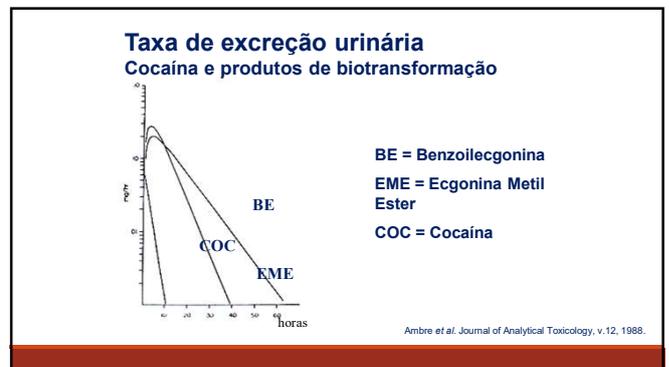


Estudo (1996):

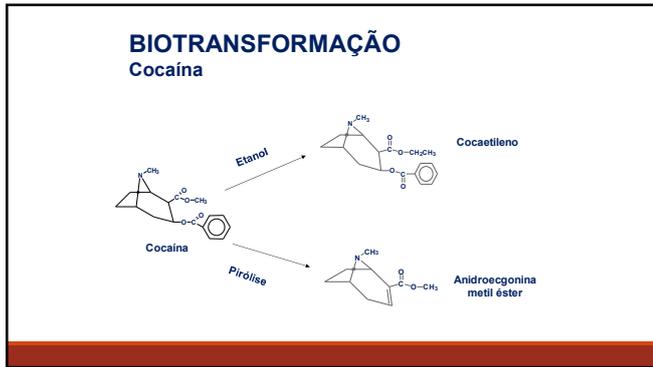
- Aproximadamente 5mg de cocaína presente no chá da Bolívia e Peru.
- Após o consumo de 1 copo - conc. urinária de benzoilecgonina: - 4000ng/mL.

Jenkins, A.J et al., Forensic Sci Int, v.73, p.179-89, 1996.

