

## EXTRAÇÃO SORTIVA EM BARRA DE AGITAÇÃO PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS

Andréa Rodrigues Chaves e Maria Eugênia Costa Queiroz\*

Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-9001, Ribeirão Preto - SP, Brasil

Recebido em 3/8/07; aceito em 17/12/07; publicado na web em 4/9/08

STIR-BAR SORPTIVE EXTRACTION FOR DRUGS ANALYSIS IN BIOLOGICAL FLUIDS. A novel solventless sample preparation, stir-bar sorptive extraction (SBSE), for extraction, and sample enrichment of organic compounds from biological fluids, is described in this manuscript from principle to applications. The SBSE is based on sorptive extraction, whereby the compounds are extracted into a polymer coating, polydimethylsiloxane (PDMS), on a magnetic stirring rod. The extraction is controlled by the partitioning coefficient of drugs between the PDMS and sample matrix, and upon the sample-extraction medium phase ratio. The SBSE technique has been applied successfully, with high sensitivities, to biomedical analysis of volatiles and for semi-volatiles drugs from biological sample, including urine, plasma, and saliva. SBSE combined with in situ derivatization, drugs quite more polar (e.g. metabolites) also can be analyzed.

Keywords: stir-bar sorptive extraction (SBSE); drugs; biological fluids.

## INTRODUÇÃO

Em razão da complexidade dos fluidos biológicos e da baixa concentração dos fármacos nestas matrizes, a etapa de preparo de amostra - extração, pré-concentração dos analitos e eliminação dos interferentes - tem sido requerida no desenvolvimento de métodos cromatográficos com alta sensibilidade e seletividade analítica.

Os métodos convencionais, empregados no preparo de amostras biológicas, para análises cromatográficas, têm sido a extração líquido-líquido e extração em fase sólida.<sup>1-6</sup>

A miniaturização dos sistemas analíticos tem sido uma convergência predominante na área de química analítica. A micro-extração em fase sólida (SPME – *solid-phase micro-extraction*), *in-tube* SPME e a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) são exemplos típicos de técnicas de preparo de amostra miniaturizadas. Estas técnicas, quando hifenadas a sistemas analíticos de detecção, têm resultado em análises rápidas, baixo consumo de solvente, menor exposição dos analistas aos fluidos biológicos e aos solventes tóxicos, assim como maior precisão analítica e automação das análises.<sup>7</sup>

A microextração em fase sólida apresenta uma série de vantagens em relação aos métodos de preparo de amostras convencionais, ou seja: não requer instrumentação analítica sofisticada, não utiliza solvente orgânico, rápido processo operacional, permite automação das análises, a reutilização das fibras extratoras e integra em um único sistema, a extração, concentração e introdução da amostra no sistema cromatográfico.<sup>8,9</sup> Porém, em razão do pequeno volume das fases extratoras e limitado número de fibras SPME, seletivas para análises de fármacos, os métodos analíticos padronizados têm apresentado baixa recuperação analítica, tornando necessária a utilização de sistemas de detecção de alta sensibilidade.

Em 1999, Baltussen e colaboradores<sup>10</sup> apresentaram a técnica extração sortiva em barra de agitação, utilizando uma barra de agitação magnética revestida com polidimetilsiloxano (PDMS), a fase extratora.

Os volumes de PDMS utilizados nos revestimentos das barras SBSE, 24 a 126  $\mu\text{L}$ , têm sido maiores quando comparados aos utilizados em SPME, 0,5  $\mu\text{L}$  para o filme de maior espessura, 100  $\mu\text{m}$ <sup>11</sup>. Conseqüentemente, a sensibilidade analítica tem aumentado de 50 a 250 vezes, reduzindo os limites de quantificação a níveis de sub-ng  $\text{mL}^{-1}$ .

