

Aula

Preparo de amostra

Introdução aos métodos de separação – Extração em fase sólida



Prof. Jany Hellen Ferreira de Jesus



1

Referências



- ▶ Lanças, F. M. Extração em fase sólida. RiMa.
- ▶ D. Skoog, D. West, J. Holler, S. Crouch. Fundamentos de Química Analítica, Thomson, 9ed.
- ▶ Daniel C. Harris, Análise Química Quantitativa, Editora LTC, 9ed.
- ▶ G. D. Christian. Analytical chemistry. John Wiley & Sons, 7ed.

2

2

Extração em fase sólida

3

Extração líquido-líquido - ELL



Desvantagens

- ▶ Solventes orgânicos com potencial toxicidade;
- ▶ Volumes de solventes relativamente grandes → problemas com o descarte de resíduos
- ▶ Realizadas manualmente → demoradas e tediosas.

▶ **Extração em fase sólida pode contornar muitos desses problemas**

Inserida em meados da década de 1970 para eliminar os problemas da ELL

4

4

Extração em fase sólida - EFS



- ▶ Da mesma forma que a ELL, a separação dos analitos por EFS é regida pela **partição** do composto de interesse **entre duas fases**, uma **aquosa**, contendo a amostra e a outra **sólida**, que irá reter os analitos.



Traz uma série de vantagens sobre a ELL: é **rápida**; **não consome** grandes quantidades de **solventes orgânicos**; a etapa de concentração do solvente, quando necessária, também é rápida; oferece maior **seletividade** e **precisão**, devido aos diferentes tipos de adsorventes; e gera **menos resíduo** pós extração.

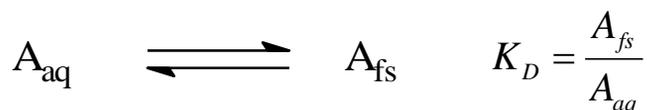
5

5



Extração em fase sólida - EFS

- Baseia-se na sorção do analito sobre a superfície de um material sólido e sua reextração com solvente apropriado para determinação do analito.
- Partição dos analitos entre a fase sólida (sorvente) e a fase líquida (a matriz):



- Fases sólidas são similares aquelas da cromatografia líquida em coluna.

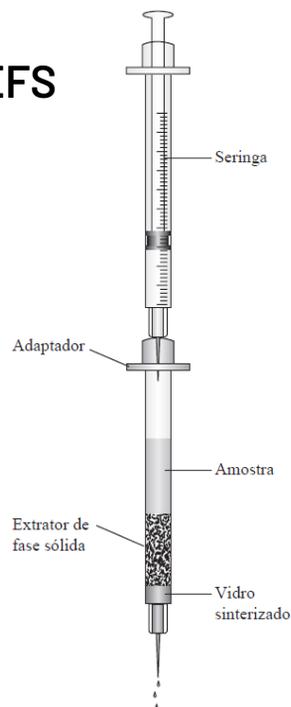
6

6



Extração em fase sólida - EFS

- Os grupos funcionais ligados à fase sólida atraem os compostos presentes na amostra por meio de interações (por exemplo, van der Waals) e os extraem da solução aquosa.
- A amostra é colocada no cartucho → os analitos são extraídas da amostra e concentradas na fase sólida → podem ser posteriormente desalojadas da fase sólida por um solvente como o metanol.



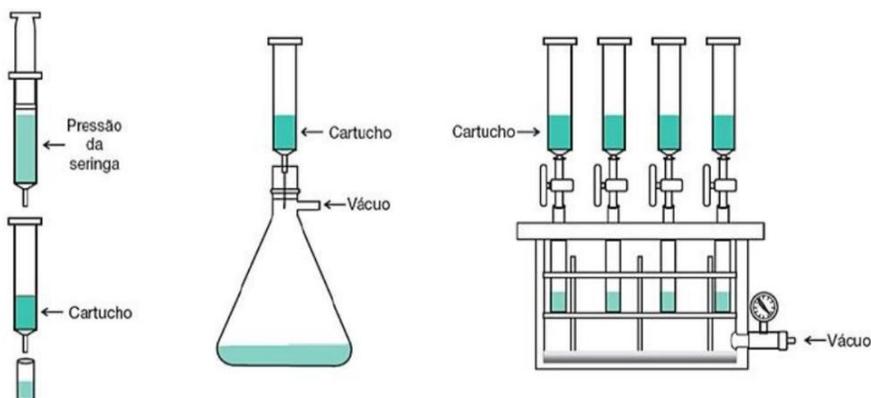
7

7

Extração em fase sólida - EFS



- A solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada com pequeno vácuo (ou pressionada com uma seringa) de forma a penetrar no cartucho. Depois de drenada toda a fase líquida, o analito retido no cartucho é eluído com pequeno volume de solvente.



