

Camila Maiara dos Santos Vieira

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO EMPREGANDO
MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA SUPOSTADA POR
MEMBRANA OCA (HF-LPME) PARA DETERMINAÇÃO DE
SULFONAMIDAS EM ÁGUA SUPERFICIAL POR HPLC-DAD.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Florianópolis
2015

Agradecimentos

A Deus, que me concedeu oportunidades além das minhas expectativas, e me sustentou para aproveitar todas elas;

Aos meus pais, Nilzo e Mirtes, que desde pequena me incentivaram nos estudos, estando presentes em todas as reuniões de escola, mesmo que as vezes, fosse para ouvir o quão barulhenta e faladeira sua filha era (e ainda é).

Ao meu esposo e super companheiro Vítor, que perdeu finais de semana indo ao laboratório me acompanhar e sempre, prestativo me auxiliou em todas as etapas do mestrado. Sem você tudo seria mais difícil.

A minha família que sempre se importou e me apoiou. Patrick e Lucas, meus irmãos, Marilene e Joarez, meus pais número dois, Vó Dolores, sempre preocupada com meus prazos além dos tios e tias. Vocês são meu suporte.

Aos meus amigos da cromatografia, Adriana, Daniela, Vanessa e Josias. Vocês tiveram grande contribuição neste trabalho e na minha formação como mestre. Valeu por toda ajuda, conversas e dicas.

A Vanessinha, que fez comigo meu primeiro experimento utilizando HF-LPME. Graças a você, hoje sou encantada nessa técnica.

Aos meus colegas do CroMaas, Ana, Naysla, Gabriela, Morés, Francielle, Anderson, Lígia, Mauana, Heloísa, Ivan, Daiane, Edinho e Lucas, obrigada pela parceria e pelas risadas. Vocês são demais!

Ao meu orientador, professor Carasek sempre muito prestativo e solícito. Ser sua aluna é um privilégio enorme. Obrigada por tudo.

A empresa de controle de qualidade, JR Hidroquímica, por me conceder uma bolsa de estudos durante o período do meu mestrado.

A UFSC e ao Programa de Pós-graduação em química pela oportunidade e pelo ensino público e de Qualidade.

Resumo

O propósito deste estudo foi o desenvolvimento de um método analítico utilizando a técnica de microextração em fase líquida suportada por membrana oca de polipropileno em configuração trifásica para extração de sulfonamidas de amostras aquosas e urina. Foram otimizados o tipo de solvente orgânico empregado como membrana líquida além de outros parâmetros que afetam a eficiência da extração empregando experimentos multivariados. As condições ótimas da extração foram a adição de 95% de sulfato de amônio na fase doadora, 1-octanol para o preenchimento dos poros da fibra oca, pH das fases doadora e receptora em 5,0 e 10,0, respectivamente, e a não utilização de solvente orgânico como aditivo na amostra. A análise das sulfonamidas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência e a detecção por arranjo de diodos. Alguns parâmetros analíticos do método proposto foram avaliados para amostra aquosa. O limite de quantificação para as sulfonamidas em amostra aquosa foi maior que $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e desvio padrão relativo (RSD) menor que 13%. Os estudos de recuperação das sulfonamidas para amostras de água superficial de açude revelaram valores variando entre 61 - 117 %. De acordo com os resultados, o método proposto apresenta-se promissor para análises de rotina em águas superficiais, tendo em vista a emergente preocupação da contaminação ambiental pelas sulfonamidas.

Palavras chave: microextração, membrana oca, sulfonamidas, amostras aquosas.

Abstract

The goal of this study was the development of an analytical method using liquid phase microextraction supported with polypropylene hollow fiber in three phases configuration for the extraction of sulfonamides. The type of organic solvent used for liquid membrane as well as other parameters that influences the extraction efficiency was optimized applying multivariate design. The optimum extraction conditions defined was the addition of 95% ammonium sulfate in the donor phase, 1-octanol for the hollow fiber pores filling, acceptor and donor phase pH at 5 and 10, respectively, and the no use of an organic solvent as sample additive. The sulfonamide analysis was carried out by high performance liquid chromatography and diode array detection. Some analytical parameters of the developed method was evaluated for aqueous samples. The quantification limit for aqueous sample was $2 \mu\text{g L}^{-1}$ and a RSD lower than 13%. The recovery obtained for the determination of sulfonamides in surface water dam revealed values ranging from 61 - 117%. According to the results the proposed method has become promising for routine analysis in surface water in view of the increasing concern of the environmental contamination by sulfonamides.

Keywords: microextraction, hollow fiber, sulfonamides, aqueous sample.

Lista de Figuras

Figura 1 – Evolução do número de publicações em jornais indexados contendo as palavras-chave “liquid microextraction phase hollow fiber”.....	19
Figura 2 – Representação esquemática das três principais categorias de LPME e seus diferentes modos operacionais.....	23
Figura 3 – Princípio básico de HF-LPME.....	24
Figura 4 – Equilíbrio hipotético da distribuição isotérmica entre a fase aquosa (w) e a fase orgânica (o). A curva "a" representa um comportamento ideal, e as curvas "b" e "c" representam isothermas não lineares devido a interação soluto-soluto.....	25
Figura 5 – Difusão molecular em estado estável com um gradiente de concentração linear. A direção de fluxo é para a direita de acordo com a primeira lei de Fick, mas não há nenhuma alteração na concentração em qualquer ponto ao longo do tempo de acordo com a segunda lei de Fick.....	29
Figura 6 – Difusão molecular em estado instável com um gradiente de concentração não-linear. A direção de fluxo é para direita, mas devido a segunda derivada positiva do gradiente, a concentração em qualquer ponto aumenta com o tempo de t_1 a t_2	29
Figura 7 – Diferentes Configurações para HF-LPME, sendo em forma de U (a) e em forma de haste (b).....	31
Figura 8 – Esquemas dos modos de extração utilizados em HF-LPME, sendo (a) de três fases e (b) de duas fases.....	32
Figura 9 – Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura, magnificação de 20000x.....	35
Figura 10 – A pré-concentração de metanfetamina em função do tempo de extração.....	38
Figura 11 – Extrutura das sulfonamidas mais comumente usadas.....	42

Figura 12 – Estrutura e distribuição das espécies de sulfadiazina (SDZ).....	43
Figura 13 – Estrutura e distribuição das espécies de sulfatiazol (STZ).....	43
Figura 14 – Estrutura e distribuição das espécies de sulfamerazina (SMR).....	44
Figura 15 – Estrutura e distribuição das espécies de sulfametoxipiridazina (SMP).....	44
Figura 16 – Estrutura e distribuição das espécies de sulfametoxazol (SMX).....	45
Figura 17 – Planejamento Doehlet.....	48
Figura 18 – Planejamento de superfície triangular.....	48
Figura 19 – Preparo das fibras de polipropileno para utilização em HF-LPME trifásica.....	52
Figura 20 – Curva gradiente de solvente otimizado para estudos de extração. Fase móvel (A) Metanol (B) Água acidificada (ácido acético, pH 3,5).....	56
Figura 21 – Cromatograma obtido após extração por HF-LPME nas condições iniciais fixadas com sulfonamidas à 250 µg/L ⁻¹ . Analitos: SDZ (t _R = 5,4 min), STZ (t _R = 6,2 min), SMR (t _R = 7,5 min), SMP (t _R = 10,2 min) e SMX (t _R = 10,8 min).....	58
Figura 22 – Estudo do pH da amostra. Condições experimentais: 300 µL de 1-octanol; 10 g de sulfato de amônio; 10 mL de tampão com pH variando de 1,5 a 6,0; 250 µg/Kg Padrão de sulfonamida e 0,5 g de amostra de mel. Fase receptora: 100 µL de tampão carbonato em pH 10,0 (os analitos SM e SD são respectivamente SMR e SDZ na sigla adotada).....	59

Figura 23 – Cronomatogramas resposta de extração com a utilização da SML (cromatograma abaixo) e na ausência da SLM (cromatograma acima).....61

Figura 24 – Superfície resposta triangular obtida a partir da extração com os solventes: tolueno, 1-octanol e 1-pentanol. Condições: volume de amostra de 15 mL tamponada em pH 5,0 com tampão acetato, 10 g sulfato de amônio, 30 µL de solvente extrator octanol:pentanol (45:55) , tempo de extração 60 minutos e 50 µgL⁻¹ de solução mista de sulfonamidas. Fase receptora: tampão carbonato em pH 10,0.....62

Figura 25 – Estudo do ajuste da força iônica utilizando 3 g de KH₂PO₄, 10 g de (NH₄)₂SO₄. Condições: volume de amostra de 15 mL, 30 uL de solvente extrator octanol:pentanol (45:55) , tempo de extração 60 minutos, 10 mL de tampão acetato e 50 µgL⁻¹ de solução mista de sulfonamidas. Fase receptora: tampão carbonato em pH 10,0.....63

Figura 26 – Superfície de resposta para os analitos na otimização da força iônica e do tempo de extração. Condições fixas: volume de amostra de 15 mL, 30 uL de solvente extrator octanol:pentanol (45:55), 10 mL de tampão acetato e 50 µgL⁻¹ de solução mista de de sulfonamidas. Fase receptora: tampão carbonato em pH 10,0.....65

Figura 27 – Superfície de compromisso resposta para os analitos na otimização da força iônica e do tempo de extração. Condições fixas: volume de amostra de 15 mL, 30 uL de solvente extrator octanol:pentanol (45:55), 10 mL de tampão acetato e 50 µgL⁻¹ de solução mista de de sulfonamidas. Fase receptora: tampão carbonato em pH 10,0.....66

Figura 28 – Estudo para a seleção do solvente de extração. Condições experimentais: 300 µL de solvente, 11,15 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão acetato pH 5,0, 250 µg/Kg de padrão de cada sulfonamida e 0,5 g de amostras de mel orgânico. Fase receptora: tampão carbonato pH 10,0.....67

Figura 29 - Comparação entre a adição de diferentes volumes do solvente extrator 1-octanol: 1-pentanol (55:45) para a extração de sulfonamidas, utilizando HF-LPME.....68

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Aplicações recentes da HF-LPME.....	39
Tabela 2 - Valores de pKa das espécies em solução aquosa para os analitos quantificados na metodologia desenvolvida.....	45
Tabela 3 - Planejamento utilizado para a otimização da adição de sal na extração de sulfonamidas em amostras aquosas por HF-LPME.....	53
Tabela 4 - Planejamento Doehlet para a otimização da quantidade de sal e do tempo de extração.....	54
Tabela 5 – Gradiente de solvente otimizado para estudos de extração.....	56
Tabela 6 - Parâmetros iniciais fixados para estudo da extração de sulfonamidas por HF-LPME.....	57
Tabela 7 - Volumes utilizados de 1-octanol e 1-pentanol para estudo de utilização de solvente orgânico coextrator.....	68
Tabela 8 - Faixa linear, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação obtidos para o método proposto com HF-LPME para determinar sulfonamidas em amostras aquosa.....	69
Tabela 9 - Faixa linear, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação obtidos para o método proposto com HF-LPME para determinar sulfonamidas em água superficial através de uma curva na matriz.....	70
Tabela 10 - Comparação de trabalhos descritos na literatura com o método proposto empregando extração de sulfonamidas em amostras aquosas e análise química em HPLC.....	71
Tabela 11 - Resultados de recuperação para água superficial de açude, realizada em três níveis de fortificação.....	72

Abreviaturas

- DAD - Detector por Arranjo de Diodos (do inglês "*Diode Array Detection*")
- HF-LPME - Microextração em Fase Líquida com Membrana Oca (do inglês "*Hollow-fiber Liquid-Phase Microextraction*")
- SDME - Microextração em Gota Única (do inglês "*Single-Drop Microextraction*")
- DLLME – Microextração líquido-líquido Dispersiva (do inglês "*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*")
- HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês "*High-Performance Liquid Chromatography*")
- DAD-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos (do inglês "*High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*")
- GC - Cromatografia Gasosa (do inglês "*Gas Chromatography*")
- SLM – Membrana de líquido suportado (do inglês "*Supported Liquid Membrane*")
- SAs – Sulfonamidas
- SDZ – Sulfadiazina
- STZ – Sulfatiazol
- SMR – Sulfamerazina
- SMX – Sulfametoxazol
- SMP – Sulfametoxipiridazina
- LOD - Limite de detecção (do inglês "*Limit of detection*")
- LOQ - Limite de quantificação (do inglês "*Limit of quantification*")
- R(%) - Ensaios de recuperação
- RSD(%) - Desvio Padrão Relativo (do inglês "*Relative Standard Deviation*")

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA	21
2.1.1 MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA	22
2.1.2 PRINCÍPIOS BÁSICOS PARA A HF-LPME	23
2.1.2.1 CONSIDERAÇÕES TERMODINÂMICAS	25
2.1.2.2 CONSIDERAÇÕES CINÉTICAS	27
2.1.3 CONFIGURAÇÕES PARA A HF-LPME	30
2.1.4 PARÂMETROS A SEREM OTIMIZADOS EM HF-LPME	34
2.1.4.1 ESCOLHA DA MEMBRANA	35
2.1.4.2 AJUSTE DO PH	35
2.1.4.3 AJUSTE DA FORÇA IÔNICA	36
2.1.4.4 SOLVENTE ORGÂNICO	37
2.1.4.5 TEMPO DE EXTRAÇÃO	38
2.1.5 APLICAÇÕES RECENTES DA HF-LPME	38
2.2 ANALITOS ESTUDADOS	40
2.2.1 SULFONAMIDAS	41
2.3 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE PARÂMETROS DE MÉTODOS ANALÍTICOS	47
2.3.1 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA	47
2.3.1.1 PLANEJAMENTO DOEHLET	48
2.3.1.2 SUPERFÍCIE TRIANGULAR	48
3. OBJETIVOS	50
3.1 OBJETIVO GERAL	50
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	51
4.1 REAGENTES QUÍMICOS E MATERIAIS	51
4.2 INSTRUMENTAÇÃO	51
4.3 PREPARO DAS FIBRAS DE POLIPROPILENO	52
4.4 OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HF-LPME PARA DETERMINAÇÃO DE SULFONAMIDAS EM AMOSTRAS AQUOSAS.	53
4.5 CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO OTIMIZADA PARA ANÁLISE DAS AMOSTRAS	54

4.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO	55
4.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	56
5.2 TESTES INICIAIS	57
5.2.1 FASE EXTRATORA, FASE RECEPTORA E A INFLUÊNCIA DO PH	59
5.2.2 SOLVENTE ORGÂNICO	60
5.2.3 FORÇA IÔNICA E TEMPO DE EXTRAÇÃO	62
5.2.3.1 TESTES INICIAS DO EFEITO DA FORÇA IÔNICA	62
5.2.3.2 OTIMIZAÇÃO DA FORÇA IÔNICA E TEMPO DE EXTRAÇÃO	64
5.2.4 SOLVENTE ORGÂNICO COEXTRATOR	66
5.3 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO.	69
5.4 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM OUTROS DA LITERATURA	71
5.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS	72
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS	75

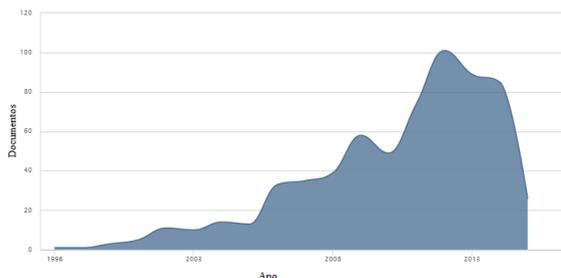
1. Introdução

São raros os casos em que podemos analisar quimicamente uma amostra de forma direta sem a preocupação com a sua composição. Apesar dos avanços da tecnologia no campo instrumental, a maioria dos equipamentos ainda não pode operar diretamente com matrizes de amostras complexas (Rezaee et al., 2010). Devido a essa característica, a etapa do preparo da amostra é considerada a mais importante em qualquer procedimento analítico.

Neste sentido, esforços tem se intensificado para o desenvolvimento e melhoria de diversos métodos de preparo de amostras, sempre visando uma simplificação e redução de processos agressivos ao meio ambiente, entretanto, mantendo-se boa eficiência de extração. (Asensio et al., 2011).

