

Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas

Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

*Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química
13083-970 Campinas (SP)*

Resumo

A extração em fase sólida (EFS), atualmente, é uma das técnicas mais utilizadas para extração e/ou concentração de amostras complexas, permitindo que analitos em concentrações muito baixas sejam detectados por métodos como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC). Este artigo tem o objetivo de discutir os fundamentos da EFS e apresentar novas estratégias de preparo de fases sólidas, desenvolvidas no Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida (LabCrom) do Instituto de Química da Unicamp, e suas aplicações. A fase sólida é preparada pela deposição de um polímero sobre suporte de sílica seguida de imobilização usando radiação gama ou microondas ou tratamento térmico. O método desenvolvido é uma aplicação da química verde, uma vez que não há resíduos tóxicos após o preparo.

Palavras-chave

Extração em fase sólida, fase sólida ou sorvente, preparação de amostra, cartuchos de extração em fase sólida preparados no laboratório

Abstract

Solid phase extraction (SPE) is nowadays a much used technique for extraction and/or concentration of complex samples, so that the analytes present in low concentration become detectable by methods such as high-performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC) and capillary electrophoresis (CE). This article aims to discuss the fundamental aspects of SPE and presents new strategies for preparation and application of the solid phases developed by the Laboratory for Research in Liquid Chromatography (LabCrom) of the Institute of Chemistry of Unicamp. The solid phases are prepared by depositing a polymer on the silica support followed by immobilization using gamma irradiation, microwave radiation or thermal treatment. The method is an application of green chemistry, since there are no toxic residues after the preparation.

Keywords

Solid phase extraction, solid phase or sorbent, sample preparation, lab-made solid-phase extraction cartridges

1 Introdução

Na maioria das análises químicas, sobretudo nas análises de resíduos, nas quais os analitos se encontram em nível de traços, $\mu\text{g kg}^{-1}$ a ng kg^{-1} ,¹ devido às concentrações serem muito baixas, os analitos apresentarem propriedades químicas distintas e a matriz ser complexa, faz-se necessária a realização de uma etapa prévia de preparo de amostra. Os principais objetivos do preparo de amostra são promover a extração e, muitas vezes, a concentração dos analitos de interesse e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes. Essa é a etapa mais onerosa e demorada envolvida no processo analítico, consumindo cerca de 80% do tempo total de análise, e pode introduzir erros, principalmente devido à perda do analito e à contaminação da amostra.²⁻⁴

Se os interferentes não forem eliminados, o resultado poderá ser falso. Em se tratando de determinações realizadas por meio do emprego de técnicas cromatográficas, como a cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou eletroforese capilar (CE), o preparo de amostra, além de evitar que interferentes da matriz coeluem com os compostos de interesse, é importante na remoção de interferentes para garantir a longevidade das colunas analíticas ou dos capilares e evitar limpezas constantes no sistema de injeção.⁵

A escolha adequada de uma técnica de preparo de amostra é um fator chave na obtenção de resultados confiáveis e exatos, portanto as seleções da técnica e das condições experimentais devem ser conduzidas cuidadosamente. Tal escolha depende da natureza da amostra, da matriz, das características do analito e da técnica analítica que será empregada na determinação, requerendo praticamente um desenvolvimento caso a caso.⁶ Considerando a matriz, devem ser analisados o seu estado físico (sólido, líquido ou gasoso), o tamanho da amostra pH, os conteúdos de matéria orgânica, gordura, pigmentos, proteínas, etc. e o pH. Quanto ao analito, devem-se analisar as suas propriedades físicas, suas propriedades químicas (massa molar, carga, polaridade, volatilidade, pKa), propriedades que permitam a sua detecção (absorção UV-Vis, fluorescência, eletroatividade) e sua concentração.

A escolha e a otimização de um método adequado de preparo de amostra não são fáceis, principalmente com matrizes altamente complexas como os fluidos biológicos (plasma, soro, sangue

total, liquor, urina, etc.) ou outras matrizes naturais como alimentos, extratos de plantas e amostras provenientes do meio ambiente. Idealmente, o método de preparo de amostra deve ser tão simples quanto possível, não somente porque reduz o tempo de análise, mas também porque um número grande de etapas aumenta a possibilidade de introdução de erros; seletivo, ou seja, conter o menor número possível de interferentes, proporcionando maior detectabilidade; rápido; empregar instrumentação de baixo custo; permitir a automação; incluir, quando necessário, uma etapa de concentração do analito a fim de obter uma concentração adequada para atingir o nível de detecção do instrumento utilizado e consumir quantidades mínimas de reagentes e solventes, atendendo a Química Verde. Esse termo foi usado a primeira vez em 1991 por Anastas⁷ em um programa especial lançado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US Environmental Protection Agency - EPA). Química Verde é uma abordagem às sínteses, aos processamentos e aos usos de produtos químicos que reduzem os riscos impostos à população e ao meio ambiente como um todo.⁸