## EXTRAÇÃO SORTIVA EM BARRA DE AGITAÇÃO

O princípio da técnica SBSE baseia-se no equilíbrio de partição (absorção) dos analitos entre a fase extratora e amostra, assim como na extração líquido-líquido. No entanto, a técnica SBSE não gera resíduos de solventes orgânicos e não ocorre perda do analito durante o processo de extração. Em contraste ao processo de adsorção, onde os analitos interagem com os sítios ativos presentes na superfície da fase extratora, na extração absorptiva os analitos solubilizam na fase sorvente. Conseqüentemente, o volume e a área superficial da fase extratora irão influenciar nas taxas de recuperação da técnica SBSE.<sup>7,12,13</sup>

As fases sortivas são materiais poliméricos, homogêneos, não porosos, os quais têm sido desenvolvidos em temperaturas acima do seu ponto de transição vítrea. Nesta faixa de temperatura, o PDMS adquire aspecto de goma e propriedades dos solventes orgânicos no estado líquido.<sup>13</sup>

O polidimetilsiloxano (Figura 1), em razão de suas propriedades de difusão e estabilidade térmica em ampla faixa de temperatura tem sido muito utilizado como fase de extração sortiva, assim como fase

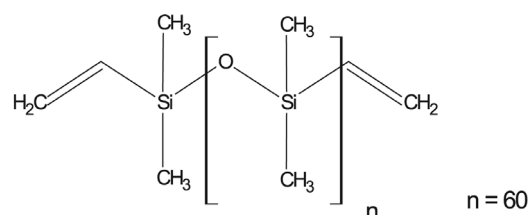


Figura 1. Estrutura do oligômero de PDMS

\*e-mail: mariaeqn@ffclrp.usp.br

estacionária em cromatografia gasosa (GC).

As vantagens do emprego da fase extratora PDMS podem ser atribuídas às taxas de extração próximas a 100%, alta estabilidade, baixa reatividade e rápida dessorção térmica em temperaturas medianas.<sup>7-13</sup>

Alguns autores correlacionam o coeficiente de partição da técnica SBSE, com o coeficiente de distribuição octanol/água ( $K_{o/w}$ ). Embora, não seja totalmente correto, o coeficiente de distribuição octanol/água de um analito específico nos dá um bom indicativo da eficiência da extração SBSE, quando utilizada a fase extratora PDMS.<sup>12-14,16</sup>

O equilíbrio de sorção é dependente da razão entre as fases, sendo diretamente dependente da quantidade de PDMS da fase extratora. Esta relação é ilustrada na Equação 1.

O coeficiente de partição do analito entre as fases PDMS e aquosa ( $K_{PDMS/w}$ ) é definido como sendo a razão entre a concentração do analito na fase de PDMS ( $C_{PDMS}$ ) e a concentração do analito em água ( $C_w$ ), no equilíbrio. Esta razão é igual ao produto entre razão das massas do soluto na fase PDMS ( $m_{PDMS}$ ) e na fase aquosa ( $m_w$ ) e  $\beta$ , onde  $\beta$  é igual à razão entre o volume da amostra e volume da fase extratora ( $\beta = V_w/V_{PDMS}$ ).<sup>12</sup>

$$K_{o/w} \approx K_{PDMS/w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \cdot \frac{V_w}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \cdot \beta \quad (1)$$

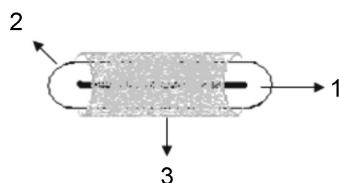
O fator de recuperação, Equação 2, é expresso através da razão entre a quantidade de analito extraído ( $m_{PDMS}$ ) e a quantidade inicial de analito em água ( $m_o = m_{PDMS} + m_w$ ) que corresponde às correlações entre  $K_{PDMS/w}$  e  $\beta$ , como ilustra a Equação 2:

$$\frac{m_{PDMS}}{m_o} = \frac{K_{PDMS/w} / \beta}{1 + (K_{PDMS/w} / \beta)} \quad (2)$$

Segundo a Equação 2, quanto maior a quantidade de PDMS, menor o  $\beta$ , maior será a eficiência de extração. Uma vez que o valor de  $K_{PDMS}$  é correlacionado ao valor de  $K_{o/w}$ , a eficiência da extração em PDMS em geral diminui com o aumento da polaridade do analito.