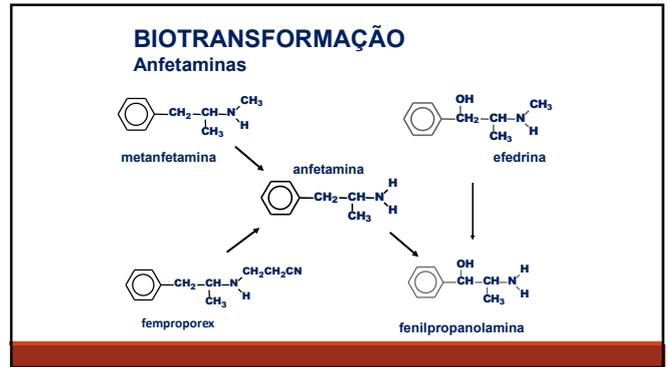
5



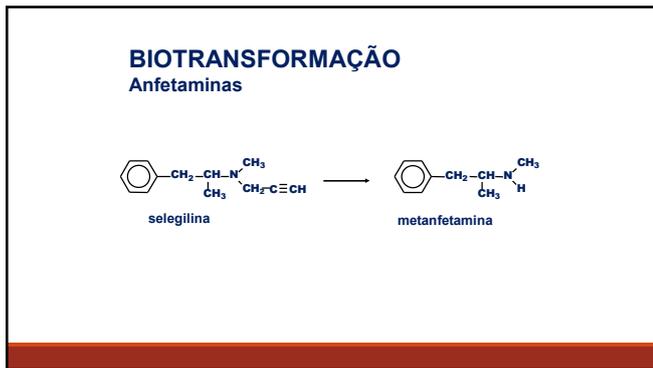
6



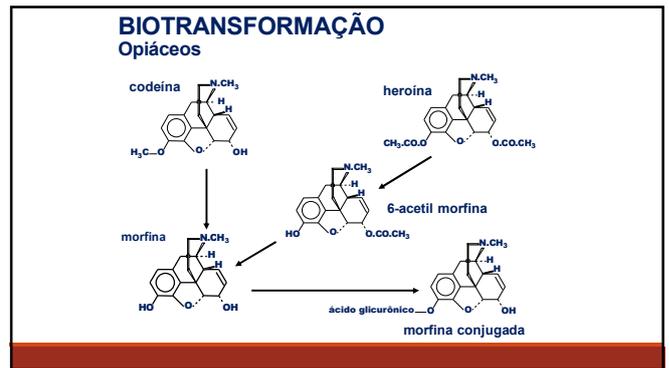
7



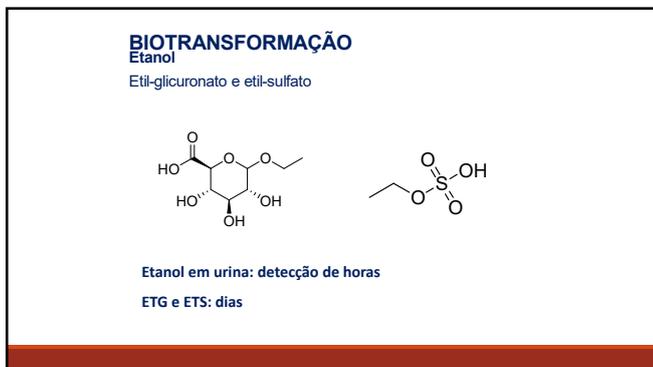
8



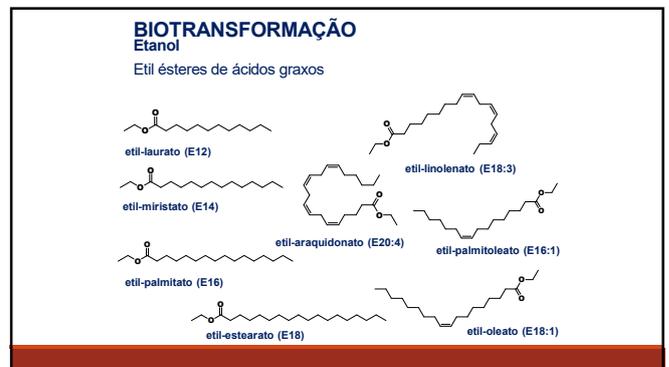
9



10



11



12

TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS EM ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

-A preparação de amostras pode ser considerada como uma série de operações unitárias necessárias para que determinada substância (analito) possa ser detectada pela técnica analítica de escolha.

13

Típicas operações em preparação de amostras:

- 1) Liberação dos analitos da amostra
- 2) Remoção de interferentes endógenos
- 3) Técnicas de extração
- 4) Aumento da seletividade e sensibilidade

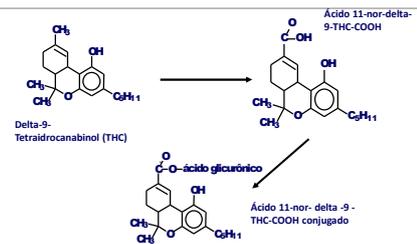
14

1) Liberação dos analitos da matriz

-Como se encontra o analito na matriz?
-conjugado/livre
-matriz?

15

BIOTRANSFORMAÇÃO Maconha - Δ^9 THC



16

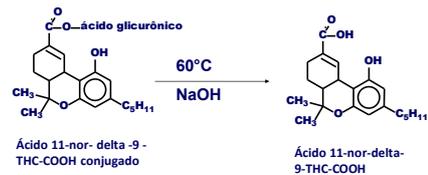
SUBSTÂNCIAS CONJUGADAS

-Hidrólise
-Alcalina
-Ácida
-Enzimática

17

HIDRÓLISE ALCALINA

-Exemplo



18

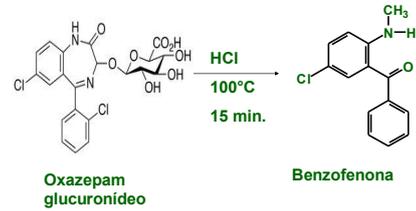
HIDRÓLISE ÁCIDA/ALCALINA

- Vantagens:
 - processo mais rápido
 - custo baixo
 - Desvantagens:
 - degradação de analitos não estáveis
- p.ex. benzodiazepínicos