2 Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos

A extração em fase sólida (EFS) foi introduzida em 1976⁹ para suprir as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido e, hoje, consiste no método mais popular de preparo de amostra, sendo utilizada pela maioria dos cromatografistas em análises de rotina. Possui um vasto campo de aplicação como análises de fármacos, alimentos e meio ambiente e nas áreas de bioquímica e de química orgânica. Essa técnica foi revisada por Hennion¹⁰ e por Fontanas *et al.*¹¹

As vantagens apresentadas pela EFS em comparação com a extração líquido-líquido clássica são: menor consumo de solvente orgânico, não formação de emulsões, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito, volumes reduzidos de resíduos tóxicos, capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito e disponibilidade comercial de muitos equipamentos e sorventes para EFS.⁶ A EFS apresenta como desvantagens o tempo elevado de análise, os altos custos dos cartuchos e dos dispositivos comerciais multivias (*manifolds*) e, eventualmente, a dificuldade em selecionar o sorvente adequado pa-

ra a aplicação desejada. Além disso, os cartuchos são utilizados uma única vez e, geralmente, há baixa reprodutibilidade de lote para lote de cartucho.¹²

Os principais objetivos da EFS são a remoção de interferentes da matriz, a concentração e o isolamento dos analitos. O fator de concentração é obtido pela razão entre o volume inicial de amostra aplicado no cartucho e o volume final de solução concentrada. A concentração pode ser aumentada por um fator de 100 a 5000, tornando possível a análise qualitativa e quantitativa a nível de traços.

As fases sólidas, ou sorventes empregados em EFS, são similares às utilizadas em cromatografia líquida em coluna, consequentemente, os mecanismos de separação também são similares. Os principais mecanismos são: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão. Esses mecanismos estão associados a processos químicos, físicos e mecânicos que atuam durante a separação. Dentre as principais forças químicas e físicas atuantes entre as moléculas do analito e do sorvente, destacam-se as ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido e interações iônicas.⁵

Na maioria das aplicações, os dispositivos de EFS mais empregados são os cartuchos nas formas de seringa ou barril, que serão descritos detalhadamente na próxima seção. Outro tipo de dispositivo é o disco de extração, nos quais as partículas ativas são imobilizadas em uma matriz inerte e estável de microfibras de politetrafluoretileno (PTFE) ou vidro. Um disco típico tem 47 mm de diâmetro interno e 0,5 mm de espessura, contendo 500 mg de sorvente. Os diâmetros disponíveis variam de 4 a 90 mm e são definidos segundo o volume da amostra. Os discos possuem vantagens, como ter leito mais homogêneo, requisitar pressões menores durante a aplicação da amostra e na eluição, com ausência de caminhos preferenciais e possibilidade de utilizar vazões mais altas e menores volumes de eluentes na remoção dos analitos. Outros formatos têm surgido recentemente com o intuito de melhorar o desempenho da EFS, principalmente facilitando a automação e diminuindo o tempo de análise, o que permite redução de custos por análise, maior flexibilidade, etc.. Uma dessas variações consiste em utilizar uma mistura de cartucho e disco. Nesse caso, o disco é colocado dentro de um cartucho de EFS, e o procedimento de análise é similar àquele usado para discos, possibilitando o uso dos dispositivos e sis-

temas de automação empregados para cartuchos convencionais.¹³ Ainda um outro formato, particularmente interessante quando análises rápidas são desejadas, uma vez que permite o uso de vazões bastante elevadas, é o cartucho contendo uma camada fina de partículas (as mesmas usadas em EFS convencional).¹³

Os avanços mais recentes em termos da técnica de EFS seguem a tendência no campo de preparo de amostra no sentido de redução de reagentes, solventes, quantidade de amostra e tempo de análise. Nesse contexto, tem-se a extração em fase sólida miniaturizada que utiliza placas que contêm 96 reservatórios (ou mais), cada um com uma coluna de EFS recheada com um disco ou com uma camada fina ou fazendo uso de ponteiros plásticos de pipetas contendo discos de EFS.^{13,14} As placas são de grande utilidade para a indústria farmacêutica e de biotecnologia, pois permitem a análise de um grande número de amostras simultaneamente, porém há grande facilidade de contaminação da amostra. As ponteiros de pipetas têm como principal vantagem a dificuldade de contaminação, uma vez que são descartáveis e também permitem um fluxo bidirecional do solvente e dispensam o uso de dispositivo a vácuo.¹³

A EFS pode ser conduzida nos modos *off-line* e *on-line*. No modo *off-line*, o processamento das amostras e a separação cromatográfica ou eletroforética são conduzidos separadamente. Após a etapa de pré-tratamento, a amostra é introduzida de modo convencional no sistema cromatográfico. O modo *off-line* é o mais utilizado em EFS. Atualmente, existem equipamentos comerciais para extrações múltiplas. Alguns deles fazem o processo de extração mecanicamente, porém a transferência da amostra para o injetor cromatográfico é manual, como nos sistemas *manifolds* (sistema mecanizado). No sistema *on-line*, o mesmo equipamento incorpora os dispositivos para extração, *clean-up* e eluição da amostra e o cromatógrafo (sendo o cromatógrafo a líquido o mais comum), resultando em uma operação sequencial e automatizada. Os sistemas *on-line* são extremamente convenientes para rotina analítica.