Para as análises SPME baixas taxas de recuperação analítica, 4,8%, têm sido obtidas para analitos com  $\log K_{o/w} = 3$  em 10 mL de amostra aquosa, utilizando a fibra PDMS (100  $\mu$ m, 0,5  $\mu$ L), pois o valor de  $\beta$  é da ordem de 20000. Já para SBSE, as taxas de recuperação são próximas a 100%, para o mesmo analito, no mesmo volume de amostra, utilizando uma barra sortiva com 0,5 mm de fase extratora, o volume de PDMS é de 25  $\mu$ L e  $\beta$  será igual a 417.<sup>7,12</sup>

As barras de agitação magnéticas revestidas com PDMS Twister têm sido adquiridas no comércio, fabricadas por Gerstel GmbH (Mülheim na der Ruhr, Alemanha). Estas barras apresentam três partes essenciais (Figura 2). A primeira e mais interna é uma haste de aço inox de agitação magnética, a qual é necessária para o movimento rotacional da amostra líquida. A segunda parte é uma capa de vidro que recobre a haste de agitação. A terceira e mais externa das partes,



**Figura 2.** Ilustração da barra de agitação magnética com o revestimento de PDMS: 1 - haste de aço inox, 2 - revestimento de vidro e 3 - fase extratora de PDMS

a camada de PDMS, é onde ocorre a extração dos analitos. Esta camada de vidro previne a decomposição da fase polimérica (PDMS), em contato direto com a haste metálica.<sup>7</sup>

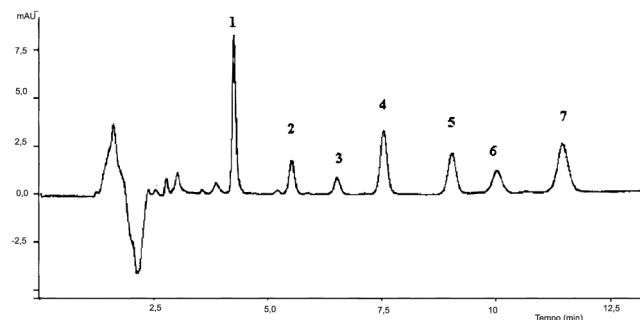
Recentemente, outras fases extratoras SBSE têm sido desenvolvidas. Liu e colaboradores<sup>17</sup> utilizaram tecnologia sol-gel para o desenvolvimento de um revestimento misto de PDMS e poli(metil-hidrossiloxano) (PMHS). Esta fase extratora foi avaliada para análise de hidrocarbonetos aromáticos em amostras de água. O método padronizado apresentou limites de quantificação de 0,18-20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

Com o objetivo de aumentar a seletividade da técnica SBSE, Lambert e colaboradores<sup>15</sup> desenvolveram uma fase extratora empregando como recobrimento alquil-di-ol-sílica (ADS), obtendo bons resultados para extração no modo direto em fluidos biológicos (plasma e urina). Neste trabalho, os autores analisaram cafeína e seus metabólitos em fluidos biológicos, empregando a dessorção líquida e análises por LC-UV, obtendo recuperações de até 102%. As barras desenvolvidas por Lambert e colaboradores<sup>10</sup> puderam ser diretamente inseridas em fluidos biológicos sem que ocorresse adsorção irreversível de compostos endógenos, como as proteínas, junto à fase extratora. A barra desenvolvida foi utilizada mais de 50 vezes, sem perda da eficiência de extração.

A técnica conhecida como polímeros molecularmente impressos consiste na produção de moléculas com sítios específicos, os quais mimetizam o comportamento de sorção nos sítios dos receptores naturais. Xiaolan e colaboradores<sup>18</sup> desenvolveram uma fase molecularmente impressa para SBSE, utilizando nylon-6 para análise de organofosforados em solventes orgânicos.

Bicchi e colaboradores<sup>19</sup> desenvolveram uma fase extratora mista para SBSE composta de material adsorvente e sorvente. Neste trabalho, os autores empregam um tubo de PDMS empacotado com carbono ativado, cujas extremidades foram fechadas com material magnético para promover a agitação. A barra foi empregada nas análises de café, folhas de sálvia, uísque e atrazina, com coeficiente de variação inferior a 16,9% e taxas de recuperação próximas a 80%, superiores aos valores encontrados com as barras SBSE comerciais.

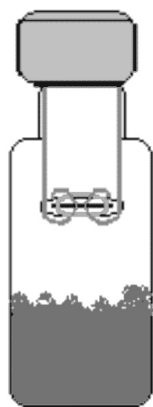
Queiroz e Lanças recentemente desenvolveram um revestimento SBSE misto de PDMS (adsorção) e poli(pirrol) (PPY, adsorção) para análises de antidepressivos não tricíclicos em amostras de plasma, para fins de monitorização terapêutica<sup>20</sup> (Figura 3). O método padronizado e validado de extração sortiva em barra de extração PDMS/PPY e análises por cromatografia líquida SBSE/LC-UV apresentou limites de quantificação de 20 a 30  $\text{ng mL}^{-1}$ , taxas de recuperação de 50 a 90% e coeficiente de variação inferiores a 15%.