8

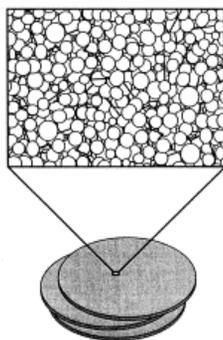
Fonte: <https://xdocz.com.br/doc/aula-3-spe-qoedjwvjkkn6>

8

Extração em fase sólida - EFS



10 μm C-18 in a matrix of Teflon or glass fiber

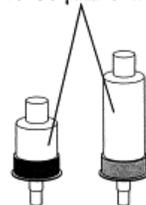


Disks

Formato mais popular - Cartucho

Seringa plástica (polipropileno) e material de empacotamento entre dois discos (*frits*)

40-80 μm C-18



Cartridges



40-80 μm C-18

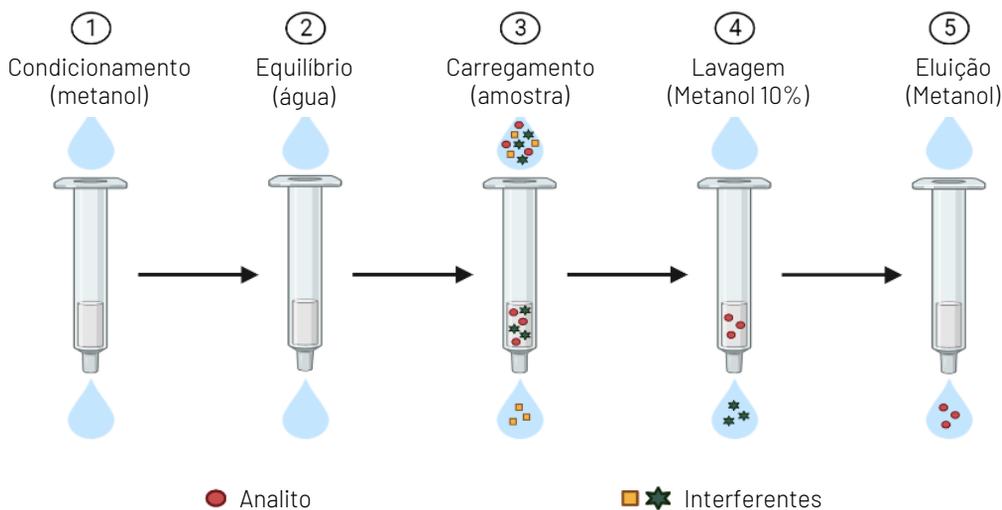
Syringe Barrels

9

Fonte: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993699001752>

9

Extração em fase sólida - EFS



10

Adaptado de https://chemistnotes.com/analytical_chemistry/solid-phase-extraction-principle-process-application/

10

Extração em fase sólida - EFS

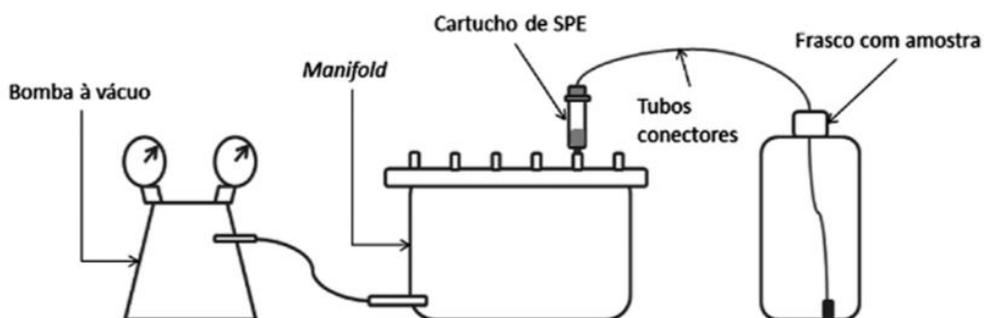


11

Fonte: https://www.youtube.com/watch?v=sKLmqU0UsE&ab_channel=SilCycleInc.

11

Extração em fase sólida - EFS

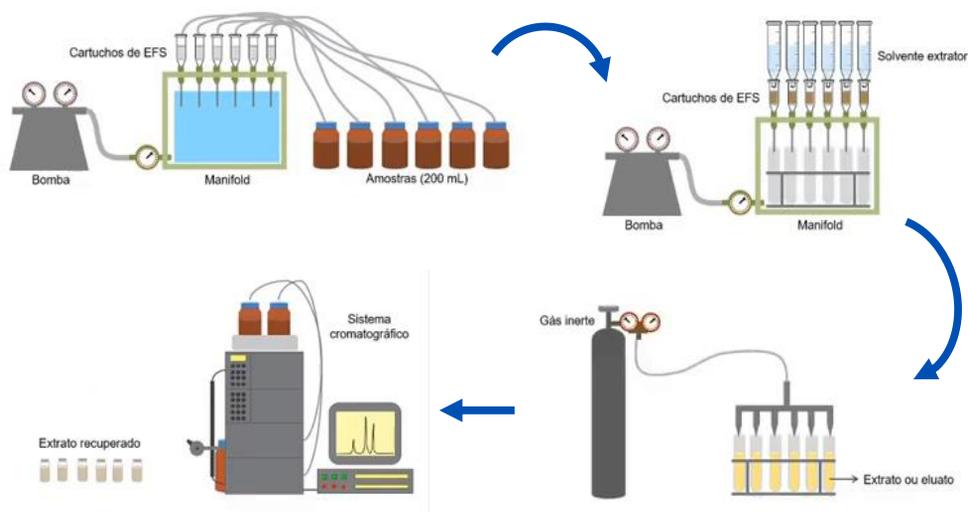


12

Fonte: A. L. Sanson, B. E. L. Baeta, K. L. T. Rodrigues e R. J. C. F. Afonso. Quim. Nova, Vol. 37, No. 1, 150-152, 2014

12

Extração em fase sólida - EFS



13

Fonte: <https://www.youtube.com/watch?v=eUoCgpYf0Ps>

13

Extração em fase sólida - Cartuchos



14

Fonte: <https://www.chromastore.com.br/cartucho-spe-preco>

14

Extração em fase sólida



15

Fonte: https://nanopdf.com/download/extraccion-en-fase-solida_pdf

15

Extração em fase sólida – Modos de operação



Concentração do analito (enriquecimento)

