

Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida

Amália G. G. Dionísio, Marina B. Batistão, Vagner B. dos Santos, Taciane M. Iceri, Neila M. Cassiano e Quezia B. Cass*

*Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química
13565-970 São Carlos (SP)*

Resumo

O preparo de amostra é uma etapa fundamental no método analítico e, em cromatografia líquida, leva ao aumento da seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão. Novas tecnologias, tais como: miniaturização, automação e injeção direta de amostra, têm sido desenvolvidas para atender a demanda por métodos mais eficientes e com menor manuseio das amostras e geração de resíduos. Este artigo versa sobre algumas das tendências atuais em preparo de amostras (método QuEChERS, microextração em fase líquida e preparo de amostra *on-line*) para cromatografia líquida.

Palavras-chave

QuEChERS; microextração em fase líquida; líquidos iônicos; injeção direta de amostras.

Abstract

Sample preparation is a crucial step in establishing a selective, sensible, precise and accurate liquid chromatography method. New technologies, such as miniaturization, automation and *on-line* sample injection, have been developed in order to attend the demand for more efficient methods with less samples handling and residues. This work shows some current trends on sample preparation (QuEChERS method, liquid-phase microextraction and *on-line* sample preparation) for liquid chromatography.

Keywords

QuEChERS, phase-liquid microextraction, ionic liquids, direct injection of the samples.

1 Introdução

O preparo de amostras antes da análise instrumental é um requisito essencial para o estabelecimento de um método cromatográfico sensível e seletivo destinado à análise de traços em matrizes complexas.

Os métodos de preparo de amostras têm evoluído para atender as demandas analíticas e acompanhar o aumento da eficiência cromatográfica, resultante das novas instrumentações e fases estacionárias.¹ Com isso, concretiza-se o intuito de se aumentar a produtividade analítica e, simultaneamente, diminuir a geração de resíduos.

Este artigo versa sobre algumas das tendências atuais dos métodos de preparo de amostras (método QuEChERS, microextração em fase líquida e preparo de amostra *on-line*) para a quantificação de analitos em diversas matrizes por cromatografia líquida (LC, *Liquid Chromatography*).

Método QuEChERS

Em 2003, Anastassiades *et al.*² propuseram um novo método de preparo de amostra para a análise de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais, com o intuito de superar as limitações dos métodos multirresíduos de extração empregados na época. Durante o desenvolvimento desse método, que foi denominado QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe*), os seguintes parâmetros foram avaliados: quantidade de amostra, natureza do solvente extrator, forma de agitação, efeito da adição de sais para promover a partição líquido-líquido e facilitar a separação de fases, utilização de padrão interno e o tipo de sorvente empregado na extração em fase sólida dispersiva. De forma resumida, o procedimento de preparo otimizado (para 10 g de amostra), envolve as seguintes etapas: extração dos analitos com acetonitrila (10 mL), adição de 1 g de NaCl e 4 g MgSO₄ para a etapa de partição/extração, adição do padrão interno (trifenilfosfato) e, na última etapa, uma alíquota do extrato (1 mL) é colocada em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente de troca aniônica *n*-propil-etilenodiamina

e 150 mg de MgSO₄. Após agitação e centrifugação, o sobrenadante é injetado no sistema cromatográfico para análise.²

O método QuEChERS apresenta altos percentuais de recuperação (> 85%) para diversas classes de compostos e possibilita o preparo de 6 a 12 amostras em 30-45 min por um único analista, sendo possível extrair de uma mesma amostra compostos de diferentes polaridades, facilitando assim as análises de multirresíduos.²

Desde a sua publicação, algumas modificações no método original vêm sendo propostas, visando melhorar a extração de compostos que se degradam em meio ácido ou alcalino, dentre elas, o tamponamento dos extratos em pH 4-5 com ácido acético e acetato de sódio. Para não aumentar o número de etapas do método original, o ácido acético (1%) é adicionado à acetonitrila, e o NaCl é substituído por acetato de sódio.³

Uma excelente revisão sobre o desenvolvimento/modificações do método QuEChERS e suas aplicações na área de alimentos, empregando cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas, foi publicada na Química Nova, em 2009.⁴ Outras referências publicadas em 2009 e 2010 que utilizam o método QuEChERS no preparo de amostras são apresentadas na Tabela 1.

Microextração em Fase Líquida

A extração líquido-líquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*) ainda hoje é uma técnica bastante utilizada para remoção de interferentes presentes em matrizes complexas. No entanto, as limitações da LLE são bem conhecidas: formação de emulsões - o que resulta em grande consumo de tempo para separação das duas fases imiscíveis, várias etapas e grande manipulação da amostra, consumo de grandes quantidades de amostras e de solventes orgânicos ultrapuros, muitas vezes tóxicos e agressivos ao meio ambiente. A miniaturização da LLE foi desenvolvida com o intuito de minimizar essas desvantagens, bem como aumentar a eficiência de extração dos analitos e o número de análises por tempo.¹⁵

Tabela 1. Aplicações do método QuEChERS no preparo de amostras para LC.