**Figura 3.** Cromatograma referente à análise SBSE/LC com o revestimento PDMS/poli(pirrol) em amostra de plasma enriquecido com os antidepressivos na concentração de 300  $\text{ng mL}^{-1}$ : 1 - mirtazapina, 2 - citalopram, 3 - paroxetina, 4 - duloxetine, 5 - fluoxetine, 6 - sertralina e 7 - clomipramina (padrão interno)

## Procedimento SBSE

Nas extrações SBSE, a barra de agitação magnética revestida com PDMS tem sido inserida diretamente na amostra ou no *headspace* (Figura 4) e agitada até atingir o equilíbrio de partição dos analitos entre a amostra e fase extratora. O frasco extrator (com tampa rosca e septo) tem sido colocado sobre o agitador magnético e a amostra agitada cerca de 30 a 240 min. Após o processo de extração, a barra de PDMS é retirada do frasco, com o auxílio de uma pinça ou de uma haste de aço inox, enxaguada levemente com água milli-Q e cuidadosamente seca com um lenço de papel macio para remoção de possíveis moléculas de água, açúcares, proteínas ou outros componentes da amostra.



**Figura 4.** Ilustração do processo de extração SBSE em fase gasosa (*headspace*)

Após sorção dos analitos na fase extratora, estes têm sido termicamente desorvidos no injetor de um cromatógrafo a gás, resultando em uma técnica simples e de alta sensibilidade para análise de analitos voláteis e semi-voláteis.

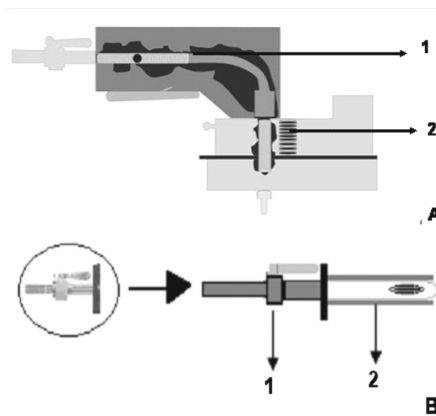
Para as análises SBSE/LC de compostos termolábeis ou de alta massa molar, o processo de dessorção SBSE tem sido realizado em uma alíquota de solvente adequado, com agitação magnética ou em banho de ultra-som. Poucas referências bibliográficas descrevem a técnica SBSE/LC empregando o processo de dessorção *off-line*.

Para a dessorção térmica, a etapa de lavagem da barra, anterior ao processo de dessorção, tem sido de extrema importância, pois previne a sorção de analitos não voláteis na barra. A lavagem não resulta em perda do analito, pois este encontra-se sorvido na fase PDMS.<sup>12,21</sup>

O processo SBSE com dessorção térmica pode ser totalmente automatizado. Dois sistemas são encontrados no comércio: o sistema de dessorção térmica clássica e outro especialmente desenvolvido para a dessorção da barra Twister, ambos da Gerstel. Estes sistemas foram especialmente desenvolvidos para serem acoplados a cromatógrafos a gás equipados com injetor de temperatura programada. O injetor com temperatura programada é operado com um *criotrap* para concentração criogênica dos analitos termicamente desorvidos (Figura 5).<sup>12-23</sup> Para a dessorção térmica (Figura 5 A), a barra PDMS é introduzida em um tubo de vidro (interface) e encaminhada para o injetor, para rápida dessorção térmica dos analitos (Figura 5 A-1 e B). Posteriormente, os analitos desorvidos termicamente são concentrados a baixas temperaturas (-150 °C) sob fluxo de nitrogênio líquido (concentração criogênica dos analitos) (Figura 5 A-2).

Após total concentração dos analitos, inicia-se o aumento gradual da temperatura e os analitos são transportados à coluna analítica para a separação cromatográfica.