Isolamento do analito (*clean-up*)

Isolamento da Matriz

Estocagem da amostra

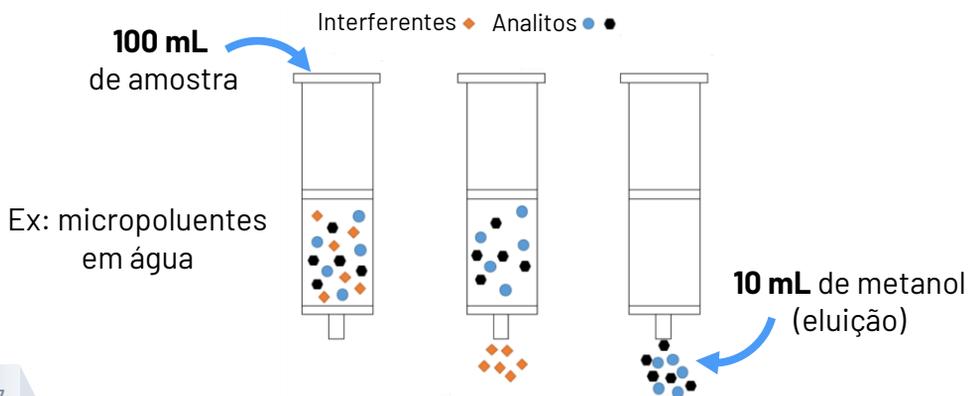
16

16

EFS – Concentração do analito/Enriquecimento



- Passar um grande volume de amostra para aprisionar o analito, deixando passar o solvente e os interferentes
- Eluir o analito com pequena quantidade de solvente (mais concentrado que na amostra original)



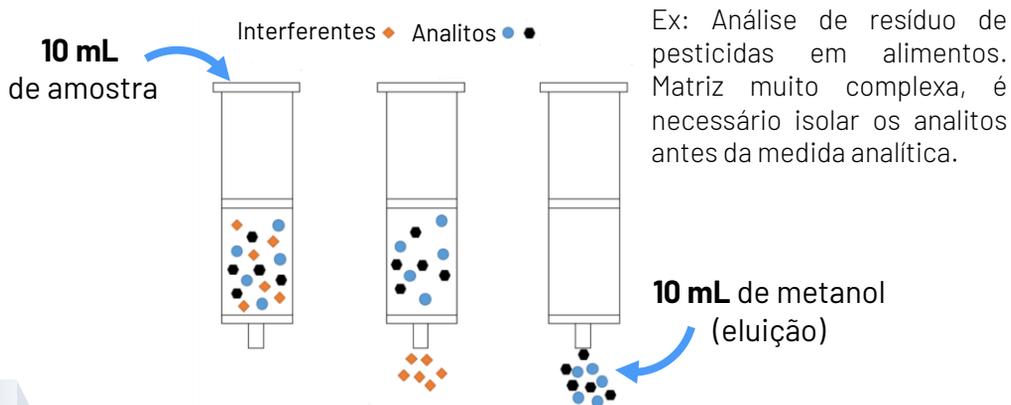
17

17

EFS – Isolamento do analito (*clean up*)



- O objetivo principal não é concentrar a amostra!!! Amostra pode já estar concentrada o suficiente, mas os constituintes da matriz poderão interferir no processo de análise.



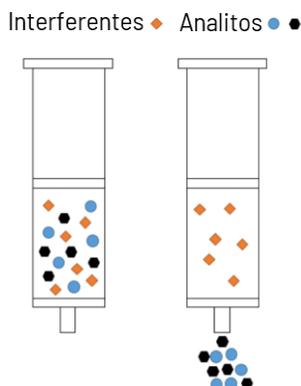
18

18

EFS – Isolamento da matriz



- Reter na fase sólida os interferentes da matriz em vez do analito de interesse – o qual passa direto com o solvente da amostra.
- O analito é coletado em um frasco para análise e os interferentes ficam retidos no cartucho (*clean up*).



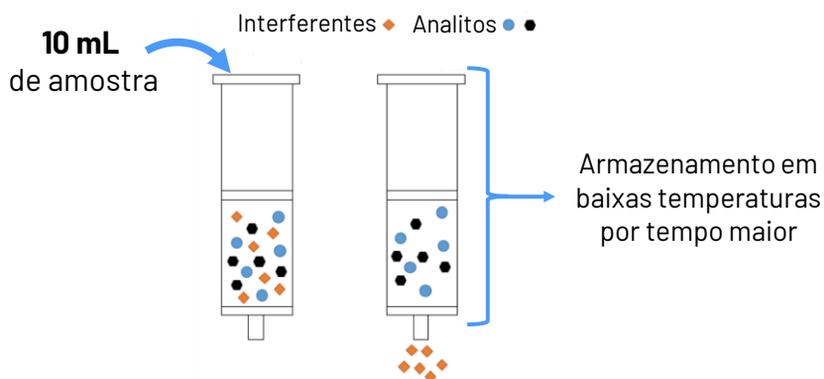
19

19

EFS – Estocagem da amostra



- Análise de amostras que se encontram em local distante do laboratório analítico (ex. água de rio, mar... localizados a longas distâncias)
- Após passar a amostra através do cartucho e reter os analitos, o cartucho é armazenado e transportado até o laboratório onde serão feitas as análises.