3 Procedimento de Extração em Fase Sólida

A EFS é uma técnica de separação líquido-sólido extensamente usada para extrair analitos semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas,

mas também pode ser usada para amostras sólidas pré-extraídas com solventes.¹² A EFS, na sua forma mais comum, emprega fases sólidas (FS) também denominadas de sorventes, recheadas em cartuchos, nas formas de barril ou seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna.^{5,14} Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40 a 60 μm de tamanho de partícula, fixado no tubo por meio de dois filtros de tamanho de poros de 20 μm . A amostra, contendo o analito de interesse, é colocada no topo do cartucho e aspirada com pequeno vácuo ou pressionada levemente com uma seringa ou gás, de forma a penetrar no cartucho. Contudo, não é fácil controlar a vazão e deve-se tomar cuidado para impedir que o material contido no cartucho seque antes da aplicação da amostra, pois pode ocorrer o problema de formação de caminhos preferenciais. Em geral, a EFS pode ser usada para três importantes propósitos: extração e/ou concentração do analito, isolamento da matriz e estocagem da amostra. Assim, o primeiro propósito refere-se aos analitos que ficam retidos na FS para posterior eluição, e o segundo, aos que são eluídos diretamente, enquanto as substâncias interferentes ficam retidas, sendo que, nesse caso, tem-se o *clean-up* da amostra e não a concentração do analito.

Em geral, os procedimentos de extração em fase sólida contêm quatro etapas: 1) condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; 2) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; 3) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito, etapa esta conhecida como lavagem com solvente ou *clean-up*; 4) eluição do analito.^{5,15} O solvente empregado no condicionamento dependerá do sorvente a ser ativado e da matriz a ser processada, optando-se por um solvente com características similares ao solvente no qual a amostra está dissolvida. O volume de amostra utilizado pode variar de alguns μL a mL. Para que se obtenha a eficiência máxima de extração, é necessário determinar o volume de *breakthrough*, VB, ou seja, o volume máximo de amostra que deve ser processado para que se obtenha a maior recuperação possível do analito. A velocidade de aplicação da amostra pode ser crítica em alguns casos, sendo determinada pela velocidade desejada para análise. Idealmente, essa etapa deve ser lenta, com va-

zão menor que 2 mL min^{-1} . Na etapa de *clean-up*, deve-se utilizar um solvente que tenha força suficiente para arrastar os interferentes, porém não os analitos. O solvente ideal é o próprio solvente da amostra, desde que ele não remova os analitos de interesse. Geralmente, a solução para a eluição dos interferentes contém menos solvente orgânico, menor concentração salina ou encontra-se em um pH ideal para eluição apenas dos interferentes. Para eluir o analito de interesse, deve-se utilizar um volume pequeno de eluente, de forma que a solução eluída já se encontre em concentração apropriada para análise; se isso não for possível, utilizar um solvente volátil para eluição, de modo que ele possa ser facilmente evaporado e o extrato ressuspenso em um volume pequeno de fase móvel. O eluente deve eluir os analitos de interesse, mas não permitir a eluição dos interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior, por estarem muito retidos no sorvente. O solvente de eluição deve ter maior força de eluição que o solvente usado na etapa anterior, *clean-up*, o que é obtido aumentando-se a quantidade de solvente orgânico ou a concentração salina ou ainda alterando-se o pH da solução de eluição. Na prática, observa-se que, de forma análoga à extração líquido-líquido, o uso de duas alíquotas do eluente, em vez de uma única em volume maior, aumenta a eficiência de extração.⁵ Na Figura 1, podem ser visualizadas as principais etapas envolvidas na EFS quando o objetivo é isolar e/ou concentrar o (s) analito(s) de interesse.

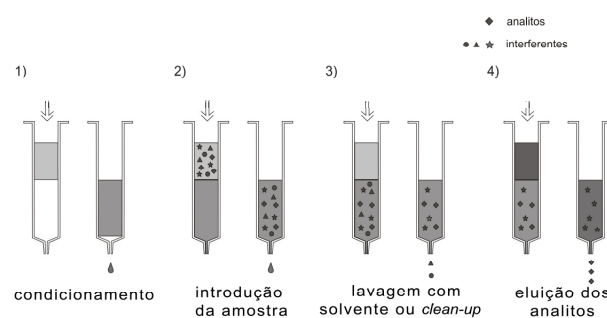


Figura 1 - Etapas da EFS no modo de concentração ou isolamento do(s) analito(s) de interesse.

4 Fases Sólidas ou Sorventes

Em geral, os materiais usados como fase

empregados em CLAE. A maioria dos sorventes disponíveis comercialmente baseia-se em grupos orgânicos, como C18, C8, C2, cicloexil, fenil, cianopropil, aminopropil (NH₂), ligados quimicamente à sílica.