Em razão do maior volume de fase PDMS, o processo SBSE



**Figura 5.** Representação esquemática do sistema de dessorção térmica. A) interface acoplada ao cromatógrafo a gás, 1 - unidade de dessorção térmica; 2 - injetor com temperatura programada. B) tubo de dessorção térmica, 1 - junção; 2 - tubo de vidro para dessorção

de dessorção é mais lento quando comparado com a técnica SPME, porém apresenta a vantagem de ser totalmente automatizado, permitindo o controle das condições de dessorção: temperaturas, fluxos e o modo de injeção *split/splitless*.<sup>14</sup>

Para o desenvolvimento de método SBSE com alta sensibilidade analítica, duas ou mais barras SBSE têm sido desorvidas simultaneamente. Segundo a Equação 2, utilizando uma única barra de extração, aumentando o volume de amostra (aumento de  $\beta$ ) observa-se a diminuição da quantidade de analito extraída pela fase PDMS e, conseqüentemente, aumento no tempo de extração. Quando a dessorção térmica simultânea de barras SBSE é empregada, o valor  $\beta$ , assim como o tempo de extração, não aumenta e a recuperação não diminui.<sup>22</sup>

Segundo Benanou e colaboradores,<sup>24</sup> a barra PDMS após a extração pode ser armazenada por uma semana (4 °C), sem perda significativa do analito, ampliando uma nova perspectiva para a extração e amostragem *in loco*.

A barra PDMS, dependendo da complexidade da matriz analisada, tem sido reutilizada de 20 a 50 vezes sem perda da eficiência do processo SBSE.

## Otimização das variáveis SBSE

A otimização das variáveis SBSE permite o aumento da eficiência do processo e menor tempo de análise.

Durante o processo de extração, a difusão dos analitos para a fase extratora depende do volume de amostra, velocidade de agitação, dimensões da barra de agitação e do revestimento. Estas variáveis deverão ser otimizadas durante o desenvolvimento do método.<sup>22</sup>

Para analitos apolares ( $\log K_{ow} > 3$ ) a quantidade extraída aumenta proporcionalmente com o aumento do volume de amostra. No entanto, para analitos mais polares, o aumento linear das taxas de recuperação não tem sido observado. Desta forma, para SBSE tem sido necessário otimizar os volumes de amostra e de fase extratora, com base nos analitos e sensibilidade analítica.<sup>12</sup>

O aumento da temperatura favorece a difusão dos analitos, diminuindo o tempo necessário para atingir o equilíbrio de partição. No entanto, diminui o coeficiente de distribuição dos analitos com a fase extratora, variações aceitáveis encontram-se na faixa de 1 a 2 °C.<sup>13</sup>

Queiroz e colaboradores<sup>11</sup> minimizaram a influência das proteínas no processo SBSE, através da diluição de amostras de plasma com solução tampão borato 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 9,0, taxas de recuperação analítica próximas a 100% foram obtidas. O processo de diluição das amostras de plasma com solução tampão diminuiu a viscosidade

da matriz, favorecendo a difusão dos fármacos para a fase extratora, assim como diminuiu o tempo necessário para atingir o equilíbrio de partição. A fase PDMS extrai compostos não iônicos. A diluição das amostras de plasma com solução tampão permitiu o ajuste do pH da matriz, favorecendo a supressão da ionização dos fármacos (valores de  $pK_a$  de 8,7 a 10,2) aumentando, assim, a afinidade destes com a fase extratora de PDMS.<sup>11</sup>

Lanças e colaboradores<sup>25</sup> empregaram o método SBSE-LC-MS na análise de fluoxetina em amostras de plasma. Anterior ao processo SBSE, os autores realizaram a precipitação das proteínas do plasma com ácido tricloroacético 10% (m/v), no intuito de minimizar a influência destas, no processo de extração. No entanto, os autores obtiveram taxas de recuperação analítica do fármaco de 57,54%. Segundo eles, a baixa taxa de recuperação é decorrente da alta ligação do fármaco às proteínas do plasma.

Assim como para SPME, as extrações SBSE podem ser realizadas fora do equilíbrio de partição; desde que as variáveis SBSE sejam rigorosamente controladas, melhores resultados são obtidos com a adição de padrão interno. Porém, segundo Baltussen e colaboradores,<sup>13</sup> o controle das variáveis em SBSE é menos rigoroso, pois a técnica SBSE apresenta taxas de recuperação próximas a 100%.

### Análises quantitativas

Para amostras de fluidos biológicos os componentes da matriz influenciam na eficiência da extração, assim sendo as curvas analíticas deverão ser preparadas com amostras biológicas isentas dos analitos (branco de referência) enriquecidas com os analitos em diferentes concentrações. As determinações quantitativas deverão ser realizadas pelo método da adição de padrão interno; sempre que possível deve-se utilizar padrões marcados por <sup>13</sup>C, em concentrações onde o sinal analítico do padrão interno seja similar à concentração do analito correspondente ao ponto central da curva analítica.