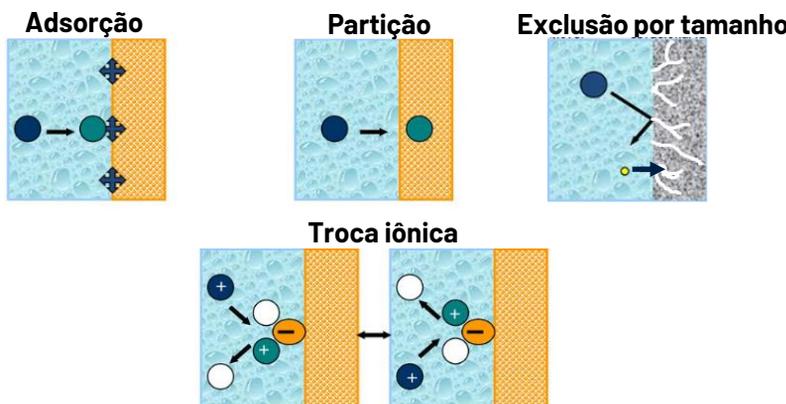
20

20

Extração em fase sólida – Fases sólidas



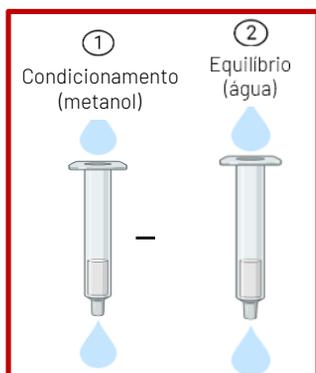
- ▶ Classificada como não polar, polar ou trocador de íons;
- ▶ Escolha da fase sólida depende da natureza do analito de interesse e da matriz.
- ▶ Mecanismos similares aos de cromatografia líquida em coluna.



21

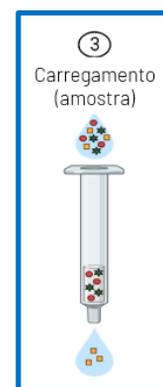
21

Extração em fase sólida – Etapas



- ▶ Ativar o material dentro do cartucho e remover possíveis interferentes presentes.
- ▶ Lavar a fase estacionária.

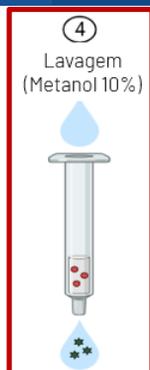
- ▶ É feita geralmente com auxílio de uma pipeta ou seringa e deve ser quantitativa. Velocidade <math><2\text{mL}/\text{min}</math>. Deve ser lenta



22

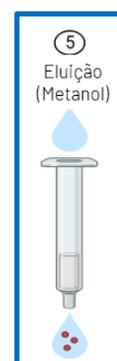
22

Extração em fase sólida - Etapas



Eliminar interferentes com um solvente que não possua força suficiente para arrancar o analito. Geralmente é uma solução com pouco solvente orgânico, menor concentração salina ou num pH em que somente os interferentes sejam removidos.

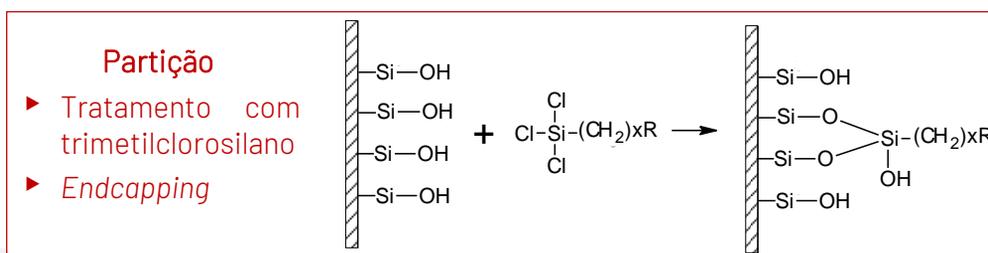
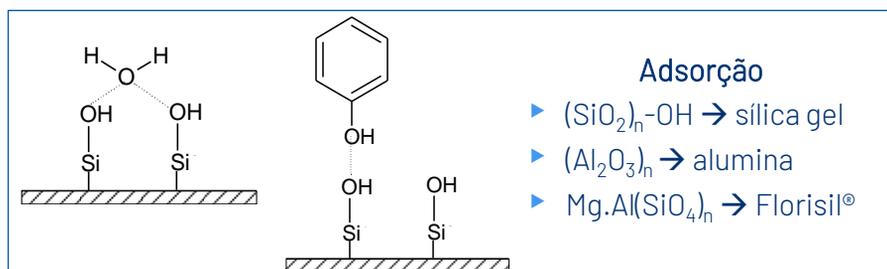
- ▶ Dever ter força de eluição maior que o utilizado na etapa anterior. Geralmente é uma solução com muito solvente orgânico, maior concentração salina ou num pH em que somente os analitos sejam removidos. Ideal é eluir com pouco solvente e já apropriado para análise posterior.



23

23

Extração em fase sólida - Mecanismos



24

24

Extração em fase sólida – Fases sólidas



Adsorventes para Extração em Fase-Sólida de amostras líquidas.