Analito	Matriz	Detector (LQ ou LD)	Ref.
Micotoxinas	Farinha de trigo	MS (LQ: 4 – 100 µg/kg)	5
Micotoxinas e metabólitos	Silagem de milho	MS (LD: 1 – 739 µg/kg)	6
Pesticidas	Frutas e vegetais	MS (LQ: 10 ng/g)	7
	Frutas e vegetais	MS (LQ: 5 µg/kg)	8
	Frutas, vegetais e cereais	MS (LQ: 10 ng/g)	9
Ftalatos	Gelatina de Frutas	MS (LQ: 0,28 – 11,25 ng/mL)	10
Almitraz e metabólitos	Frutas	MS (LQ: 0,4 – 3,5 µg/kg)	11
PAH	Peixes	F (LQ: 0,12 – 1,90 ng/g)	12
Fármacos de uso veterinário	Carne de frango	MS (LQ: 2 – 200 µg/kg)	13
	Leite e fígado bovinos	MS (LQ: 5 – 10 µg/kg)	14

LQ: limite de quantificação; LD: limite de detecção; PAH: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; MS: espectrômetro de massas; F: detector de fluorescência.

Atualmente, várias técnicas de microextração em fase líquida (LPME, *Phase Liquid Microextraction*) têm sido empregadas no preparo de amostras para análise por LC e, dentre elas, destacam-se a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), a microextração em fase líquida com fibras ocas (HF-LPME, *Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*) e a microextração com gota suspensa (SDME, *Single-Drop Microextraction*).¹⁶⁻¹⁸

A DLLME, introduzida por Rezaee *et al.*¹⁹ em 2006, utiliza uma mistura de dois solventes orgânicos, um com alta densidade e imiscível em água (solvente extrator) e outro miscível no solvente extrator e em água (solvente dispersor). Quando essa mistura é rapidamente injetada na solução da amostra, uma grande turbulência é produzida, acarretando a formação de uma emulsão de gotículas que se

dispersam por toda a amostra. Após a centrifugação da solução turva, a fase sedimentada (gotículas constituídas pelo solvente extrator e analito) é retirada e analisada.²⁰ A Figura 1 ilustra as diferentes etapas envolvidas na DLLME.

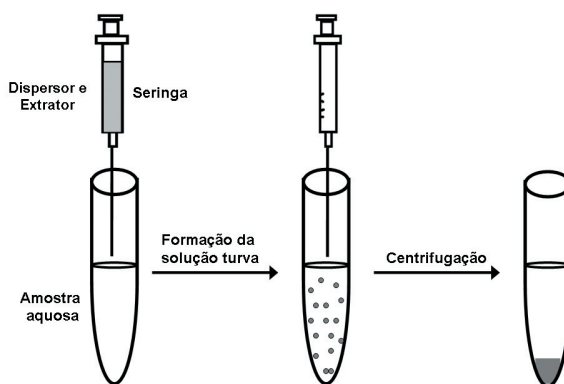


Figura 1. Representação esquemática do procedimento de DLLME. Adaptada da ref. 17

Pedersen-Bjergaard e Rasmussen²¹ desenvolveram a técnica de HF-LPME. Nesse tipo de extração, um solvente orgânico imiscível em água é imobilizado nos poros de uma fibra oca porosa, e o interior da fibra (lúmen) é preenchido com poucos microlitros de uma solução aceitadora (aquosa ou orgânica). Os analitos são extraídos da amostra aquosa (fase doadora) pelo solvente orgânico, imobilizado nos poros da fibra e transferidos para a solução aceitadora presente no lúmen da fibra oca. Após a extração, a solução aceitadora é injetada no sistema cromatográfico.

Quando o solvente orgânico imobilizado nos poros da fibra é igual ao solvente aprisionado no interior dela, tem-se uma HF-LPME de duas fases (Figura 2a) que, em geral, é utilizada para a extração de analitos neutros. Uma vez que a fase aceitadora é orgânica, esse modo de extração é compatível com LC no modo normal de eluição. Na HF-LPME de três fases (Figura 2b), usada para extração de compostos ionizáveis, o solvente orgânico também é imobilizado nos poros da fibra oca, mas uma solução aquosa é aprisionada no seu interior. Nesse sistema, os analitos são transferidos da amostra aquosa para a fase aquosa aceitadora no lúmen por meio da fase orgânica imobilizada na fibra, e, na sequência, analisados por LC no modo reverso de eluição.^{22,23}

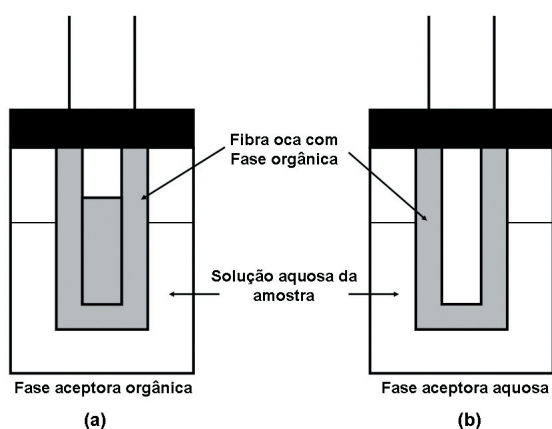


Figura 2. Representação esquemática da HF-LPME com duas fases (a) e três (b). Adaptada da ref. 23