Outros sorventes incluem as fases poliméricas, como o metacrilato entrecruzado, o copolímero poliestireno divinilbenzeno, que se destaca pela área superficial específica elevada (700 a 1200 m² g⁻¹), estabilidade na faixa de pH 1 – 14 e maior capacidade de retenção de compostos polares que as fases C18. As fases sólidas de carbono grafitizado caracterizam-se como materiais com resistência mecânica baixa, entretanto são altamente homogêneos, com área superficial específica baixa (100 – 200 m² g⁻¹), possuem estrutura cristalina e têm capacidade de atuar em EFS como fases reversas, com retenções superiores às obtidas com fases C18. Os sorventes de modo misto contêm em sua estrutura tanto cadeias alquílicas (fase reversa) como ligantes trocadores iônicos. Essas fases sólidas realizam, em uma única etapa, a extração e o *clean-up* de matrizes biológicas. Os analitos ionizados sofrem uma interação forte com os sítios iônicos, possibilitando que a etapa de limpeza seja eficiente e sem grandes perdas. Em um segundo momento, troca-se o solvente, com um pH que permita o rompimento das interações iônicas entre o analito e o sorvente. Como fases mais seletivas, têm-se os imunossorventes, as fases de polímeros impressos molecularmente, conhecidos como *MIP*, e as fases de acesso restrito (*RAM*). Os imunossorventes baseiam-se nas reações específicas entre antígeno e anticorpo, em um suporte sólido, como agarose ou sílica, usando o mesmo princípio da cromatografia por afinida-

de. Os *MIP* são obtidos por meio da preparação de polímeros com sítios de reconhecimento sintéticos e têm uma seletividade pré-determinada para um ou mais analitos. Tais sítios de reconhecimento são obtidos pelo arranjo de monômeros funcionais polimerizáveis ao redor das moléculas do analito. Dessa forma, são formados complexos, por meio da interação molecular, entre o analito e o monômero precursor. Os complexos são fixados por meio de reações de entrecruzamento de polímeros. A remoção do analito da matriz polimérica forma lacunas (sítios de reconhecimento) que irão exibir afinidade pelo analito. O potencial desse tipo de material é alto por oferecer resistência mecânica à temperatura e à pressão e por ser inerte em condições extremas de ácidos, bases, íons metálicos e solventes orgânicos.¹⁵

Os sorventes à base de sílica apresentam como desvantagem o fato de serem instáveis no intervalo 8 < pH < 2 e também por conterem os grupos silanóis residuais que podem reter irreversivelmente compostos básicos.¹²

A seleção da fase sólida em EFS segue, na maioria das vezes, as mesmas regras utilizadas para a escolha da fase estacionária em CLAE. O primeiro critério a ser considerado refere-se à estrutura química do analito, às propriedades do sorvente e à composição da matriz da amostra. Isso definirá o mecanismo a ser empregado e, conseqüentemente, ajudará na seleção da fase sólida. Uma fase sólida com seletividade ótima, ou seja, com capacidade de discriminar entre o analito e os outros componentes, é encontrada analisando os grupos funcionais do analito que não estão presentes na matriz da amostra e em outros interferentes. A Tabela 1 apresenta um guia geral para escolha

Tabela 1 - Guia geral para seleção de fase sólida e eluente, empregando amostras orgânicas contendo analitos com massas molares inferiores a aproximadamente 2000 daltons.¹⁶

Mecanismo	Sorvente	Tipo de Analito	Tipo de Matriz	Eluente do Analito
apolar (fase reversa) partição e adsorção	C18, C8, C2, cicloexil, fenil, cianopropil, polimérico	grupos funcionais apolares como alquílicas e aromáticos	soluções polares (tampão aquoso)	solventes polares como metanol, acetonitrila e água com pH ajustado
polar (fase normal) partição e adsorção	Sílica, diol, ciano, aminopropil, diamino	grupos funcionais polares como aminas e hidroxilas	solventes apolares, óleos	solventes apolares como hexano e diclorometano
troca catiônica	forte (ácido sulfônico) ou fraco (ácido carboxílico)	grupos funcionais carregados positivamente como aminas	aquosa, força iônica baixa	tampão como acetato, citrato e fosfato
troca aniônica	forte (tetra alquilamônio) ou fraco (amino)	grupos funcionais carregados negativamente como ácidos orgânicos	aquosa, força iônica baixa	tampão como fosfato e acetato

de uma fase sólida apropriada para analitos orgânicos com massas molares inferiores a aproximadamente 2000 daltons.¹⁶