Adsorvente	Estrutura da superfície	Propriedades e usos
Sílica	$\begin{array}{c} \text{—O—Si—O—Si—O—} \\ \quad \\ \text{HO} \quad \text{OH} \end{array}$	Retém espécies de polaridade baixa a moderada de matrizes orgânicas. Vitaminas lipossolúveis e esteróides.
Alumina	$\begin{array}{c} \text{—O—Al—O—Al—O—} \\ \quad \\ \text{HO} \quad \text{OH} \end{array}$	Retém espécies hidrofílicas de matrizes orgânicas.
Cianopropil	$\text{—C}_3\text{H}_6\text{CN}$	Pesticidas e peptídeos hidrofóbicos.
Diol	$\begin{array}{c} \text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	Proteínas, peptídeos e fungicidas.
Octadecil (C-18)	$\text{—C}_{18}\text{H}_{37}$	Retém espécies hidrofóbicas de matrizes aquosas. Cafeína, sedativos, HPA, pesticidas.
Octil (C-8)	$\text{—C}_8\text{H}_{17}$	Similar ao C-18.
Estireno divinilbenzeno		Espécies orgânicas de matrizes aquosas.

25

Fonte: <https://www2.ufjf.br/quimica/files/2016/08/M%c3%a9todos-cl%c3%a1ssicos-de-separa%c3%a7%c3%a3o-REVISADO-2016.pdf>

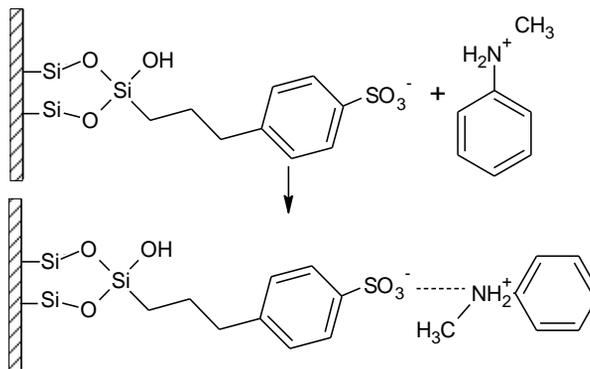
25

Extração em fase sólida – Mecanismos



Troca iônica

- ▶ Trocador de cátions do tipo $[\text{SO}_3^-]$ aprisionado à sílica.
- ▶ Trocador de ânions do tipo $[\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$ aprisionado à sílica.
- ▶ Interação de cargas opostas



26

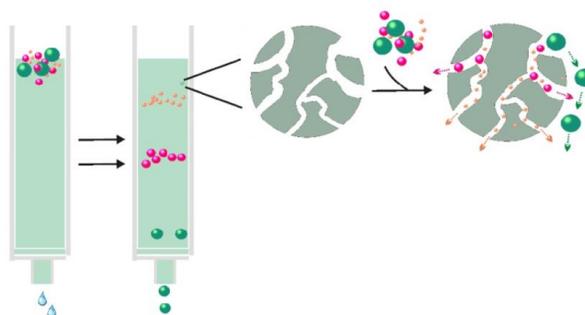
26

Extração em fase sólida - Mecanismos



Exclusão molecular

- ▶ Mecanismo físico de separação
- ▶ Polímero → Sephadex® (unidades de glicose e epícloridrina), tamanho de poro bem controlado: permite entrada de pequenas moléculas (analito) e exclui os maiores, indesejáveis (ex. proteínas)



27

27

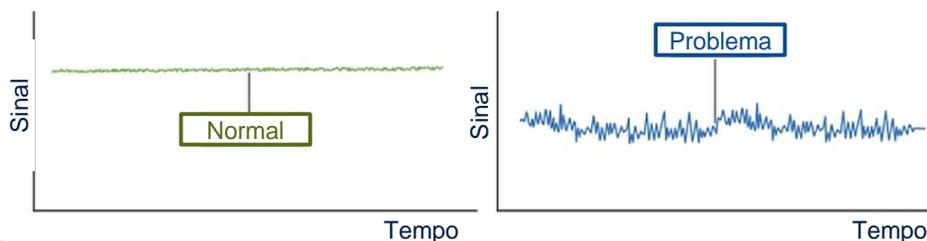
EFS – Desenvolvimento do método



- ▶ **Isolar** um ou mais analitos em uma **matriz complexa** para posterior **análise** (método instrumental).

Ex: Evitar uso de solventes que absorvem em determinado comprimento de onda se uma técnica espectrofotométrica for posteriormente utilizada.

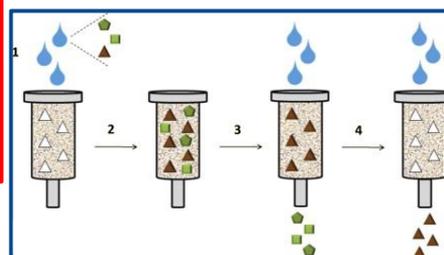
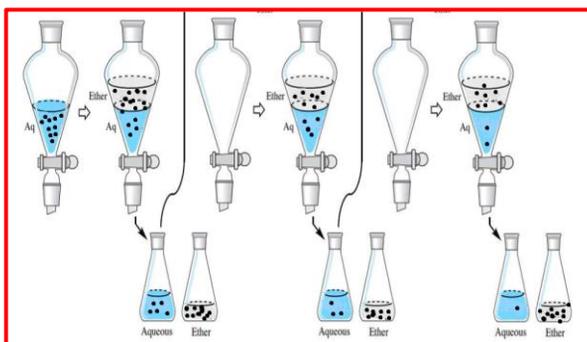
Ex: Solventes orgânicos clorados devem ser evitados se o método for cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons.