A eficiência do processo de extração depende de vários fatores como, por exemplo, dos coeficientes de partição dos analitos, tipo de fibra oca, volumes das fases doadoras eceptoras, tipo de solvente orgânico, pH da fase doadora, composição da solução aceitadora, tempo e temperatura de extração, dentre outros.^{16,22}

Na SDME, a fase extratora é uma gota de um solvente orgânico imiscível em água (tipicamente poucos microlitros) suspensa na ponta da agulha de uma microseringa de LC. A gota, na qual os analitos sofrem partição, depois de exposta à amostra, é retraída para a seringa e, então, injetada no cromatógrafo. Os dois principais modos da SDME são por imersão direta (DI-SDME, *Direct Immersion Single-Drop Microextraction*) e no headspace (HS-SDME, *Headspace Single-Drop Microextraction*).^{17,24}

No modo DI-SDME, a microgota é imersa na solução da amostra, e os analitos (apolares e de média polaridade) são extraídos para a fase extratora (Figura 3a). A agitação mecânica é empregada para acelerar o transporte dos analitos do meio da solução para a vizinhança da gota. No modo headspace, (HS-SDME), empregado para compostos voláteis e semivoláteis, a microgota é suspensa na região sobre a amostra, contida em um frasco de amostragem, onde os analitos são transportados através da barreira de ar antes de atingirem a gota (Figura 3b).¹⁷

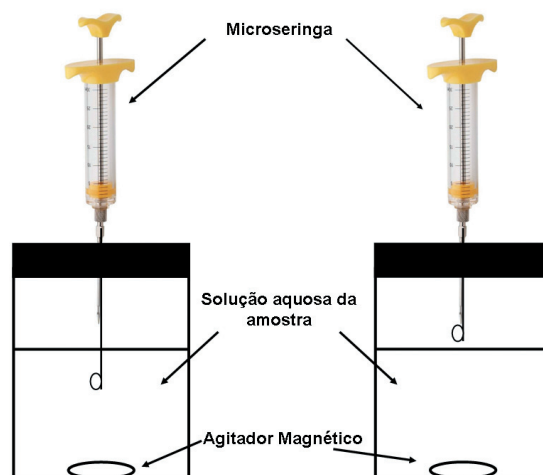


Figura 3. Representação esquemática da DI-SDME (a) e HS-SDME (b). Adaptada da ref. 15

Na SDME, assim como nas demais técnicas de microextração, a otimização dos parâmetros experimentais é de fundamental importância para garantir uma eficiente extração dos analitos. Tais parâmetros incluem: escolha do solvente extrator, tempo de extração, pH da amostra, agitação da

amostra, força iônica do meio e volumes da amostra e da gota extratora.¹⁷

A Tabela 2 apresenta algumas aplicações da DLLME, HF-LPME e SDME no preparo de amostras para LC.

Tabela 2. Aplicações das técnicas de microextração em fase líquida (LPME) no preparo de amostras para LC.

Tipo de Extração	Analito (Matriz)	Detector (LQ ou LD)	Ref.
DLLME	Medroxiprogesterona (águas)	UV (LQ: 0,5 µg/L)	25
	Auxins (plantas)	F (LD: 0,02 ng/mL)	26
	Bisfenol A (águas)	UV (LD: 0,07 µg/L)	27
	Quinilonas (músculo de porco)	DAD (LD: 5,6 – 23,8 µg/kg)	28
HF-PLME (2 fases)	β-Artemeter e dihidroartemisinina (plasma)	MS (LQ: 5 ng/mL)	29
	Surfactante de amônio quaternário (águas)	MS (LD: 0,9 µg/L)	30
	Diuréticos (urina)	MS (LQ: 0,9 – 22,3 ng/mL)	31
HF-PLME (3 fases)	Fluoxetina e norfluoxetina (plasma)	F (LQ: 5 ng/mL)	32
	Metabólitos da venlafaxina (microsoma)	UV (LQ: 200 ng/mL)	33
	Tetraciclina (leite, plasma e águas)	UV (LD: 0,5 – 1 µg/L)	34
	Fitohormônios (água de côco)	UV (LD: 0,9 – 4,6 ng/mL e 8,8 µg/mL)	35
	Ácido salicílico (AS), ibuprofeno (IBU) e diclofenaco (DIC) (urina)	DAD e F (LD: 12 (AS); 40 (IBU) e 53 ng/mL (DIC) com DAD e 2 (IBU) e 7 ng/mL (AS) com F)	36
DI-SDME	Compostos fenólicos (águas)	UV (LD: 4 – 9 ng/mL)	37
	Anestésicos locais (urina)	UV (LD: 0,03 – 0,05 µg/mL)	38
	Pseudohipericina (PH), hipericina (HR) e hiperforina (HF) (urina e plasma)	UV e F (LQ: 3 (PH); 6 (HR) e 12 ng/mL (HF) em urina e 5 (PH); 12 (HR) e 20 ng/mL (HF) em plasma)	39
HS-SDME	Compostos fenólicos (águas)	UV (LD: 0,2 – 2,1 ng/mL)	40
	PAH (águas e folhas de plantas)	F (LD: 0,004 – 0,247 ng/mL)	41
	Anfetaminas (urina)	UV (LD: 0,3 µg/mL)	42

LQ: limite de quantificação; LD: limite de detecção; PAH: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva; HF-LPME: microextração em fase líquida com fibras ocas; DI-SDME: microextração em gota suspensa com imersão direta; HS-SDME: microextração em gota suspensa com headspace; UV: detector ultravioleta; F: detector de fluorescência; DAD: detector por arranjo de fotodiodos; MS: espectrômetro de massas.