19

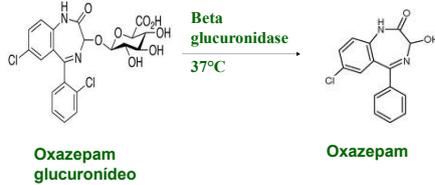
HIDRÓLISE ÁCIDA/ALCALINA

Benzodiazepínicos



20

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA



21

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

- Vantagens:
 - não degrada os analitos
- Desvantagens:
 - custo mais alto
 - maior tempo de reação
 - controle mais rigoroso das condições
 - enzimas podem ser inibidas por substâncias presentes nas amostras
 - aconselhável o uso de controle

22

OUTRAS AMOSTRAS P. ex: cabelo

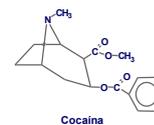
- Matriz complexa
- como retirar os analitos do cabelo?
 - digestão da matriz (solução de NaOH 1M e temperatura 70°C durante 20 minutos)
- substâncias estáveis (THC, anfetaminas)



23

OUTRAS AMOSTRAS P. ex: cabelo

- E para substâncias não estáveis?
P.ex. cocaína



-Incubação em solução ácida ou metanol durante 18 horas a 50°C

24

2) Remoção de interferentes endógenos

Uma matriz biológica consiste de muitos componentes, como proteínas, lipídios, carboidratos que podem interferir na análise.

25

2) Remoção de interferentes endógenos

Precipitação de proteínas:

A remoção de proteínas por desnaturação ou precipitação é muitas vezes necessária principalmente em amostras como sangue total ou plasma. A principal razão de remover proteínas é que elas podem precipitar em contato com a fase móvel, obstruindo a coluna de HPLC.

26

Métodos de precipitação:

a) com ácidos (p.ex. ácido tricloroacético e ácido perclórico)
-formam sais insolúveis com a forma catiônica das proteínas em meio ácido

b) com solventes orgânicos
-solventes que são miscíveis em água como acetona, metanol, etanol e acetonitrila podem abaixar a solubilidade de proteínas.

27

Métodos de precipitação:

c) com sais metálicos: proteínas também podem ser removidas da amostra com o uso de sais de zinco ou cobre em condições alcalinas.

-não : analitos que complexam com metais.

d) sulfato de amônio: O sulfato de amônio é um precipitante relativamente ineficiente: < 75% das proteínas são removidas com a adição de 1,5mL de sol. Saturada em 0,2ml de plasma. Entretanto, poderia ser possível injetar o sobrenadante diretamente no HPLC.

28

Métodos de precipitação:

Amostra de plasma	Agente precipitante (v/v) 99% de ppt
10% ácido tricloroacético	0,2
6% ácido perclórico	0,7
Acetonitrila	1,3
Acetona	1,4
Etanol	3,0
Metanol	4,0
Sulfato de amônio saturado	3,0

29

Considerações:

- A possibilidade de perda de analitos com a precipitação deve ser levada em conta.
- Se ácidos fortes são utilizados, os analitos e o PI devem ser estáveis nesse meio.
- Diminuir a temperatura (-20°C) pode aumentar a eficiência.
- Recomendável adicionar uma segunda porção do agente ppt no sobrenadante.
- A filtração minimiza a possibilidade de se injetar partículas, mas pode causar perda de analitos retidos no filtro.

30

Precipitação de pigmentos e sais biliares:

Pigmentos urinários e sais biliares podem produzir altos "backgrounds" que podem interferir na quantificação de analitos. A remoção desses compostos com extensos esquemas de extração podem ser relativamente difíceis ou demorados. Sua remoção pode ser feita preferencialmente por precipitação com sais de chumbo.