28

28

LLE versus SPE



31

31

Extração em fase sólida - Aplicações



Article

J. Br. Chem. Soc., Vol. 18, No. 5, 1004-1010, 2007.
 Printed in Brazil - ©2007 Sociedade Brasileira de Química
 1010 - 8253 SciELO Online

Solid-Phase Extraction of Nitro-PAH from Aquatic Samples and its Separation by
 Reverse-Phase Capillary Liquid Chromatography

Marcelo Toledo, Fernando M. Lanças and Emanuel Carrilho*

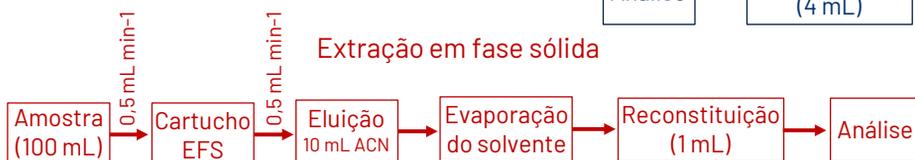
Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo,
 Av. Trabalhador São-Carlense, 400, CP 780, 13560-970 São Carlos-SP, Brazil



Extração Líquido-Líquido



Extração em fase sólida



32

32

Extração em fase sólida - Aplicações



*J. Braz. Chem. Soc., Vol. 18, No. 5, 1004-1010, 2007.
Printed in Brazil - ©2007 Sociedade Brasileira de Química
0031-3073/07 \$0.00+0.00*

Article

Solid-Phase Extraction of Nitro-PAH from Aquatic Samples and its Separation by Reverse-Phase Capillary Liquid Chromatography

*Marcelo Toledo, Fernando M. Lanças and Emanuel Carrilho**

*Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo,
Av. Trabalhador São-Carlotense, 400, CP 730, 13560-970 São Carlos-SP, Brazil*

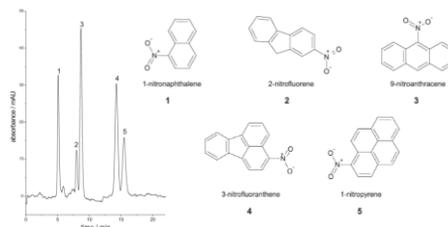


Table 1. Comparison of recovery of analytes from five different protocols for extraction of nitro-PAH from water samples and determination by μ LC-UV

Compound	Recovery (RSD) / (%)					
	LLE MC	XAD-2 ACN	XAD-2 MC	C ₁₈ ACN	C ₁₈ MC	C ₁₈ MC
1-nitronaphthalene (1)	48.7 (10.4)	24.6 (13.2)	30.6 (14.6)	81.8 (1.9)	76.5 (2.0)	76.5 (2.0)
2-nitrofluorene (2)	83.5 (3.3)	59.2 (12.0)	71.4 (14.4)	48.4 (2.0)	87.1 (2.0)	87.1 (2.0)
9-nitroanthracene (3)	84.8 (3.2)	45.7 (11.0)	69.3 (14.7)	25.5 (1.5)	94.2 (3.8)	94.2 (3.8)
3-nitrofluoranthene (4)	75.8 (1.5)	40.9 (12.8)	81.8 (1.8)	36.1 (1.6)	97.2 (2.0)	97.2 (2.0)
1-nitropyrene (5)	78.8 (1.1)	21.8 (13.2)	59.5 (9.9)	28.6 (1.2)	80.1 (3.8)	80.1 (3.8)
Average	74.3 (3.9)	38.4 (12.4)	62.5 (11.1)	44.1 (8.2)	87.0 (2.7)	87.0 (2.7)

MC: methylene chloride; ACN: acetonitrile.

33

33

Extração em fase sólida - Aplicações



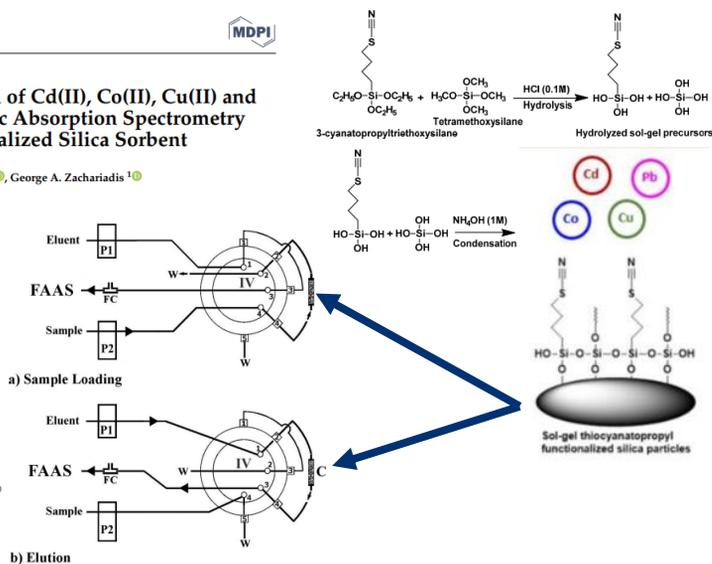
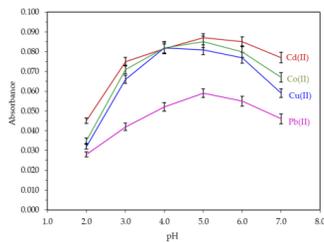
separations

MDPI

Article

Automated Solid Phase Extraction of Cd(II), Co(II), Cu(II) and Pb(II) Coupled with Flame Atomic Absorption Spectrometry Utilizing a New Sol-Gel Functionalized Silica Sorbent