Para facilitar essa seleção, na Figura 2¹⁶ encontra-se um esquema geral da seleção das fases sólidas e solventes para eluição de amostras contendo analitos com massas molares inferiores a 2000 daltons, para evitar efeitos de exclusão que possam bloquear os poros das fases sólidas. Os solventes recomendados para eluição devem ser considerados como uma primeira aproximação. A aplicabilidade de outros solventes ou misturas de solventes é determinada pela polaridade requerida para a separação. Inicialmente, as amostras são divididas em dois grandes grupos: as solúveis em água e as solúveis em solvente orgânico. As amostras solúveis em água são primeiramente divididas em iônicas e não iônicas. As amostras não iônicas solúveis em água são classificadas de acordo com a sua polaridade: apolar, moderadamente polar e polar. No caso de analitos apolares a escolha inicial de uma fase sólida recai nas fases reversas como C18, C8, C4, C2, cicloexil, fenil, cianopropil, e o solvente de eluição do analito deve apresentar características mais polares que a fase sólida, como acetonitrila, álcoois, diclorometano, etc.. Para analitos moderadamente polares, a fase sólida inicialmente escolhida deve ser polar, como a sílica, e o solvente de eluição do analito deve ser menos polar, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, álcoois e água. Em se tratando de analitos polares, a fase sólida selecionada será do tipo fase normal, em que a FS é mais polar que o solvente de eluição, como cianopropil, diol, aminopropil, diaminopropil e o solvente de eluição do analito menos polar, como clorofórmio, diclorometano, etc..⁵ As amostras iônicas solúveis em água são classificadas em catiônicas e aniônicas. Os analitos carregados positivamente são extraídos em FS trocadores catiônicos fortes (ácido sulfônico) ou fracos (ácido carboxílico). Os analitos carregados negativamente são extraídos em FS trocadores aniônicos fortes (tetra alquilamônio) ou fracos (amino). Os solventes de eluição para troca iônica são, geralmente, soluções ácidas, alcalinas ou tampão.

Os analitos solúveis em solvente orgânico também são classificados de acordo com a sua polaridade e seguem os mesmos critérios usados na seleção da FS para amostras solúveis em solventes aquosos.⁵

5 Desenvolvimento de Novas Fases Sólidas ou Sorventes

A maioria das fases sólidas empregadas é do tipo C18, quimicamente ligado, preparado a partir da reação da sílica com um reagente organossilano que será responsável pelas características da fase sólida. Apesar das inúmeras vantagens que a consolidaram mundialmente na preparação de fases estacionárias quimicamente ligadas para CLAE e também como fase sólida para EFS, esse tipo de reação apresenta desvantagens com relação ao custo dos reagentes organoclorossilanos, ao procedimento trabalhoso de síntese que envolve grandes quantidades de solventes tóxicos, atmosfera inerte, temperatura elevada e tempo longo de síntese.

Algumas alternativas promissoras para preparação de sorventes para EFS têm sido estudadas no meu grupo de pesquisa, baseadas no sucesso e na experiência adquirida em mais de uma década, no Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida (LabCrom) do Instituto de Química da Unicamp, na preparação de fases estacionárias para CLAE, que consistem na sorção de polisiloxanos sobre sílica. A descrição detalhada das fases estacionárias para CLAE pode ser encontrada nas revisões publicadas por Faria *et al.*^{17,18} e Collins *et al.*¹⁹

Nos estudos realizados por Jardim e colaboradores²⁰⁻³⁰, visando novas estratégias na preparação de sorventes, a reação química foi substituída pela deposição de um polímero sobre suporte de sílica seguido de imobilização por radiação gama, micro-ondas ou tratamento térmico.

A preparação da fase sólida *lab-made* consiste na ativação do suporte de sílica irregular, de tamanho de partículas de 0,040-0,063 mm (200-400 mesh) e tamanho de poro de 10 nm, em estufa sob temperaturas de 120 a 140 °C por 12 a 24 h. Uma quantidade adequada de sílica e de polímero são suspensos separadamente em solventes como n-pentano, clorofórmio ou diclorometano, dependendo da solubilidade do polímero, na proporção de 12 mL de solvente para 1 g de FS. A suspensão de sílica é adicionada à de polímero, lentamente, e essa mistura permanece sob agitação por 3h à temperatura ambiente, a fim de que o polímero se distribua uniformemente sobre o suporte. Após essa etapa, o solvente é evaporado lentamente à exaustão, à temperatura ambiente.