### Derivatizações

O uso de reagentes derivatizantes, para análises de solutos polares com baixo valor de  $K_{o/w}$ , tem resultado em espécies com maior  $K_{o/w}$  e, por conseguinte, maiores taxas de recuperação e alta sensibilidade analítica.<sup>12</sup>

Kawaguchi e colaboradores<sup>7</sup> apresentaram, em artigo de revisão, alguns processos de derivatizações *in situ* empregados para SBSE. Os principais relatos do uso de reações derivatizantes para SBSE estão relacionados à sua aplicação em fluidos biológicos, já que a maioria dos fármacos é polar.

Em SBSE, anidrido acético tem sido utilizado como reagente derivatizante, para a acetilação *in situ* (na amostra), onde o pH da amostra e o volume do reagente são parâmetros importantes na derivatização.<sup>26,27</sup>

Uma alternativa ao processo *in situ* tem sido a dessorção térmica dos analitos da barra PDMS no injetor do cromatógrafo gasoso e derivatização simultânea. Vários agentes de sililação podem ser empregados nesta técnica.<sup>7</sup>

### Aplicações

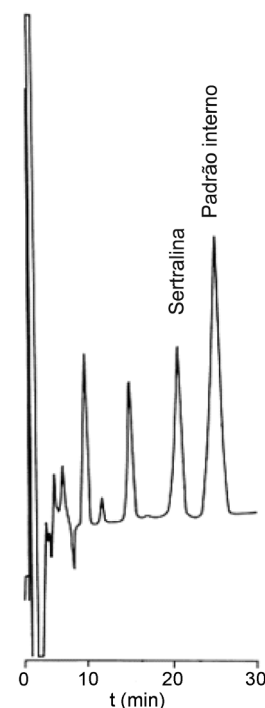
A técnica SBSE tem sido empregada com êxito, para diferentes fins, nas análises de diferentes fármacos nas mais diversas amostras biológicas, soro, plasma, urina, escarro ou esperma, empregando ou não o processo de derivatização (Tabela 1).

Tiepoint e colaboradores<sup>28</sup> analisaram 25 fármacos em amostras de urina por TD-CG-MS. O destaque deste trabalho está relacionado com a diversidade de fármacos analisados, assim como as altas taxas

de recuperações obtidas para fármacos polares, derivatizados por dois reagentes diferentes: ácido anidrido acético e etil cloroformiato, antecedendo às extrações SBSE.

A análise de ácido tubérculo em escarro demonstra a aplicabilidade da técnica SBSE para análises de rotina. As análises foram realizadas em menor tempo (60 min) com precisão e exatidão equivalentes ao método padrão de diagnóstico convencional, o qual requer 8 semanas para obtenção do resultado.<sup>31</sup>

Queiroz e colaboradores<sup>11</sup> padronizaram e validaram um método para análise de 11 antidepressivos em amostras de plasma para fins de monitorização terapêutica (Figura 6).



**Figura 6.** Cromatograma obtido da análise de amostra de paciente que faz uso do antidepressivo sertralina. Concentração encontrada: 118,5 ng mL<sup>-1</sup>

A testosterona e epitestosterona foram analisadas em amostra de urina de pacientes HIV positivos através da técnica TD/GC-MS. Segundo os autores, os pacientes HIV positivos apresentam menor excreção destes hormônios. O método mostrou-se adequado com limites de quantificação de 0,9 ng mL<sup>-1</sup> para a testosterona e 2,8 ng mL<sup>-1</sup> para a epitestosterona.<sup>36</sup>

### CONCLUSÕES

A técnica miniaturizada SBSE apresenta uma série de vantagens em relação aos métodos de preparo de amostras convencionais, ou seja, não requer instrumentação analítica sofisticada, não utiliza solvente orgânico, menor exposição dos analistas aos fluidos biológicos e aos solventes tóxicos, permite automação das análises, a reutilização das barras extradoras e integra em um único sistema a extração, concentração dos analitos e introdução da amostra no cromatógrafo SBSE-TD/CG.