Natalia Manousi¹, Abuzar Kabir², Kenneth G. Furton², George A. Zachariadis¹ and Aristidis Anthemidis^{1,*}



34

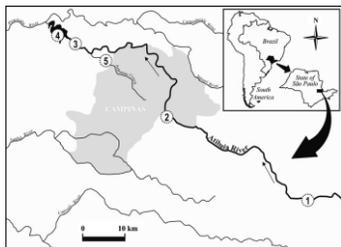
34

Extração em fase sólida - Aplicações



Determination of Antibiotics in Brazilian Surface Waters Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry

Marco Antonio F. Locatelli · Fernando F. Sodré · Wilson F. Jardim



Cartuchos de troca aniônica contendo 500 mg de Strata SAX (Phenomenex, Torrance, CA) foram usados para remover substâncias húmicas, e um **Oasis HLB** polimérico de 500 mg (Waters, Milford, CT) foi usado para reter os compostos alvo.

Condicionamento: 6mL de metanol, 6mL de água ultrapura e 6mL de solução de HCl em pH 2,4
Carregamento das amostras: 5 mL min⁻¹

Cartucho SAX removido e o cartucho HLB foi lavado com 6mL de água deionizada.

Eluição: 6mL de metanol. O solvente foi evaporado até a secura com um fluxo suave de N₂, e os compostos alvo foram ressuspensos até um volume final de 1,0mL em uma solução de água (ácido fórmico a 0,1%):metanol de 90:10 (v/v).

35

35

Extração em fase sólida - Aplicações

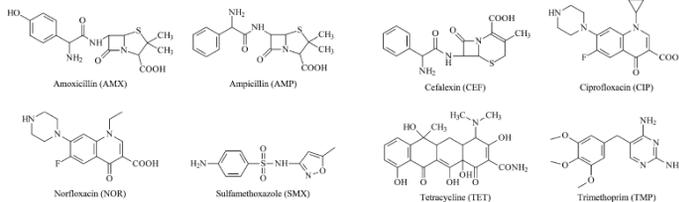


Table 3 Antibiotic concentrations (ng L⁻¹) in Atibaia River and Anhumas Creek by season

Sampling point	AMP	AMX	CEF	CIP	NOR	SMX	TET	TMP
Rainy season								
P1	<0.45	ND	4.6	<0.41	<0.41	ND	<2.5	5.3
P2	<0.45	<0.46	ND	ND	ND	ND	<2.5	ND
P3	<0.45	<0.46	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P4	ND	5.4	<0.64	<0.41	1.5	<0.78	11	2.3
P5	ND	1,284	133	<0.41	ND	ND	ND	<0.56
Dry season								
P1	<0.45	8.9	26	0.6	0.5	1.8	ND	3.5
P2	<0.45	17	29	2.5	2.2	1.4	ND	6.9
P3	<0.45	4.0	28	1.1	0.7	1.1	ND	6.3
P4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P5	ND	ND	2,422	119	51	106	ND	484

ND not detected, NA not analyzed

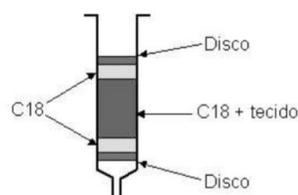
36

36

MSPD - Dispersão em Matrizes Sólidas



- ▶ **Dispersão em Matriz Sólida ("Matrix Solid-Phase Dispersion")** → suporte sólido, geralmente contendo uma fase quimicamente ligada (ex: C-18), atuando como um abrasivo para produzir uma **ruptura na arquitetura da amostra**, facilitando o processo de **extração**.
- ▶ Modificação da SPE para aceitar amostras sólidas e semissólidas (ex. biológicas)
- ▶ 1989 por Barker e colaboradores com o intuito de isolar resíduos de drogas em tecidos.
- ▶ Homogeneização da amostra de tecido com C-18, transferência para o cartucho, e eluição como em SPE.



37

F. M. Lanças. Avanços Recentes e Tendências Futuras das Técnicas de Separação: uma visão pessoal. *Scientia Chromatographica*, 2008.

37

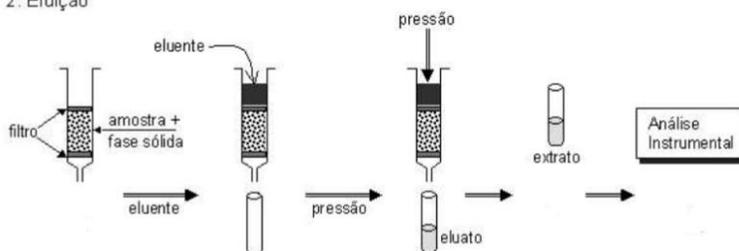
MSPD - Dispersão em Matrizes Sólidas



1. Homogeneização: amostra - fase sólida



2. Eluição



38

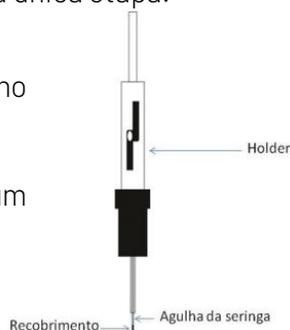
F. M. Lanças. Avanços Recentes e Tendências Futuras das Técnicas de Separação: uma visão pessoal. *Scientia Chromatographica*, 2008.