31

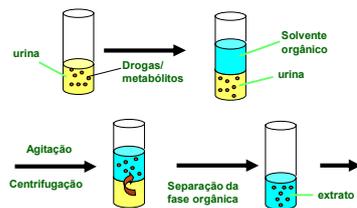
3) Técnicas de extração

- A) Extração líquido-líquido (LLE)
- B) Extração em fase sólida (SPE)
- C) Extração por *headspace* (HS)
- D) Extração por fluido supercrítico (SFE)
- E) Extração acelerada por solvente (ASE)
- F) Microextração em fase sólida (SPME)*
- G) Microextração em fase líquida (LPME)*

* Técnicas miniaturizadas de preparação de amostras

32

A) EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO



33

A) EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Propriedades de um solvente extrator "ideal":

- Bom "poder de extração"
- Baixa solubilidade em água
- Menos denso que a água
- Moderada volatilidade
- Estável, inerte
- Pouco inflamável
- Baixa toxicidade
- Baixo custo

34

A) EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Polaridade de solventes:

Hexano
Ciclohexano
Tetracloro de carbono
Éter dietílico
Diclorometano
Clorofórmio
Acetona
Metanol



35

A) EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Efeitos/danos de alguns solventes:

Solvente	Efeitos/danos
Benzeno	Carcinógeno
Tetracloro de carbono, clorofórmio	Hepatotóxico, carcinógeno
Diclorometano	Carboxiemoglobinemia
Éter etílico*	Inflamável, explosivo
Hexano, 2-hexanona	Neurotóxico
Tricloroetileno	Cardiotóxico

*forma peróxidos que podem reagir com analitos

36

EXTRAÇÃO (líquido-líquido)

INFLUÊNCIA DO pH NA HIDROSSOLUBILIDADE/LIPOSSOLUBILIDADE

▶ substâncias de caráter ácido. Ex. ácido 11-nor-delta-9-THC-COOH

ácido 11-nor-delta-9-THC-COOH

37

EXTRAÇÃO (líquido-líquido)

INFLUÊNCIA DO pH NA HIDROSSOLUBILIDADE/LIPOSSOLUBILIDADE

substâncias de caráter básico. Ex. anfetaminas

Anfetamina

38

Exemplo de aplicação da extração líquido-líquido: Triagem de estimulantes (análise antidoping)

Urina (5mL)

- PI (difenilamina)
- Éter (3mL)
- NaCl (5g)
- Agitação 10 min
- Centrifugação 5 min

Fase aquosa Fase orgânica

GC-NPD

39

Cocaína

40

EQUAÇÃO DE HENDERSON - HASSELBALCH

Para bases:

$$\text{pH} - \text{pKa} = \log \frac{[\text{não-ionizado}]}{[\text{ionizado}]}$$

cocaína (pKa = 8,6)

$$\text{pH} - \text{pKa} = \log \frac{[\text{NI}]}{[\text{I}]}$$

Meio pH = 9,6

$$9,6 - 8,6 = \log \frac{[\text{NI}]}{[\text{I}]}$$

$$1 = \log \frac{[\text{NI}]}{[\text{I}]}$$

$$10 = \frac{[\text{NI}]}{[\text{I}]}$$

OBS: Em meio muito alcalino, a cocaína sofre hidrólise rapidamente.

41

INFLUÊNCIA DO PH NA EXTRAÇÃO

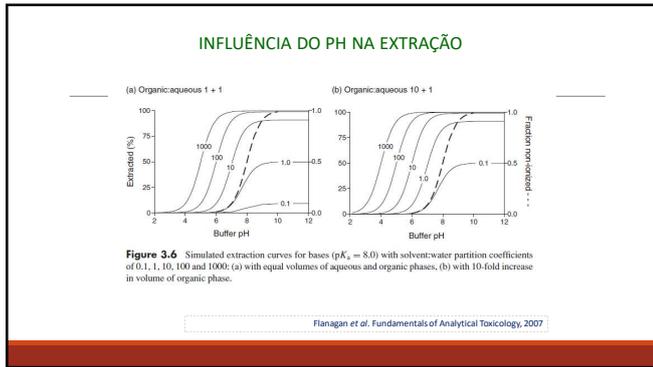
$$F = [1 + \text{Vaq} / (\text{Vorg} \cdot \text{APC})]^{-1}$$