Para detectar níveis traço de analitos muitas técnicas de preparo de amostra foram desenvolvidas, entre elas as técnicas com a utilização de membranas se destacam pela facilidade de utilização e bons resultados. Processos de separação por membranas apresentaram um rápido crescimento nas últimas décadas (Figura 1), isto por serem de grande interesse comercial e possuírem aplicações na pesquisa de bio-separação, purificação de água potável, tratamento de águas residuais, além de separações de fase líquida (Feng; Khulbe; Matsuura; Ismail, 2013).

Figura 1 - Evolução do número de publicações em jornais indexados contendo as palavras-chave “liquid microextraction phase hollow fiber”.



Fonte: SCOPUS (abril de 2015).

Devido a preocupação científica e geral com a saúde e o meio ambiente, práticas ambientalmente amigáveis tem sido utilizadas em diferentes áreas de pesquisa, principalmente na química analítica (Anastas, 1999). Em função disso, o trabalho propõe o uso da técnica de microextração em fase líquida suportada por membrana oca (HF-LPME, do inglês *hollow-fiber liquid phase microextraction*) contendo fase receptora aquosa e fase doadora livre de solvente extrator. Diminuir a utilização do solvente orgânico, apresenta vantagens tanto para uma metodologia mais verde, quanto para a saúde do analista.

O propósito geral deste estudo foi o desenvolvimento e avaliação de alguns parâmetros de validação de um método analítico utilizando fibra oca de polipropileno para a determinação de sulfonamidas em amostra de água utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

2. Revisão da Literatura

2.1 Técnicas de Preparo de Amostra

Apesar dos avanços no desenvolvimento da instrumentação analítica altamente eficiente para a determinação de analitos em amostras biológicas, ambientais e produtos farmacêuticos, geralmente um pré-tratamento na amostra é necessário, a fim de extrair, isolar e concentrar os analitos.

Devido a necessidade de analisar matrizes complexas, o desenvolvimento de metodologias rápidas, precisas e sensíveis é uma questão importante. Entretanto, as técnicas convencionais de preparo de amostra têm desvantagens envolvidas, como procedimentos demorados e necessidade de grandes volumes de amostra e solventes. Usando substâncias químicas nocivas em quantidades elevadas, além da poluição ambiental, apresentamos riscos de saúde para os profissionais de laboratório e custos operacionais adicionais para o tratamento de resíduos. Idealmente, as técnicas de preparo de amostra devem ser rápidas, de fácil utilização, baixo custo e compatíveis com uma variedade de instrumentos analíticos (Sarafraz-Yazdi; Amiri, 2010).

Além disto, a etapa do preparo de amostra é dependente das características do analito e da matriz, exigindo uma otimização adequada de seus diferentes parâmetros de influência. (Asensio et al., 2011).

A busca por novos métodos de preparo que sejam eficientes e ainda assim contribuam com a “Química Verde”, apresentou um novo foco na última década do século XX. Neste período novas técnicas foram desenvolvidas e estão sendo aperfeiçoadas até os dias atuais, sendo aplicadas para análise de diferentes analitos e matrizes.

Dentre as técnicas desenvolvidas, ganharam destaque as chamadas técnicas miniaturizadas de preparo de amostras, as quais tiveram grande impulso com o desenvolvimento da microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) proposta por Pawlczyn e colaboradores no ano de 1990 e a microextração em fase líquida (LPME, do inglês *liquid phase microextraction*) introduzidos por Dasgupta et al e Cantwell et al. em 1996. A partir dos trabalhos iniciados na segunda metade da década de 90, com a microextração em fase líquida, foram desenvolvidas variantes para a LPME, cada uma delas apresentando características específicas. (Merib, Carasek, 2013).

2.1.1 Microextração em fase líquida

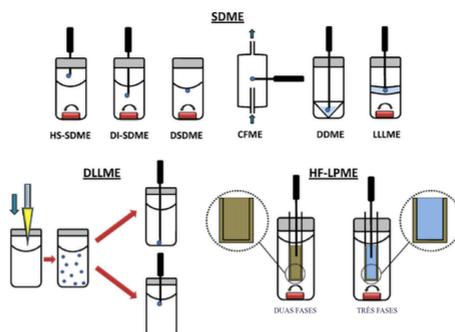
As primeiras utilizações de LPME basearam-se na extração de analitos de amostras aquosas por meio de uma pequena gota de um solvente orgânico. Em virtude da particular configuração, a técnica ficou conhecida como microextração com gota única (SDME, do inglês *single drop microextraction*) (Dasgupta, 1996). A pequena gota de solvente orgânico era suspensa a partir da ponta de uma seringa e colocada na solução aquosa para a extração. Dessa forma, os analitos eram extraídos da amostra aquosa pela gota em suspensão, sendo ao fim recolhida para o interior da seringa e analisada por cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*). Apesar dessa configuração ser simples, eficiente e reduzir o consumo de solventes orgânicos, ela é pouco utilizada nos laboratórios de pesquisa. Uma possível razão é a baixa estabilidade da gota suspensa, a qual pode ser perdida na amostra durante a extração (Pederson-Bjergaard; Rasmussen, 1999).

Outra conformação bem difundida nos estudos analíticos é a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*), sendo introduzida em 2006 (Rezaee; Assadi; Hossein; Aghaee; Ahmadi; Berijani, 2006). A técnica é constituída basicamente da mistura de um solvente dispersor, miscível em um solvente extrator (orgânico) e na amostra (fase aquosa) e um solvente extrator, imiscível na fase aquosa. A mistura de poucos microlitros do solvente dispersor com o extrator é introduzida rapidamente na amostra, proporcionando assim a formação de uma quantidade muito grande de microgotículas. Estas permitem a formação de uma grande área de contato entre o solvente extrator e a amostra, facilitando assim a migração dos analitos da fase aquosa para a fase extratora. Após determinado tempo, a fase extratora é decantada no fundo do frasco e retirada com o auxílio de uma microseringa podendo ser encaminhada a um instrumento analítico para medição (Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 2008).

Outro método muito importante da LPME são as técnicas utilizando o auxílio de membranas, chamadas de microextração em fase líquida suportada com membrana oca (HF-LPME, do inglês *hollow-fiber liquid phase microextraction*). Essa técnica foi introduzida por Pedersen-Bjergaard et al. em 1999. Neste trabalho amostras de plasma humano e urina foram submetidos a análise de metanfetamina pela utilização de um solvente orgânico imobilizado nos poros de uma membrana de polipropileno (fibra oca), formando uma membrana

líquida suportada (SLM, do inglês *supported liquid membrane*) de 1-octanol. O interior da fibra oca foi preenchido com 25 μL de uma solução receptora ácida e a amostra teve seu pH ajustado com a utilização de NaOH. O analito foi extraído da fase doadora (amostra) para o solvente orgânico e em seguida conduzido para a fase receptora. Após a extração, a fase receptora foi analisada por eletroforese capilar, sendo encontrado um limite de detecção na ordem de 5 ng mL^{-1} para as matrizes de urina e plasma (Pedersen-Bjergaard, 1999). A Figura 2 apresenta as três principais categorias de LPME e seus diferentes modos de operação.

Figura 2 - Representação esquemática das três principais categorias de LPME e seus diferentes modos operacionais.

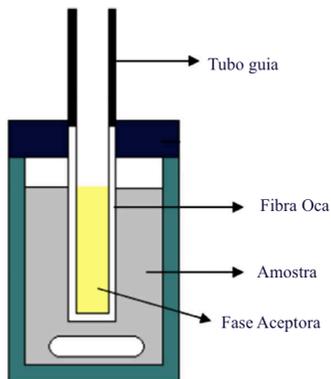


Fonte: Adaptação de Ansesio-Ramos, et al. (2011)

2.1.2 Princípios básicos para a HF-LPME

A variação da LPME utilizando membrana oca foi desenvolvida por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, em 1999, como mencionado anteriormente. Assemelhando-se com a membrana de líquido suportado (SLM, do inglês *supported liquid membrane*), metodologia extensivamente relatada na literatura por Jonsson e Mathiasson nos trabalhos de 1992 e 1999, a técnica de HF-LPME consiste em uma membrana de extração líquido-líquido, entre outros componentes como apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Princípio básico de HF-LPME.



Fonte: Adaptação de Sarafray-Yazdi; Amiri (2010)

De um modo geral, um frasco é preenchido com a amostra e um pequeno pedaço da membrana oca é exposto com auxílio de um tubo guia. Antes da extração, a membrana oca é mergulhada em um solvente orgânico, sendo seus poros preenchidos com o solvente orgânico formando uma fina membrana líquida suportada na parede da membrana. O comprimento da membrana pode variar de 1,5 cm a 10 cm dependendo da configuração e aplicação. O solvente é imiscível com água para assegurar que se mantenha dentro dos poros durante a extração sem perdas para a amostra aquosa sendo seu excesso retirado antes da utilização. A membrana mais utilizada para HF-LPME é composta por polipropileno, e geralmente apresenta porosidade de aproximadamente 70%, sendo seus poros de 0,2 μm , espessura de parede de aproximadamente 200 μm e diâmetro interno de 600 μm (Merib, Carasek, 2013).

Existem dois modos de operação para HF-LPME: um sistema de duas fases desenvolvido por Shen e Lee em 2002, no qual a membrana é preenchida com um solvente de extração orgânico tal como o 1-octanol, e um sistema trifásico.

O modo de duas fases, que é por vezes chamado de extração líquido-líquido com membrana microporosa, pode ser útil para amostras de água altamente contaminadas por sólidos, tais como sedimentos (Fontanals et al., 2006).

O sistema de três fases tem a parede da membrana oca polimérica saturada com um solvente orgânico, enquanto que em seu interior contém uma fase aquosa, geralmente ácida ou básica. Este

método pode ser útil para a extração de produtos farmacêuticos ou metabolitos a partir de fluidos biológicos (Hou, Lee, 2003 e Kuورانne et al., 2003).

Os analitos então são extraídos a partir da amostra aquosa por meio da SLM orgânica e migram para a solução receptora (aquosa ou orgânica - dependendo da configuração) localizada no interior da membrana oca (Sarafraz-Yazdi; Amiri, 2010).

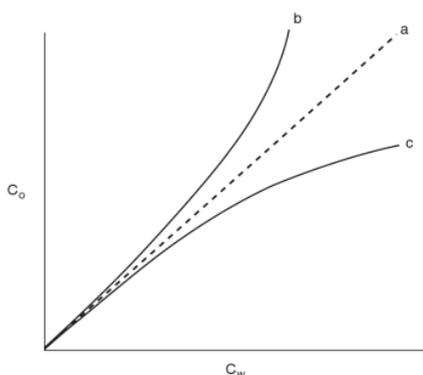
Após extração, a solução receptora é retirada do interior da membrana e encaminhada para análise química.

2.1.2.1 Considerações Termodinâmicas

Microextrações em solvente, em comum com outras técnicas de pré-concentração e clean-up, são baseadas na distribuição dos analitos entre a fase da amostra (normalmente uma solução aquosa) e uma fase extratora (normalmente um solvente orgânico).

Uma distribuição de equilíbrio isotérmica consiste em um gráfico do equilíbrio da concentração dos analitos na fase orgânica versus a concentração na fase aquosa. Hipoteticamente, apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Equilíbrio hipotético da distribuição isotérmica entre a fase aquosa (w) e a fase orgânica (o). A curva "a" representa um comportamento ideal, e as curvas "b" e "c" representam isothermas não lineares devido a interação soluto-soluto.



Fonte: Kokosa; Przyjazny; Jeannot (2009)

Tais isotérmicas tipicamente irão apresentar um comportamento linear a concentrações baixas, mas podem desviar-se da linearidade a concentrações mais elevadas. O coeficiente de equilíbrio de distribuição, K , é definido como:

$$K = \frac{C_o}{C_w} \quad (1)$$

onde C_o e C_w representam concentrações do analito na fase orgânica e aquosa, respectivamente, em qualquer ponto na distribuição isotérmica.

A suposição de que K é tipicamente constante é válida apenas em soluções diluídas, como nos casos em que aplicamos microextrações usando solventes (SME, do inglês *solvent microextraction*). Isso porque temos baixas concentrações do analito na amostra (ppb ou ppm) e ainda concentrações baixas na fase orgânica extratora. Em concentrações mais elevadas, as interações soluto-soluto tornam-se importantes, e desvios de comportamento da distribuição linear podem tornar-se aparentes, tal como ilustrado na Figura 4. Nesses casos é necessário uma melhor investigação, uma vez que podem resultar em curvas de calibração não-lineares.

Combinando a definição da constante de equilíbrio de distribuição (Equação 1), com a condição de equilíbrio de massa para uma dada concentração de analito inicial C_w^o com o volume de aquoso e orgânico, respectivamente V_w e V_o temos:

$$C_w^o \cdot V_w = C_w V_w + C_o V_o \quad (2)$$

Com a Equação 2, obtemos a Equação 3, sendo uma expressão para a concentração do equilíbrio na fase orgânica como uma função da concentração de analito na fase aquosa (amostra):

$$C_o = \frac{K C_w^o}{1 + K V_o / V_w} \quad (3)$$

Embora estas equações apliquem-se, em geral, para a maioria dos tipos de processos de extração, é importante reconhecer uma característica única de SME em comparação com extrações convencionais. Isso porque a relação de fase (V_o/V_w) é normalmente muito pequena para as microextrações líquidas (3/10 ou menos), a função KV_o/V_w é geralmente pequena, e logo o denominador da

Equação 3 se aproxima de 1. Por exemplo, se uma gota de 1 μL é utilizada para extrair um soluto com uma constante distribuição de 50 a partir de uma amostra de água de 2 mL, o termo do denominador (KV_o/V_w) apresenta um resultado de 0,0025 e, por consequência, a Equação 3 se resume a: $C_o = KC_w^o$, dentro de 2% de erro. Isto é equivalente a dizer que o número de mols de analito na fase orgânica é pequeno em comparação com a fase aquosa, e uma pequena quantidade de analito é removida da amostra.

O outro extremo na Equação 3 é o caso de uma extração exaustiva, onde o valor de K é tão grande que o segundo termo no denominador é muito maior do que 1 tornando C_o independente de K resumindo a equação a $C_w^o V_w/V_o$. Por exemplo, um soluto com uma constante de distribuição de 5000 sendo extraído com 5 μL de solvente a partir de uma amostra de água 0,5 mL de água resultaria em $KV_o/V_w = 50$ e $C_o \approx C_w^o V_w/V_o$ (extração exaustiva dentro de 2% de erro).

No entanto, na maioria das vezes a situação é intermediária entre estes dois extremos, em que uma quantidade significativa (porém muito menor do que 100%) de analito é removido a partir da solução aquosa.

2.1.2.2 Considerações Cinéticas

A taxa de transporte do analito entre fases é regulada ao nível molecular por difusão. Moléculas em solução (gasosas e em soluções em fase líquida) são submetidas a movimentos com direção e velocidade em constante mudança devido a colisões e interações com moléculas de solvente. Por causa da natureza aleatória do movimento a velocidade média de um conjunto de moléculas é zero. Embora a velocidade média para um grande conjunto de moléculas seja zero, há uma variação associada com este meio e uma dada molécula provavelmente será submetida a este movimento num dado período de tempo.

Assim, é possível observar como um conjunto de moléculas inicialmente concentrados num ponto tendem a se igualar ao longo de todo o solvente, se deslocando de regiões de alta concentração para regiões de baixa concentração.

Há duas leis matemáticas conhecidas que descrevem este processo. A primeira lei de difusão de Fick descreve o fluxo de moléculas (mols, n por uma superfície por tempo t) como uma função do gradiente de concentração (dC/dx):

$$-\frac{1}{A} \frac{dn}{dt} = D \frac{dC}{dx} \quad (4)$$

A constante de proporcionalidade entre o gradiente de concentração e o fluxo é o coeficiente de difusão, D , com unidades de cm^2/s (com A em cm^2 , dC , em mol/cm^3 , e dx em cm). O sinal negativo significa difusão de alta concentração para baixa concentração.

