



Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Ciências Farmacêuticas  
Coordenação do Curso de Farmácia  
Trabalho de Conclusão de Curso



## **AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS UTILIZADOS EM BIOENSAIOS**

**Vanessa Morais Muniz**

Orientanda

**Fábio Santos de Souza**

Orientador

**Deysiane de Oliveira Brandão**

Co-orientadora

João Pessoa – PB

2015

**Vanessa Morais Muniz**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS  
UTILIZADOS EM BIOENSAIOS**

**Trabalho de Conclusão de Curso** para a obtenção  
do título de bacharel no curso de farmácia da  
Universidade Federal da Paraíba.

**Orientador: Prof. Dr. Fábio Santos de Souza**

**Co-orientadora: Deysiane de Oliveira Brandão**

João Pessoa – PB

2015

*M966a Muniz, Vanessa Morais.*

*Avaliação de métodos de preparação de amostras utilizadas em bioensaios / Vanessa Morais Muniz. -- João Pessoa: [s.n.], 2015.*

*52f.: il. --*

*Orientador: Fábio Santos de Souza.*

*Coorientadora: Deysiane de Oliveira Brandão.*

*Aos meus pais,  
Joana e Tavares,  
pela paciência, pela força e pelo amor.*

## AGRADECIMENTOS

O meu maior agradecimento vai ao meu Deus, que sempre foi muito generoso comigo, tanto em escolher as pessoas certas para estarem junto de mim nos momentos mais difíceis, como também por me proporcionar oportunidades maravilhosas, e que só eu sei o quanto foram importantes na minha vida. Ele que me carregou nos braços nos momentos que eu mais precisei. Ele que me deu todo o consolo que eu precisei. Toda a coragem que eu tive foi Ele que me proporcionou. E hoje estou aqui graças a Ele e às pessoas que Ele colocou na minha vida para me acrescentar. A tudo dou graças ao Pai.

Aos meus pais, Joana e Tavares, e aos meus irmãos, Vinícius e Pretinha, vão também o meu obrigada. Eles foram a minha fortaleza e o meu porto seguro em todos os momentos. E só o fato de saber que eles estavam ali na minha vida, mesmo que de longe, me dava vontade de seguir em frente e ser muito feliz só para deixá-los felizes e orgulhosos. E também à toda a minha família. Em especial aos meus avós Luiza, Chico Bilé e Louzo, que descansem em paz e que se eternizem em meu coração.

Aos meus amigos: os amigos distantes, os amigos do encontro de jovens com Cristo, os meus eternos colegas de faculdade, agora de profissão, e também os grandes amigos que eu fiz nessa cidade. Em especial, alguns nomes: Bia, Edynha, Amanda, Fernanda, Ramon, Marquinhos, Kleber, Rose, Péricles, Luiz, Simone, Verena, Laísa, André, Aratã, Jephesson, Bruno, Elba, Ana Paula, Katherine, Aline, Sara, Gabi, Rayana, Elba, John, Daniel, Lívia, Vinícius, Cleyton, Rafael, Érika, Larissa, aos meus irmãos ‘amaréluz’, as minhas “pareas” de pastoral. Obrigada a todos os meus amigos que de forma direta ou indireta me ajudaram a chegar até aqui.

Ao meu orientador, Fábio de Souza, que sempre me apoiou e me deu ideias para conseguir concluir o trabalho. Obrigada pela paciência, pela dedicação e pelo trabalho realizado. A minha co-orientadora, Deysiane, que também se tornou muito importante para a preparação do trabalho. Obrigada por sempre me acolher e me ajudar sempre que pôde. Obrigada também a minha banca, Ionaldo Basilio e Antônio Severino, por dispor, com muita boa vontade, um tempo para avaliar o meu trabalho.

*Obrigada!*

*“Mas Ele disse-me: ‘Basta-te a minha graça, pois é  
na fraqueza que a força se manifesta.’  
Por isso, de bom grado, eu me gloriarei das  
minhas fraquezas, para que a força de Cristo  
habite em mim. Eis porque eu me comprazo  
nas fraquezas, nas injúrias, nas necessidades,  
nas perseguições e nas angústias sofridas por amor a Cristo.  
Pois quando eu me sinto fraco, é então que eu sou forte.”*

*2 Cor 12, 9-10*

## RESUMO

A análise de material biológico é de grande interesse para várias áreas, incluindo o campo farmacêutico. Nestas análises são feitas a detecção e/ou quantificação de substâncias de interesse, que são os analitos e/ou biomarcadores. As matrizes biológicas são altamente complexas e possuem componentes endógenos ou exógenos, que podem interferir na busca pelo analito de interesse. Os efeitos causados pelos compostos interferentes são chamados de efeitos de matriz, e podem ser driblados ou amenizados por meio de técnicas de preparação de amostras. Por causa disso, são realizadas técnicas de extração, na tentativa de eliminar os componentes que causam o efeito de matriz, tornando a amostra adequada para a realização da análise do composto de interesse. É uma etapa demorada e determinante, que deve ser escolhida de acordo com alguns critérios relacionados à amostra, ao analito e às técnicas cromatográficas. Cada tipo de matriz possui componentes diferentes e devem ser preparadas também de acordo com os tipos de interferentes de cada. Neste trabalho, foi feita a análise de 22 artigos e foi extraído deles informações como: matriz biológica utilizada, técnica de extração, método cromatográfico, limite de detecção, limite inferior de quantificação (LOD e LIQ), recuperação e coeficiente de correlação. As matrizes biológicas mais utilizadas são sangue e urina. As técnicas mais comuns são a extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), precipitação de proteínas (PPT), microextração em fase sólida (SPME) e microextração em fase líquida (LPME). Dentre elas, a mais utilizada nos trabalhos foi a SPE, presente em 8 artigos, dos 22. A SPE provou ser o mais eficaz para a extração de matrizes biológicas, com valores de LIQ e LOD satisfatórios, como exemplo LIQ: 0,3 pg/mL e LOD: 2,5 pg/mL. Alguns artigos apresentaram outros tipos de técnicas de preparação, menos usadas ou mais sofisticadas, como por exemplo a técnica de RAM (material de acesso restrito), presente em 4 artigos. Alguns parâmetros são utilizados para a otimização do processo, como a agitação, o aumento da temperatura, a adição de sal, o uso de alta pressão e a escolha do solvente ideal. Todos os métodos de extração provaram eficácia na eliminação de interferentes, visto a análise dos valores de LIQ e LOD, com valores satisfatórios, os valores de coeficiente de correlação, todos próximos de 1, provam a confiabilidade das análises. Além dos altos valores de recuperação, exceto nos dois trabalhos em que o método de extração selecionado foi o LLE, que mostraram baixos

valores de recuperação (45,1 e 60%). Cada análise deve ser avaliada separadamente, de acordo com as suas características, para a escolha do método de extração ideal.

Palavras-chave: extração, matriz biológica e preparação de amostra.

## ABSTRACT

The analysis of a biological material is of great interest to a number of areas, including the pharmaceutical field. In these analyzes are made the detection and / or quantification of substances of interest, which are the analytes and biomarkers. The biological matrices are highly complex and have endogenous or exogenous components, which can interfere with the search for the analyte of interest. The effects caused by the interfering compounds are called matrix effect, and can be circumvented or mitigated by preparing biological samples techniques. Because of this, extraction techniques are performed in an attempt to eliminate the components that cause the matrix effect by making the appropriate specimen for analysis and detection and / or quantification of the analyte. It is a time consuming step and determining and should be selected according to some criteria related to the sample, the analyte and chromatographic techniques. Each type of matrix has different components that should also be prepared in accordance with the types of interfering. In this work, the analysis was made of 22 articles and extracted information from them as: biological matrix used, extraction technique, chromatographic method, detection limit, lower limit of quantification (LOD and LIQ), recovery, correlation coefficient. The most frequently biological matrices used are blood and urine, which has been proved in the evaluation of articles, in which most used these types of arrays. The most common techniques are liquid-liquid extraction (LLE), solid phase extraction (SPE), protein precipitation (PPT), solid phase microextraction (SPME) and liquid phase microextraction (LPME). Among them, the most used in the SPE, present in 8 articles, from 22. selected articles. The SPE proved to be the most effective when the sample is a biological matrix, with satisfactory LIQ and LOD, for example LIQ: 0.3 pg / mL and LOD: 2.5 pg / ml. Some articles had other types of preparation techniques, more or less sophisticated used, such as RAM technique (restricted access material) present in 4 articles. Some parameters are used to optimize the process, such as stirring, the temperature increase, salt addition, the use of high pressure and the choice of optimal solvent. All extraction methods have proven effective in eliminating interfering, since the analysis of the values of LIQ and LOD, with satisfactory values, the correlation coefficient values all close to 1, prove the reliability of the analysis. In addition to the high recovery values, except in two papers in the selected extraction method was the LLE,

which showed low recovery values (45.1 and 60%). Each analysis shall be assessed separately according to their characteristics, to choose the ideal extraction method.

Keywords: extraction, biological matrix and sample preparation.

## **LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1** - Métodos e técnicas empregadas em análises de matrizes biológicas – Técnicas mais utilizadas.