Onde: Vaq = Volume de aquosa,
Vorg = Volume de fase orgânica
APC = coeficiente aparente de distribuição
F = fração extraída

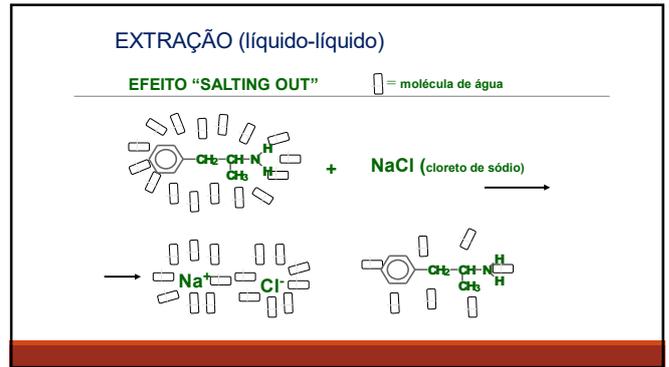
$$\text{TPC} = [1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH})}] \cdot \text{APC} \quad \text{para bases}$$

Onde: TPC = coeficiente de partição total

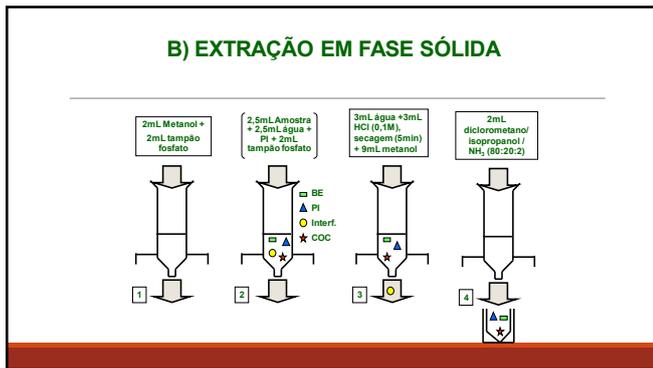
42



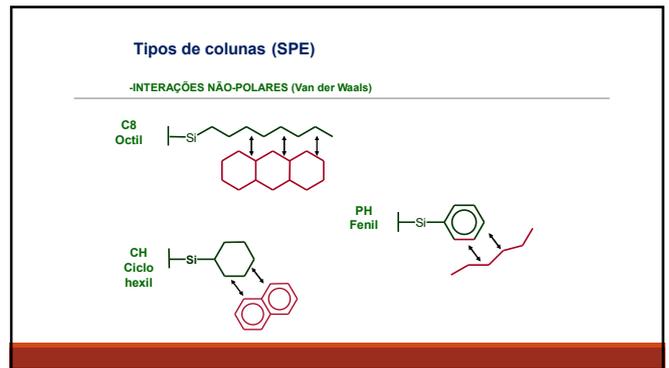
43



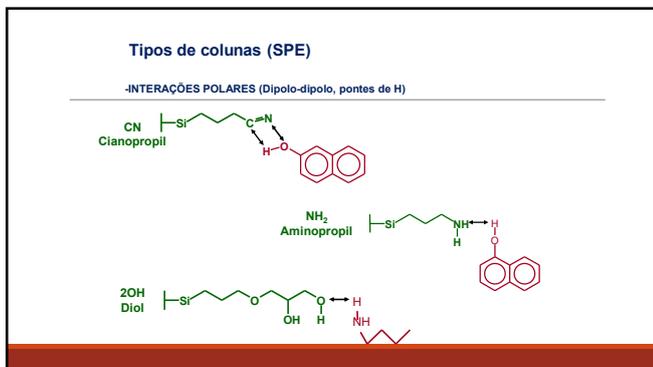
44



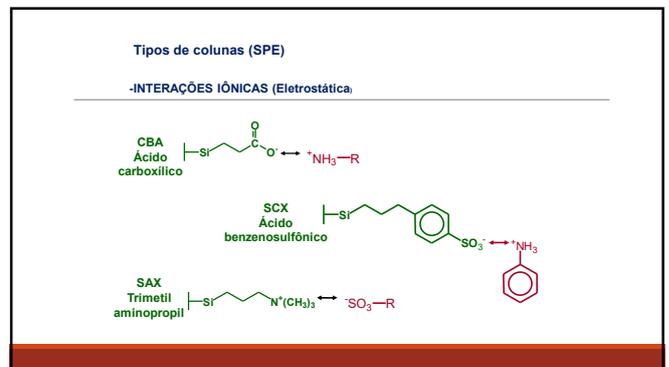