Os métodos SBSE padronizados para análises de fármacos em diferentes fluidos biológicos, plasma, urina, esperma, escarro e saliva, para diferentes fins, contemplam as normas de validação analítica em vigência. Desta forma, a técnica SBSE destaca-se como uma alternativa promissora para a substituição das técnicas convencionais. No entanto, o revestimento de polidimetilsiloxano é a única fase extratora disponível no comércio, o que limita a seletividade/especificidade do

**Tabela 1.** Aplicações do método SBSE para análises de fármacos em fluidos biológicos

Ref.	Análito e matriz	Condições de extração	Deteção	LOQ <sup>A</sup>	Observações
28	Fármacos em urina	60 min, 1000 rpm	TD-CG-MS	Barbitúricos 1 µg L <sup>-1</sup>	Derivatização com etil cloroformiato e ácido anidrido acético
29	Alquilfenóis em urina e plasma	60 min, 25 °C, 500 rpm	TD-CG-MS	0,04 a 0,004 ng mL <sup>-1</sup>	Amostra diluída com água (1:1 v/v) sem a etapa de derivatização
30	Bisfenol A em urina, plasma e saliva	45-120 min, 500-1000 rpm	TD-CG-MS	20 pg mL <sup>-1</sup> Urina 100 pg mL <sup>-1</sup> Plasma, 20 pg mL <sup>-1</sup> Saliva	Amostra com pH ajustado (pH 10,5) Derivatização <i>in situ</i> , aumento da sensibilidade do método
15	Cafeína e metabólitos em plasma	30 min, 1000 rpm	LC-UV	25 ng mL <sup>-1</sup>	Dessorção líquida ADS-RAM como revestimento SBSE <sup>E</sup>
31	Ácido tubérculo em escarro	30 min, 1000 rpm	TD-CG-MS	0.2 ng mL <sup>-1</sup>	Antes da extração; os lipídios micobacterianos foram hidrolisados e derivatizados com formiato de etilcloro
32	Xenoestrógenos fenólicos em urina	150 min, 1000 rpm	TD-CG-MS	10-50 pg mL <sup>-1</sup>	Derivatização com ácido anidrido acético
33	Clorofenóis em urina	60 min, 500 rpm	TD-CG-MS	10-20 pg mL <sup>-1</sup>	Conjugação enzimática e derivatização com ácido anidrido acético
34	4-hidroxinonenol em urina	50 min, 42 °C, 1100 rpm	HD-TD-CG-MS <sup>F</sup>	22,5 pg mL <sup>-1</sup>	Derivatização em fase gasosa empregando ácido anidrido acético catalisado por piridina
35	Hormônios sexuais em água e urina	4 h, 750 rpm	LC-DAD	75-300 µg mL <sup>-1</sup>	Dessorção líquida, revestimento comercial <sup>G</sup> e otimização do processo de extração
25	Fluoxetina em plasma	30 min, 25 °C, 900 rpm	LC-MS	3 ng mL <sup>-1</sup>	Precipitação de proteínas antecedendo o processo de extração
11	Antidepressivos em plasma	45 min, 50 °C, 1200 rpm	LC-UV	10-40 ng mL <sup>-1</sup>	Extração direta na amostra diluída com solução tampão
36	Testosterona e epitestosterona em urina	60 min, 50 °C, 1100 rpm	TD-CG-MS	0,9 ng mL <sup>-1</sup> e 2,8 ng mL <sup>-1</sup>	Derivatização com ácido anidrido acético e otimização dos parâmetros de extração

<sup>A</sup>LOQ: limite de quantificação. <sup>B</sup>TD-GC-MS: dessorção térmica-cromatografia gasosa-espectrometria de massa. <sup>C</sup>Metanol foi adicionado à solução da amostra para minimizar o efeito da adsorção pelo vidro. <sup>D</sup>DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalate. <sup>E</sup>ADS-RAM: aquill-diol-sílica, material de acesso restrito. <sup>F</sup>HD-TD-CG-MS derivatização em fase gasosa-derivatização térmica-cromatografia gasosa-espectrometria de massas. <sup>G</sup>revestimento de polidimetilsiloxano.

processo de extração. Desta forma, é necessário o desenvolvimento de novas fases extratoras (SBSE) mais seletivas e de baixo custo.

## AGRADECIMENTOS

À Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudo concedida.