**Quadro 2** - Métodos e técnicas empregadas em análises de matrizes biológicas– Outras técnicas de preparação.

## LISTA DE SIGLAS

**CLAE:** cromatografia líquida de alta eficiência;

**CG:** cromatográfica gasosa;

**DAD:** detector de arranjo de diodos;

**DLPME:** LPME em dispersão;

**DSPME:** SPME em dispersão;

**EM:** efeito de matriz;

**HF-LPME:** LPME com fibra oca;

**HF-SSBME:** fase sólida suportada com fibra oca com barra com solvente;

**LDO:** limite de detecção;

**LIQ:** limite inferior de quantificação;

**LLE:** extração líquido-líquido;

**LPME:** microextração em fase líquida;

**MEPS:** microextração por solvente empacotado;

**MIP:** polímeros molecularmente impressos;

**MS e MS/MS:** espectrômetro de massas e espectrômetro de massas em tandem;

**PPT:** precipitação de proteínas;

**RAM:** material de acesso restrito;

**RPLC:** cromatografia líquida com fase reversa;

**SIL-IS:** padrão interno marcado com isótopos estáveis;

**SPE:** extração em fase sólida;

**SPME:** microextração em fase sólida;

**UHPLC:** cromatografia líquida de ultra performance;

**UV:** detector de ultravioleta.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
1.1 Justificativa .....	2
2. Objetivos	
2.1 Objetivo geral .....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. Metodologia .....	5
4. Revisão Bibliográfica.....	6
4.1 As amostras biológicas.....	6
4.2 Efeito de matriz.....	8
4.3 Principais métodos de preparação de amostras biológicas.....	9
- Extração líquido-líquido (LLE).....	11
- Extração em fase sólida (SPE).....	12
- Microextração em fase sólida (SPME).....	13
- Microextração em fase líquida (LPME).....	14
-Precipitação de proteínas.....	16
4.4 Parâmetros que otimizam o processo de extração.....	16
4.5 Quadro de dados 1 .....	19
4.6 Outras técnicas de preparação.....	25
4.7 Quadro de dados 2.....	28
5. Considerações finais.....	30
Referências Bibliográficas.....	32

## 1. INTRODUÇÃO

A análise de substâncias em material biológico é de elevado interesse em diversas áreas. Alguns exemplos são: monitorização terapêutica no uso prolongado de medicamentos; estudos de biodisponibilidade, de bioequivalência, de farmacocinética e de toxicidade; diagnóstico laboratorial de suspeita de uso de substâncias com finalidade suicida ou homicida, intoxicações (DE FREITAS, 2009) e doping (SILVEIRA; RIGO, 2015).

O objetivo destas análises é a detecção e/ou quantificação de uma ou mais substâncias de interesse. Em cada um destes estudos, a presença ou ausência de alguma substância ou de seu metabólito, ou até a sua concentração é que dá a resposta ao pesquisador e, a partir disso, as conclusões são tomadas. Estas substâncias de interesse são os analitos e os biomarcadores. Segundo a RDC nº 27/2012, o analito é um composto químico específico a ser mensurado em uma matriz. Já o biomarcador é uma substância ou seu produto de biotransformação, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, fornece a intensidade de exposição e o risco à saúde, pois refletem as alterações celulares e moleculares que ocorrem num organismo (KUNO; ROQUETTI; GOUVEIA, 2010).

As matrizes biológicas, como plasma, sangue, urina, saliva, órgãos, cabelo são altamente complexas. Alguns de seus componentes podem atrapalhar as análises, afetando a resposta do analito de interesse, a sensibilidade e a reprodutibilidade do ensaio (CHIU et al, 2010). O efeito na resposta do analito por estes componentes das matrizes biológicas é chamado de efeito de matriz (RDC nº27/2012). O desenvolvimento de métodos de preparação de amostra, que aborda a extração, o 'clean-up' e o enriquecimento de amostras é uma etapa de extrema importância para driblar o efeito de matriz. Esta é a etapa mais demorada do processo, equivale cerca de 80% do tempo total de análise, além disso, pode acontecer nela a introdução de erros, principalmente devido à perda do analito e à contaminação da amostra (JARDIM, 2010).

É necessário o conhecimento destas matrizes e do analito para selecionar a técnica de extração utilizada, para assegurar especificidade e seletividade na análise, e para ser possível determinar os limites de quantificação, de determinação e a faixa linear. Também

é importante selecionar a técnica dependendo do limite inferior de quantificação desejado, do tipo de cromatografia e do detector utilizado para a etapa de análise (BEDOR, 2007). Uma preparação de amostra adequada é um passo fundamental para qualquer procedimento analítico (TSAI et al; 2009).

A RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, dispõe dos requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Os parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez são avaliados para validar uma bioanálise, tornando o método confiável.

Neste trabalho, foram avaliados alguns destes parâmetros presentes nos artigos analisados, com o objetivo de comparar e avaliar a eficiência dos métodos de extração. Os parâmetros avaliados foram limite de detecção (LDO), limite inferior de quantificação (LIQ), recuperação, além do coeficiente de correlação, que é o grau de relacionamento entre as duas variáveis (X e Y), da curva de calibração.

O LDO é, segundo a RDC 899/2003, a menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo, ou seja, a menor quantidade do analito de interesse que pode ser detectada pelo método. O LIQ, segundo a RDC nº 27/2012, é a menor concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz, e esta, por sua vez, é a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, ela é feita com o analito em diferentes concentrações. Outra definição importante neste contexto é a recuperação, que avalia a capacidade que a metodologia tem de extrair a substância de interesse da amostra dentro de um limite de variação (BAZZARELA, 2010).

## **1.1 Justificativa**

Nas últimas décadas, a instrumentação analítica e a separação e a detecção do analito têm tido um grande avanço, deixando-se em segundo plano a parte de preparação de amostras. Mas o cenário tem mudado nos últimos anos, levando-se em consideração a introdução de novas técnicas de preparação. A parte de preparação de amostras é de

importância indiscutível. É uma fase crucial para toda a análise e, se não for bem executada, não mostrará resultados confiáveis. Esse trabalho pretende fazer uma abordagem geral sobre os principais métodos de extração envolvidos em preparação de amostras biológicas. Fornecendo as melhores opções e colaborando na escolha da técnica mais adequada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Analisar publicações recentes da literatura sobre o preparo de amostras que são utilizadas em bioensaios.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Fazer o levantamento bibliográfico de artigos que tratem de preparação de amostras biológicas;
- Reunir informações sobre os principais métodos de preparação de amostras e os parâmetros de validação contidos nos artigos;
- Comparar os métodos de preparação mais utilizados para as amostras biológicas utilizadas em bioensaios.

### 3. METODOLOGIA

Este trabalho é uma revisão sistemática da literatura científica sobre os principais métodos de preparação de amostras utilizados em bioensaios. Foi feita uma investigação em estudos publicados entre 2009 e 2015, nos bancos de dados eletrônicos: SciELO, Web of Science, SCOPUS, ACADEMIC OneFile, Technology Research Database, ScienceDirect, LILACS. Na busca dos artigos a serem analisados, foi utilizado o cruzamento das palavras-chaves: extração, matriz biológica e preparação de amostra ('extraction', 'biological matrix' e 'sample preparation').

Os critérios utilizados para a inclusão dos artigos científicos nessa revisão foram:

- Artigos publicados de janeiro de 2009 a maio de 2015, disponíveis na íntegra nas bases de dados supracitadas;
- Artigos que usem pelo menos uma técnica de preparação de amostra;
- Estudos que possuíssem a análise de ao menos uma amostra biológica;
- Artigos em língua portuguesa e inglesa.

Os dados coletados dos artigos científicos foram organizados em um quadro e avaliados posteriormente.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Conforme o que foi exposto na metodologia, 22 artigos científicos foram selecionados, analisados e os dados foram expressos de forma descritiva ou em quadros.

### 4.1 As amostras biológicas

As matrizes biológicas mais utilizadas em bioensaios são o plasma e a urina porque, na maioria dos casos, elas contêm quantidades significativas do analito ou do biomarcador analisado e também por serem de fácil obtenção. A concentração do analito no plasma pode informar a exposição do analito aos tecidos. E a presença deles na urina, principal forma de eliminação, indica que de alguma forma houve a exposição do composto investigado ao organismo. Mas em outras análises também são utilizadas outros tipos de matrizes dependendo do objetivo do estudo. Como, por exemplo, a análise do cabelo para informar uma exposição por um longo período. E também o leite materno, para avaliar compostos utilizados previamente pela mãe (DE OLIVEIRA et al, 2008).

Amostras biológicas, ante ou post-mortem, podem apresentar quantidades de analito em várias concentrações. As amostras post-mortem diferem por conter compostos em decomposição e putrefação. A variabilidade na composição de amostras reflete na variabilidade do efeito de matriz. Um problema encontrado na extração a partir de sangue (especialmente post-mortem) é a viscosidade, comparado a amostras de urina, podendo conter células que bloqueiam cartuchos ou membranas, por exemplo. Uma alternativa para diminuir a viscosidade é a sonicação do sangue para fragmentar as células vermelhas, e também a diluição com um tampão para reduzir a viscosidade (VERPLAETSE; TYTGAT, 2010, 2012).