Uso de Líquidos Iônicos em procedimentos de Microextração em Fase Líquida

O termo líquidos iônicos (ILs, *Ionic Liquids*) é utilizado para descrever uma ampla classe de sais que apresentam ponto de fusão inferior a 100 °C. Se o sal tem ponto de fusão menor que a temperatura ambiente (~25 °C), o IL é classificado como líquido iônico à temperatura ambiente (RTIL, *Room Temperature Ionic Liquid*).^{43,44}

Os ILs são constituídos por cátions orgânicos como, por exemplo, 1-alkil-3-metilimidazólio, *N*-alkilpiridínio, tetralquilamônio e tetralquilfosfônio, e ânions inorgânicos ou orgânicos, tais como: cloreto

(Cl⁻), tetrafluorborato (BF₄⁻), hexafluorofosfato (PF₆⁻), trifluormetilsulfonato (CF₃SO₃⁻), trifluoretanoato (CF₃CO₂⁻) e bis[(trifluormetil)sulfonil]imida ((CF₃SO₂)₂N⁻).⁴³⁻⁴⁵

As propriedades físico-químicas dos ILs são influenciadas pela natureza e tamanhos de seus íons constituintes.⁴⁶ Por exemplo, enquanto o tetrafluorborato de 1-etil-3-metilimidazólio é solúvel em água, o bis[(trifluormetil)sulfonil]imida de 1-etil-3-metilimidazólio, além de ser mais denso do que o primeiro, é insolúvel em água. Ademais, o aumento da cadeia carbônica no 1-alkil-3-metilimidazólio faz com que o IL seja mais viscoso (Tabela 3).

Tabela 3. Propriedades físico-químicas de ILs com cátions do tipo 1-alkil-3-metilimidazólio. Adaptada da ref. 47.

Líquido iônico	PF (°C)	Densidade (g/ml)*	Viscosidade (cP)	Solubilidade em água*
bis[(trifluormetil)sulfonil]imida de 1-etil-3-metilimidazólio	-17	1,52	18	Insolúvel
Tetrafluorborato de 1-etil-3-metilimidazólio	6	1,248	66	Solúvel
Tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio	-82	1,208	233	Solúvel
Tetrafluorborato de 1-hexil-3-metilimidazólio	-82	1,208	310	Parcialmente solúvel

* a 25 °C, cP: centésimo de Poise

A partir do início da década de 90, após o desenvolvimento de ILs termodinamicamente mais estáveis, essa nova classe de solventes começou a ser efetivamente utilizada em diversas áreas da química, como eletroquímica, espectroscopia e separações cromatográficas.^{43,48,49} Em LC, os líquidos iônicos têm sido utilizados como aditivos/modificadores orgânicos de fases móveis e constituintes de fases estacionárias^{45,47,50} e, principalmente, como solventes extratores em DLLME, HF-LPME e SDME.^{43-45,51}

Comparado a outros solventes orgânicos normalmente empregados em métodos de extração,

os ILs apresentam uma série de vantagens, as quais são decorrentes de suas propriedades físico-químicas. Esses líquidos têm baixa pressão de vapor, estabilidade térmica elevada e, normalmente, são mais densos do que a água e outros solventes orgânicos. A miscibilidade com água e solventes orgânicos de diferentes polaridades varia de acordo com o tipo de cátion e ânion constituintes.⁴⁵

A alta viscosidade é uma propriedade importante para o uso de ILs em HS-SDME e DI-SDME, uma vez que possibilita a formação de gotas com volumes maiores do que as gotas

geradas com os solventes usualmente empregados em microextração em fase líquida. Dessa forma, a interação entre o IL e o analito é mais efetiva, acarretando uma maior eficiência de extração. Além disso, o volume de IL utilizado é muito pequeno (3-10 µl), gerando, assim, uma menor quantidade de resíduos.⁴⁴

Desde a introdução de ILs como extratores em LPME,⁵² em 2003, o número de publicações que empregam esses solventes tem aumentado anualmente. A Tabela 4 apresenta alguns trabalhos recentes que empregam ILs em diferentes técnicas de microextração em fase líquida no tratamento de amostras para LC.

Tabela 4. Aplicações de ILs em técnicas de microextração em fase líquida.