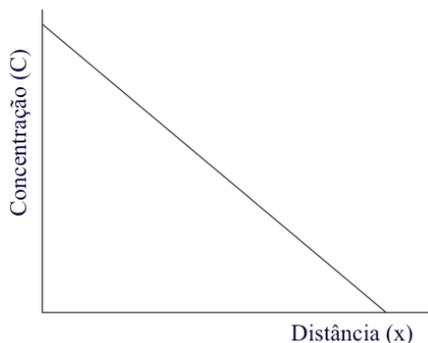
Os coeficientes de difusão de moléculas em fase gasosa são relativamente grandes (da ordem de $0,1 \text{ cm}^2/s$) devido ao movimento de translação na sua maioria sem impedimentos na fase gasosa. Por outro lado, os coeficientes de difusão para moléculas de soluto em solução líquida são muito menores (no ordem de $10^{-5} \text{ cm}^2/s$). Devido a isso, a compreensão e controle das taxas de difusão na fase líquida é muito mais importante.

Coefficientes de difusão de líquidos podem ser medidos experimentalmente, através do método de dispersão de Taylor (Cussler, 1997) ou estimada dentre uma série de modelos teóricos ou empíricos por exemplo, via a equação de Stokes-Einstein ou o modelo de Wilke-Chang (Cusser, 1997). Em geral, a maioria dos modelos apresentam uma relação direta com a temperatura de D e uma relação inversa com a viscosidade do solvente e o tamanho da molécula que está difundindo. Assim, podemos ver imediatamente três parâmetros experimentais que controlam a taxa de difusão, embora a exata dependência das taxas de difusão sobre estes parâmetros possam não ser exatamente conhecidas. A segunda lei de Fick da difusão é uma equação diferencial para a taxa de variação de concentração com o tempo, que pode ser resolvida exatamente por um número de processos simples:

$$\frac{dC}{dt} = D \frac{d^2C}{dx^2} \quad (5)$$

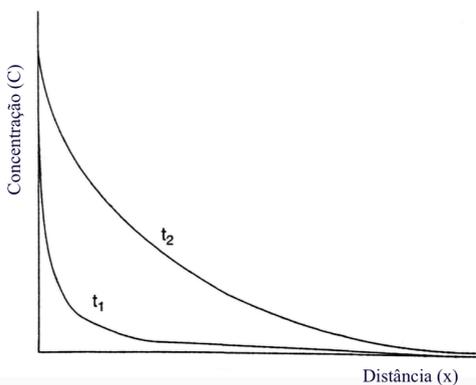
A segunda lei de Fick nos diz que para gradientes de concentração lineares (onde d^2C/dx^2 é zero), não há nenhuma mudança líquida na concentração, embora haja um transporte líquido de moléculas de acordo com a primeira lei de Fick. Em outras palavras, com um gradiente de concentração linear, temos uma situação de estado estacionário. Por outro lado, os gradientes de concentração não-lineares resultam em uma acumulação ou decréscimo da concentração (estado instável) de acordo com a segunda lei de Fick. As Figuras 5 e 6 ilustram a diferença entre estes dois tipos de gradientes de concentração.

Figura 5 - Difusão molecular em estado estável com um gradiente de concentração linear. A direção de fluxo é para a direita de acordo com a primeira lei de Fick, mas não há nenhuma alteração na concentração em qualquer ponto ao longo do tempo de acordo com a segunda lei de Fick.



Fonte: Adaptado de Kokosa; Przyjazny; Jeannot (2009)

Figura 6 – Difusão molecular em estado instável com um gradiente de concentração não-linear. A direção de fluxo é para direita, mas devido a segunda derivada positiva do gradiente, a concentração em qualquer ponto aumenta com o tempo de t_1 a t_2 .



Fonte: Adaptado de Kokosa; Przyjazny; Jeannot (2009)

Os dois métodos mais comuns de agitação em fase líquida são de agitação magnética e vibrações mecânicas. Em ambos os casos, o

fluxo de massa da fase líquida é empregada para assegurar a mistura dentro da fase líquida ou para renovar a área interfacial de contato entre as fases. Uma descrição exata do comportamento hidrodinâmico da fase líquida e sua dependência de variáveis experimentais, tais como taxa de agitação e geometria da barra de agitação, é geralmente inatingível. No entanto, os modelos simples, mas úteis, de fenômenos de convecção-difusão podem ser construídos, e os diversos modos de agitação podem ser tratados de forma semelhante em termos de modelagem de transferência de massa.

Os postulados básicos da teoria de transferência de massa foram definidos por Jeannot e Cantwell em 1996, como sendo:

1- A taxa de transferência de massa para interface ou a partir dela, em qualquer fase, será proporcional à diferença na concentração de solução e a concentração na interface. A constante de proporcionalidade é chamada de coeficiente de transferência de massa;

2- Há adsorção desprezível de moléculas de analito na própria interface. Em outras palavras, não haverá nenhum acúmulo ou decréscimo de analito na interface;

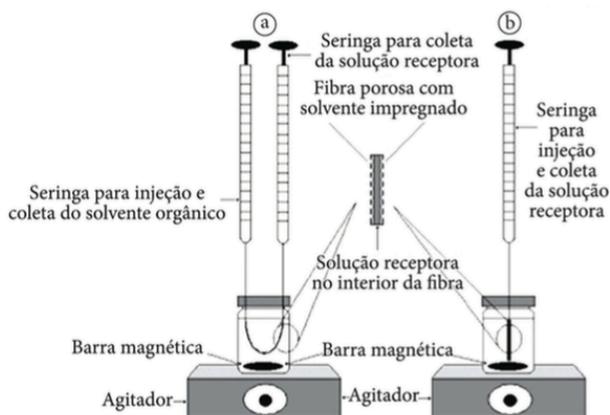
3- Não há resistência à transferência de massa na própria interface. Em outras palavras, o equilíbrio de distribuição irá prevalecer em todos os momentos em cada fase imediatamente adjacente à interface.

Com estes pressupostos básicos é possível formular modelos de transferência de massa gerais para os sistemas de duas e de três fases e adapta-los para circunstâncias específicas associadas com diferentes modos de SME.

2.1.3 Configurações para a HF-LPME

Existem duas configurações na utilização de membranas em microextração líquida (Figura 7). A configuração em haste que geralmente utiliza ponteiras de micropipetas encaixadas na extremidade não selada da membrana, para facilitar a colocação e retirada da solução. E também a configuração em forma de U, na qual duas microseringas são utilizadas durante a extração para posterior retirada da fase receptora.

Figura 7 - Diferentes Configurações para HF-LPME, sendo em forma de U (a) e em forma de haste (b).

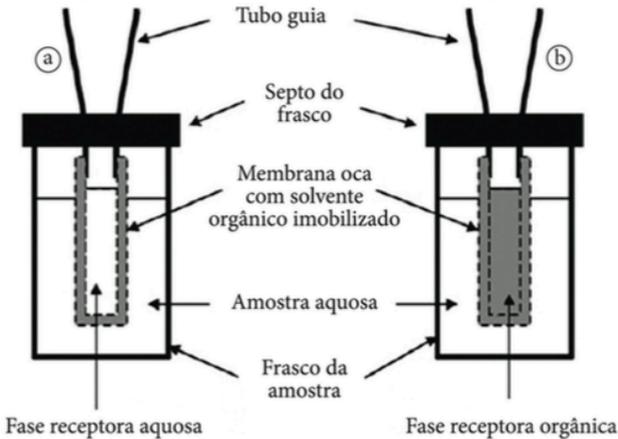


Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2008)

A forma básica da configuração também pode ser dividida em duas, podendo ser de duas ou três fases. Essa diferença classifica os modos de HF-LPME. De uma forma geral, a principal diferença entre as duas abordagens é a solução de extração contida no interior da membrana oca: no sistema de três fases, uma solução aquosa é utilizada como fase receptora e no sistema de duas fases, um solvente orgânico é utilizado como fase receptora (Sarafraz-Yazdi; Amiri, 2010).

Na Figura 8 estão representados esquemas dos constituintes de um dos sistemas de HF-LPME utilizados com três fases (A) e com suas fases (B). Para a extração, frascos devidamente vedados são utilizados e, no caso do esquema da Figura 7, pequenos tubos cônicos como guias – embora geralmente sejam utilizadas ponteiros de micropipetas – as quais facilitam a colocação e retirada da solução no interior da membrana oca com o auxílio de uma microseringa.

Figura 8 - Esquemas dos modos de extração utilizados em HF-LPME, sendo (a) de três fases e (b) de duas fases.



Fonte: Merib; Carasek (2013)

Em um sistema utilizando a configuração de duas fases, o analito é extraído de uma amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível com a água. Solvente este que é imobilizado nos poros da membrana oca para formar uma membrana líquida suportada (este mesmo solvente orgânico é utilizado no interior da membrana - fase receptora). O extrato final obtido no sistema de duas fases é uma fase orgânica compatível com técnicas analíticas tais como HPLC ou GC. A equação 6 relaciona a concentração de analito A no equilíbrio entre amostra ($A_{amostra}$) e fase extratora orgânica receptora ($A_{fase\ orgânica}$) para um sistema de HF-LPME com duas fases (Merib; Carasek, 2013).

$$A_{amostra} \rightleftharpoons A_{fase\ orgânica} \quad (6)$$

No sistema de HF-LPME com duas fases, os analitos são extraídos por difusão passiva da amostra aquosa (solução doadora) diretamente para a solução orgânica receptora, como mostrado na Equação 6. O processo de extração depende do coeficiente de partição entre a solução orgânica receptora e a solução doadora ($K_{r/d}$) conforme a equação:

$$K = \frac{C_{eq,r}}{C_{eq,d}} \quad (7)$$

onde $C_{eq,r}$ corresponde à concentração do analito no equilíbrio na solução receptora e $C_{eq,d}$ à concentração do analito no equilíbrio na solução doadora (Rasmussen; Pedersen-Bjergaard, 2004).

O sistema de HF-LPME com três fases foi originalmente desenvolvido por Pedersen-Bjergaard et al., e consiste em o analito ser extraído da amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imobilizado nos poros de uma membrana oca para uma nova fase aquosa contida no interior da fibra oca (fase receptora). A fase orgânica nesse caso funciona como uma barreira entre a solução receptora e a solução doadora, barreira esta que não permite a mistura dessas duas fases aquosas (Merib; Carasek, 2013). A fase receptora, por ser aquosa, é amplamente analisada por HPLC ou Eletroforese Capilar (Rasmussen; Pedersen-Bjergaard, 2004).

A Equação 8 relaciona a concentração de analito no equilíbrio entre a amostra ($A_{amostra}$), a fase orgânica extratora ($A_{fase\ orgânica}$) e fase aquosa receptora ($A_{fase\ receptora}$), para um sistema de HF-LPME com três fases.

$$A_{amostra} \rightleftharpoons A_{fase\ orgânica} \rightleftharpoons A_{fase\ receptora} \quad (8)$$

O pH é um parâmetro fundamental para sistemas trifásicos de HF-LPME, por isso será explicado com mais detalhes posteriormente. Nos sistemas utilizando três fases, os analitos são extraídos mediante difusão passiva da amostra aquosa (fase doadora), através do solvente orgânico imobilizado nos poros da membrana oca (fase orgânica) e posteriormente, pela fase receptora da amostra presente no interior da fibra. O processo geral de extração é afetado por ambos os coeficientes de partição entre a fase orgânica e a solução doadora ($K_{org/d}$) e entre a fase receptora e a fase orgânica ($K_{r/org}$).

$$K_{org/d} = \frac{C_{eq,org}}{C_{eq,r}} \quad (9)$$

$$K_{r/org} = \frac{C_{eq,r}}{C_{eq,org}} \quad (10)$$

Onde $C_{eq/org}$ corresponde à concentração do analito no equilíbrio na fase orgânica, $C_{eq/d}$ corresponde a concentração do analito no equilíbrio na solução doadora, $C_{eq/r}$ corresponde à concentração do analito no equilíbrio da solução receptora e K corresponde ao coeficiente de partição. O coeficiente de partição entre a fase receptora e a fase doadora ($K_{r/d}$) é calculado como o produto de $K_{org/d}$ e $K_{r/org}$ e deve ser considerado como a força motriz global para a extração.

$$K_{r/d} = \frac{C_{eq,r}}{C_{eq,d}} = K_{org/d} \cdot K_{r/org} \quad (11)$$

A adaptação do modelo geral de transferência de massa em sistemas de três fases para líquido-líquido-líquido (aquoso-orgânico-aquoso) é um pouco complicada pelo fato de que a condição de equilíbrio de massas pode necessitar a inclusão da substância a ser analisada, presente na fase intermediária (orgânica). A constante de distribuição a partir da fase doadora (amostra) para a fase orgânica é normalmente grande, porém a presença de uma concentração suficiente de ácido ou base forte perto da interface na fase receptora seria necessário. Ma e Cantwell desenvolveram um tratamento cinético rigoroso de tais sistemas com base em analogia com as reações homogêneas reversíveis de primeira ordem (Ma; Cantwell, 1998). Nos estudos, foi presumido o controle da taxa de transferência, estando do lado do doador, na interface das fases doadora-orgânica e do lado do orgânico na interface das fases orgânica-receptora, o que implica a importância em gerar convecção dentro da amostra para obter melhores taxas de extração (Kokosa; Przyjazny; Jeannot, 2009).

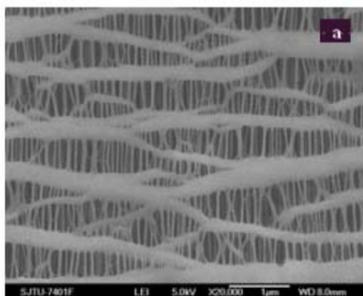
2.1.4 Parâmetros a serem otimizados em HF-LPME

Existem parâmetros que afetam a extração e variam de acordo com a técnica utilizada. Além das características inerentes do analito (coeficientes de ionização e partição) e da razão das fases receptoras e doadoras, outros parâmetros devem ser considerados e otimizados durante o desenvolvimento do método. Quando se utiliza HF-LPME, os principais parâmetros são: a escolha do tipo de membrana, o tempo de extração, o solvente orgânico a ser empregado na técnica, pH e da força iônica na solução da amostra (doadora), a agitação da amostra e os volumes e composição de solução doadora e receptora (Psillakis; Kalogerakis, 2003).

2.1.4.1 Escolha da membrana

As membranas capilares empregadas em LPME devem ser hidrofóbicas e compatíveis com solventes orgânicos utilizados, bem como apresentarem alta porosidade possibilitando a imobilização deste solvente. Esses pré-requisitos são cumpridos pelas membranas compostas de polipropileno e são disponíveis comercialmente (Oliveira, et al., 2008). As membranas comerciais (Figura 9) geralmente apresentam diâmetro interno de 600 μm , parede com espessura de 200 μm , oferecendo excelente estabilidade mecânica durante a extração e porosidade de 70% com tamanho de 0,2 μm de poros, o que fornece eficaz microfiltração, impedindo a passagem de macromoléculas, entre elas, proteínas (Andersen, 2002).

Figura 9 - Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura, magnificação de 20000x.



Fonte: Lu, Y. (2011).

2.1.4.2 Ajuste do pH

O ajuste do pH é um fator muito importante, pois resulta em uma maior razão de distribuição e garante elevados fatores de enriquecimentos e valores de recuperação do analito nos sistemas de HF-LPME utilizando três fases (Oliveira, et al., 2013).

O pH da fase doadora deve ser ajustado para manter os analitos na forma não ionizada, enquanto que o pH para a fase receptora deve ser ajustado a um valor em que os analitos permaneçam na forma ionizada. A diferença de pH entre as fases doadora e receptora é um dos principais parâmetros que podem promover a transferência dos analitos da fase doadora para o solvente orgânico imobilizado e, posteriormente, para a

fase receptora. Dessa forma, os valores de pH para a fase doadora e receptora são selecionados como sendo ligeiramente menores e maiores do que o valor do pKa dos analitos (Merib; Carasek, 2013).

Em um sistema de HF-LPME utilizando três fases, para assegurar a extração dos analitos para a fase aceptora e prevenir o seu retorno para a fase orgânica localizada nos poros da membrana, o pH da solução aceptora deve ser ajustado a valores que garantam a ionização dos analitos, dessa forma soluções receptoras básicas devem ser usadas para analitos ácidos e soluções receptoras ácidas devem ser usadas para analitos básicos (Kokosa; Przyjazny; Jeannot, 2009). Geralmente para analitos ácidos, o pH da amostra é ajustado entre 0,1 e 3,5, enquanto que para analitos básicos, o ajuste varia entre 10 e 14.