45



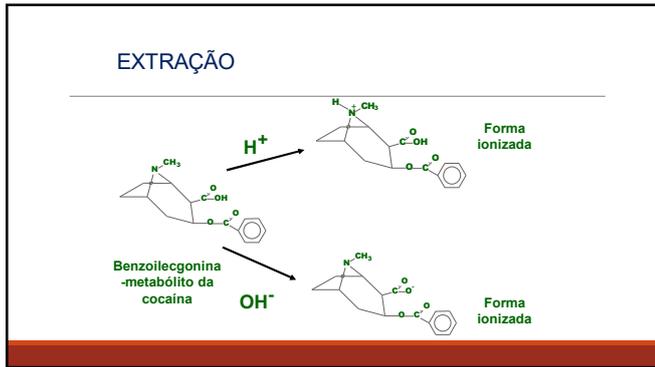
46



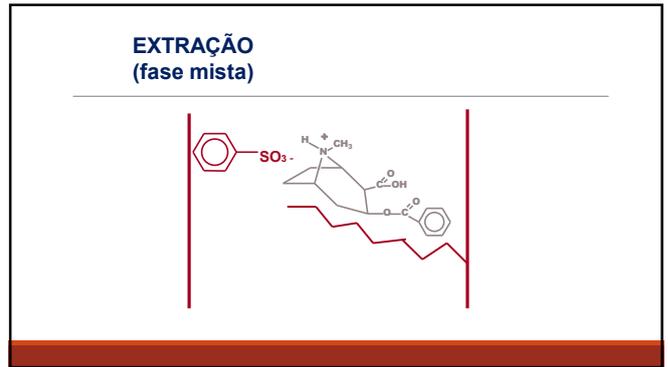
47



48



49



50

OUTRAS FASES:

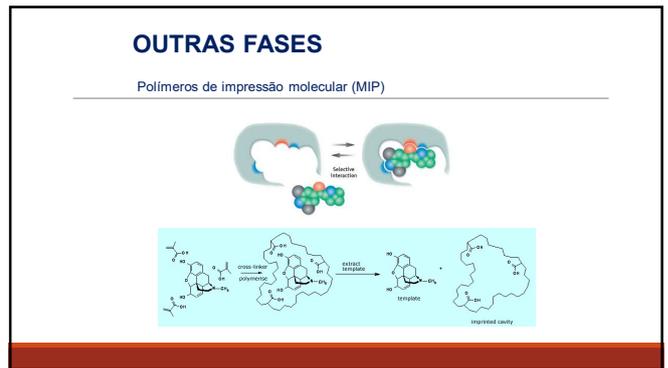
Fases poliméricas:

- Baseadas em poli-estireno-divinilbenzeno
- Seletividade superior às fases derivadas de sílica gel
- Trabalha em toda faixa de pH e solventes variados

Mais recentemente:

- Baseadas em poli-estireno-divinilbenzeno-metacrilato
- estireno-divinilbenzeno (apolar) e metacrilato (polar)
- sem necessidade de condicionamento