Líquido Iônico	Analito (Matriz)	Tipo de Extração	Detector (LD)	Ref.
BMIMPF ₆	Anti-inflamatórios não-esteroidais (urina)	DLLME	UV (8,3 – 3,2 ng/mL)	53
	compostos fenólicos (águas)	DLLME	UV (0,68 – 10 µg/L)	54
HMIMPF ₆	Pesticidas (banana)	DLLME	DAD (0,32 – 4,66 µg/kg)	55
	Inseticidas (águas)	DLLME	DAD (0,53 – 1,28 µg/L)	56
OMIMPF ₆	Pesticidas (águas)	DLLME	UV (0,1 – 5,0 µg/L)	57
	PAH (águas)	DLLME	F (0,1 – 7,0 ng/L)	58
	Clorofenóis (águas)	HF-LPME	UV (0,5 – 1,0 µg/L)	59
	Sulfonamidas (águas)	HF-LPME	UV (0,1 – 0,4 µg/L)	60
BMIMPF ₆	Clorobenzenos (águas)	HS-SDME	DAD (0,10 – 0,20 µg/L)	61
	1-naftilamina, N,N-dimetilanilina e difenilamina (águas)	HS-SDME	UV (0,09 – 0,38 µg/L)	62
	tributilestanho e trifenilestanho (águas)	HS-SDME	F (0,62 µg/L)	63
HMIMPF ₆	Benzofenona-3 (urina)	DI-SDME	DAD (1,3 ng/mL)	64
	Espécies de mercúrio (MeHg ⁺ , EtHg ⁺ , PhHg ⁺ e Hg ²⁺) (águas)	DI-SDME	DAD (1,0 – 22,8 µg/L)	65
PH ₃ TFAP	compostos fenólicos e PAH (águas)	DI-SDME	UV e F (0,03 – 0,4 µg/L)	66

LD: limite de detecção; BMIMPF₆: Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio; HMIMPF₆: Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio; OMIMPF₆: Hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazólio; PH₃TFAP: tris(pentafluoretil)trifluorofosfato de trihexil(tetradecil)fosfônio; DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva; HF-LPME: microextração em fase líquida com fibras ocas; HS-SDME: microextração em gota suspensa com headspace; DI-SDME: microextração em gota suspensa com imersão direta; PAH: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; UV: detector ultravioleta; DAD: detector por arranjo de fotodiodos; F: detector de fluorescência.

Preparo de Amostra *on-line*

Métodos de extração *on-line* têm sido desenvolvidos objetivando a injeção direta de amostras nos sistemas cromatográficos. Algumas das principais técnicas de injeção direta de amostras são descritas a seguir.

Extração em Fase Sólida on-line

A extração em fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) é uma técnica de preparo de amostra bem estabelecida.⁶⁷⁻⁷⁰ A eficiência de extração por SPE é determinada pela maior interação dos analitos pelo sorvente do que pela matriz e/ou eluente.

Mediante o sucesso dessa técnica na configuração *off-line*,⁷¹ desenvolvimentos tecnológicos foram feitos de modo a possibilitar o acoplamento direto da SPE aos sistemas de LC, dando origem à SPE *on-line*. A automatização propiciou uma maior frequência analítica e diminuição do manuseio da amostra que, por conseqüência, minimiza a perda dos analitos associada a erros humanos de manipulação.

Os princípios da SPE *on-line* inspiraram o surgimento de novos métodos de tratamento de amostras, porém com fases estacionárias especiais,^{67,72,73} as quais são descritas a seguir.

Cromatografia de Fluxo Turbulento

Na cromatografia de fluxo turbulento (TFC, *Turbulent Flow Chromatography*), como o próprio nome sugere, opera-se em altas vazões de fase móvel (4 a 6 mL/min), fazendo com que o tempo de análise seja reduzido. Para isso, a fase estacionária utilizada é de sílica, com tamanho de partícula em torno de 60 µm, permitindo grande difusibilidade das moléculas. As pequenas moléculas se difundem rapidamente para os poros, enquanto as macromoléculas são arrastadas pela alta vazão de fase móvel. Como vantagens desse tipo de limpeza de amostra, têm-se a automatização, alta frequência analítica e reprodutibilidade. Porém, devido à magnitude dos valores de vazão de fase móvel empregada, a principal desvantagem é a geração de um alto volume de resíduos.^{67,74}

Colunas de Meio de Acesso Restrito

Um dos problemas associados às análises de exógenos/endógenos em matrizes complexas, como biofluidos, alimentos e ambientais, reside no fato de que os analitos estão presentes em baixas concentrações, enquanto o percentual de macromoléculas é elevado.⁷⁵

As fases de meio de acesso restrito (RAM, *Restricted-Access Media*) são capazes de excluir macromoléculas e reter pequenas moléculas. Nessas fases, a superfície externa da sílica é hidrofílica, enquanto os analitos são retidos nos poros das partículas por diferentes tipos de interações. Associando a barreira de difusão química (hidrofílica) à barreira de difusão física (microporos), apenas as micromoléculas são capazes de acessar o interior dos poros. Assim, as fases estacionárias do tipo RAM combinam os princípios da cromatografia de exclusão, afinidade, modo reverso, troca iônica e quiral, dentre outros.⁷⁵⁻⁷⁷

Muitas inovações relacionadas ao desenvolvimento de fases RAM têm surgido com o objetivo de torná-las ainda mais seletivas. Como exemplos, podemos citar as fases dos tipos catiônicas ou aniônicas, de interações fortes ou fracas, que são ideais para o preparo de amostras que contém compostos ionizáveis e hidrofílicos.⁷⁷

As colunas RAM podem ser usadas no modo simples de análise, como colunas extratoras e analíticas, ou mais comumente em sistemas de duas dimensões, com a coluna analítica na segunda dimensão. A última configuração, usualmente, é a mais utilizada, uma vez que as colunas RAM, de modo geral, apresentam uma baixa eficiência analítica.⁷⁵⁻⁷⁷