Além disso, em sistemas HF-LPME em três fases a eficiência da extração é dependente do equilíbrio entre os analitos a partir da fase doadora e o solvente orgânico, assim como aquela entre os analitos a partir do solvente orgânico e da fase receptora. Neste caso, é importante que o equilíbrio esteja deslocado para a fase receptora, para extrair os analitos para a fase desejada. (Bedendo; Jardim; Carasek, 2010)

2.1.4.3 Ajuste da Força Iônica

Dependendo da natureza dos analitos, a adição de sal à solução da amostra pode diminuir a sua solubilidade e melhorar a extração. Porém o efeito da adição de sais à matriz é complexo. O aumento da eficiência, particularmente para analitos mais polares e voláteis, pode ocorrer devido ao efeito denominado “salting-out”. (Psillakis; Kalogerakis, 2003). “Salting-out” é um termo em inglês que define o processo pelo qual substâncias solúveis em fase aquosa são excluídas da fase pela adição de sal. O resultado pode ser uma precipitação e consequentemente a formação de uma fase sólida, ou a separação dos analitos para uma segunda fase líquida, geralmente constituída de um ou mais solventes orgânicos. O fundamento deste feito consiste no aumento da força iônica da fase aquosa, que acarreta na diminuição da solubilidade de inúmeros compostos covalentes ou iônicos (Miller; Dykes Polesky, 1988). Neste processo, as moléculas de água da fase doadora passam a hidratar também os íons de sal adicionados, ocorrendo então a redução de moléculas do analito dissolvidos na solução aquosa, por mecanismos de competição. Por outro lado, a interação das moléculas do analito com os íons adicionados pode reduzir a difusão do analito para fase extratora (Shen; Lee, 2002). Além da dificuldade de

difusão, o aumento da viscosidade da matriz também pode reduzir a mobilidade dos analitos, prejudicando assim a extração. Por esses efeitos e suas singularidades, de acordo com analitos e matrizes diferenciadas é que temos a força iônica como um parâmetro a ser otimizado no preparo de amostra utilizando técnicas de microextração líquida assistida por membranas.

Trabalhos utilizando HF-LPME, confirmam uma melhor eficiência de extração com a adição de sal, entretanto, outros apresentam situações em que esta variável não tem efeito significativo na eficiência do processo de microextração (Psillakis; Kalogerakis, 2003).

Entre os sais mais empregados como aditivos na fase doadora, o cloreto de sódio é o mais comum.

2.1.4.4 Solvente Orgânico

A seleção do solvente orgânico é uma etapa fundamental na otimização de métodos em HF-LPME. Algumas propriedades são extremamente necessárias para que o solvente orgânico possa ser empregado na técnica. Dentre elas: baixa volatilidade, evitando perda da fase orgânica durante a extração; baixa solubilidade em água, prevenindo assim a dissolução da fase orgânica na fase doadora (amostra); alto grau de pureza, para não apresentar contaminantes ou impurezas que prejudiquem a análise; compatibilidade com a membrana oca utilizada – além de compatibilidade com a técnica de determinação analítica empregada; fácil impregnação nos poros da mesma e solubilidade adequada para os compostos de interesse (Oliveira, et al., 2013). Vários solventes orgânicos tem sido empregados na técnica, como éter diexílico, n-octanol, acetato de butila, acetato de hexila, acetato de dodecila, éter dibutílico e iso-octanol e outros, além de misturas de solventes orgânicos (Rasmussen; Pedersen-Bjergaard, 2004). Dentre os solventes, o 1-octanol, ciclohexano e tolueno tem se mostrado eficientes em um grande número de publicações para diferentes aplicações (Kolosa; Przyjazny; Jeannot, 2009).

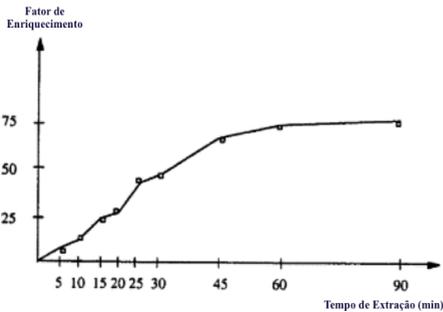
Pedersen-Bjergaard e Rasmussen de maneira muito interessante avaliaram o emprego de óleos vegetais como fases orgânicas em LPME. Todos os óleos testados foram compatíveis com urina, porém apenas o óleo de erva-doce forneceu bons resultados para análise de plasma. Com isso temos uma nova e potencial alternativa para as fases orgânicas, substituindo assim o uso de solventes prejudiciais (Pedersen-Bjergaard; Rasmussen, 2004).

2.1.4.5 Tempo de Extração

Como explanado anteriormente, a eficiência da extração nas técnicas de LPME dependem da transferência de massa do analito da fase aquosa para a fase orgânica – e desta para a fase aceptora, nos casos em sistemas trifásicos. Temos um processo de equilíbrio e portanto a recuperação do analito aumenta com o tempo até atingir uma situação de platô.

Em um primeiro trabalho realizado em 1999 por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, a quantidade de metanfetamina extraída em um sistema trifásico apresenta a situação de platô bem definida (Figura 10). A otimização utilizou a fibra oca impregnada com 1-octanol, 10^{-1} M de NaOH como solução doadora e 10^{-1} M como solução receptora.

Figura 10 - A pré-concentração de metanfetamina em função do tempo de extração.



Fonte: Adaptado de Pedersen-Bjergaard; Rasmussen (1999)

O tempo de extração é definido teoricamente como o tempo em que o sistema alcança o equilíbrio. Este tempo pode ser reduzido aumentando a área superficial de contato da fibra com a amostra. De forma geral, o tempo de extração depende de algumas características do analito, tais como massa molecular e volatilidade (Kolosa; Przyjazny; Jeannot, 2009 e Psillakis; Kalogerakis, 2003).

2.1.5 Aplicações recentes da HF-LPME

As técnicas de microextração em fase líquida estão ganhando cada vez mais espaço na comunidade científica, principalmente em virtude da utilização de uma quantidade reduzida de solventes. Essas

técnicas miniaturizadas têm ampla aplicabilidade, podendo ser utilizadas na quantificação de compostos ao nível de traços, tais como diversos contaminantes ambientais que possuem limites de concentração específicos para cada matriz nos quais podem ser encontrados (Merib, Carasek, 2013). Nesse sentido, a técnica HF-LPME apresenta vantagens em relação as outras técnicas de microextração em fase líquida, tais como a possibilidade de utilizar amostras mais complexas, as quais também possam conter certa quantidade de material particulado, possibilitando a análise de amostras aquosas em geral, solos, amostras biológicas como urina, plasma e cabelo, entre outras com alta complexidade.

Diversos trabalhos vêm sendo publicados utilizando a HF-LPME como técnica de extração em amostras biológicas. A Tabela 1 resume as mais importantes técnicas efetuadas em plasma, sangue total, urina e amostras aquosas.

Tabela 1 - Aplicações recentes da HF-LPME

Configuração	Matriz	Analito	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Sistema Analítico	Referência
HF-LPME (2 fases)	Plasma de ratos	Ostol	2	HPLC-F	Zhou et al., 2011.
HF-LPME (2 fases)	Plasma de ratos	Equinacósideo	2,0	HPLC-UV	Zhou et al., 2013.
HF-LPME (2 fases)	Amostra biológica	Mercúrio e Selênio	0,11-0,23	HPLC-IC-MS	Moreno et al., 2013.
HF-LPME (2 fases)	Plasma	Diazepam e Prazepam	10	GC-NPD	Rasmussen et al., 2000.
HF-LPME (2 fases)	Urina	THC-COOH	10-200	GC-MS	Kramer; Andrews, 2001.
HF-LPME (3 fases)	Urina e Plasma	Tramadol	0,08	GC-MS	Ghambarian et al., 2011.
HF-LPME (3 fases)	Amostras aquosas	Sulfonamidas	0,0003-0,033	HPLC-DAD HPLC-F	Payán et al., 2011.
HF-LPME (3 fases)	Plasma	Varfarina	5	HPLC-UV	Hadjmohammadi; Ghambari, 2012.
HF-LPME (3 fases)	Urina	Aminoácóois	80-500	CE-UV	Hou et al., 2002.
HF-LPME (3 fases)	Plasma e Sangue	Acetato de dodecila	1,8E6	HPLC-MS	Pedersen-Bjergaard, 2005.
HF-LPME (3 fases)	Urina	Esteróides anabolizantes	2	CG-MS	Leinonen, 2006.

Fonte: Autoria própria (2015)

Algumas variações das configurações originais da HF-LPME têm sido propostas. A microextração com fibra oca em membrana

líquida renovável (HF-RLM, do inglês *hollow fiber renewal liquid membrane*) é baseada em uma modificação da membrana líquida suportada (SML) utilizando um solvente extrator na amostra. Com esse solvente extrator, temos uma solução com alta razão entre a fase aquosa e o solvente orgânico, o qual é colocado em agitação do lado de fora da membrana oca. Devido à força de cisalhamento causado pela agitação da amostra, temos a formação de uma película fina de solvente orgânico formando uma membrana líquida. Ao mesmo tempo, as microgotas de solvente orgânico presente na amostra aumentam a área de contato entre o solvente extrator e a amostra. De forma simultânea, as microgotas são reintroduzidas no filme de solvente, renovando a membrana líquida (Merib; Carasek, 2013).

Essa variação de configuração com membrana líquida renovável foi aplicada para análises de sulfonamidas em amostras de mel com separação/deteção por LC-MS/MS. Neste trabalho foi utilizado uma mistura de 1-octanol:1-pentanol (55:45 v/v) como solvente extrator, sendo acrescentado diretamente na amostra além de um sistema trifásico tendo como fase receptora uma solução tamponada de carbonato, pH 10. As condições foram otimizadas quanto ao tempo de extração, pH da solução receptora e doadora, tipos de solvente extrator e força iônica da solução. Resultados satisfatórios em relação aos parâmetros analíticos de mérito foram obtidos, como limites de deteção dos analitos variando entre 5,1-27,4 mg kg⁻¹ e coeficientes de correlação superiores a 0,987. Estudos de repetibilidade e precisão intermediária foram realizados, apresentando 15 e 13% respectivamente, bem como a utilização do tempo de extração relativamente curto (Bedendo; Jardim; Carasek, 2010).

2.2 Analitos Estudados

Os fármacos pela sua tradição não são vistos como potenciais poluentes ambientais. Porém, com as constatações recentes da presença deles em meios aquáticos, levantou uma grande questão devido a possíveis impactos. Além de seu uso e diversidades aumentarem a cada ano, as moléculas são altamente ativas, o que agrava ainda mais o problema. Contaminantes prioritários, como pesticidas, metais tóxicos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos agrupam uma enorme quantidade de métodos de quantificação desenvolvidos, porém uma preocupação com contaminantes emergentes em amostras ambientais vêm crescendo. Estes compostos emergentes são citados como agentes

de diagnóstico, surfactantes, fragrâncias, aditivos industriais, fármacos, produtos de cuidado pessoal, esteroides entre outros (Mozaz; Lopez; Barceló, 2007).

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos para a determinação algumas sulfonamidas (Figura 11) em amostras de água de açude. Na determinação destes compostos é requerida a etapa de preparo de amostra antes da análise, por isso foram desenvolvidas metodologias utilizando a técnica HF-LPME.

2.2.1 Sulfonamidas

A problemática de alimentos e amostras ambientais contaminadas por medicamentos veterinários é de grande preocupação (Sarmah; Meyer; Boxall, 2006). Estudos tem se intensificado para detecção de antibióticos nos alimentos de origem animal, de leite, mel, de peixe, bem como de amostras ambientais. De acordo com avaliações realizadas em 2010 (Cháfer-Pericás; Maquieira; Punchades, 2010), sulfonamidas (SAs) e fluoroquinolonas estão entre os antibióticos veterinários mais comumente usados. SAs são derivados do ácido sulfanílico (ácido p-aminobenzeno) e são uma das classes mais antigas de drogas antimicrobianas, os quais foram utilizados para o tratamento de seres humanos e animais a partir do meio do século XX.

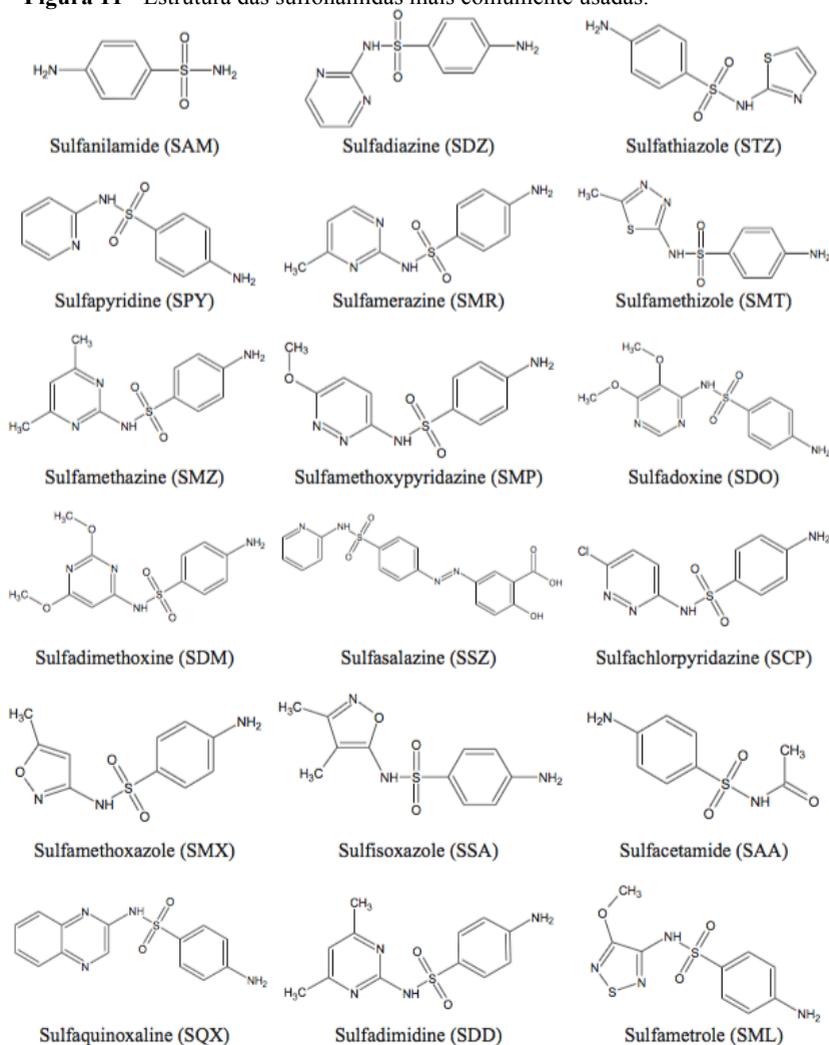
SAs atuam como agentes bactericida e possuem atividade quimioterapêutica contra infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas e alguns protozoários (agentes causadores da malária, toxoplasmose, etc). O precursor das SAs é sulfanilamida (p-aminobenzenesulfonamida), mais conhecido com o nome comercial de *streptocid*, o qual foi sintetizado pela primeira vez em 1908 e foi amplamente utilizado como um intermediário na produção de corantes. As propriedades antibacterianas das SAs foram descobertas em 1935 por G. Domagk (Baran; Adamek; Ziemianska; Sobczak. Hazard, 2011).

Até o momento, mais de 10.000 derivados sulfanilamida foram sintetizados, e 40 deles são aplicados em práticas médicas e veterinárias. As estruturas das sulfonamidas mais comumente usadas estão representadas na Figura 11, sendo utilizadas para o desenvolvimento da metodologia de análise as seguintes: Sulfadiazina (SDZ, do inglês *sulfadiazine*), Sulfatiazol (STZ, do inglês *sulfathiazole*), Sulfamerazina (SMR, do inglês *sulfamerazine*), Sulfametoxazol (SMX, do inglês *sulfamethoxazole*) e Sulfametoxipiridazina (SMP, do inglês

sulfamethoxyipyridazine). Seus respectivos pKas estão apresentados na Tabela 2.