Após o preparo, o polímero é imobilizado

Solubilidade da amostra	solvente	Polaridade da amostra	Fase sólidas	Solventes para eluição dos analitos
Solúvel em água	não iônico — aquoso	apolar	Octadecil (C18) Octil (C8) Butil (C4) Dimetil (C2) Cicloexil (○) Fenil (⊙) Ciano (CN)	Hexano Diclorometano Acetonitrila Álcoois
		moderadamente polar	Sílica gel (SiO ₂) Florisil (Mg ₂ SiO ₃) Alumina (Al ₂ O ₃) Amino (NH ₂) Dimetilaminopropil	Clorofórmio Diclorometano Acetato de etila Álcoois Água
		polar	Ciano (CN) Diol (COH COH) Amino (NH ₂) Poliamida	Clorofórmio Diclorometano Acetato de etila Álcoois Água
	iônico — aquoso	catiônico	Ácido Carboxílico (COOH) Ácido Sulfônico (SO ₃ H)	Ácidos Tampão
		aniônico	Amina quaternária (N ⁺) Amino (NH ₂) Dimetilaminopropil	Bases Tampão
	Solúvel em solvente orgânico	aquoso — apolar		Octadecil (C18) Octil (C8) Butil (C4) Dimetil (C2) Cicloexil (○) Fenil (⊙) Ciano (CN)
orgânico — moderadamente polar			Sílica gel (SiO ₂) Florisil (Mg ₂ SiO ₃) Alumina (Al ₂ O ₃) Amino (NH ₂)	Clorofórmio Diclorometano Acetato de etila Álcoois
orgânico — polar			Ciano (CN) Diol (COH COH) Amino (NH ₂) Dimetilaminopropil	Clorofórmio Diclorometano Acetato de etila Álcoois

Figura 2 – Guia para seleção de fases sólidas e solventes de eluição de analitos com massas molares inferiores a 2000 daltons.¹⁶

por meio de radiação gama, tratamento térmico ou radiação micro-ondas para aumentar a estabilidade do polímero sobre o suporte, em doses ou temperaturas e tempos pré-determinados.

Os materiais imobilizados são submetidos ao processo de extração com solventes, a fim de eliminar o polímero que não tenha ficado aderido ao suporte cromatográfico. Para confecção dos cartuchos, 500 mg da FS preparada são colocadas em seringas de polipropileno de 5 mL e são retidos por dois filtros de polietileno de porosidade de 20 µm. As etapas de EFS, condicionamento, aplicação da amostra, *clean up* e eluição do analito são realizadas usando um *manifold* a vácuo de 12 vias, com solventes apropriados.

As FS são caracterizadas por termogravimetria, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e análise de teor de carbono. O desempenho da FS é avaliado por meio da extração de amostras, água Milli-Q e outras, fortificadas com padrões de agrotóxicos ou de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Para avaliar a eficiência da extração, calculam-se a porcentagem de recuperação (R) e a estimativa de desvio-padrão relativo (CV). Na Tabela 2, encontra-se um resumo das características e aplicações de to-

das as fases *lab-made* preparadas no LabCrom.

6 Considerações Finais

A EFS continua sendo o método mais popular empregado em análises de rotina para extrair e concentrar vários analitos presentes em amostras complexas.

O procedimento de deposição de um polímero sobre suporte de sílica seguido de imobilização por radiação gama, tratamento térmico ou radiação micro-ondas consiste em uma estratégia promissora para preparação de novos sorventes para EFS em substituição aos materiais quimicamente ligados, uma vez que é simples, demanda poucas etapas, utiliza reagentes menos tóxicos e disponíveis comercialmente, é reprodutível, seu custo final é significativamente menor que os cartuchos adquiridos comercialmente e, em comum com outros procedimentos de EFS, reduzem os resíduos tóxicos gerados.

Tabela 2 – Características e aplicações das fases sólidas *lab-made* preparadas no LabCrom

PMODS – poli (metiloctadecilsiloxano) PMS – poli(metilsiloxano) PMOS – poli(metiloctilsiloxano)

PMTDS – poli(metiltetradecilsiloxano)

PDMFS – poli (dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano) PMTFS – poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano) F=vazão

FS/polímero	Imobilização	Porcentagem de Carbono da FS(%)	Procedimento de EFS	Aplicação	Recuperação (%)	CV (%)	Referência
C18/ PMODS	irradiação gama (60 e 80 kGy)	12	Cond.: 10 mL de MeOH + 3 mL de H ₂ O Milli-Q Eluição: 1 mL de MeOH	determinação por CLAE dos agrotóxicos benomil, tebutiurum, simazina, atrazina, diurom e ametrina em água Milli-Q fortificada	73 - 103	< 16	Queiroz <i>et al.</i> ²⁰

Tabela 2 (continuação)

FS/polímero	Imobilização	Porcentagem de Carbono da FS(%)	Procedimento de EFS	Aplicação	Recuperação (%)	CV (%)	Referência
C18/PMODS	tratamento térmico-TT (120 °C por 4 h)	15	Cond.: 10 mL de MeOH + 5 mL de H ₂ O Milli-Q Lavagem: 5 mL de H ₂ O Eluição: 3 mL de CH ₂ Cl ₂	determinação por CLAE dos agrotóxicos diurom e linurom em urina	85 - 103	< 1,8	Pozzebon <i>et al.</i> ²¹
C18/PMODS	tratamento térmico (120 °C por 4 h)	15	Eluição: etanol F= 1,0 mL/min	concentração de Pb em água de lago e em amostras biológicas usando colunas de enriquecimento em sistema de injeção em fluxo e determinação por espectroscopia de absorção atômica	98,7 (amostra de água de lago) 97,9 (amostras biológicas)	< 1,2	Maltez <i>et al.</i> ²²
NH ₂ /PMS – aminopropil		NH ₂ - 12	NH ₂ Cond.: 2 mL de CH ₂ Cl ₂ Eluição: 2 x 3 mL CH ₂ Cl ₂ :MeOH 95:5,v/v		NH ₂ (55 - 143)	NH ₂ (1,4 - 19)	
C18/PMODS	tratamento térmico (120 °C por 4 h)	C18 - 15	C18 Cond.: 5 mL de MeOH + 5 mL de H ₂ O Milli-Q Eluição: 10 mL de CH ₂ Cl ₂	determinação por CLAE dos agrotóxicos benomil, tebutiurum, simazina, atrazina, diurom e ametrina em uva	C18 (8,0 - 103)	C18 (0 - 27)	Melo <i>et al.</i> ²³