Colunas Monolíticas e de Polímeros Molecularmente Impressos

As fases monolíticas são consideradas diferenciais pelo fato de serem meios contínuos de separação, pois são formadas por uma única rede polimérica e, principalmente, de elevada porosidade.⁷⁶⁻⁷⁸ A existência de longos canais, geralmente maiores que 1 µm de diâmetro, facilita a passagem da fase móvel devido à baixa resistência

à vazão do eluente, sem perda de eficiência de separação cromatográfica.⁷⁸ As vazões de fase móvel usadas com as colunas monolíticas são de cinco a dez vezes maiores que as das colunas convencionais (particuladas) usadas em LC, permitindo um maior número de análises por tempo.⁷⁶

A alta porosidade confere às fases monolíticas uma grande permeabilidade, possibilitando injeções diretas de amostras. Os monolitos podem ser preparados por polimerização *in situ*, gerando uma rede que preenche totalmente o volume da coluna, de modo a não apresentar os vazios entre as partículas.^{76,77}

Uma classe de fases monolíticas que merece destaque são as de polímeros molecularmente

impressos (MIP, *Molecularly Imprinted Polymers*). Tais fases são formadas a partir de monômeros específicos com habilidade de reconhecimento para uma molécula modelo. As fases MIP são sintetizadas por copolimerização com auxílio de agentes de cruzamento, na presença de um modelo molecular. Depois que o modelo é retirado, restam somente as cavidades com forma e tamanho complementares às da molécula modelo.^{67,79} Uma vez que o mecanismo de interação depende da estrutura espacial dos analitos, os MIPs são adequados para o preparo de amostras em separações enantioméricas.⁷⁷

A Tabela 5 apresenta algumas aplicações dos métodos de preparo de amostra *on-line* para LC.

Tabela 5. Aplicações do preparo de amostra *on-line* em LC

Tipo de Extração	Analito (Matriz)	Detector (LQ)	Ref.
SPE	β-Lactamas (leite)	MS (0,09 – 1,44 ng/mL)	80
	Sulfonamidas e pesticidas (águas)	MS (1,0 – 10 ng/L)	81
TFC	Flavonóides e resveratrol (vinho)	MS (0,050 e 1,0 mg/mL)	82
	Antibióticos (águas)	MS (45 – 122 ng/L)	83
	Dextrometorfano e dextrorfan (plasma)	MS (5,0 ng/mL)	84
RAM	Antibióticos (águas)	MS (7,0 – 20 ng/L)	85
	Omeprazol (águas)	MS (15 µg/L)	86
	Antibióticos (leite e águas)	MS (10 µg/L)	87
	Antidepressivos (plasma e urina)	MS (1,0 ng/mL)	88
	Lansoprazol (plasma)	UV (0,10 µg/mL)	89
Monolítica	Nicardipina e anlodipino (plasma)	UV (0,50 ng/mL)	90
	Amprenavir (APV) e atazanavir (AZA) (plasma)	MS (4,50 ng/mL (APV) e 2,77 ng/mL (AZA))	91
MIP	Ciprofloxacina (urina)	UV (0,080 mg/mL)	92
	Alfuzosina (plasma)	UV (15 µg/L)	93

LQ: limite de quantificação; SPE: extração em fase sólida; TFC: cromatografia de fluxo turbulento; RAM: meio de acesso restrito; MIP: polímero molecularmente impresso; MS: espectrômetro de massas; UV: detector ultravioleta.

Considerações Finais

No presente trabalho, foram apresentadas algumas das tendências atuais dos métodos de preparo de amostras para cromatografia líquida. De modo geral, esses métodos são de fácil automação, associado a uma maior seletividade, a qual permite maior eficiência cromatográfica, precisão e exatidão, com baixos limites de quantificação e alta frequência analítica. Menor manuseio da amostra e geração de resíduos são, também, importantes atrativos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro e bolsas concedidas