Quando a análise é feita a partir de qualquer tecido, o primeiro passo é extrair os analitos deste tecido com algum solvente, como por exemplo o MeCN, usado por exemplo, por Tsai et al (2009). Antes da extração é feita a homogeneização e centrifugação do tecido com solvente e, a partir disso, é utilizada para a extração o sobrenadante, que contém os analitos. Como exemplo de extração em tecido muscular suíno, o autor Tsai et al (2009) utilizou o seguinte método: utilizou-se cinco gramas de

tecido suíno, que foi colocado em um tubo de 50 mL, com 5 mL de MeCN, 50 µL de ácido perclórico a 70% e tudo foi homogeneizado. Após a adição de 2 g de anidro sulfato de magnésio e 1 g de cloreto de sódio, a mistura foi agitada à mão durante um minuto e, em seguida, centrifugada durante quatro minutos a 10.000 rpm. A camada superior de MeCN foi utilizada para a extração. Os solventes podem ser diferentes para cada tecido, são selecionados os que têm maior afinidade com o analito, fazendo com que se tenha um melhor rendimento nessa primeira fase de preparação.

Já o leite humano é uma matriz complexa que contém lipídeos, proteínas, hidratos de carbono, vitaminas e minerais que podem ser também extraídos junto com o analito e interferir na detecção do mesmo. Uma forma utilizada para diminuir a coextração destes interferentes é a liofilização prévia das amostras (RODRÍGUEZ-GÓMEZ et al, 2015). O leite materno contém água (88%), proteínas (3%), lipídeos (aproximadamente 3%) e carboidratos na forma de lactose (6,8%) (DE OLIVEIRA et al, 2008).

Em relação à composição dessas matrizes, o plasma humano contém aproximadamente 7-8% de proteínas (55% de albumina, além de 1-glicoproteína ácida, lipoproteínas e imunoglobulinas etc), além de eletrólitos, lipídeos, hormônios e metabólitos, em diferentes concentrações, dependendo da situação do organismo. E ainda existem os fármacos altamente ligados às proteínas plasmáticas. No sangue, as hemácias constituem 45% do volume total. (DE OLIVEIRA et al, 2008).

A urina contém compostos inorgânicos e orgânicos, com quantidade relativamente grande de sais, cristais e células. A variação de pH também afeta consideravelmente o efeito de matriz (CHIU et al, 2010).

Na saliva humana, fosfolipídeos constituem uma fração menor de lipídeos totais, no entanto, lipídeos neutros constituem 96,4% do total de lipídeos (ISMAIEL et al, 2010). Tudo isso interfere de forma direta na análise, causando o chamado efeito de matriz. Os efeitos são dependentes do tipo de material biológico, pois cada um tem uma composição diferente. Cada método analítico também reage de forma diferente aos efeitos (CHIU et al, 2010).

## 4.2 Efeito de matriz

Este fenômeno complexo foi relatado pela primeira vez por *Kebarle e Tang* em 1993 (LIU, Lei et al, 2012). Os efeitos de matriz ocorrem por conta da coeluição de componentes da matriz com os analitos de interesse. Estes efeitos podem afetar significativamente a eficiência, sensibilidade e exatidão do ensaio. Eles também podem causar problemas analíticos, devido à variabilidade na concentração dos componentes da matriz. Também pode ocorrer retenção e deslocamento de tempo, presença de linhas de base elevadas e de curvas de calibração divergentes (RODRÍGUEZ-GÓMEZ et al, 2015).

Os efeitos da matriz influenciam nos ensaios bioanalíticos, com eventual supressão ou o aumento de ionização de analitos pela presença de componentes endógenos (DE SOUSA et al, 2012; ANSERMOT et al, 2013). O efeito pode ser positivo, com o aumento do sinal cromatográfico, ou negativo, quando acontece a diminuição do sinal. Estas alterações são resultado da adsorção de analitos com componentes da matriz no injetor, e/ou no detector, e/ou na coluna cromatográfica. (DE SOUSA et al, 2012). Faz-se necessária uma separação cromatográfica adequada para análises fideis, com eluição dos analitos sem os efeitos da matriz, normalmente observados no início do cromatograma (ISMAIEL et al, 2010).

Fosfolipídeos são os lipídeos mais abundantes das membranas celulares, e são considerados o principal grupo de componentes endógenos que causam este tipo de efeito (GUO et al, 2015). O tipo e quantidade de lipídeos pode variar de um indivíduo para outro, dependendo da dieta e das taxas metabólicas de cada um. O acúmulo ou a eluição incompleta dos mesmos reduz a vida útil da coluna, além dos efeitos de matriz, tais como deslocamento na retenção de analitos das amostras injetadas sequencialmente (ISMAIEL et al, 2010; TULIPANI et al, 2013). Este efeito também pode ser causado por substâncias endógenas inorgânicas e orgânicas, incluindo sais, hidratos de carbono, amins, ureia, peptídeos, metabólitos etc (CHIU et al, 2010).

Existem duas principais técnicas para avaliar os efeitos da matriz: infusão pós-coluna e de pós-extração. No método de infusão pós-coluna é feita a infusão contínua do analito utilizando uma bomba de seringa ligada através de um “T” entre a coluna cromatográfica e o espectrômetro de massa (fonte de iões) (TUDELA; MUÑOZ;

MUÑOZ-GUERRA, 2012; MARCHI et al, 2010). Simultaneamente, uma amostra de extrato em branco é injetada e a resposta do analito é monitorizada. Esta técnica permite, de forma qualitativa, a identificação da área cromatográfica onde o analito sofrerá influência do efeito de matriz (CHIU et al, 2010). Já o método de pós-extração fornece dados quantitativos dos efeitos de matriz, pois compara a resposta de alguns analitos adicionados a uma amostra que sofreu extração, e a injeção direta da mesma quantidade de analitos numa fase móvel. O cálculo do efeito é feito dividindo a resposta do analito na amostra que sofreu extração (B), pela resposta da solução pura (A), e multiplicando o resultado por 100 (YADAV et al, 2012). O “-100” é o fator de diferença.

$$EM\% = ((B/A) \times 100) - 100$$

Em geral, as duas abordagens para combater os efeitos da matriz podem ser aplicadas no intuito de melhorar a separação cromatográfica ou direcionar o melhor método para a preparação da amostra. O ajuste das condições cromatográficas é feito para impedir a eluição dos analitos na região onde se observa a supressão de íões, mas pode acarretar um maior tempo de análise cromatográfica. De acordo com algumas publicações, quando os valores de supressão de íões são inferior a 25%, os resultados são considerados aceitáveis. Os resultados podem ser positivos ou negativos, dependendo se houver supressão ou aumento da resposta dos íões (TUDELA; MUÑOZ; MUÑOZ-GUERRA, 2012).

### **4.3 Principais métodos de preparação de amostras biológicas**

Os principais objetivos da preparação da amostra são promover a extração, também muitas vezes, aumentar a concentração dos analitos de interesse (pré-concentração), e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes (‘clean-up’). Essa é a etapa mais onerosa e demorada envolvida no processo analítico, consumindo o maior tempo da análise (JARDIM, 2010). A preparação das amostras ainda representa um passo essencial e consiste numa vasta gama de procedimentos, incluindo centrifugação, para a remoção de materiais insolúveis de soluções, ‘clean-up’ e pré-concentração, utilizando diferentes métodos de extração. As técnicas mais comuns são a precipitação de proteína

(PP), extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE) (BOURGOGNE et al, 2015). Na última década, tem acontecido um rápido desenvolvimento de novas técnicas de preparação de amostra com base na miniaturização dos métodos tradicionais: microextração em fase líquida (LPME) e microextração em fase sólida (SPME) (PETERSEN et al, 2011).

Várias estratégias de preparação de amostras podem ser usadas para desenvolver bioanálises. A maioria delas depende de fatores tais como volume da amostra, limite de quantificação, a duração e o custo de desenvolvimento de métodos por amostra (BOURGOGNE et al, 2015).

O primeiro passo é a determinação do tipo de técnica de amostragem (dependendo do objetivo da investigação), depois é importante ter o conhecimento físico-químico da amostra e das condições de análise, para a escolha do método de extração (JARDIM, 2010). E, finalmente, a preparação da amostra, que tem por objetivo a retirada de compostos que podem interferir na análise, ou em outros casos, realizar reações de derivatização para tornar o analito compatível ao sistema analítico. A fase de preparação é importante e crítica, visto que na maioria das vezes é feito de forma manual. Sendo assim a precisão e exatidão serão dependentes deste processo. O tipo de análise cromatográfica vai ser escolhida de acordo com as características da matriz e do analito/biomarcador a ser quantificado. Na escolha, deve-se levar em consideração também a instrumentação e as condições de análise para cada caso em particular. É interessante que o processo seja rápido, com poucas etapas e com uma recuperação satisfatória (GIU, 2011).

Por último, é utilizado o sistema cromatográfico para a separação e quantificação do soluto. Elas tem como objetivo a limpeza da amostra e a concentração dos analitos/biomarcadores (DE FREITAS, 2009). Esta preparação, 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 (JARDIM, 2010).

A seguir, serão abordadas as principais características, vantagens e desvantagens de cada uma delas.