Todas as SAs são pós inodoros brancos, ou ligeiramente amarelados, e contém um gosto amargo. A maior parte destas substâncias é pouco solúvel ou praticamente insolúvel em água. As sulfonamidas em geral são levemente ácidas ou neutras.

Figura 11 - Estrutura das sulfonamidas mais comumente usadas.



Fonte: Dmitrienko, et al. (2014)

Figura 12 – Estrutura e distribuição das espécies de sulfadiazina (SDZ).

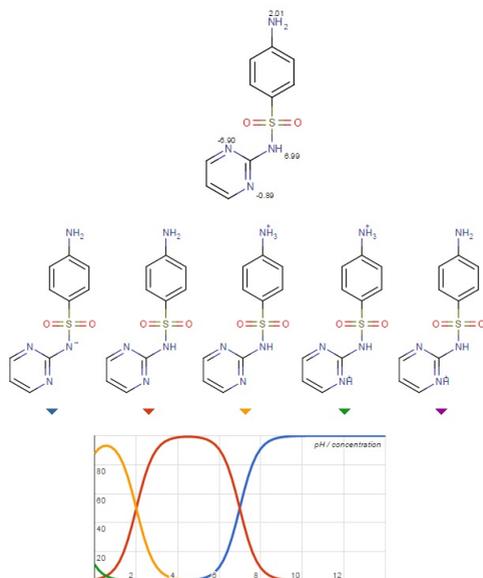


Figura 13 - Estrutura e distribuição das espécies de sulfatiazol (STZ).

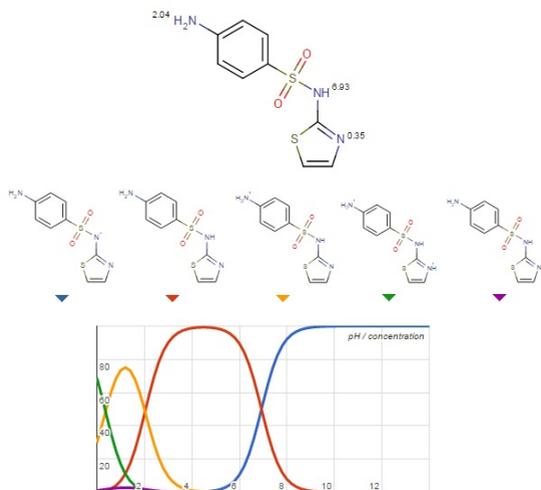


Figura 14 - Estrutura e distribuição das espécies de sulfamerazina (SMR).

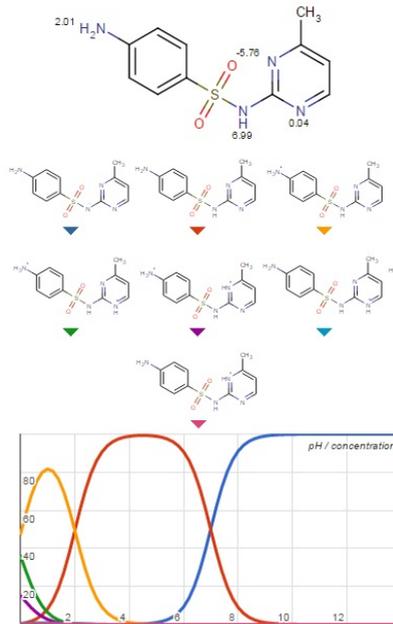


Figura 15 - Estrutura e distribuição das espécies de sulfametoxipiridazina (SMP).

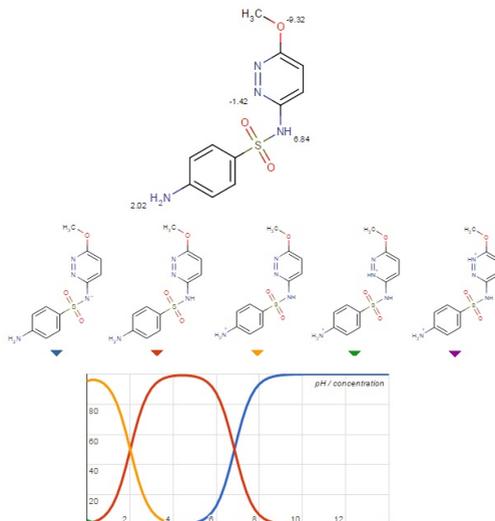


Figura 16 - Estrutura e distribuição das espécies de sulfametoxazol (SMX).

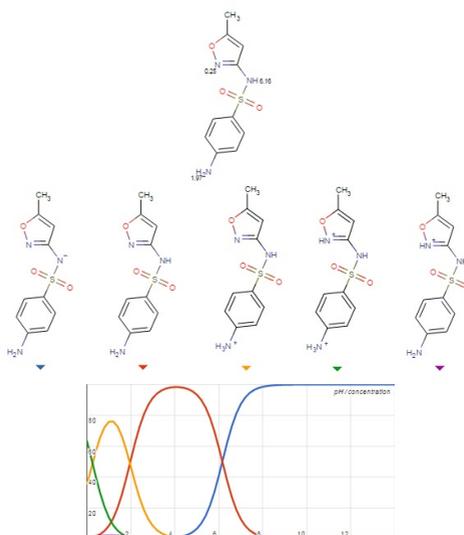


Tabela 2 - Valores de pKa das espécies em solução aquosa para os analitos quantificados na metodologia desenvolvida.

Analito	Valor do pKa
SDZ	6,99
STZ	6,93
SMR	6,98
SMP	6,84
SMX	6,16

Fonte: Chemicalize.org (acessado em 2015)

A alta eficiência de SAs e seu custo relativamente baixo têm estimulado o seu uso onipresente em práticas veterinárias. SAs são usados em medicina veterinária, em formulações puros ou em combinação com outros antibióticos, não só para combater doenças

infeciosas, mas como aditivos para rações para animais. Seu uso visa promover o crescimento e aumento na produtividade das aves de capoeira e gado, apesar do fato da utilização de antibióticos para este fim ser proibida em várias partes do mundo.

Como resultado de má conduta na profilaxia e no tratamento de animais ou devido à não conformidade com tempos de espera antes do abate, os traços de drogas SAs podem estar presente em alimentos. Sendo assim, cada ser humano torna-se um consumidor passivo desses fármacos, a partir de carne, laticínios, ovos e mel. A ingestão humana sistemática das SAs é perigosa, podendo ter efeitos adversos como reações alérgicas, supressão de atividade da enzima, alteração da microflora intestinal e promoção de formas sustentáveis de patógenos (Dmitrienko, et al., 2014). É importante também salientar que certos produtos da decomposição de SAs podem ser ativos e potencialmente mais tóxicos do que os compostos parentais (García-Galán, et al., 2008).

Anualmente, mais de 20.000 toneladas de SAs entram no meio ambiente em todo o mundo, sendo a principal fonte de contaminação os dejetos de suínos e bovinos (García-Galán, et al., 2009). A excreção se dá principalmente renal por filtração e secreção. Para algumas sulfonamidas, 20 a 30% da dose excretada está na forma de fármaco ativo; no caso da trimotoprima – nome comercial do Sulfametoxazol (SMX) – cerca de 50 a 60% da dose inicial submetida ao animal é eliminada em 24 horas, sendo 80% em forma inalterada (Cribb et al., 1996).

O Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em conjunto, estabeleceram na Resolução RDC nº 53 de 2 de outubro de 2012 o Regulamento Técnico do Mercosul para Limites Máximos de Resíduos (LMR) para Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. O Limite é apresentado em $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ para matrizes de fígado, rim, músculo e leite em alimentos de origem bovina, suína e aves.

Para Resíduos em água não há resolução, porém publicações recentes da U.S. Environmental Protection Agency (EPA) apresentam as sulfonamidas como contaminantes emergentes que causam preocupação. Isso por estarem em quantidades significativas em amostras ambientais, tais como águas residuais farmacêuticas e agrícolas, águas superficiais, subterrâneas e solos. O documento 1694 de dezembro de 2007 – Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS – apresenta uma série de métodos para análises de sulfonamidas. Dessa forma, a tendência atual é o

estabelecimento de limites máximos de sulfonamidas em matrizes aquosas.

2.3 Otimização e Validação de Parâmetros de Métodos Analíticos

2.3.1 Otimização Multivariada

Otimização consiste em melhorar o desempenho de um sistema, um processo, ou de um produto de modo a obter o máximo benefício. O termo otimização tem sido comumente usado em análise química como um meio de descobrir as condições em um determinado processo que produzam as melhores respostas (Araujo; Brereton, 1996).

Tradicionalmente, a otimização dos métodos são realizadas de forma univariada, ou seja, monitorando a influência de um fator por vez. Dessa forma, apenas uma das variáveis estudadas é alterada mantendo-se constante as demais. Essa forma de otimização apresenta desvantagens como a realização de um número maior de experimentos além de não analisar a resposta da influência das interações entre as variáveis estudadas (Bezerra et al., 2008).

A fim de superar este problema, a otimização de procedimentos analíticos tem sido realizada por meio de técnicas de estatística multivariada. Entre as técnicas multivariadas mais relevantes utilizadas na otimização de metodologia analítica destaca-se a de superfície de resposta (RSM, do inglês *Resposnse Surface Methodology*).

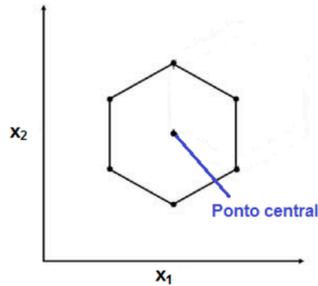
A metodologia de superfície de resposta é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas baseadas no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais, que deve descrever o comportamento de um conjunto de dados com o objetivo de fazer previsões estatísticas quando uma resposta ou um conjunto de respostas de interesse são influenciadas por diversas variáveis. O objetivo é, simultaneamente, otimizar os níveis dessas variáveis para atingir o melhor desempenho do sistema (Bezerra et al., 2008).

Para a construção de superfícies de resposta, diversos tipos de planejamentos multivariados podem ser utilizados, como: planejamento fatorial, planejamento Box-Behnken, planejamento Doehlert e planejamento composto central.

2.3.1.1 Planejamento Doehlet

O planejamento Doehlet é utilizado para suas variáveis, sendo três (3) níveis para variável X_1 e cinco (5) níveis para a variável X_2 .

Figura 17 - Planejamento Doehlet.

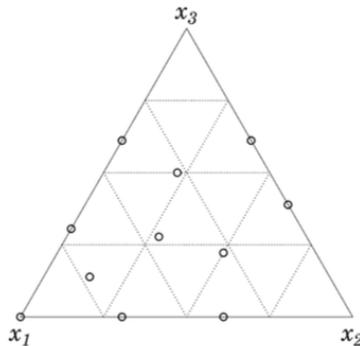


Fonte: Teófilo *et al.* (2006).

2.3.1.2 Superfície Triangular

Outro planejamento muito utilizado é a superfície triangular na otimização de misturas de solventes.

Figura 18 - Planejamento de superfície triangular.



Fonte: de Barros Neto. (2010).

Após a otimização o método analítico é validado baseado em alguns parâmetros de mérito. A “single-laboratory method validation” é a validação mais desenvolvida por laboratórios de pesquisa e utilizada em casos em que uma validação total não é necessária (IUPAC, 2002). De forma geral, em métodos desenvolvidos, são considerados: limites de detecção e quantificação, faixa linear, coeficiente de correlação linear (r^2), ensaios de recuperação e precisão. Para o limite de quantificação, o primeiro ponto da curva analítica pode ser considerado e para o limite de detecção, 3 vezes inferior ao de quantificação. Os valores dos coeficientes de correlação linear devem ser no mínimo 0,9 e a precisão associada < 20% (Çabuk, H. et al, 2012). Os experimentos de recuperação avaliam a exatidão e devem apresentar valores entre 70 e 120 % porém, podem ser aceitos valores fora desse intervalo desde sejam precisos (SANCO, 2013).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e aplicar um método analítico baseado na microextração em fase líquida suportada com membrana oca (HF-LPME) para determinação de sulfonamidas em amostras de águas superficiais.

3.2 Objetivos Específicos

Desenvolver um método em HPLC-DAD para a quantificação de sulfadiazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametoxazol e sulfametoxipiridazina.

Determinar as melhores condições de extração para a técnica de microextração em fase líquida suportada com membrana oca (HF-LPME), configuração trifásica e em haste, otimizando todas as variáveis significativas;

Determinar e avaliar os principais parâmetros analíticos de mérito como limites de detecção e quantificação, coeficientes de correlação linear e recuperação e precisão.

Aplicar o procedimento HF-LPME otimizado para amostras de águas superficiais coletadas no município de Gaspar, Santa Catarina;

4. Procedimento Experimental

4.1 Reagentes Químicos e Materiais

Soluções estoque individuais, com concentração de 500 mg L^{-1} de sulfadizina (SDZ), sulfametaxazol (SMX), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR) e sulfametoxipiridazina (SMP) foram preparadas utilizando padrões disponíveis em laboratório. A partir dessa solução, foram elaboradas soluções de trabalho em metanol:água (50:50) na concentração de 10 mg L^{-1} as quais foram utilizadas para a fortificação das amostras nos experimentos de otimização e validação do método.

Na avaliação da força iônica (efeito salting-out) da amostra foram utilizados sulfato de amônio (Vetec, Brasil), cloreto de sódio (Vetec, Brasil) e fosfato de potássio monobásico anidro (Sigma, USA). Para avaliar o solvente de recobrimento e o solvente extrator foram utilizados octanol (Sigma, USA), tolueno (Tedia, USA) e pentanol (Sigma Aldrich, USA). Nas extrações foram empregados frascos com tampas em volumes de 20 mL (Supelco, EUA). Para a fabricação da urina sintética foram utilizados 0,33 M de uréia, 0,12 M de cloreto de sódio (Vetec, Brasil), 0,016 M de difosfato potássico (Vetec, Brasil), 0,007 M de creatina (INP, Brasil) e 0,004 M de monofosfato de sódico (Vetec, Brasil) segundo referência (Haglock-Adler, et al., 2014).

4.2 Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido modelo LC 20AT (Shimadzu, Japão) equipado com detector DAD modelo SPD-M20A, com injetor manual, modelo Rheodyne 7725i (Rohnert Park, EUA) e loop de injeção de 20 μL . A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa com uma coluna C18 (Phenomenex Kinetex, 250 mm x 4,6 mm d.i. 5 μm de espessura de filme) (Torrance, EUA). Entre o injetor e a coluna foi utilizada uma coluna de guarda C18 (Phenomenex Kinetex, 2 mm x 4,6 mm d.i. 2 μm de espessura de filme) (Torrance, EUA). Também foram empregados volume de injeção de 20 μL e vazão de fase móvel de 1 mL min^{-1} . O modo escolhido foi a eluição por gradiente e a fase móvel utilizada foi (A) metanol e (B) água acidificada (0,1% ácido acético) em $\text{pH} \approx 3,5$. Os comprimentos de onda máximo escolhidos foram 267, 289, 267, 265, 269 nm para SDZ, STZ, SMR, SMP, SMX, respectivamente.

4.3 Preparo das fibras de polipropileno

Para os experimentos, hastes de 4 cm de comprimento de fibras de polipropileno (PP) foram cortadas e seladas em uma das extremidades. Com a fibra sendo submetida à chama da vela, o polipropileno se funde, sendo facilmente moldado com o auxílio da pinça. Após o resfriamento a membrana, já com a extremidade selada, pode ser preenchida com a fase receptora.

As fibras, depois de preparadas, foram armazenadas em um frasco contendo acetona até a sua utilização na extração conforme demonstrado na Figura 13.

Figura 19 - Preparo das fibras de polipropileno para utilização em HF-LPME trifásica.



Fonte: Autoria própria (2015)

4.4 Otimização da técnica de HF-LPME para determinação de sulfonamidas em amostras aquosas.

A otimização dos parâmetros que afetam a extração das sulfonamidas por HF-LPME foi realizada por experimentos multivariados em uma concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos em água ultra-pura.