Referências Bibliográficas

1. D. Guillarme, J. Ruta, S. Rudaz, J. L. Veuthey. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397 (2010) 1069.
2. M. Anastassiades, S. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck. *J. AOAC Int.*, 86 (2003) 412.
3. S. J. Lehotay, K. Mastovska, A. R. Lightfield. *J. AOAC Int.*, 88 (2005) 615.
4. O. D. Prestes, C. A. Friggi, M. B. Adaime, R. Zanella. *Quim. Nova*, 32 (2009) 1620.
5. I. Sospedra, J. Blesa, J. M. Soriano, J. Mañes. *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1437.
6. R. R. Rasmussen, I. M. L. D. Storn, P. H. Rasmussen, J. Smedsgaard, K. F. Nielsen. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397 (2010) 765.
7. S. T. Lehotay, K. A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, N. Leepipatpiboon. *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2548.
8. J. Wang, W. Chow, D. Leung. *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2010) 1513.
9. S. J. Lehotay, K. Mastovska, A. R. Lightfield, R. A. Gates. *J. AOAC Int.*, 93 (2010) 355.
10. Y. Ma, Y. Hashi, F. Ji, J. M. Lin. *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 251.
11. C. Ferrer, A. Aguera, M. Mezcuca, A. R. Fernandez-Alba, D. Mack, M. Anastassiades, M. Gamon. *J. AOAC Int.*, 93 (2010) 380.
12. M. J. Ramalhosa, P. Paíga, S. Morais, C. Delerue-Matos, M. B. P. P. Oliveira. *J. Sep. Sci.*, 32 (2009) 3529.
13. G. Stubbings, T. Bigwood. *Anal. Chim. Acta*, 637 (2009) 68.
14. B. Kinsella, S. J. Lehotay, K. Mastovska, A. R. Lightfield, A. Furey, M. Danaher. *Anal. Chim. Acta*, 637 (2009) 196.
15. H. Kataoka. *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2010) 339.
16. A. R. M. Oliveira, I. R. S. Magalhães, F. J. M. Santana, P. S. Bonato. *Quim. Nova*, 31 (2008) 637.
17. F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho. *Spectrochim. Acta B*, 64 (2009) 1.
18. A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri. *Trends Anal. Chem.*, 29 (2010) 1.
19. M. Rezaee, Y. Assadi, M. R. M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani. *J. Chromatogr. A*, 1116 (2006) 1.
20. M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji. *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2342.
21. S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen. *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2650.
22. S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen. *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 132.
23. J. Lee, H. K. Lee, K. E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard. *Anal. Chim. Acta*, 624 (2008) 253.
24. M. A. Jeannot, A. Przyjazny, J. M. Kokosa. *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2326.
25. S. Xie, B. Xiang, M. Zhang. *Microchim. Acta*, 168 (2010) 253.
26. Q. Lu, L. Chen, M. Lu, G. Chen, L. Zhang. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (2010) 2763.
27. M. Rezaee, Y. Yamini, S. Shariati, A. Esrafil, M. Shamsipur. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 1511.
28. W. H. Tsai, H. Y. Chuang, H. H. Chen, J. J. Huang, H. C. Chen, S. H. Cheng, T. C. Huang. *Anal. Chim. Acta*, 656 (2009) 56.
29. I. R. Magalhães, V. A. Jabor, A. M. Faria, C. H. Collins, I. C. Jardim, P. S. Bonato. *Talanta*, 81 (2010) 941.
30. S. Hultgren, N. Larsson, B. F. Nilsson, J. A. Jönsson. *Anal. Bioanal. Chem.*, 393 (2009) 929.
31. T. F. Tsai, M. R. Lee. *Talanta*, 75 (2008) 658.
32. D. F. Freitas, C. E. Porto, E. P. Vieira, M. E. Siqueira. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 51 (2010) 170.
33. P. Fonseca, P. S. Bonato. *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2010) 817.
34. S. Shariati, Y. Yamini, A. Esrafil. *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 393.
35. Y. Wu, B. Hu. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7657.
36. M. R. Payán, M. A. B. López, R. F. Torres, J. L. P. Bernal, M. C. Mochón. *Anal. Chim. Acta*, 653 (2009) 184.
37. J. L. Darias, M. G. Hernández, V. Pino, A. M. Afonso. *Talanta*, 80 (2010) 1611.
38. M. Ma, S. Kang, Q. Zhao, B. Chen, S. Yao. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40 (2006) 128.
39. E. M. Gioti, D. C. Skalkos, Y. C. Fiamegos, C. D. Stalikas. *J. Chromatogr. A*, 1093 (2005) 1.
40. Y. Wu, B. Hu, Y. Hou. *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 3772.
41. Y. Wu, L. Xia, R. Chen, B. Hu. *Talanta*, 74 (2008) 470.
42. Y. He, A. Vargas, Y. J. Kang. *Anal. Chim. Acta*, 589 (2007) 225.
43. P. Sun, D. W. Armstrong. *Anal. Chim. Acta*, 661 (2010) 1.
44. C. F. Poole, S. K. Poole. *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2268.
45. D. Han, K. H. Row. *Molecules*, 15 (2010) 2405.