- **Extração líquido-líquido (ELL)**

Dentre as técnicas de preparo de amostras, a ELL é uma das mais antigas. Geralmente é feita em um funil de separação ou tubos de centrífuga, em que se faz a adição de um ou mais solventes imiscíveis na matriz. Após agitação são formadas duas fases (aquosa e orgânica). Se o analito migrar para a fase orgânica, é necessária a evaporação desta fase para a recuperação do mesmo. Caso o mesmo migre para a fase aquosa, a análise é feita diretamente no sistema cromatográfico (DE FREITAS, 2009).

A recuperação se dá de acordo com o coeficiente de partição entre as duas fases. O coeficiente de partição (representado pela letra  $P$ ) é a razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio de uma espécie química, quando dissolvido em um sistema em que se tem uma fase aquosa e uma fase orgânica, ou seja,  $P = \frac{[\text{solute}] \text{ na fase orgânica}}{[\text{solute}] \text{ na fase aquosa}}$  (TAVARES, 2004). Também pode-se dizer que é a tendência do soluto de se distribuir entre as duas fases de acordo com o grau de afinidade entre elas. Se  $P=1$  significa que há equilíbrio na distribuição do soluto entre as duas fases, se  $P<1$  significa que o soluto tem preferência em se distribuir na fase aquosa e se  $P>1$  significa que o soluto tem preferência pela fase orgânica. Os valores são tabelados pelo *log de P*, facilitando a interpretação (PERUZZO; DO CANTO, 2012).

É necessário o ajuste de parâmetros como o pH, complexação e concentração salina, ou até por meio de reações de derivatização, fazendo com que aumente a solubilidade do analito na fase extratora, elevando o coeficiente de partição e a porcentagem de recuperação (GIU, 2011).

Esta técnica tem como vantagens a facilidade de operação, relativo baixo custo, a disponibilidade de solventes que podem ser utilizados, além do conhecimento acumulado ao longo dos anos sobre eles e a alta reprodutibilidade por causa da pureza dos solventes. As desvantagens são a perda de grande quantidade de solvente na fase de evaporação, a possível formação de emulsões depois da agitação, solventes caros pelo alto grau de pureza, tempo prolongado de separação, dificuldade de automação e a produção de resíduos orgânicos, que podem ser tóxicos para o operador (DE FREITAS, 2009; ORLANDO et al, 2009).

- *Extração em fase sólida (SPE)*

Esse tipo de extração é baseado no método da cromatografia líquida em coluna, em que a separação do analito é dada de acordo com a sua afinidade pela fase estacionária. A SPE pode ser feita de três maneiras: modo reverso, modo normal ou de troca iônica. Em cada um dos três modos haverá um tipo de interação diferente. 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 e interações iônicas (JARDIM, 2010; DE FREITAS, 2009).

O primeiro passo é o condicionamento do sorvente (ativação e equilíbrio do sorvente), logo depois a matriz é adicionada à coluna por meio de uma pressão. O passo seguinte é a retenção do analito pelo adsorvente dos discos ou cartuchos, estes dois são os dispositivos mais utilizados na SPE. Na sequência, são feitas lavagens para a eliminação dos interferentes ('clean-up') e, em seguida, a eluição do analito com solventes adequados (CALDAS et al, 2011). Pode ser necessário o pré-tratamento da amostra antes de passar pelo cartucho, para que ele apresente uma maior eficiência. Este pré-tratamento pode ser feito com o uso de solventes orgânicos e vai depender da complexidade da matriz (ROSA; SARCINELLI, 2008). Em relação aos dispositivos, os cartuchos são mais vantajosos do que os discos em relação à maior disponibilidade no mercado, maior facilidade de manuseio e menor custo. São utilizados mais comumente na forma de seringa, em que a fase estacionária está retida entre dois cartuchos. Já os discos possuem uma fase estacionária imobilizada em uma matriz inerte (BEDOR, 2007), eles possuem uma camada extratora mais fina, facilitando a passagem da matriz. Também nos discos utiliza-se um menor volume de eluentes e as extrações são mais reprodutíveis, porém são mais caros e menos acessíveis (GIU, 2011).

A SPE pode ser feita offline e online. No modo offline, o processamento das amostras e a separação cromatográfica são feitos de forma separada. Após o tratamento, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico. No sistema online, o mesmo equipamento realiza extração, 'clean-up', eluição da amostra e liga-se diretamente ao cromatógrafo, é uma operação sequencial e automatizada (JARDIM, 2010).

As vantagens da SPE são a capacidade de automação, pelo uso de sistemas extratores com vácuo, exigindo assim um tempo menor de análise. Normalmente só é necessária uma única extração para se recuperar o analito, diferentemente da técnica explicada anteriormente. Além disso, se utiliza uma menor quantidade de solvente e permite uma maior seletividade na extração pelo uso de uma gama de sorventes diferentes, com a capacidade de reter compostos tanto polares, como apolares (DE FREITAS, 2009; BEDOR, 2007). Porém, se for feito de forma manual o tempo chega a ser maior do que na ELL, além também de exigir mais da técnica manual pelo operador e a limpeza da amostra causa uma diminuição dos limites de quantificação e detecção (ROSA; SARCINELLI, 2008).

- ***Microextração em fase sólida (SPME)***

A SPME é uma forma de avanço da técnica SPE, pelo uso reduzido de reagentes, solventes, menores quantidade de amostra e tempo de análise (JARDIM, 2010). Nesta técnica, utiliza-se uma microseringa, que contém no seu interior uma fibra ótica de sílica fundida (KRAHN, 2010). Tem como fundamento o coeficiente de partição do analito entre a fibra e a matriz. A fibra é recoberta com um adsorvente adequado. Nesta técnica, a matriz é chamada de fase doadora e a fase em que vai ficar o composto de interesse é chamado de fase receptora. Estas duas fases são separadas por uma membrana seletiva, que como o próprio nome diz, vai permitir a passagem somente do que for solúvel ou do que for pequeno o bastante para passar pelos seus poros (GIU, 2011).

Os dois principais modos de operação em SPME são a extração direta e a extração via ‘headspace’. No primeiro, a fibra é colocada na amostra e os analitos são transportados da amostra para a fase receptora (VIEIRA; REBOUÇAS; DE ANDRADE, 2012). A otimização da agitação é fundamental para abreviar o tempo de extração. A agitação magnética, por sua simplicidade, é a mais comumente utilizada (VALENTE; AUGUSTO, 2000). É mais usada quando a análise for feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e para compostos termossensíveis. Já o ‘headspace’ é mais usado quando a análise for feita pela cromatografia gasosa (CG), muito utilizada para compostos mais voláteis (GIU, 2011). O modo ‘headspace’ serve, principalmente, para proteger a fibra de possíveis danos provocados por interferentes de elevada massa molecular ou baixa volatilidade presentes nas amostras, como as proteínas. A quantidade de analito extraída

na fibra será proporcional à constante de equilíbrio entre as fases gasosa ('headspace') e líquida (amostra) (VIEIRA; REBOUÇAS; DE ANDRADE, 2012).

Existem o 'headspace' dinâmico e o 'headspace' estático. No primeiro, a amostra é mantida num recipiente fechado até os compostos voláteis atingirem o equilíbrio termodinâmico entre as fases líquida e gasosa, geralmente é feito à temperatura ambiente (WELKE, 2012). Depois disso, uma alíquota da fase gasosa é colhida e aplicada no CG, nisso os analitos são termicamente desorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica (VALENTE; AUGUSTO, 2000). Já o segundo tipo é feito por um sistema à vácuo ou pela passagem de um gás inerte. É feita a coleta e a concentração dos compostos voláteis de forma contínua, depois disso os compostos voláteis são eluídos com um solvente adequado ou desorvidos termicamente (WELKE, 2012).

As vantagens dessa técnica são a capacidade de automação, exige um menor tempo, há a possibilidade de se utilizar várias vezes a mesma fibra, evita a formação de emulsões, tem alto poder de concentração, usa uma quantidade reduzida de amostra e não utiliza solvente orgânico para a extração (WELKE, 2012). Porém, possui limites de quantificação altos, existem grandes variações entre marcas e lotes dos polímeros extratores. Na maioria dos casos, é necessário análise em replicata, pois a quantidade de analito extraída é muito menor do que a quantidade total presente na amostra (GIU, 2011).

- ***Microextração em fase líquida (LPME)***

Na LPME, a amostra aquosa é colocada em um frasco pequeno ( $\pm 5$  mL), no qual é introduzido um pedaço de fibra oca de polipropileno poroso (DE FREITAS, 2009). Antes da extração, a fibra é imersa no solvente orgânico a fim de imobilizá-lo nos seus poros, e o excesso é removido por imersão em água (DE SANTANA, 2008).