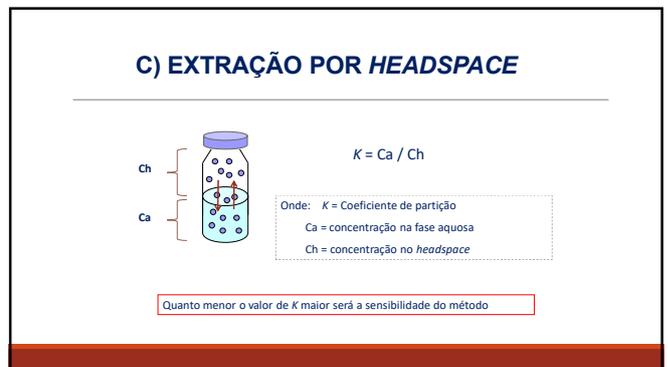
51



52



53



54

C) EXTRAÇÃO POR HEADSPACE

Coefficiente de partição (K) de alguns solventes a 40°C:

Solvente	K	Solvente	K
Cicloexano	0,077	Acetato de butila	31,4
Hexano	0,14	Acetato de etila	62,4
Tetracloroetileno	1,48	Butanona	139,5
1,1,1-Tricloroetano	1,65	Butanol	647
o-Xileno	2,44	2-Propanol	825
Tolueno	2,82	Etanol	1355
Benzeno	2,90	Dioxano	1618
Diclorometano	5,65		

55

C) EXTRAÇÃO POR HEADSPACE

O valor de K pode ser diminuído nas seguintes condições:

- Aumentando-se a temperatura

Ex. para análise de etanol, a temperatura de 80°C diminui o K de 1355 a 328. Entretanto, temperaturas de 60°C são geralmente utilizadas, para não se injetar vapor de água.

- Adicionando-se sal (efeito *salting-out*)

Cloreto de amônio, sulfato de amônio, cloreto de sódio, citrato de sódio

Geralmente a adição de sal tem pouca influência em compostos voláteis com alto valor de K.

56

C) EXTRAÇÃO POR HEADSPACE

A eficiência do *headspace* também é influenciada pela razão de fases β :

$$\beta = V_h / V_a$$

Onde: V_a = Volume da fase aquosa
 V_h = Volume do *headspace*

Quanto menor o valor de β maior será a sensibilidade do método

Geralmente o V_h deve ser, no mínimo, 50% do volume da amostra.

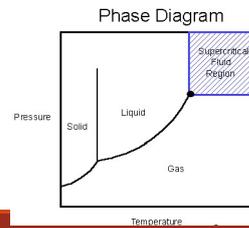
$$C_h = C_o / K + \beta$$

Onde: C_h = Concentração no *headspace*
 C_o = Concentração original da amostra

57

D) EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

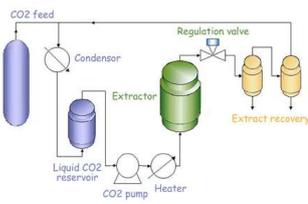
Um fluido supercrítico é uma substância que é mantida acima de sua temperatura e pressão críticas, onde ela exibe propriedades físico-químicas intermediárias entre um líquido e um gás.



58

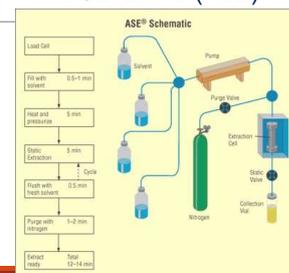
D) EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

CO₂ supercrítico
-não poluente, baixa toxicidade, baixo custo



59

E) EXTRAÇÃO ACELERADA POR SOLVENTE (ASE)



60

E) EXTRAÇÃO ACELERADA POR SOLVENTE (ASE)

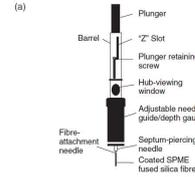
Características da ASE:

- Flexibilidade (possibilidade de alterar solventes, proporções de solventes, temperatura e pressão para otimizar o processo de extração),
- Promissor para amostras em estado sólido ou semi-sólido (análise de tecidos em Toxicologia Forense)
- Não há atualmente sistemas de interface com cromatografias.