Tabela 2 (continuação)

FS/polímero	Imobilização	Porcentagem de Carbono da FS(%)	Procedimento de EFS	Aplicação	Recuperação (%)	CV (%)	Referência
NH2 PMS – aminopropil C18/PMODS	idêntico ref.23	Idem ref.23	NH2 Cond.: 2 mL de CH ₂ Cl ₂ Eluição: 2 x 3 mL CH ₂ Cl ₂ :MeOH 99:1, v/v C18 (Idem ref.23)	determinação por CLAE dos agrotóxicos benomil, tebutiurrom, simazina, atrazina, diurom e ametrina em tomates	NH2 (45 - 99) C18 (6,0 - 70)	NH2 (7,6 - 36) C18 (7,3 - 52)	Melo <i>et al.</i> ²⁵
C8/PMOS	tratamento térmico (120 °C por 4 h) ou radiação gama (60 e 80 kGy)	14 (TT) 18 (60 kGy) 17 (80 kGy)	Cond.: 10 mL de MeOH + 3 mL de H ₂ O Milli-Q Eluição: 2 x 0,5 mL de MeOH	determinação por CLAE dos agrotóxicos benomil, tebutiurrom, simazina, atrazina, diurom e ametrina em água Milli-Q fortificada	88-120 (TT) 82-115 (60 kGy) 85- 114 (80 kGy)	5-13 (TT) 0-16 (60 kGy) 0-13 (80 kGy)	Queiroz <i>et al.</i> ²⁶
C8/PMOS	tratamento térmico (120 °C por 8 h)	14	Cond.: 3 mL de acetato de etila + 3 mL de H ₂ O Milli-Q + 3 mL de H ₂ O Milli-Q pH 2,5 Eluição: 5 mL ACN + 2 mL acetato de etila	determinação por CLAE dos agrotóxicos imazetapir, nicosulfurom, diurom, linurom, clorimurrom-etil em água Milli-Q fortificada	72 - 111	< 15	Vigna <i>et al.</i> ²⁷

Tabela 2 (continuação)

FS/polímero	Imobilização	Porcentagem de Carbono da FS(%)	Procedimento de EFS	Aplicação	Recuperação (%)	CV (%)	Referência
C14/ PMTDS	tratamento térmico (110 °C por 13 h)	8,3	Cond.: 3 mL de acetato de etila + 3 mL de H ₂ O deionizada + 3 mL de H ₂ O pH 3,0 F _{amostra} > 5 mL/min Eluição: 5 x 1 mL acetato de etila	determinação por CLAE dos agrotóxicos imazetapir, imazaquim, metsulfurom-metil, bentazona, clorimurmetil, tebuconazol em água superficiais	74 - 99	< 10	Faria <i>et al.</i> ²⁸
Fenil/ PDMFS	tratamento térmico (150 °C por 4,5 h)	7,7	Cond.: 2 x 6 mL de hexano + 6 mL de MeOH + 6 mL H ₂ O deionizada F _{amostra} > 10 mL/min Eluição: 2 x 3 mL acetato de etila + 3 mL de hexano + 2 x 3 mL acetato de etila	determinação por CLAE dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), antraceno, fenantreno, fluoranteno, pireno em água Milli-Q fortificada	59 - 75	1,4 - 16,9	Marques <i>et al.</i> ²⁹
Fluorado/ PMTFS	tratamento térmico (220 °C por 12 h) ou radiação micro-ondas (1000 W, 150 °C por 30 min)		Cond.: 5 mL de CH ₂ Cl ₂ + 5 mL de H ₂ O deionizada F _{amostra} = 8 mL/min Eluição: 5 x 1 mL CH ₂ Cl ₂ + 5 x 1 mL MeOH	Determinação por CLAE dos agrotóxicos simazina, fludioxonil, fenarimol e diflubenzurom em água Milli-Q fortificada	96,2 - 100,5		Bodemeier <i>et al.</i> ³⁰

Entre as técnicas de imobilização empregadas, a térmica é considerada mais simples que a radiação gama devido à facilidade de obtenção do equipamento (estufa), que é comum em todos os laboratórios, seguido da radiação por micro-ondas. Os cartuchos confeccionados apresentam bom desempenho, fornecendo porcentagens de recuperação e coeficiente de variação geralmente dentro do intervalo citado na literatura, que é de 70-120% e $CV \leq 20\%$, respectivamente³¹ e permitem a concentração dos analitos, agrotóxicos e HPA, de forma que eles alcancem os limites máximos de resíduos estabelecidos pelas agências reguladoras. Além disso, as FS preparadas são bastante seletivas, podendo ser aplicadas em diversos tipos de amostra, como ambientais, fluidos biológicos, alimentos, fármacos e produtos naturais.