A LPME pode ser feita de dois modos: duas ou três fases, de acordo com as características do analito em questão. No primeiro deles, o analito é extraído da amostra aquosa (também chamada de fase doadora) através de um solvente orgânico que é imiscível em água, que está imobilizado nos poros da membrana passando para o mesmo solvente orgânico (fase aceptora), que também está presente no lúmen da fibra. Nesse

tipo de LPME é interessante que o analito seja moderada ou altamente hidrofóbico para os resultados desejáveis. No segundo modo, o analito é extraído da amostra aquosa da mesma maneira do primeiro modo, mas neste caso a passagem é para uma solução aquosa, presente no lúmen da fibra. Entre as fases aceptora e doadora (ambas aquosas), existe uma fase orgânica, que serve de barreira, impedindo o contato entre as duas fases. Se o analito for altamente hidrofílico e tem dificuldade em ser extraído na membrana orgânica apenas pelo processo de difusão, uma outra possibilidade seria a adição de reagente iônico relativamente hidrofóbico à fase doadora, permitindo a formação de um par iônico com o analito de interesse, ocorrendo então a extração (DE OLIVEIRA et al, 2008; PETERSEN et al, 2011).

Na LPME também é utilizada agitação da amostra para acelerar o processo de extração, facilitando a difusão dos analitos através da interface fase doadora (solvente orgânico). As membranas capilares empregadas em LPME devem ser hidrofóbicas e compatíveis com os solventes orgânicos utilizados (DE OLIVEIRA et al, 2008). Após a extração, o solvente orgânico é aspirado pela seringa e injetado diretamente no CG. No caso do CLAE, o solvente orgânico é evaporado e o resíduo é dissolvido em um solvente apropriado (CALIXTO, 2012).

Esta técnica combina os princípios da LLE com a natureza miniaturizada da SPME, para obter as vantagens das duas técnicas. É uma técnica simples, rápida, praticamente livre de solventes, alto grau de recuperação e sem possibilidade de contaminação cruzada, visto que a fibra é utilizada uma única vez (DE SANTANA, 2008). Cada extremidade da fibra é conectada a uma agulha de aço deixando a fibra com o formato de “U”. Este formato contribui para excelentes extrações, mas com a desvantagem da transferência da solução aceptora e a difícil automação, que pode ser resolvido com o formato linear da fibra (DE FREITAS, 2009).

- ***Precipitação de proteínas (PPT)***

A técnica de PPT pode ser utilizada para eliminar as substâncias interferentes (BRASIL, 2010). É feita pela adição de sais ou solventes orgânicos miscíveis (por exemplo, acetonitrila e metanol), com posterior centrifugação para separar o material que precipita da substância a ser analisada (MA et al, 2008). É comumente utilizada como

método de preparação do plasma por causa de seu baixo custo e requisitos mínimos de desenvolvimento do método. A inclusão de uma etapa de precipitação é normalmente utilizada antes da extração, proporcionando amostras livres de interferentes, resultando num aumento da eficiência de extração (DE SANTANA, 2008; CÉSAR, 2009; CHIU et al, 2010). No entanto, também é utilizada como único método de preparação por alguns autores (SHAH; KARNES, 2010; OLDI; KANNAN, 2009). Os sais ou solventes orgânicos adicionados competem com as proteínas pela água disponível. É uma técnica muito simples e de baixo custo, porém de pouca eficiência na retirada de interferentes, baixa reprodutibilidade e perda do analito (ORLANDO et al, 2009).

Utiliza-se o PPT dependendo do tipo de analito, como mostra o trabalho de SCHETTGEN et al (2009), que explica que a alta polaridade dos analitos, o permitiu reduzir a etapa de limpeza na fase de RAM (material de acesso restrito), realizada diretamente com a PPT. Os analitos deste caso são satisfatoriamente separados dos componentes da matriz por estes métodos. Os resultados mostraram alta especificidade, pois na detecção MS / MS houve uma determinação de todos os analitos livre de interferentes.

#### **4.4 Parâmetros que otimizam o processo de extração**

Existem alguns parâmetros que auxiliam o processo de extração, otimizando o processo e melhorando os resultados, os tornando mais confiáveis. A agitação, por exemplo, acelera a cinética de extração. De acordo com Wei Liu et al (2012), é formada uma interface entre a fase aquosa e a fase orgânica, que ajuda na transferência dos compostos de interesse através do solvente orgânico para os poros da fibra, melhorando, assim, a eficiência de extração. Mas deve-se ter atenção, pois uma agitação muito vigorosa pode produzir bolhas de ar que aderem à superfície da fibra e limita a transferência dos analitos. Também pode acontecer a dissolução dos analitos na fase orgânica presente na membrana e causar a diminuição da eficiência de extração, além de poder acarretar a perda de fase orgânica impregnada na membrana.

A temperatura afeta diretamente as propriedades físico-químicas do solvente. Elevar a temperatura, diminui a viscosidade, aumenta a velocidade de difusão e a

solubilidade dos analitos no solvente. Além disso, diminui a tensão superficial do solvente, permitindo uma melhor penetração nos poros e as partículas da matriz, o que melhora a transferência de massa. E também, as temperaturas mais elevadas podem enfraquecer e perturbar as fortes interações entre os analitos e a matriz, como Van der Waals e ligações de hidrogênio. Portanto, a temperatura é um parâmetro importante a ser avaliado pelo método (MANTOVANI et al, 2014).

Deve-se ter atenção ao tipo de matriz e às propriedades dos compostos de interesse para selecionar a temperatura correta. Um estudo realizado pelo autor Wei Liu et al (2012) testou uma série de temperaturas para extração, numa solução aquosa contendo 25 ng/mL de cada analito, com a velocidade de agitação de 750 rpm. Verificou-se que os sinais analíticos aumentaram rapidamente na faixa de 40 °C, mas depois de 40 °C, os sinais recuaram. Este resultado pode ser explicado pelo fato da alta temperatura transformar a fase orgânica em aquosa, e, portanto, diminuiria os coeficientes de partição entre as duas fases, diminuindo as taxas de transferência de massa dos analitos. Os autores Miró e Hansen (2013) também relataram que o aumento da temperatura pode aumentar a transferência de massa de analitos a partir da solução da amostra para o 'headspace', no caso da SPE; no entanto, ela também diminui a quantidade de analitos que deveriam ser retidos pelo revestimento da fibra.

O efeito de 'salting-out', que equivale à adição de sal, tem sido amplamente utilizado em diferentes métodos de extração e foi relatado que ele pode aumentar a eficiência da extração, por exemplo, no método LLE. Mas alguns resultados contraditórios também têm sido relatados (TAHMASEBI; YAMINI; SALEH, 2009). O método foi utilizado pelos autores Miró e Hansen (2013), que relataram, em seu trabalho, o aumento da área do pico de drogas básicas em 3 a 4 vezes, em comparação com nenhuma adição de sal. Já o autor Moein et al (2014) ressalta que a influência da adição de sal pode variar de melhor a pior eficiência da extração, dependendo da natureza dos analitos e da matriz.

Além disso, a presença da alta concentração de sal na solução pode alterar as propriedades físico-químicas da substância analisada ou diminuir a taxa de difusão do sorvente. Um estudo feito pelo mesmo autor avaliou o efeito da adição de sal sobre a recuperação de ácido hipúrico (HA) por MIP (polímeros molecularmente impressos).

Diferentes concentrações de NaCl (1-100 mmol/L) foram adicionadas às soluções, e extrações usando a membrana MIP foram utilizadas. Os resultados mostram que a concentração específica de 20 mmol/L de NaCl ajudou na recuperação de HA em amostras de plasma e de urina e em seguida, a recuperação diminuiu quando a concentração de sal aumentou. A adição de sal pode aumentar o particionamento do analito para a fase orgânica pelo efeito de ‘salting-out’.

No trabalho de Tahmasebi, Yamini e Saleh (2009), resultados mostraram que a adição de sal até 10% da concentração, aumenta a eficiência de extração dos compostos de interesse, mas a adição de mais sal diminuiu a sua eficiência. Este efeito pode ser devido às crescentes interações entre a substância a analisar e o sal, e também o aumento da viscosidade da solução de amostra, com o aumento da concentração de sal.

Em relação à alta pressão, a principal razão para o uso durante o processo de extração é a de manter o solvente na forma líquida, mesmo quando a temperatura estiver acima do ponto de ebulição. Isso facilita a extração dos analitos, forçando o solvente a entrar em contato com áreas que normalmente não entrariam em contato com os solventes utilizando condições atmosféricas, tornando a substância disponível para extração (MANTOVANI et al, 2014).

A seleção do solvente de extração é também de grande importância, a fim de se obter uma eficiente pré-concentração do analito, bem como sensibilidade, precisão e seletividade na extração dos compostos alvo. Como, por exemplo, em HF-LPME utilizado no trabalho de Tahmasebi, Yamini e Saleh (2009), o solvente orgânico escolhido tem de satisfazer requisitos como: ser facilmente imobilizado no interior dos poros da fibra, ter alta seletividade para o analito e baixa tendência para extrair os interferentes existentes, deve ser imiscível com água para evitar a dissolução e ser não-volátil para prevenir a perda de solvente durante a extração. Solventes com baixa viscosidade são preferidos devido à grande coeficiente de difusão dos analitos; e, finalmente, o solvente deve ter baixa toxicidade. Padrões internos também são conhecidos por enfrentar variações causadas pelos efeitos de matriz (VERPLAETSE; TYTGAT, 2012).