Para a otimização da adição de sal, foram utilizados sulfato de amônio, cloreto de sódio e fosfato de potássio monobásico ambos em quantidades pouco abaixo da sua saturação em água conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Planejamento utilizado para a otimização da adição de sal na extração de sulfonamidas em amostras aquosas por HF-LPME.

Sal	Solubilidade dos sais em 25 °C (g/100 m de água)	Quantidade utilizada (g)
Sulfato de amônio	76,9	10
Cloreto de sódio	35,9	5
Fosfato de Potássio monobásico	22,2	3

Fonte: Autoria própria (2015)

Além dos diferentes sais, é necessário otimizar a quantidade de sal adicionada. Para isso foram realizados 9 experimentos em planejamento Doehlet, entre eles uma triplicata conforme descrito na Tabela 4 em que foram avaliados o tempo de extração (30-120 minutos) e a quantidade de sal adicionada (0-11,2 g).

Tabela 4 - Planejamento Doehlet para a otimização da quantidade de sal e do tempo de extração.

Experimentos	Sal (g)	Tempo (min)
1	5,6	120
2	11,2	95
3	5,6	30
4	0	50
5	0	95
6	11,2	50
7	5,6	75
8	5,6	75
9	5,6	75

Fonte: Autoria própria (2015)

Experimentos foram realizados para a escolha do solvente orgânico de recobrimento da fibra – formação da camada líquida extratora – utilizando 1-octanol, tolueno e 1-pentanol.

A adição de solvente extrator na fase doadora também foi avaliada, variando a utilização de 0, 30, 60 e 100 μL de octanol:pentanol (55:45).

Os resultados experimentais foram processados com auxílio dos programas computacionais como Statsoft Statistica 8.0 e Microsoft Excel considerando as áreas ou as médias geométricas das áreas dos cinco analitos.

4.5 Condição de extração otimizada para análise das amostras

A extração por HF-LPME foi realizada em um tempo de 60 minutos utilizando a fibra de polipropileno, previamente preparada. Volumes de 15 mL de amostra foram transferidos para frascos de 20 mL sendo submetidos às condições de extração previamente otimizadas. A amostra foi tamponada com acetato, pH 5,0 em concentração de 0,05 mol L⁻¹ e adicionada de 11,2 g de sulfato de amônio. O 1-octanol foi utilizado como solvente orgânico para o preenchimento da fibra e a fase

receptora aquosa tamponada com carbonato pH 10,0 em concentração $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

4.6 Avaliação dos parâmetros analíticos de mérito

Nestas etapas foi empregado o preparo de amostra otimizado. As figuras de mérito para avaliar a performance do método foram: limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão, exatidão, faixa linear e coeficiente de correlação linear (r^2). Os níveis de concentração das curvas analíticas foram preparados através da fortificação dos analitos em água ultra-pura e em amostras de urina sintética e na sequência extrações por HF-LPME foram executadas, seguido da análise por DAD-HPLC. Com base nas curvas analíticas foram estimados faixas lineares, LOD, LOQ e r^2 para o método proposto. O LOQ foi definido como o primeiro ponto da curva analítica e o LOD como três vezes menor do que o LOQ.

A precisão e a exatidão foram avaliadas através da fortificação de amostras aquosas, urina sintética e água superficial de açude. A precisão foi calculada como desvio padrão relativo (RSD), considerando valores precisos aqueles inferiores a 20%. A repetibilidade foi avaliada em três níveis de fortificação sendo a exatidão avaliada em termos de porcentagem de recuperação considerando valores bons entre 60 e 130%.

4.7 Aplicação do método desenvolvido

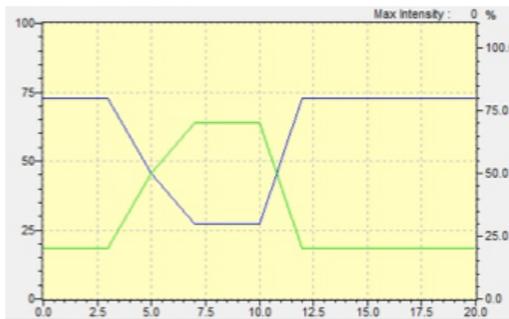
O método proposto neste estudo foi aplicado em amostras de água superficial de açude localizado em Gaspar - Santa Catarina ($26^{\circ}49'18.1''\text{S } 49^{\circ}01'32.0''\text{W}$). As amostras foram coletadas em frascos esterilizados e mantidos em temperatura controlada até a realização dos ensaios.

5. Resultados e Discussões

5.1 Condições Cromatográficas

Para iniciar os estudos de extração, as condições cromatográficas foram previamente otimizadas utilizando uma solução mista de 5 analitos de sulfonamidas. A fase móvel e seu gradiente foram determinados em razões entre metanol, acetonitrila e água acidificada. Porém as separações utilizando acetonitrila não foram eficientes, apresentando coeluição.

Figura 20 - Curva gradiente de solvente otimizado para estudos de extração. Fase móvel (A) Metanol (B) Água acidificada (ácido acético, pH 3,5).



Fonte: Autoria própria (2015)

Tabela 5 – Gradiente de solvente otimizado para estudos de extração.

Condição Tempo (min)	MeOH %	H ₂ O (acidificada) %
início	20	80
3-5	50	50
5-7	70	30
Mantém até 10 minutos	70	30
10-12	20	80
Mantém até 20 minutos	20	80

O gradiente do solvente (Figura 13) iniciou com (A) metanol e (B) água acidificada (0,1% ácido acético) em pH \approx 3,5 a 20:80 e manteve-se por 3 minutos. De 3 minutos até 5 minutos uma rampa foi aplicada até proporção 50:50 da fase móvel; de 5 minutos a 7 minutos

uma segunda rampa até 70:30 foi aplicada, mantendo até 10 minutos de corrida. A partir disso, até 12 minutos, a razão voltou a inicial (20:80) sendo reestabelecida e equilibrada até 20 minutos.

5.2 Testes iniciais

Bedendo et al. no ano de 2010 desenvolveram um estudo de extração de sulfonamidas em mel que utilizava a técnica de HF-LPME com configuração em “U” e membrana líquida renovável, ou seja, os poros da fibra de polipropileno não eram preenchidos previamente com solvente orgânico. Utilizando esse trabalho como ponto de partida, alguns parâmetros iniciais foram fixados de acordo com a referência, porém outros foram modificados para possibilitar o uso da técnica em configuração de haste. Os parâmetros iniciais fixados são apresentados na Tabela 5.

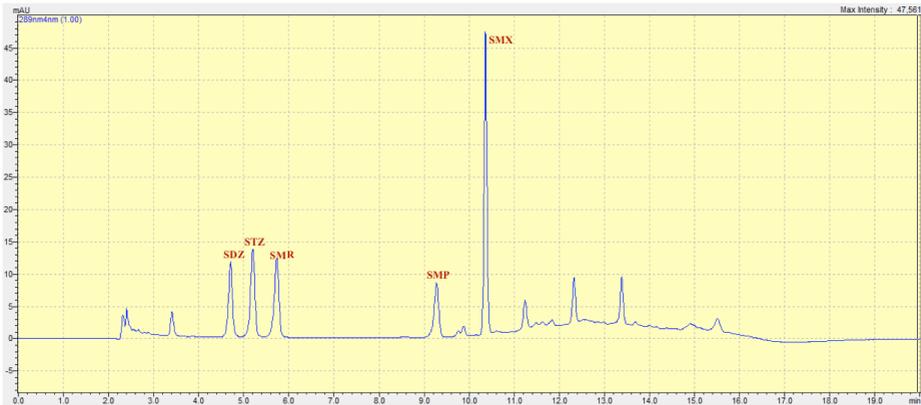
Tabela 6 - Parâmetros iniciais fixados para estudo da extração de sulfonamidas por HF-LPME

Parâmetros iniciais fixados
15 mL de amostra 10 g de sulfato de amônio Fase doadora: tampão pH 5,0 (acetato 0,05 mol/L) Fase receptora: tampão pH 10,0 (carbonato 0,05 mol/L) Aditivo na amostra: 30 µL de extrator (1-octanol:1-pentanol - 55:45) 4 cm de membrana de polipropileno (configuração em haste) Solução mista de sulfonamidas

Fonte: Autoria própria (2015)

Com a definição dos parâmetros iniciais, testes de extração foram realizados utilizando concentrações de 500, 250, 150 e 50 µg L⁻¹ da solução mix de sulfonamidas. Foi observada uma boa resposta nas extrações aquosas utilizando concentrações de 50 µg L⁻¹ e por isso, definido como concentração para realização dos estudos e otimizações.

Figura 21 - Cromatograma obtido após extração por HF-LPME nas condições iniciais fixadas com sulfonamidas à $50 \mu\text{gL}^{-1}$. Analitos: SDZ ($t_R = 5,4 \text{ min}$), STZ ($t_R = 6,2 \text{ min}$), SMR ($t_R = 7,5 \text{ min}$), SMP ($t_R = 10,2 \text{ min}$) e SMX ($t_R = 10,8 \text{ min}$).



Fonte: Autoria própria (2015)

O cromatograma demonstrado na Figura 15 consiste da extração utilizando os parâmetros iniciais fixados (Tabela 5) e a fibra de polipropileno contendo em seus poros octanol como solvente orgânico. O tempo de extração foi de 60 minutos.

Pequenas variações foram feitas para observar o comportamento inicial da extração. Dentre elas:

- Extração não utilizando os poros da fibra preenchidos e acrescentando um volume de $30 \mu\text{L}$ de solvente extrator na amostra (1-octanol:1-pentanol - 55:45);
- Utilização dos poros da fibra preenchidos com 1-octanol, porém sem alterar o pH dos meio doadora e receptora;
- Utilização de $100 \mu\text{L}$ uma mistura de solvente extrator e dispersor (DLME) metanol:1-octanol (1:10) adicionado na amostra (fase doadora).

No entanto, nenhum dos testes descritos acima apresentou boa eficiência de extração. Para alguns analitos, inclusive, não houve a possibilidade de integrar os picos encontrados e por isso não há uma forma de representar os resultados comparativamente.

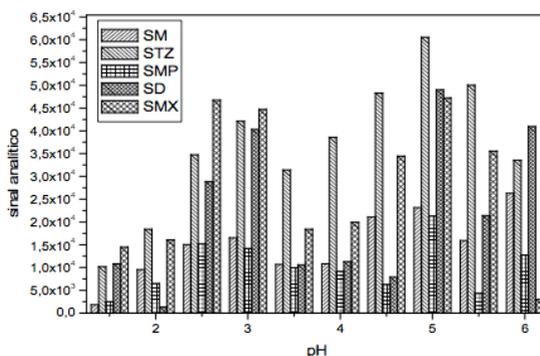
Os parâmetros da extração foram otimizados após os testes iniciais.

5.2.1 Fase extratora, fase receptora e a influência do pH

É conhecido que o pH da amostra exerce influência sobre a eficiência de extração dos analitos devido a possibilidade de ionização. Na metodologia proposta por HF-LPME os analitos devem necessariamente estar na forma molecular. Isso porque, em sua forma molecular, ocorre a interação com o solvente orgânico e, conseqüentemente, a extração. Dessa forma é necessário trabalhar com amostras tamponadas na fase doadora sempre abaixo do pKa dos analitos. Como as sulfonamidas são basicamente neutras, o meio da amostra deve ser no mínimo levemente ácido, assegurando a não ionização dos analitos.

Estudos realizados por *Bedendo et al.* em 2010 demonstrados na Figura 16 otimizaram o pH da fase doadora em extrações de sulfonamidas. Embora haja diferença nas condições experimentais, as conclusões apontam resultados promissores na utilização do pH 5,0 (tampão acetato 0,05 mol L⁻¹). Em meio mais ácido pode ocorrer a protonação do grupo amino, reduzindo a interação com o solvente orgânico, enquanto em pH mais altos pode ocorrer a desprotonação do grupo.

Figura 22 - Estudo do pH da amostra. Condições experimentais: 300 µL de 1-octanol; 10 g de sulfato de amônio; 10 mL de tampão com pH variando de 1,5 a 6,0; 250 µg/Kg Padrão de sulfonamida e 0,5 g de amostra de mel. Fase receptora: 100 µL de tampão carbonato em pH 10,0 (os analitos SM e SD são respectivamente SMR e SDZ na sigla adotada).



Fonte: Bedendo et al. (2010)

Como discutido anteriormente, o sistema de três fases utilizado em HF-LPME está sob influência do equilíbrio entre o analito na fase doadora-solvente e analito-solvente-fase receptora. Neste caso, o deslocamento do equilíbrio no sentido da fase receptora implica no aumento da eficiência da extração. Logo, a fase receptora apresenta grande importância, uma vez que esta armazena o analito. Para isso é necessário uma fase receptora com pH duas unidades acima do pKa dos analitos estudados (Tabela 2) de modo a promover a ionização do analito na interface analito-solvente-fase receptora e garantir a permanência do mesmo na fase devido a falta de interação do analito com o solvente orgânico. Utilizando uma fase receptora em pH 10 é garantida a ionização dos analitos. Dessa forma o pH da fase doadora foi definido em 5,0 com a utilização de tampão acetato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e o pH da fase receptora, definido em 10,0 com tampão carbonato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$).

5.2.2 Solvente Orgânico

O solvente orgânico para o método proposto utilizado na membrana líquida suportada deve ter polaridade similar as sulfonamidas, de modo a obter um elevado coeficiente de partição.

Testes foram realizados para confirmar a importância da presença do solvente orgânico também nos poros da fibra e não somente na amostra como aditivo. O cromatogramas (Figura 18) confirmam a ineficiência da extração na ausência da membrana líquida suportada (SLM) quando comparado com a utilização da SLM. Os picos dos analitos SDZ, STZ, SMR, SMP e SMX podem ser observados respectivamente a partir dos 5 minutos de corrida.

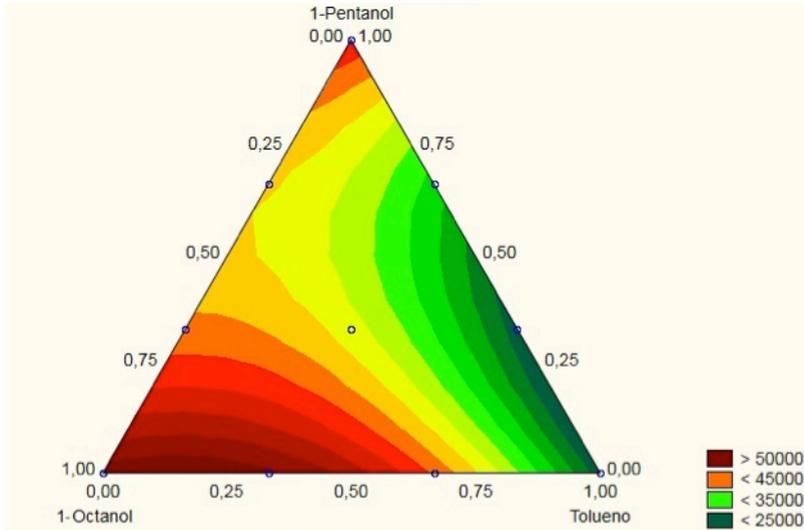
Figura 23 – Cronomatogramas resposta de extração com a utilização da SLM (cromatograma abaixo) e na ausência da SLM (cromatograma acima).



Fonte: Autoria própria (2015)

Para os estudos da SLM o efeito de três solventes foram analisados, entre eles 1-octanol e 1-pentanol, devido à polaridade relativa aos analitos e tolueno. Os resultados foram avaliados por superfície triangular (Figura 19) na qual os mesmos foram avaliados individualmente, em misturas binárias com 33% e 67% (v/v) de cada solvente e em misturas ternárias contendo 33% de cada solvente.

Figura 24 - Superfície resposta triangular obtida a partir da extração com os solventes: tolueno, 1-octanol e 1-pentanol. Condições: volume de amostra de 15 mL tamponada em pH 5,0 com tampão acetato, 10 g sulfato de amônio, 30 μL de solvente extrator octanol:pentanol (45:55), tempo de extração 60 minutos e 50 μgL^{-1} de solução mista de sulfonamidas. Fase receptora: tampão carbonato em pH 10,0.