38

Microextração em Fase Sólida (SPME)



- ▶ Uma das principais microtécnicas utilizadas no preparo de amostra para análise de resíduos e contaminantes em alimentos (SPME - "solid-phase microextraction").
- ▶ Dispensa o uso de solvente de extração e permite a realização de amostragem, isolamento e concentração em uma única etapa.
- ▶ Fibra (sílica fundida) recoberta com um filme fino de polímero, ou sólido adsorvente → extrair
- ▶ Analitos são desorvidos para dentro de um instrumento analítico.



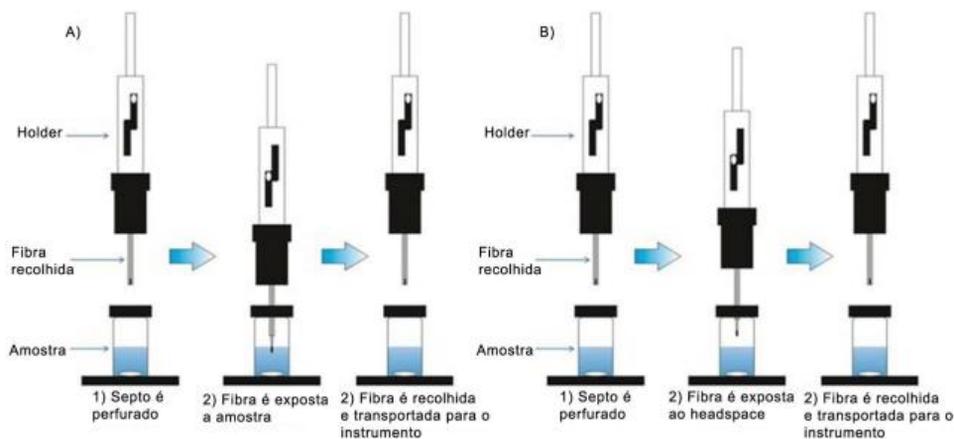
39

39

Microextração em Fase Sólida (SPME)



- ▶ Dois diferentes modos de extração: (A) imersão direta e (B) "headspace"



40

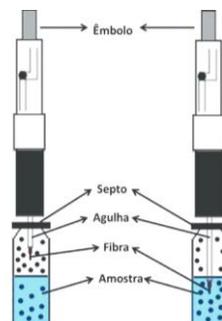
40

Microextração em Fase Sólida (SPME)



"headspace": Volatilidade média e alta

- Os analitos devem ser transportados através de barreiras de ar antes de atingirem o recobrimento da fibra.
- Protege a fibra de possíveis danos causados por interferentes de elevada massa molar ou baixa volatilidade (materiais húmicos), proteínas, etc.
- Permite modificação da matriz sem danos na fibra (pH).



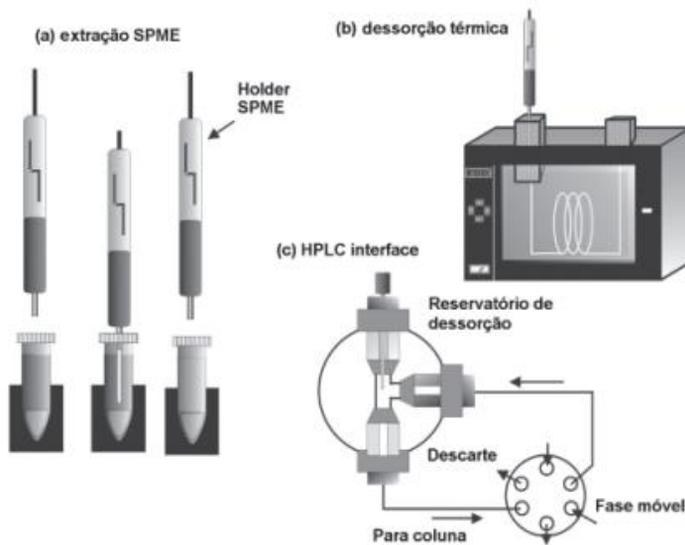
Imersão direta: Volatilidade média e baixa

- A agitação mecânica é utilizada pra acelerar este processo.
- Amostras gasosas: a convecção natural do ar é suficiente para estabelecer o equilíbrio.
- Amostras aquosas: técnicas mais eficientes de agitação mecânica ou sonicação

41

41

Microextração em Fase Sólida (SPME)



42

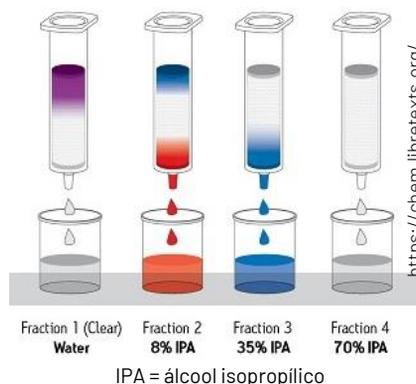
Fonte: M. E. C. Queiroz e F. M. Lanças. Quim. Nova, Vol. 28, No. 5, 880-886, 2005

42

Exercícios



1. Quais são as principais diferenças entre a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida?
2. A Figura mostra um procedimento SPE. Neste exemplo, um solvente polar é passado através de um material adsorvente menos polar (fase reversa). Para este exemplo, digamos que estamos interessados em determinar a quantidade de corante vermelho e azul na amostra. Em termos de polaridade, quais espécies são retidas no adsorvente e quais espécies são eluídas com a água? Em termos de polaridade, que tipo de espécie será eluída nas demais frações (2, 3 e 4)?



43

43

Próxima aula



- ▶ Fundamentos da cromatografia

44

44