#### **4.5 Quadro de dados**

A seguir está o quadro com os métodos de preparação retirados dos artigos, bem como o tipo de matriz biológica, de análise cromatográfica e com os parâmetros analíticos. Para o primeiro quadro, foram utilizados 15 artigos dos 22. Estes 15 artigos utilizaram os métodos mais usuais, explicados anteriormente.

<b>QUADRO 1: MÉTODOS E TÉCNICAS EMPREGADAS EM ANÁLISES DE MATRIZES BIOLÓGICAS.– Técnicas mais utilizadas</b>								
<b>Matriz biológica</b>	<b>Método de preparação</b>	<b>Técnica de análise</b>	<b>Analito/Biomarcador</b>	<b>LDO</b>	<b>LQQ</b>	<b>Eficiência de recuperação</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>	<b>Fonte</b>
Tecido muscular suíno	DLPME (dispersão)	CLAE-DAD	Sete quinolonas	5,6 a 23,8 µg/Kg	--	93,0-104,7%	0,9985 a 0,9999	TSAI et al; 2009
	DSPME (dispersão)		Sete quinolonas	7,5 a 26,3 µg/Kg	--	95,5-111,0%	0,9986 a 0,9997	
Urina humana	SPME	CG/MS	Anfetamina	0,1 µg/L	--	89-102,6%	0,9901	HE et al, 2009
			Metanfetamina	0,5 µg/L	--	94,4-113,8%	0,9895	
Urina humana	SPE	CL-MS/MS	Opioides	50 pg/mL- 5 ng/mL	0,025-1,25 ng/mL	92,3-117,2%	--	VERPLAETSE; TYTGAT, 2012
Sangue humano				5-1000 pg/mL	0,05-2,5 ng/mL	80,2-107,4%	--	

Plasma humano	HF-LPME	CLAE -UV	Pioglitazona	1,0 µg/L	--	91 %	>0,998	TAHMASEBI; YAMINI; SALEH, 2009
Urina humana				1,0 µg/L	--	97%	>0,998	
Urina humana	SPE	CL-MS/MS	Fentanil	0,3 pg/mL	2,5 pg/mL	Urine low: 103,5%	>0,998	VERPLAETSE; TYTGAT, 2010
						Urine high: 98,6%		
			Norfentanil	2 pg/mL	5 pg/mL	Urine low: 99%	>0,998	
Plasma humano	Fentanil	4,7 pg/mL	10 pg/mL	Blood low: 96,8%	>0,998	Blood high: 93,4%		

			Norfentanil	5 pg/mL	10 pg/mL	Blood low: 103,6%  Blood high: 100,1%	>0,998	
Leite bovino	SPE	UCLAE-MS / MS	Benzimidazois	0,01-0,1 µg/L	0,1-1 µg/L	80,5-101,3%	>0,991	XIA et al, 2010
Plasma humano	SPME	CL-MS/MS	Ácido tranexâmico	0,5 µg/L	1,5 µg/L	--	0,9992	BOJKO et al, 2011
			10,11-epóxido carbamazepina	40 ng/mL	50 ng/mL		0,995	
Plasma de rato	SPE	CLAE-DAD	Bavachinin	--	20 ng/mL	95,15-96,37%	0,9997	LIU, Lei et al, 2012
Mecônio	ASE-SPE	CG-MS	Cocaína/Crack	11-17 ng/g	30 ng/g	17,3-85,3%	0,99	MANTOVANI et al, 2014

Plasma de rato	SPE	RPLC-MS/MS (fase reversa)	Triptorrelina	--	10 ng/mL	80,68-90,54%	0,999	WANG et al, 2014
Plasma e tecido cerebral (rato)	PPT + SPE	CL-MS / MS	Pramipexol	0,02 ng/mL	0,05 ng/mL	80,7-90,3%	>0,99	GUO et al, 2015
Plasma humano	SPE	CL-MS / MS	Cotidina	0,13 ng/mL	0,20 ng/mL	>95%	0,99	DUNLOP et al, 2014
Saliva humana	PPT	CL -MS/MS	Percolato	0,01 ng/mL	0,04 ng/mL	95-104%	>0,99	OLDI; KANNAN, 2009
Saliva humana	LLE	CG-MS	Anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilenodioxianfetamina, 3,4-metilenodioxietilamfetamina	2,5-7,5 ng/mL	10 ng/mL	45,1-61,4%	0,9878 – 0,9978	BAZZARELA, 2010
Plasma	LLE	CLAE-DAD	Ciclofosfamida, doxorubicina, flururacila e ifosfamida	--	1 µg/mL	60 a 98%	>0,85	SANSON et al, 2011

#### 4.6 Outras técnicas de preparação

Alguns dos artigos selecionados não utilizaram exatamente os métodos tradicionais. Em alguns deles, houve a tentativa de aperfeiçoamento destes métodos comuns ou o uso de suas variações, já presentes na literatura. A seguir, serão destacadas algumas características e vantagens destas outras técnicas. Posteriormente, será apresentado o quadro com os parâmetros analíticos com o uso destas técnicas.

O método de microextração em fase sólida suportada com fibra oca, com barra com solvente (HF-SSBME), utilizado pelo autor Wei Liu et al (2012), é rápido, sensível e robusto para a determinação quantitativa do abuso de drogas, como esteroides anabolizantes e tem sido bastante utilizado na extração destes esteroides em matrizes, como urina e cabelo. Este equipamento experimental é extremamente simples e é facilmente montado. Este método é feito em uma única etapa, além disso ele possui autoagitação.

Segundo o autor Ansermot et al (2013), o uso de padrões internos marcados com isótopos estáveis (SIL-IS) corrigiu os efeitos de matriz. Ele diz que o potencial dos efeitos de matriz deve ser reduzido utilizando um procedimento de extração e separação cromatográfica adequada, mas o mais importante, o seu poder de variabilidade deve ser reduzido ao mínimo. As vantagens desta técnica são a facilidade de desenvolvimento, uma preparação mais rápida da amostra e custos mais baixos. O autor defende a necessidade de se utilizar a tal abordagem.

Existem variações dos métodos, como, por exemplo, no trabalho de Wang et al (2014) em que foi feito um estudo entre três métodos de SPE em relação ao efeito de matriz. Quanto mais próximo de 100% o valor é, menor é o efeito de matriz é (cálculo feito sem o uso do fator de diferença). Um valor > 100% indica um realce de iões, enquanto um valor <100% indicam supressão de iões. O trabalho estudou três variações do método SPE (Click XION SPE, fase reversa C18 e HLB SPE) e mostrou que o Click XION SPE teve valores variando de 96,02% para 103,41%, que mostra um melhor desempenho do que a dos de fase reversa C18 e HLB SP, com valores de efeito de matriz de 102,21-142,05% e 100,38-123,86%, respectivamente. Além disso, as recuperações dos analitos pré-tratados por Clique sorbentes Xion variou de 80,68% enquanto as

recuperações do analito obtido em fase reversa C18 e HLB absorventes foram 64,17-87,96% e 54,78-68,02%, respectivamente. Os valores de eficiência do processo Clique XION SPE variou de 82,83% a 92,95%, enquanto em fase inversa SPE C18 variam de 86,78% a 91,00% e de HLB SPE variam de 56,40% a 74,23%. Portanto, as amostras de plasma pré-tratado por Clique Xion SPE foram consideradas livre de efeitos de matriz devido ao aumento de ionização insignificante, bem como a supressão de ionização.

MIP-MEPS é uma técnica de preparação seletiva, robusta e totalmente automatizada. Ela une as técnicas de microextração por sorvente empacotado (MEPS) e a de polímeros molecularmente impressos (MIPs). É um método online e usa pequenos volumes de amostras. O autor Moein et al (2014) fez um estudo sobre esta técnica de extração, cujos resultados mostraram boa seletividade para a extração de ácido hipúrico a partir de amostras de plasma e urina. Este novo sorvente pode ser usado em aproximadamente 50 extrações. A membrana MIP-MEPS foi conectada ao LC-MS/MS para a avaliação da eficiência do processo de extração. Vários parâmetros foram investigados e os resultados mostraram que a membrana pode ser útil como um sorvente para extração de diferentes tipos de drogas e metabólitos.

A extração por ultrassom assistida foi considerada uma boa escolha pelo autor do Rodríguez-Gómez et al (2015), pois segundo o seu trabalho, a técnica possui rendimentos de extração mais altos e é de fácil operação, especialmente quando se é comparada com a técnica de SPE que é tradicionalmente usada para a análise de leite humano, de modo que esta alternativa poupa tempo e requer menores volumes de solventes do que SPE, reduzindo custos e resíduos. Esta técnica tem como fundamento os efeitos químicos provocados pelos ultrassons, que acontecem devido ao fenômeno da cavitação acústica, que é o processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos a ondas ultrassônicas de baixa frequência (<1 MHz). A energia liberada durante a cavitação acústica fornece excelentes perspectivas para o preparo e/ou tratamento de amostras. É uma técnica robusta (DE MORAES et al, 2009).