46. K. N. Marsh, J. A. Boxall, R. Lichtenthaler. *Fluid Phase Equilib.*, 219 (2004) 93.
47. A. Berthod, M. J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch. *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 6.
48. R. J. Soukup-Hein, M. M. Warnke, D. W. Armstrong. *Ann. Rev. Anal. Chem.*, 2 (2009) 145.
49. Y. Wang, M. Tian, W. Bi, K. H. Row. *Int. J. Mol. Sci.*, 10 (2009) 2591.
50. D. Han, M. Tian, D. W. Park, D. K. Choi, K. H. Row. *Korean J. Chem. Eng.*, 26 (2009) 1353.
51. R. Liu, J. F. Liu, Y. G. Yin, X. L. Hu, G. B. Jiang. *Anal. Bioanal. Chem.*, 393 (2009) 871.
52. J. F. Liu, G. B. Jiang, Y. G. Chi, Y. Q. Cai, Q. X. Zhou, J. T. Hu. *Anal. Chem.*, 75 (2003) 5870.
53. M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Varcárcel. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 6459.
54. Y. C. Fan, M. L. Chen, C. Shen-Tu, Y. Zhu. *J. Anal. Chem.*, 64 (2009) 1017.
55. L. M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, M. Asensio-Ramos, M. A. Rodrigues-Delgado. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7336.
56. Y. Liu, E. Zhao, W. Zhu, H. Gao, Z. Zhou. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 885.
57. L. He, X. Luo, H. Xie, C. Wang, X. Jiang, K. Lu. *Anal. Chim. Acta*, 655 (2009) 52.
58. M. T. Pena, M. C. Casais, M. C. Mejuto, R. Cela. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 6356.
59. J. F. Peng, J. F. Liu, X. L. Hu, G. B. Jiang. *J. Chromatogr. A*, 1139 (2007) 165.
60. Y. Tao, J. F. Liu, X. L. Hu, H. C. Li, T. Wang, G. B. Jiang. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 6259.
61. L. Vidal, E. Psillakis, C. E. Domini, N. Grané, F. Marken, A. Canals. *Anal. Chim. Acta*, 584 (2007) 189.
62. Q. Zhou, C. Ye. *Microchim. Acta*, 162 (2008) 153.
63. H. Sheikhoie, M. Saber-Tehrani, P. Abrumand-Azar, S. Waqif-Husain. *Acta Chromatogr.*, 21 (2009) 577.
64. L. Vidal, A. Chisvert, A. Canals, A. Salvador. *J. Chromatogr. A*, 1174 (2007) 95.
65. F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, L. Vidal, A. Canals. *Talanta*, 78 (2009) 537.
66. C. Yao, W. R. Pitner, J. L. Anderson. *Anal. Chem.*, 81 (2009) 5054.
67. L. Novakova, H. Vlckova. *Anal. Chim. Acta*, 656 (2009) 8.
68. K. M. Li, L. P. Rivory, S. J. Clarke. *Cur. Pharm. Anal.*, 2 (2006) 95.
69. S. C. N. Queiroz, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim. *Quim. Nova*, 24 (2001) 68.
70. C. F. Poole. *Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 362.
71. D. M. Pavlovic, S. Babic, A. J. M. Horvat, M. Kastelan-Macan. *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 1062.
72. S. Rodriguez-Mozaz, M. J. L. de Alda, D. Barceló. *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 97.
73. L. Chen, H. Wang, Q. Zeng, Y. Xu, L. Sun, H. Xu, L. Ding. *J. Chromatogr. Sci.*, 47 (2009) 614.
74. W. M. Mullett. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70 (2007) 263.
75. N. M. Cassiano, V. V. Lima, R. V. Oliveira, A. C. de Pietro, Q. B. Cass. *Anal. Bioanal. Chem.*, 384 (2006) 1462.
76. S. Souverain, S. Rudaz, J.-L. Veuthey. *J. Chromatogr. B*, 801 (2004) 141.
77. N. M. Cassiano, J. C. Barreiro, M. C. Moraes, R. V. Oliveira, Q. B. Cass. *Bioanalysis*, 1 (2009) 577.
78. A. M. Faria, C. B. G. Bottoli, I. C. S. F. Jardim, C. H. Collins. *Quim. Nova*, 29 (2006) 300.
79. V. Pichon. *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 41.
80. L. Kantiani, M. Farré, M. Sibum, C. Postigo, M. L. de Alda, D. Barceló. *Anal. Chem.*, 81(2009) 4285.
81. K. Stoob, H. P. Singer, C. W. Goetz, M. Ruff, S. Mueller. *J. Chromatogr. A*, 1097 (2005) 138.
82. M. A. Presta, B. Bruyneel, R. Zanella, J. Kool, J. G. Krabbe, H. Lingeman. *Chromatographia*, 69 (2009) 167.
83. P. A. Segura, C. Gagnon, S. Sauvé. *Chromatographia*, 70 (2009) 239.
84. S. L. Zhou, H. Y. Zhou, M. Larson, D. L. Miller, D. M. Mao, X. Y. Jiang, N. D. Weng. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 (2005) 2144.
85. J. Ding, N. Ren, L. Chen, L. Ding. *Anal. Chim. Acta*, 634 (2009) 215.
86. J. C. Barreiro, K. L. Vanzolini, T. V. Madureira, M. E. Tiritan, Q. B. Cass. *Talanta*, 82 (2010) 384.
87. J. Chico, S. Meca, R. Companyó, M. D. Prat, M. Granados. *J. Chromatogr. A*, 1181 (2008) 1.
88. A. J. Santos-Neto, J. Bergquist, F. M. Lanças, P. J. R. Sjöberg. *J. Chromatogr. A*, 1189 (2008) 514.
89. R. F. Gomes, N. M. Cassiano, J. Pedrazolli Jr., Q. B. Cass. *Chirality*, 22 (2010) 35.
90. X. Wei, G. Yang, L. Qi, Y. Chen. *Talanta*, 77 (2009) 1197.
91. R. N. Xu, L. Fan, G. E. Kim, T. A. El-Shourbagy. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40 (2006) 728.
92. H. Yan, K. H. Row. *Biomed. Chromatogr.*, 22 (2008) 487.
93. F. Hugon-Chapuis, J. U. Mullet, G. Tuffal, M. C. Hennion, V. Pichon. *J. Chromatogr. A*, 1196 (2008) 73.