## REFERÊNCIAS

- Titier, K.; Castaing, N.; Scotto-Gomez, E.; Pehourcq, F.; Molimard, M.; *Ther. Drug Monit.* **2003**, *25*, 581.
- Tournel, G.; Houdret, N.; Deveaux, M.; Gosset, D.; Lhermitte, M.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2001**, *761*, 147.
- Frahmert, C.; Rao, M. L.; Grasmader, K.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *794*, 35.
- Duverneuill, C.; Mazancourt, P.; Alvarez, J. C.; *Ther. Drug Monit.* **2003**, *25*, 565.
- Llerena, A.; Dorato, P.; Berecz, R.; Gonzalez, A.; Caceres, M.; *J. Chromatogr B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *783*, 25.
- Queiroz, M. E. C.; Lanças, F. M.; *LCGC North Am.* **2004**, *22*, 970.
- Kawaguchi, M.; Ito, R.; Saito, K.; Nakazawa H.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 500.
- Pawliszyn, J.; *Applications of solid phase microextraction*, Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1999, p. 45.
- Pawliszyn, J.; *J. Chromatogr. Sci.* **2000**, *38*, 270.
- Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Janssen, H. -G.; Cramers, C. A.; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5213.
- Chaves, A. R.; Silva, S. M.; Queiroz, R. H. C.; Lanças, F. M.; Queiroz, M. E. C.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *850*, 295.
- David, F.; Sandra, P.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1152*, 54.
- Baltussen, E.; Cramers, C. A.; Sandra, P. J. F.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *373*, 22.
- Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C. A.; *J. Microcol. Sep.* **1999**, *11*, 737.
- Lambert, J. P.; Mollet, W. M.; Kwong, E.; Lubda, D.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *1075*, 43.
- Bicchi, C.; Cordero, C.; Rubiolo, P.; Sandra, P.; *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 1650.
- Liu, W.; Wang, H.; Guan, Y.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1045*, 15.
- Xiaolan, Z.; Cai, J.; Jun, Y.; Su, Q.; Yun, G.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1131*, 37.

19. Bicchi, C.; Cordero, C.; Liberto, E.; Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; David, F.; Sandra, P.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *109*, 49.
20. Melo, L. P.; Nogueira, A. M.; Lanças, F. M.; Queiroz, M. E. C.; *J. Chromatogr., A*, submetido.
21. David, F.; Tiepont, B.; Sandra, P.; *LCGC North Am.* **2003**, *27*, 108.
22. Kawaguchi, M.; Ishii, Y.; Okanouchi, N.; Ito, R.; Inoue, K.; Saito, K.; Nakazawa, H.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1049*, 1.
23. Ochiai, N.; Sasamoto, K.; Daishima, S.; Heiden, A. C.; Hoffmann, A.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *986*, 101.
24. Benanou, D.; Acobas, F.; de Roubin, M. R.; David, F.; Sandra P.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 69.
25. Fernandes, C.; Jiayu, P.; Sandra, P.; Lanças, F. M.; *Chromatographia* **2006**, *64*, 517.
26. Kawaguchi, M.; Inoue, K.; Yoshimura, M.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Ito, R.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1041*, 19.
27. Kawaguchi, M.; Inoue, K.; Yoshimura, M.; Ito, R.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Nakazawa, H.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *805*, 41.
28. Tiepont, B.; David, F.; Benjits, T.; Sandra, P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *32*, 569.
29. Kawaguchi, M.; Inoue, K.; Sakui, N.; Ito, R.; Izumi, S.; Makino, T.; Okanouchi, N.; Nakazawa, H.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *799*, 119.
30. Kawaguchi, M.; Yoshimura, K.; Ito, R.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Nakazawa, H.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *805*, 41.
31. Stopforth, A.; Burger, B. V.; Crouch, A. M.; Sandra P.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, *834*, 134.
32. Kawaguchi, M.; Sakui, N.; Okanouchi, N.; Ito, R.; Saito, K.; Izumi, S.; Makino, T.; Nakazawa, H.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *820*, 49.
33. Kawaguchi, M.; Ishii, Y.; Okanouchi, N.; Ito, R.; Saito, K.; Nakazawa, H.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *533*, 57.
34. Stopforth, A.; Burger, B. V.; Crouch, A. M.; Sandra, P.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, *834*, 134.
35. Almeida, C.; Nogueira, J. M. F.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *411*, 303.
36. Stopforth, A.; Grobbelaar, C. J.; Crouch, A. M.; Sandra, P.; *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 257.