Colunas com material de acesso restrito (RAM) também são uma ferramenta útil para a injeção direta da matriz na coluna, permitindo a extração/concentração de analitos, sem a perda da eficiência da coluna cromatográfica. Tem como mecanismo a capacidade

de remoção de macromoléculas das matrizes, bem como a retenção das micromoléculas de interesse (LOPES et al, 2012; LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

A seguir está o segundo quadro, com os métodos de preparação retirados dos artigos, bem como o tipo de matriz biológica, de análise cromatográfica e com os parâmetros analíticos. Para este segundo quadro, foram utilizados 7 artigos dos 22. Estes 7 artigos utilizaram outras técnicas de preparação, menos utilizadas ou mais avançadas.

**QUADRO 2: MÉTODOS E TÉCNICAS EMPREGADAS EM ANÁLISES DE MATRIZES BIOLÓGICAS - Outras técnicas**

<b>Matriz biológica</b>	<b>Método de preparação</b>	<b>Técnica de análise</b>	<b>Analito/Biomarcador</b>	<b>LDO</b>	<b>LQQ</b>	<b>Eficiência de recuperação</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>	<b>Fonte</b>
Urina humana	RAM online	LC-MS/MS	Biomarcadores da exposição a xenobióticos	0,2-3,2 ng/mL	3-10 ng/mL	84-120%	0,995-0,999	RODRÍGUEZ-GONZALO et al, 2010
Urina humana	HF-SSBME	CG-MS	Sete esteroides anabolizantes	<0,10 ng/mL	--	75,65-92,37%	0,9907 a 0,9999	LIU, Wei et al, 2012
Cabelo humano				<0,10 ng/mL		73,97 – 93,56%	0,9907 a 0,9999	
Plasma humano	PPT com SIL-IL	UHPLC-MS/MS	Dez psicofármacos	--	0,5 a 1 ng/mL	96-108%	0,971 a 0,999	ANSERMOT et al, 2013
Plasma humano	MIP-MEPS	CL-MS / MS	Ácido hipúrico	0,3 nmol/L	1 nmol/L	91-96%	>0,997	MOEIN et al, 2014
Urina humana				0,3 nmol/L	1 nmol/L	91-96%	>0,997	

Leite materno	Ultrassom e 'clean-up'	UHPLC-MS/MS	Cinco benzofenonas	0,1-0,2 ng/mL	0,3-0,6 ng/mL	90,9 e 109,5%	0,833 a 0,897	RODRÍGUEZ-GÓMEZ et al, 2015
Leite materno	Coluna RAM	CL-TI-MS / MS	Carbamazepina	20 ng/mL	25 ng/mL	--	0,995	LOPES et al, 2012
			10,11-epóxido carbamazepina	40 ng/mL	50 ng/mL		0,995	
Urina humana	PPT + RAM	CL-MS/MS	CEMA	0,5 µg/L	1 µg/L	110%	>0,998	SCHETTGEN et al, 2009
			MHBMA	1 µg/L	2 µg/L	115%		
			DHBMA	5 µg/L	10 µg/L	102%		

## 5. Considerações finais

Como já previsto, dentre os artigos analisados, a maioria das matrizes biológicas utilizadas para as análises foram plasma e urina. E o método de extração mais utilizado foi o SPE isolado, em conjunto com PPT ou em suas variações. Ele é considerado o melhor método para extração de amostras biológicas e provou ser a técnica preferida para preparação de amostras biológicas. Em comparação com a PPT, a LLE e a ultrafiltração. A SPE apresenta maior seletividade e melhor reprodutibilidade. Dos 22 trabalhos, 8 utilizaram a SPE como pelo menos uma das etapas de preparação.

A LLE requer uma grande quantidade de amostra, e geralmente produz baixa recuperação, além de apresentar efeito de matriz em análise com LC-MS. Enquanto a SPE é eficaz em reduzir o efeito de matriz e é mais seletiva do que o método LLE, pois requer um longo período de tempo para realizar uma série de processos de purificação/extração, tais como o pré-condicionamento de sorvente, uso de vários solventes e etapas de fracionamento de resíduos de solventes. Sendo uma das explicações para a preferência no uso de SPE nas preparações de amostras.

Então a LLE, que é um dos métodos mais antigos, foi o menos proposto dentre os artigos selecionados. O que era de se esperar, visto que o SPE foi criado com base no LLE, porém com menos desvantagens do que o primeiro. Os 2 trabalhos em que foi utilizado o método LLE, mostraram os menores índices de recuperação comparado aos outros.

As formas miniaturizadas estavam presentes em 4 artigos, as mesmas já estão ganhando mais espaço e estão começando a ser uma presente escolha pelos autores. Todos os trabalhos em que as formas SPME e LPME foram utilizados mostraram resultados satisfatórios.

O método PPT foi utilizado, na maioria dos estudos, antes de outro método de extração pelos motivos já citados. Apenas em um artigo foi utilizado somente a PPT como forma de preparação, mas mesmo assim os resultados se mostraram satisfatórios.

A grande maioria dos trabalhos, se tratava de estudos para aperfeiçoamento dos métodos de extração, servindo como monografias para possíveis usos no campo

farmacêutico. Além de comparação entre métodos para encontrar o que mais se adequa para determinada substância.

Todos os métodos de extração provaram que ajudam na eliminação de interferentes, visto a análise dos valores de LIQ e LOD, todos satisfatórios, havendo variações, mas todos os valores na escala de pico, nano e microgramas. Métodos combinados também mostraram bastante eficácia. Os valores de coeficiente de correlação, todos altos, provam a confiabilidade das análises. O desenvolvimento dos métodos analíticos na detecção e quantificação de substâncias depende da natureza química da mesma, então cada análise deve ser avaliada separadamente, de acordo com as suas características, para a escolha do método de extração ideal.

## Referências bibliográficas

ANSERMOT, Nicolas; BRAWAND-AMEY, Marlyse; KOTTELAT, Astrid; EAP, Chin B. Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography A*, 1292, p. 160–172, 2013.

BAZZARELA, Rafael Barcellos. *Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de anfetaminas em amostras de saliva, empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas*, 2010. Dissertação (Mestre em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BEDOR, Danilo César Galindo. *Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para dosagem de antimicrobianos em plasma humano*, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

BOJKO, Barbara; VUCKOVIC, Dajana; CUDJOE, Erasmus; HOQUE, Md Ehsanul; MIRNAGHI, Fatemeh; WASOWICZ Marcin; JERATH, Angela; PAWLISZYN, Janusz. Determination of tranexamic acid concentration by solid phase microextraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry : First step to in vivo analysis. *Journal of Chromatography B*, 879, p. 3781–3787, 2011.

BOURGOGNE, Emmanuel; GRIVET, Chantal; VARESIO, Emmanuel; HOPFGARTNER, Gérard. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Generic on-line solid phase extraction sample preparation strategies for the analysis of drugs in biological matrices by LC – MS / MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102, p. 290–298, 2015.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. *Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos*.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 31 de maio de 2003. “*Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos.*”

CALDAS, Sergiane Souza; GONÇALVEZ, Fábio Ferreira; PRIMEL, Ednei Gilberto; PRESTES, Osmar Damian; MARTINS, Manoel Leonardo; ZANELLA, Renato. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, 34(9), p. 1604-1617, 2011.

CALIXTO, Leandro Augusto. *Métodos de análise da rosiglitazona e pioglitazona e de seus principais metabólitos: aplicações em estudos de metabolismo in vitro*, 2012. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CÉSAR, Isabela da Costa. *Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de artemeter e lumefantrina em comprimidos de dose fixa combinada e em plasma humano*, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

CHIU, May L.; LAWI, Watson; SNYDER, Steven T.; WONG, Pak Kin; LIAO, Joseph C.; GAU, Vicent. Matrix Effects-A Challenge Toward Automation of Molecular Analysis. *JALA - Journal of the Association for Laboratory Automation*, 15(3), p. 233–242, 2010.

DE FREITAS, Daniela Fernanda. *Microextração em fase líquida no preparo de amostra de plasma para análise cromatográfica de fluoxetina e norfluoxetina*, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais.

DE MORAES, Paula M.; LOUREIRO, Vanessa R.; PADILHA, Pedro M.; NEVES, Renato de Cássio F.; SALEH Mayra A. D.; DOS SANTOS, Felipe A.; SILVA, Fábio A. Determinação de fósforo biodisponível em rações de peixes utilizando extração assistida por ultra-som e espectrofotometria no visível. *Química Nova*, 32(4), p. 923-927, 2009.

DE OLIVEIRA, Anderson Rodrigo Moraes; MAGALHÃES, Igor Rafael dos Santos; DE SANTANA; Fernando José Malageño; BONATO, Pierina Sueli. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. *Química Nova*, 31(3), p. 637–644, 2008.

DE SANTANA, Fernando José Malageño. *Análise enantiosseletiva da mirtazapina e seus metabólitos: técnicas modernas de microextração e análise e aplicação em estudos de disposição cinética*, 2008. Tese (Doutorado em toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DE SOUSA, Flaviane Aparecida; GUIDO COSTA, Ana Isabel; DE QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro; TEÓFILO, Reinaldo Francisco; NEVES, Antônio Augusto; DE PINHO, Gevany Paulino. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. *Food Chemistry*, 135(1), p. 179–185, 2012.

DUNLOP, Allan J.; CLUNIE, Iain; STEPHEN, Duncan W. S.; ALLISON, James J. Determination of cotinine by LC-MS-MS with automated solid-phase extraction. *Journal of Chromatographic Science*, 52(4), p. 351–356, 2014.