7 Agradecimentos

A todos os alunos que contribuíram para o desenvolvimento das novas fases sólidas. À FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro. À Liane Maldaner, Milena P. Segato, Rafael T. Marques e Carol H. Collins pelas discussões e sugestões.

Referências Bibliográficas

- H.F. DeBrabander, H. Noppe, K. Verheyden, J.V. Bussche, K. Wille, L. Okerman, L. Vanhaecke, W. Reybroeck, S. Ooghe, S. Croubels. *J. Chromatogr. A*, 1216, 7964 (2009).
- A. Hercegová, M. Dömötöróvá, E. Matisová. *J. Chromatogr. A*, 1153, 54 (2007).
- Y. Chen, Z. Guo, X. Wang, C. Qiu. *J. Chromatogr. A*, 1184, 191 (2008).
- O.D. Prestes, C.A. Friggi, M.B. Adaime, R. Zanel-la. *Quim. Nova*, 32, no 6, 1620 (2009).
- F.M. Lanças. Extração em Fase Sólida (SPE). Rima, São Carlos (2004).
- J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miguel, M.Á. Rodríguez-Delgado, A. Cifuentes. *J. Chromatogr. A*, 1153, 214 (2007).
- P.T. Anastas. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29, 167 (1999).
- M. Tobiszewski, A. Mechlinska, B. Zygmunt, J. Namiesnik. *Trends Anal. Chem.*, 28, 943 (2009).
- K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi. *Talanta*, 23, 449 (1976).
- M.C. Hennion. *J. Chromatogr. A*, 856, 3 (1999).
- N. Fontanals, R.M. Marce, F. Borrull. *Trends Anal. Chem.*, 24, 394 (2005).
- L. Nováková, H. Vlcková. *Anal. Chim. Acta*, 656, 8 (2009).
- F.M. Lanças. *Sci. Chromatogr.*, 0, 17 (2008).
- T. Hyötyläinen. *LCGC*, 12, 6 (2009).
- S.C.N. Queiroz, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim. *Quim. Nova*, 24, no 1, 68 (2001).
- Guide to Sample Preparation. Supplement to *LCGC*. Outubro de 2008.
- A.M. Faria, C. H. Collins, I.C.S.F. Jardim, *J. Braz. Chem. Soc.*, 20, no 8, 1385 (2009).
- A.M. Faria, I.C.S.F. Jardim; K. E. Collins, C. H. Collins. *J. Sep. Sci.*, 29, 782 (2006).
- C.H. Collins, C. R. Silva, A.M. Faria, A. M.; K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20, 604 (2009).
- S.C.N. Queiroz, L.F.C. Melo, I.C.S.F. Jardim. *J. Chromatogr. A*, 948, 171 (2002).
- J.M. Pozzebon, S.C.N. Queiroz, L.F.C. Melo, M.A. Kapor, I.C.S.F. Jardim. *J. Chromatogr. A*, 987, 381 (2003).
- H.F. Maltez, L.F.C. Melo, S.C.N. Queiroz, I.C.S.F. Jardim, A.J. Curtius, E. Carasek. *Microchim. Acta*, 144, 17 (2004).
- L.F.C. Melo, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim. *J. Chromatogr. A*, 1032, 51 (2004).
- I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins. *Microchem. J.*, 77, 191 (2004).

25. L.F.C. Melo, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim. *J. Chromatogr. A*, 1073, 75 (2005).
26. S.C.N. Queiroz, L.F.C. Melo, I.C.S.F. Jardim. *Quim. Nova*, 29, no 4, 637 (2006).
27. C.R.M. Vigna, L.S.R. Morais, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim. *J. Chromatogr. A*, 1114, 211 (2006).
28. A.M. Faria, L. Maldaner, C.C. Santana, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins. *Anal. Chim. Acta*, 582, 34 (2007).
29. R.T. Marques, L. Maldaner, I.C.S.F. Jardim, Preparação de cartuchos recheados com sorvente do tipo fenil para extração em fase sólida de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Trabalho apresentado no 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, (2009).
30. A.P. Bodemeier, L. Maldaner, I.C.S.F. Jardim, Influência da carga do polímero fluorado no preparo de cartuchos para extração em fase sólida. Trabalho apresentado no 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, (2009).
31. Commission of the European Communities (SANCO), 2003, Document nº SANCO/2007/3131. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, Bruxelles, Bélgica, 2007, http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf, acessado em jan/2010.