Fonte: Autoria própria (2015)

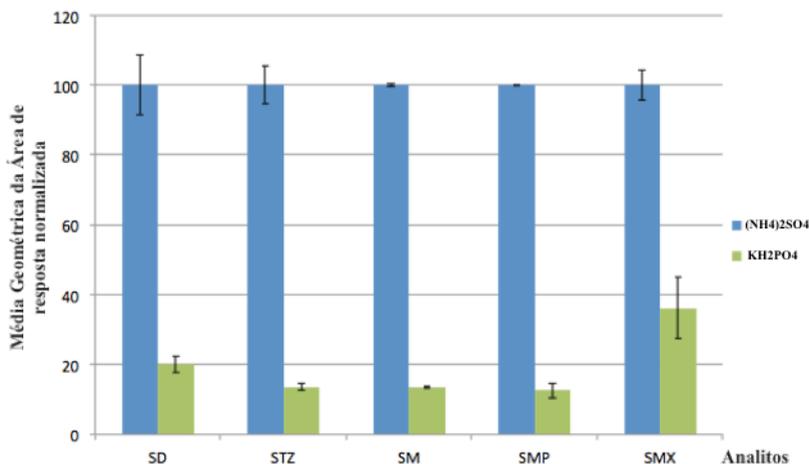
A superfície resposta triangular apresentou melhores resultados com os solventes orgânicos puros, naqueles com maior similaridade de polaridade com os analitos. As melhores respostas foram obtidas nas misturas contendo maiores quantidades de 1-octanol. A utilização de 25 % de tolueno em 1-octanol apresentou resultados tão bons quanto os obtidos com o 1-octanol puro. Por considerar os efeitos toxicológicos do tolueno, ficou definida a sua não utilização ($\text{LD } 50_{\text{tolueno}} > \text{LD } 50_{\text{octanol}}$).

5.2.3 Força iônica e tempo de extração

5.2.3.1 Testes iniciais do efeito da força iônica

Inicialmente foi realizado um estudo para verificar o efeito da adição de sal na solução mista de padrões em água. O efeito “salting out”, faz com que as moléculas de água hidratam preferencialmente os íons provenientes de sal, liberando dessa forma os analitos para que estes sejam extraídos pelo solvente orgânico. Os sais de sulfato de amônio, cloreto de sódio e fosfato de potássio monobásico anidro foram testados, sendo adicionados à amostra em quantidades um pouco abaixo da saturação da solução. Os resultados estão apresentados na Figura 20.

Figura 25 - Estudo do ajuste da força iônica utilizando 3 g de KH_2PO_4 , 10 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Condições: volume de amostra de 15 mL, 30 μL de solvente extrator octanol:pentanol (45:55), tempo de extração 60 minutos, 10 mL de tampão acetato e $50 \mu\text{gL}^{-1}$ de solução mista de sulfonamidas. Fase receptora: tampão carbonato em pH 10,0.



Fonte: Autoria própria (2015)

O gráfico de barras (Figura 20), apresenta em porcentagem (%) normalizada, a média das triplicatas de respostas obtidas para os sais sulfato de amônio e fosfato de potássio monibásico. As extrações utilizando cloreto de sódio não apresentaram bons resultados de extração, sendo difícil até mesmo a realização da integração dos picos no cromatograma, e dessa forma, não foi comparada com os outros sais.

O sal de fosfato de potássio monobásico apresentou bons resultados porém o sulfato de amônio mostrou efeito mais significativo

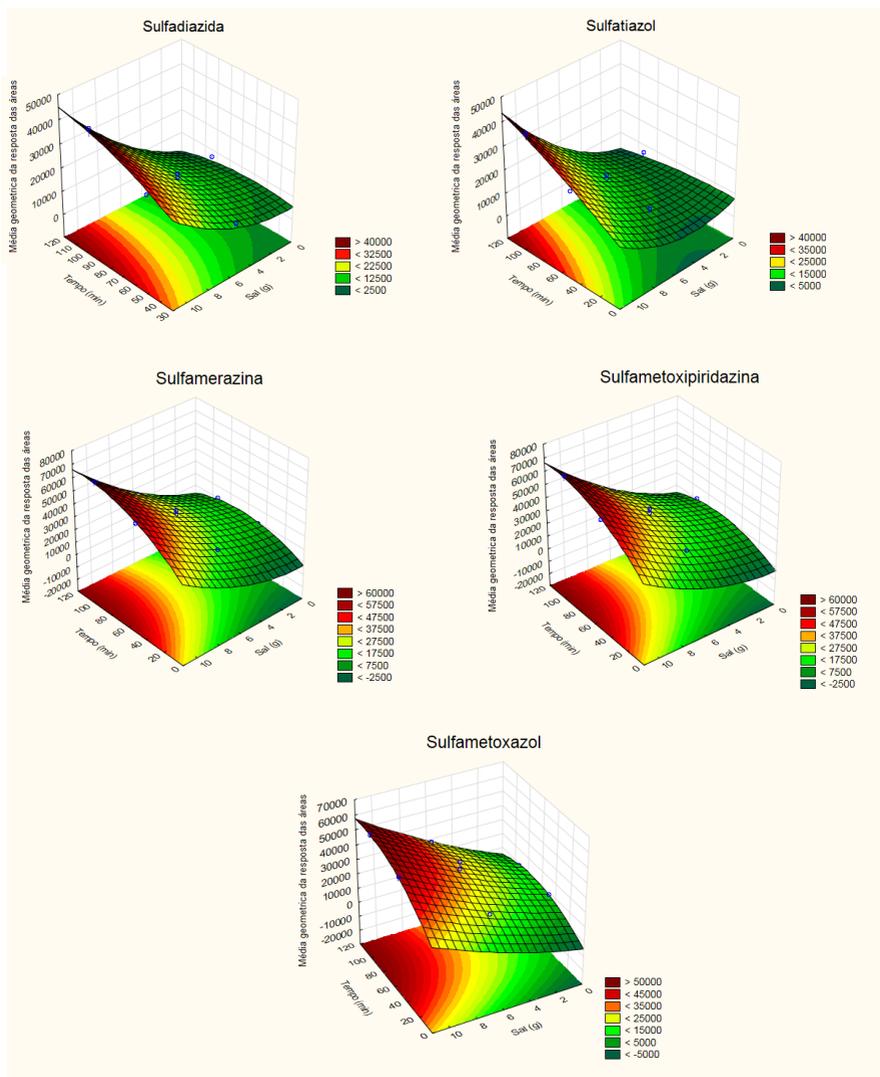
na extração. Uma possível explicação é a alta solubilidade do sal, o que promove um aumento considerável na força iônica da solução.

5.2.3.2 Otimização da força iônica e tempo de extração

Para esta otimização foram realizados 9 experimentos em planejamento composto central, entre eles uma triplicata, conforme descrito na Tabela 4, em que foram avaliados o tempo de extração (30 a 120 minutos) e a quantidade de sal adicionada (0 a 11,2 g – considerando de 0 a 97,5 % de saturação).

Foram obtidas superfícies de resposta individuais para os analitos (Figura 21), onde é possível observar o acréscimo ou decréscimo da eficiência de extração com a variação dos experimentos.

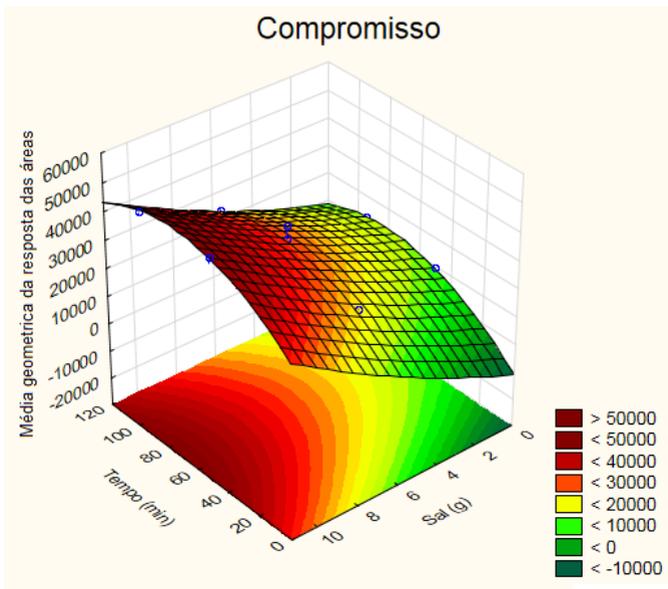
Figura 26 - Superfície de resposta para os analitos na otimização da força iônica e do tempo de extração. Condições fixas: volume de amostra de 15 mL, 30 μL de solvente extrator octanol:pentanol (45:55), 10 mL de tampão acetato e 50 μgL^{-1} de solução mista de sulfonamidas. Fase receptora: tampão carbonato em pH 10,0.



Fonte: Autoria própria (2015)

Com as 5 superfícies individuais, utilizando a média geométrica das respostas dos analitos, é possível obter uma superfície de resposta compromisso para a extração, apresentada na Figura 22.

Figura 27 - Superfície de resposta compromisso para os analitos na otimização da força iônica e do tempo de extração. Condições fixas: volume de amostra de 15 mL, 30 uL de solvente extrator octanol:pentanol (45:55), 10 mL de tampão acetato e 50 ppb solução mista de sulfonamidas. Fase receptora: tampão carbonato em pH 10,0.



Fonte: Autoria própria (2015)

Com a superfície resposta de compromisso podemos observar resultados ótimos com a utilização de 11,2 g de sulfato de amônio (97,5% de sal) e 60 minutos de extração.

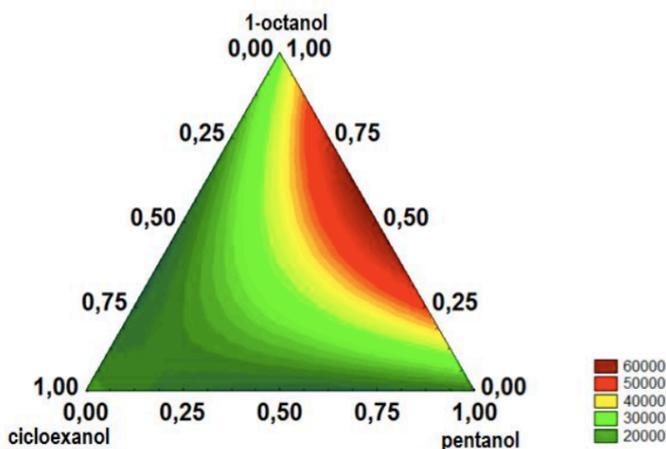
5.2.4 Solvente Orgânico Coextrator

É conhecido que solventes extratores adicionados na amostra (fase doadora) melhoram a eficiência da extração. Porém, quando

utilizado a fibra de polipropileno como suporte para a membrana líquida, esta adição de solvente orgânico pode não influenciar na extração. Para verificar a influência desse aditivo, experimentos foram realizados.

Recorrendo à literatura para a escolha do solvente extrator adicionado, foi determinado a utilização de 1-octanol:1-pentanol (55:45), de acordo com a Figura 23, referência de *Bedendo et al* (2010).

Figura 28 - Estudo para a seleção do solvente de extração. Condições experimentais: 300 μ L de solvente, 11,15 g de sulfato de amônio, 10 mL de tampão acetato pH 5,0, 250 μ g/Kg de padrão de cada sulfonamida e 0,5 g de amostras de mel orgânico. Fase receptora: tampão carbonato pH 10,0.



Fonte: Bedendo et al. (2010)

Para otimizar o volume de solvente extrator adicionado na amostra, experimentos foram realizados de acordo com a Tabela 6, em triplicata:

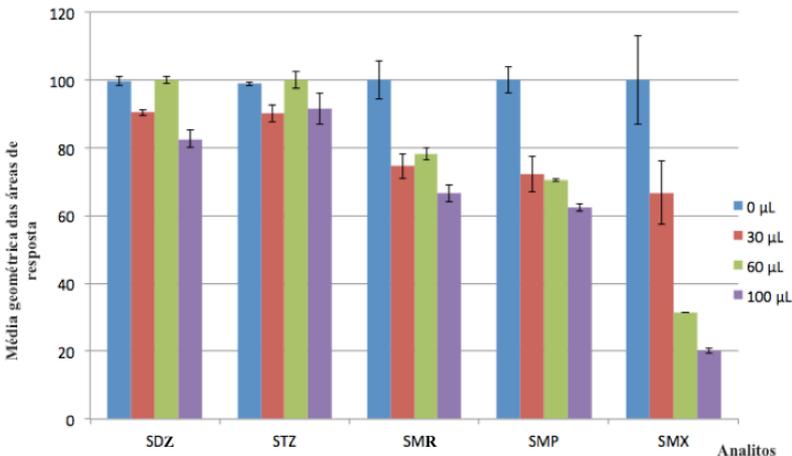
Tabela 7 - Volumes utilizados de 1-octanol e 1-pentanol para estudo de utilização de solvente orgânico coextrator.

Volume final de solvente extrator (μL)	Volume de 1-octanol (μL)	Volume de 1-pentanol (μL)
0	0	0
30	16,5	13,5
60	33,0	27,0
100	55	45

Fonte: Autoria própria (2015)

Com os resultados experimentais foi possível a elaboração de um gráfico de barras (Figura 24) comparando a adição de diferentes volumes do solvente extrator. Para os analitos SDZ e STZ a adição não apresentou alteração, enquanto para SMR, SMP e SMX a eficiência diminuiu.

Figura 29 - Comparação entre a adição de diferentes volumes do solvente extrator 1-octanol: 1-pentanol (55:45) para a extração de sulfonamidas, utilizando HF-LPME.



Fonte: Autoria própria (2015)

Após a verificação da não necessidade do solvente extrator, as otimizações foram encerradas. Sendo as condições finais otimizadas: pH da fase doadora 5,0 e fase receptora 10, 11,2 g de sulfato de amônio na amostra (97,5 % de saturação), 60 minutos de extração e 1-octanol como solvente orgânico para preenchimento dos poros da fibra de polipropileno.

5.3 Avaliação de parâmetros analíticos de mérito.

Após a otimização dos parâmetros para extração das sulfonamidas o método foi avaliado através das principais figuras de mérito para amostra aquosa sendo obtido a Tabela 7.

Tabela 7 - Faixa linear, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação obtidos para o método proposto com HF-LPME para determinar sulfonamidas em amostra aquosa.

Analito	LOD (μgL^{-1})	LOQ (μgL^{-1})	Faixa Linear (μgL^{-1})	Curva Analítica	r^2	RSD ^a (%)	RSD ^b (%)
SDZ	0,7	2,0	2-100	$y = 1010x - 88,341$	0,9985	4,3	6,9
STZ	0,7	2,0	2-100	$y = 1034,1x - 1002,7$	0,9948	4,8	5,3
SMR	0,7	2,0	2-100	$y = 1956x - 1754$	0,9964	7,8	8,2
SMP	0,7	2,0	2-50	$y = 1929,1x - 76,574$	0,9986	1,2	2,6
SMX	0,7	2,0	2-50	$y = 4094,5x + 1250,9$	0,9991	4,0	12,8

Condições HF-LPME otimizadas. (Fonte: Autoria Própria, 2015)

^a RSD – 2 μgL^{-1} (n=3).

^b RSD – 35 μgL^{-1} (n=3).

Inicialmente a amostra foi analisada na curva aquosa e não foi elaborada uma nova curva com adição do analito na água superficial. Isso porque queríamos verificar se a matriz traria interferências significativas. Com a aplicação de uma curva aquosa geral, também facilitamos o uso do método desenvolvido para análises de rotina. Os resultados são apresentados no tópico seguinte, 5.5 Análise das Amostras, em que pode ser observado a interferência da matriz na quantificação através da curva aquosa. Para minimizar o efeito, uma curva na matriz foi proposta, tendo seus principais parâmetros de mérito apresentados na tabela abaixo.

Tabela 9 - Faixa linear, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação obtidos para o método proposto com HF-LPME para determinar sulfonamidas em água superficial através de uma curva na matriz.