61

G) MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

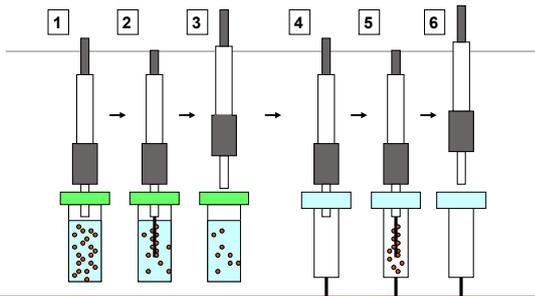
-Baseado na partição do analito entre a fibra de extração e a matriz (amostra)



Flanagan et al. Fundamentals of Analytical Toxicology, 2007

62

G) MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)



63

MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

-Fibras comercialmente disponíveis:

Fase estacionária e espessura do filme	Abreviação	Aplicação geral
Polidimetilsiloxano (100um)	PDMS	Compostos não-polares, voláteis
Polidimetilsiloxano (30um)	PDMS	Não-polares, voláteis e semi-voláteis
Polidimetilsiloxano (7um)	PDMS	Não-polares, semi e não voláteis
Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (65um)	PDMS-DVB	Polar
Poliacrilato (85um)	PA	Polar, uso geral, voláteis
Carboxeno-polidimetilsiloxano (75um, 85um)	CAR-PDMS	Voláteis
Carbowax-divinilbenzeno (65um, 75um)	CW-DVB	Polar, voláteis

64

MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

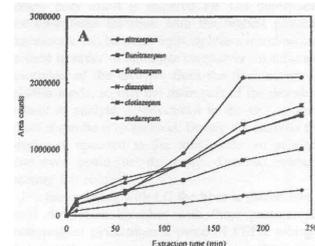
Fatores que afetam a eficácia de extração por SPME:

- Dimensões da fibra (comprimento, espessura);
- Tipo de fibra;
- Temperatura de extração;
- Efeito da matriz (presença de sal, pH);
- Velocidade de agitação;
- Tempo de extração.

65

MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

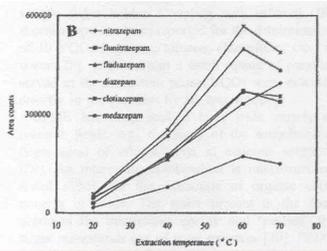
-Influência do tempo de extração:



66

MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

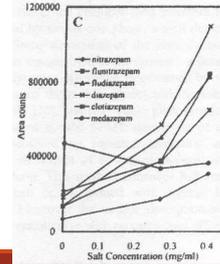
-Influência da temperatura de extração:



67

MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

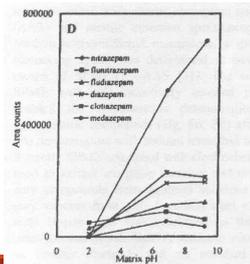
-Influência da concentração de sal:



68

MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

-Influência do pH:



69

MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

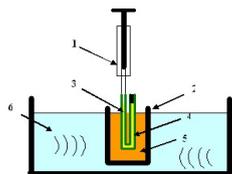
Vantagens da SPME sobre a SPE e extração líquido-líquido:

- simplicidade
- prático
- rápido
- extração sem utilização de solventes
- pode ser automatizado.

* Recuperação absoluta em torno de 1-10%.

70

E) MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA (LPME)



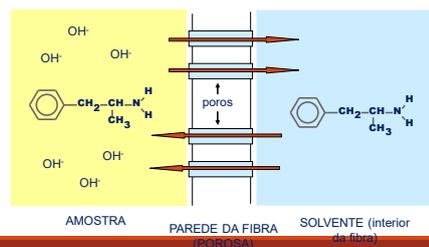
SISTEMAS DE LPME:
• BIFÁSICO
• TRIFÁSICO

Sistema de microextração em fase líquida (LPME). (1) Micro-seringa; (2) Vial de amostra; (3) Líquido aceitador; (4) fibra porosa; (5) amostra; (6) banho de ultrassom.

71

E) MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA (LPME)

SISTEMA BIFÁSICO



72