Analito	LOD (μgL^{-1})	LOQ (μgL^{-1})	Faixa Linear (μgL^{-1})	Curva Analítica	r^2	RSD ^a (%)	RSD ^b (%)
SD	1,6	5	5-100	$y = 554,69x - 40,252$	0,998	1,2	0,8
STZ	1,6	5	5-100	$y = 492,69x + 1155,6$	0,997	8,0	0,5
SM	1,6	5	5-100	$y = 910,99x + 89,223$	0,999	0,8	3,7
SMP	1,6	5	5-100	$y = 768,47x + 133,15$	0,998	2,8	5,8
SMX	1,6	5	5-100	$y = 1109,8x - 314,7$	0,998	12,5	16,2

Condições HF-LPME otimizadas. (Fonte: Autoria Própria, 2015)

^a RSD – $5 \mu\text{gL}^{-1}$ (n=3).

^b RSD – $100 \mu\text{gL}^{-1}$ (n=3).

5.4 Comparação do método proposto com outros da literatura

Ao comparar o método proposto para a extração de sulfonamidas, com métodos referenciados na literatura, é possível observar que a técnica utilizando HF-LPME apresenta um procedimento simples e em poucas etapas, baixo custo de operação e baixo consumo de solventes orgânicos, o que a caracteriza como uma técnica mais "verde". A Tabela 10 apresenta alguns artigos publicados utilizando diferentes modos de preparo de amostra e extração de sulfonamidas.

Tabela 10 - Comparação de trabalhos descritos na literatura empregando extração de sulfonamidas em amostras aquosas e análise química em HPLC.

Trabalho	Analitos	Faixa Linear (μgL^{-1})	Modo de extração	Modo de detecção
Este trabalho	SD, STZ, SMD, SMP, SMX	2 – 100 2 – 100 2 – 100 2 – 50 2 – 50	HF-LPME em configuração trifásica, 1-octanol nos poros da fibra e amostra tamponada em pH 5,0. Extração por 60 minutos e fase receptora retirada com micropipeta.	DAD
Han, J. <i>et al</i> , 2013.	SMZ SMT STZ	0,5 – 100 1 – 100 0,8 – 100	Preparo da amostra, 20 minutos na centrífuga seguindo de 12 horas em banho maria.	DAD
Flores, J. L. <i>et al</i> , 2007.	SA SMX STZ	15 – 1500* 55 – 1500* 66 – 1500* <small>*para injeções de 300 μL</small>	Filtração em microcoluna com posterior encaminhamento para fotoreator.	PIF
Zhi-Gang, X. <i>et al</i> , 2012.	SMR SMZ	10 – 200 10 – 200	Barra adsorviva com 30 mL de solvente orgânico por 10 minutos, retoevaporação e redissolução.	DAD
Liu, J. <i>et al</i> , 2010.	SMR SMZ STZ SDZ	10 – 10000 10 – 10000 10 – 10000 10 – 10000	Extração líquido-líquido com utilização múltiplas de vortex e adição de solventes orgânicos utilizando seringa plástica para recipiente de separação.	UV-Vis

(Fonte: Autoria Própria, 2015)

5.5 Análise das amostras

O método foi aplicado para controle ambiental de amostras de água superficial de açude. A fazenda, localizada no Vale do Itajaí, não utiliza antibióticos para tratamento animal, dessa forma, resíduos de sulfonamidas não deveriam ser encontrados nas amostras.

Inicialmente a amostra foi analisada na curva aquosa e os resultados de recuperação estão demonstrados na Tabela 11. A amostra de água superficial não apresentou sulfonamidas, confirmando o esperado.

Tabela 11 - Resultados de recuperação para água superficial de açude, realizada em três níveis de fortificação.

Analito	Nível Fortificado (μgL^{-1})	REC (%)
SD	2	95,7
	5	112,4
	35	85,7
STZ	2	118,7
	5	88,1
	35	65,1
SM	2	117,3
	5	73,2
	35	63,6
SMP	2	90,0
	5	69,1
	35	71,5
SMX	2	61,4
	5	77,6
	35	68,8

(Fonte: Autoria Própria, 2015)

6. Conclusões

Os procedimentos de HF-LPME utilizando três fases, membrana líquida suportada de 1-octanol e variação do pH do interior da fibra para a fase doadora apresentaram bons resultados de extração de sulfonamidas. Os limites de quantificação e detecção apresentaram valores eficientes quando comparados com outras técnicas utilizando detecção por DAD ou UV-Vis. A faixa linear obtida também é satisfatória, isso por promover a utilização do método para análises de controle ambiental de rotina. O desvio padrão relativo (RSD) demonstrou baixos valores, o que confirma uma boa precisão do método proposto. Além disso, obteve-se boas repostas de recuperação utilizando amostras de água superficial sem a realização de curva com adição de analito e sem diluição da amostra. O que facilita a aplicação do método para águas superficiais geral, uma vez em que o método proposto é capaz de extrair os compostos de interesse de forma seletiva, não sendo grandemente influenciado por efeito de matriz.

7. Referências

ANASTAS, P.T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 167-175, 1999.

ANDERSEN, S., HALVORSEN, T. G., PEDERSEN-BJERGAARD, S., RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 963, p. 303-312, 2002.

ARAUJO, P. W., BRERETON, R. G. Experimental design II Optimization. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, p. 63, 1996.

ARTHUR, C. L., PAWLISZYN J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62 (19), p. 2145-2148, 1990.

ASENSIO-RAMOS, M., RAVELO-PÉREZ, L. M., GONZÁLEZ-CURBELO, M. A., HERNÁNDEZ-BORGES, J. Liquid phase microextraction applications in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218(42), p. 7415-7437, 2011.

BARAN, W., ADAMEK, E., ZIEMIAŃSKA, J., SOBCZAK, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. **Journal of Hazardous Materials**, v. 196, p. 1-15, 2011.

BEDENDO, G. C., JARDIM, I. C. S. F., CARASEK, E. A simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for analysis of sulfonamides in honey samples with determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6449-6454, 2010.

BEZERRA, M., A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

ÇABUK, H. et al. A simple solvent collection technique for a dispersive liquid-liquid microextraction of parabens from aqueous samples using low-density organic solvent. **Journal Separation Science**, v. 35, p. 2645-2652, 2012.

CHÁFER-PERICÁS, C., MAQUIEIRA, Á., PUCHADES, R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29 (9), p. 1038-1049, 2010.

CRIBB, A. E., LEE, B. L., TREPANIER, L. A., SPIELBERG, S. P. Adverse reactions to sulphonamide and sulphonamide-trimethoprim antimicrobials: Clinical syndromes and pathogenesis. **Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews**, v.15, p. 9-50, 1996.

CUSSLER, E. L. Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems, 2nd ed, **Cambridge University Press**, p. 111-121, 1997.

CUSSLER, E. L. Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems, 2nd ed, **Cambridge University Press**, p. 133-134, 1997.

DASGUPTA, P. K., LIU, H. Analytical Chemistry in a Drop. Solvent extraction in a Microdrop. **Analytical Chemistry**, v. 68(11), p. 1817-1821, 1996.

DE BARROS NETO, B. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. **Bookman**, p. 414, 2010.

DE JAGER, L. S., ANDREWS, A. R. Preliminary studies of a fast screening method for cocaine and cocaine metabolites in urine using hollow fibre membrane solvent microextraction (HFMSME). **Analyst**, v. 126 (8), p. 1298-1303, 2001.

DMITRIENKO, S. G., APYARI, K. V. V., TOLMACHEVA, V. T., ZOLOTOV, Y. A. Recent advances in samples preparation techniques and methods of sulfonamides detection – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 850, p. 6-25, 2014.

FENG, C. Y., KHULBE, K. C., MATSUURA, T., ISMAIL, A. F. Recent progresses in polymeric hollow fiber membrane preparation,

characterization and applications. **Separation and Purification Technology**, v. 111, p. 43-71, 2013.

FLORES, J. L., CORDOVA, M. L. F., DIAZ, A. M. Flow-through opto sensor combined with photochemically induced fluorescence for simultaneous determination of binary mixtures of sulfonamides in pharmaceuticals, milk and urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, p. 164-171, 2007.

FONTANALS, N., BARRI, T., BERGSTRÖM, S., JÖNSSON, J. Å. Determination of polybrominated diphenyl ethres at trace levels in environmental waters using hollow-fiber microporous membrane liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1133 (1-2), p.41-48, 2006.

GARCÍA-GALÁN, M. J., DÍAS-CRUZ, M. S., Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. **Trends in Analytical Chemistry**, v.27 (11), p. 1008- 1022, 2008.

GARCÍA-GALÁN, M. J., DÍAS-CRUZ, M. S., BARCELÓ, D. Combining chemical analysis and exotoxicity to determine environmental exposure and to assess risk from sulfonamides. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28 (6), pg. 804-819, 2009.

GHAMBARIAN, M., YAMINI, Y. ESRAFILI, A. Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction based on two immiscible organic solvents for determination of tramadol in urine and plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 1041-1045, 2011.

HADJOMAHAMMADI, M., GHAMBARI, H. Three-phase hollow fiber liquid phase microextraction of wartarin from human plasma and its determination by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, p. 44-49, 2012.

HAGLOCK-ADLER, C. J., HURLEY, A., STRATHMANN, F. G. Use of synthetic urine as a matrix substitute for standard and quality control materials in the clinical assessment of iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 47, p. 80-82, 2014.

HOU, L., LEE, H. K. Dynamic three-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 75(11), p. 2784-2789, 2003.

HOU, L., WEN, X., TU, C., LEE, H. K. Combination of liquid-phase microextraction and on-column stacking for trace analysis of amino alcohols by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 979, p. 163-169, 2002.

JEANNOT, M. A., CANTWELL, F. F. Solvent Microextraction into a single Drop. **Analytical Chemistry**, v. 68(13), p. 2236-2240, 1996.

JÖNSSON, J. Å., MATHIASSEN, L. Liquid membrane extraction in analytical sample preparation and enrichment in environmental and biological analysis. **Trends Analytical Chemistry**, v. 18 (5), p. 318-325, 1999.

JÖNSSON, J. Å., MATHIASSEN, L. Supported liquid membrane techniques for sample preparation and enrichment in environmental and biological analysis. **Trends Analytical Chemistry**, v. 11(3), p. 106-114, 1992.

KOKOSA, J. M., PRZYJAZNY, A., JEANNOT, M. A. Solvent Microextraction – Theory and Practice. **New Jersey: Wiley ed.** 2009

KRAMER, K. E., ANDREWS, A. R. J. Screening method for 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 760, p. 27-36, 2001.

KUURANNE, T., KOSTIAHO, T., PETERSEN-BJERGAARD, S., RASMUSSEN, K. E., LEINONEN, A., WESTWOOD, S., KOSTIANINEN, R. Feasibility of a liquid-phase microextraction sample clean-up and liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for selected anabolic steroid glucuronides in biological samples. **Journal Mass Spectrom.**, v. 38(1), p. 16-26, 2003.

LIU, J., JIANG, M., LI, G., LI, X., XIE, M. Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction of sulfonamides from diferente matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 679, p. 74-80, 2010.

LEINONEN, A., VUORENSOLA, K., LEPOLA, L. M., KUUNANNE, T., KOTIAHO, T., KETOLA, R. A., KSTIAINEN, R. Liquid-phase microextraction for sample preparation in analysis for sample preparation in analysis of unconjugated anabolic steroids in urine. **Analytical Chimica Acta**, v. 559 (2), p. 166-172, 2006.

MA, M., CANTWELL, F. F. Solvent microextraction with simultâneos back-extraction for sample cleanup and preconcentration: preconcentration into a single microdrop. **Analytical Chemistry**, v. 71 (2), p. 388-393, 1999.

MA, M., CANTWELL, F. F. Solvent microextraction with simultâneos back-extraction for sample cleanup and preconcentration: quantitative extraction. **Analytical Chemistry**, v. 70 (18), p. 3912-3919, 1998.

MERIB, J., CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v.5, p. 249-262, 2013.

MILLER, S. A., DYKES, D. D., POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from homan nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, v. 16 (3), p. 1215, 1988.

MORENO, F., GARCÍA-BARRETA, T. GÓMEZ-ARIZA, J. L. Simultaneous speciation and preconcentration of ultra trace concentrations of Mercury and selenium species in environmental and biological samples by hollow fiber liquid phase microextraction prior to high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1300:4350, 2013.

OLIVEIRA, A. R. M., CARDOSO, C. D., BONATO, P. S. Stereoselective determination of hydroxychloroquine and its metabolites in human urine by liquid-phase microextraction and CE. **Eletrophoresis**, v. 28, p. 1081-1091, 2007.

OLIVEIRA, A. R. M., MAGALHÃES, I. R. S., SANTANA, F. J. M., BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos de técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31 (3), p. 637-644, 2008.

PAYÁN, M. R., LÓPEZ, M. A. B., FERNÁNDEZ-TORRES, R., NAVARRO, M. V., MOCHÓN, M. A. Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) for a highly sensitive HPLC determination of sulfonamides and their main metabolites. **Journal of Chromatography B**, v. 879 (2), p. 197-204, 2011.

PEDERSEN-BJERGAARD, S., RASMUSSEN, K. E., BREKKE, A. HO, T. S., HALVORSEN, T. G. Liquid-phase microextraction of basic drugs selection of extraction mode based on computer calculated solubility data. **Journal of Separation Science**, v.11, p. 1195-203, 2005.

PEDERSEN-BJERGAARD, S., RASMUSSEN, K. E. Líquid-líquid-líquid microextraction for samples preparation of biological fluids prior to capillary eletrophoresis. **Analytical Chemistry**, v.71(14), p. 2650-2655, 1999.

PEDERSEN-BJERGAARD, S., RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction utilising plants oils as intermediate extraction médium-towards elimination of synthetic organic solventes in sample preparation. **Journal of Separation Science**, v. 17-18, p. 1511, 2004.

PEDERSEN-BJERGAARD, S., RASMUSSEN, K. E. Líquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1184(1-2), p. 132-142, 2008.

PSILLAKIS, E., KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 565-574, 2003.

PRZYJAZNY, A., KOKOSA, J. M. Analytical characteristics of the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in water by headspace solvente microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.977 (2), p. 143-153, 2002.

RASMUSSEN, K. E., PEDERSEN-BJERGAARD, S. Development in hollow fiber-based, liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v.23 (1), p. 1-10, 2004.

RASMUSSEN, K. E., PEDERSEN-BJERGAARD, S., KROGH M., UNGLAND, H. G., GRØNHAUG, T. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 873, p. 3-11, 2000.

Resolução RDC nº 53 de 2 de outubro de 2012 - Regulamento Técnico do Mercosul para Limites Máximos de Resíduos (LMR) para Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal.

REZAEI, M., ASSADI, Y., HOSSEIN, M. M., AGHAEI, E., AHMADIA, F., BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.1116(1-2), p. 1-9, 2006.

REZAEI, M. et al. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2342-2357, 2010.

SANCO/12571/2013, EUROPEAN COMMISSION: HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL: Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Belgium, 2013. 44p.

SARAFRAZ-YAZDI, A., AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, 2010.

SARMAH, A. K., MEYER, M. T., BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. **Chemosphere**, v. 65 (5), p. 725-759, 2006.

SHEN, G., LEE, H. K. Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. **Analytical Chemistry**, v. 74 (3), p. 648-654, 2002.

TEÓFILO, R. F., FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

VALENTE, A. L. P., AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, p. 523-530, 2000.

YASHIKI, M., KOJIMA, T., MIYAZAKI, T., NAGASAWA, N., IWASAKI, Y., HARA, K. Detection of amphetamines in urine using head space-solid phase microextraction and chemical ionization selected ion monitoring, **Forensic Science International**, v. 76 (3), p. 169-177, 1995.

ZHOU, J., ZENG, P., SUN, J. B., WANG, F. Q., ZHANG, Q. Application of two-phase hollow fiber liquid phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the study of the echinacoside pharmacokinetics in Parkinson's disease rat plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 81-82:27-33, 2013.

ZHI-GANG, X., ZHUO, D., YU-LING, H., YU-FEI, H., YING-PENG, P., GONG-KE, L. Preparation of trimethoprim molecularly imprinted stir bar sorptive extraction and its application for trace analysis of trimethoprim and sulfonamides in complex samples. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 40 (7), 2012.

ZHOU, J., ZENG, P., CHENG, Z. H., LIU, J., WANG, F. Q., QIAN, R. J. Application of hollow fiber liquid phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the study of the osthole pharmacokinetics in cerebral ischemia hypoperfusion rat plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 879 (23), p. 22304-2310, 2011.