GIU, Eric de Souza. *Controle de qualidade físico-químico de qualidade de medicamentos*. 3.ed. São Paulo-SP: Pharmabooks, 2011. Vol.1.

GUO, Weilin; Li, Gao; YANG, Yanxia; YANG, Conglian; SI, Luqin; HUANG, Jiangeng. LC-MS/MS analysis of pramipexole in mouse plasma and tissues: Elimination of lipid matrix effects using weak cation exchange mode based solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 988, p. 157–165, 2015.

HE, Yi; POHL, Jeremy; ENGEL, Robert; ROTHMAN, Leah; THOMAS, Marie. Preparation of ionic liquid based solid-phase microextraction fiber and its application to forensic determination of methamphetamine and amphetamine in human urine. *Journal of Chromatography A*, 1216(24), p. 4824–4830, 2009.

ISMAIEL, Omnia A.; ZHANG, Tianyi.; JENKINS, Rand G.; KARNES, H. Thomas. Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that

contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography / mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878(31), p. 3303–3316, 2010.

JARDIM, Isabel Cristina Sales Fonte. Extração em fase sólida : fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), p. 13–25, 2010.

KUNO, Rubia; ROQUETTI, Maria Helena; GOUVEIA, Nelson. Conceitos e derivação de valores de referência para biomonitorização humana de contaminantes ambientais. *Rev Panam Salud Publica*. 27(1), p. 74–79, 2010.

KRAHN, Carolina Lopes. *Isoflurano: desenvolvimento de um método analítico empregando microextração em fase sólida, incorporação em nanoemulsões e avaliação biológica das nanoemulsões* (2010). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

LIMA, Virgínia Verônica de; CASSIANO, Neila Maria; CASS, Quezia Bezerra. Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína-imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano. *Química Nova*, 29(1), p. 72, 2006.

LIU, Lei; LIU, Kang-Ning; WEN, Ya-Bin; ZHANG, Han-Wen; LU, Ya-Xin; YIN, Zheng. Development of a fully automated on-line solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection method for the pharmacokinetic evaluation of bavachinin: A study on absolute bioavailability and dose proportionality. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 893-894, p. 21–28, 2012.

LIU, Wei; ZHANG, Lan; FAN, Liangbiao; LIN, Zian; CAI, Yimin; WEI, Zhenyi; CHEN, Guonan (2012). An improved hollow fiber solvent-stir bar microextraction for the preconcentration of anabolic steroids in biological matrix with determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1233, p. 1–7, 2012.

LOPES, B. R.; BARREIRO, J. C.; BARALDI, P. T.; CASS, Q. B. Quantification of carbamazepine and its active metabolite by direct injection of human milk serum using liquid chromatography tandem ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 889-890, p. 17–23, 2012.

MA, Ji; Shi, Jianxia; LE, Hoa; CHO, Robert; HUANG, Judy Chi-jou; MIAO, Shichang; WONG, Bradley K. A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC-MS/MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 862(1-2), p. 219–226, 2008.

MOEIN, Mohammad Mahdi; EL-BEQALI, Aziza; JAVANBAKHT, Mehran; KARIMI, Mohammad; AKBARI-ADERGANI, Behrouz; ABDEL-REHIM, Mohamed. On-line detection of hippuric acid by microextraction with a molecularly-imprinted polysulfone membrane sorbent and liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1372, p. 55–62, 2014.

MANTOVANI, Cínthia de Carvalho; LIMA, Marcela Bittar; OLIVEIRA, Carolina Dizioli Rodrigues de; MENCK, Rafael de Almeida; DINIZ, Edna Maria de Albuquerque; YONAMINE, Mauricio. Development and practical application of accelerated solvent extraction for the isolation of cocaine/crack biomarkers in meconium samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 957, p. 14–23, 2014.

MARCHI, Ivano; VIETTE, Véronique; BADOUD, Flavia; FATHI, Marc; SAUGY, Martial; RUDAZ, Serge; VEUTHEY, Jean-Luc. Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), p. 4071–4078, 2010.

MIRÓ, Manuel; HANSEN, Elo Harald. On-line sample processing involving microextraction techniques as a front-end to atomic spectrometric detection for trace metal assays: A review. *Analytica Chimica Acta*, 782, p. 1–11, 2013.

OLDI, John F.; KANNAN, Kurunthachalam. Analysis of perchlorate in human saliva by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Science & Technology*, 43(1), p. 142–147, 2009.

ORLANDO, Ricardo M.; CORDEIRO, Diogo Dias; MATHIAS, Ana Elisa Barreto; REZENDE, Kênnia R.; GIL, Eric de S. Pré-Tratamento de Amostras. *Vita et Sanitas, Trindade-GO, n. 03*, p. 122–139, 2009.

PERUZZO, Francisco Miragaia; DO CANTO, Eduardo Leite. *Informe-se sobre a química*, p. 55, 2012.

PETERSEN, Nickolaj Jacob; RASMUSSEN, Knut Einar; PEDERSEN-BJERGAARD, Stig; GJELSTAD, Astrid. Electromembrane Extraction from Biological Fluids. *Analytical Sciences*, 27(10), p. 965, 2011.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ R.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALLESTEROS, O.; NAVALÓN, A. Talanta Determination of benzophenone-UV filters in human milk samples using ultrasound-assisted extraction and clean-up with dispersive sorbents followed by UHPLC – MS / MS analysis. *Talanta*, 134, p 657–664, 2015.

RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; GARCÍA-GÓMEZ, D.; CARABIAS-MARTÍNEZ, R. Development and validation of a method for the detection and confirmation of biomarkers of exposure in human urine by means of restricted access material-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(1), p. 40–48, 2010.

ROSA, Ana Cristina Simões; SARCINELLI, Paula de Novaes. Monitoring organochlorine exposure: a review on biological matrices analysis. *Cad. Saúde Colet., Rio de Janeiro*, 16(4), p. 659–675, 2008.

SANSON, Ananda Lima; SILVA, Suéllen Cristina Rennó; MARTINS, Matheus Coutinho Gonçalves; GIUSTI-PAIVA, Alexandre; MAIA, Patrícia Penido; MARTINS, Isarita. Liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography-diode array-ultra-violet for simultaneous determination of antineoplastic drugs in plasma. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(2), p. 363–371, 2011.

SCHETTGEN, T.; MUSIOL, A.; ALT, A.; OCHSMANN, E.; KRAUS, T. A method for the quantification of biomarkers of exposure to acrylonitrile and 1,3-butadiene in human

urine by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(3), p. 961–989, 2009.

SHAH, Kumar A.; KARNES, H. Thomas. A review of the analysis of tobacco-specific nitrosamines in biological matrices. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(4), p. 305–327, 2010.

SILVEIRA, Viviane Teixeira; RIGO, Luiz Carlos. O programa passaporte biológico: considerações sobre o governo dos atletas. *Revista da escola de educação física da UFRGS*, 21(2), p. 495-506, 2015.

TAVARES, Leoberto Costa. QSAR : the Hansch's approach. *Química Nova*, v.24, n. 4, p. 1-15, 2004.

TAHMASEBI, Elham; YAMINI, Yadollah; SALEH, Abolfazl. Extraction of trace amounts of pioglitazone as an anti-diabetic drug with hollow fiber liquid phase microextraction and determination by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection in biological fluids. *Journal of Chromatography B*, 877, p. 1923–1929, 2009.

TUDELA, Eva; MUÑOZ, Gloria; MUÑOZ-GUERRA, Jesús A. Matrix effect marker for multianalyte analysis by LC-MS/MS in biological samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 901, p. 98–106, 2012.

TULIPANI, Sara; LLORACH, Rafael; URPI-SARDA, Mireia; ANDRES-LACUEVA, Cristina. Comparative analysis of sample preparation methods to handle the complexity of the blood fluid metabolome: When less is more. *Analytical Chemistry*, 85(1), p. 341–348, 2013.

TSAI, Wen-Hsien; CHUANG, Hung-Yi; CHEN, Ho-Hsien; HUANG, Joh-Jong; CHEN, Hwi-Chang; CHENG, Shou-Hsun.; HUANG, Tzou-Chi. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and dispersive micro-solid-phase extraction for the determination of quinolones in swine muscle by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Analytica Chimica Acta*, 656(1-2), p. 56–62, 2009.

VALENTE, Antonio Luiz Pires; AUGUSTO, Fabio. SPME, SOLID PHASE MICRO-EXTRACTION. Fundamental aspects of Solid Phase Micro-Extraction (SPME) are discussed in the present paper. The application of SPME as a microtechnique of sample preparation for gas chromatographic analysis is considered and related to existing theoretical models. Both research prototypes and commercial SPME devices are considered. *Química Nova*, 23(3), p. 523-530, 2000.

VERPLAETSE, Ruth; TYTGAT, Jan. (2010). Development and validation of a sensitive ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of fentanyl and its major metabolite norfentanyl in urine and whole blood in forensic context. *Journal of Chromatography B*, 878, p. 1987–1996, 2010.

VERPLAETSE, Ruth; TYTGAT, Jan. Development and validation of a sensitive UPLC – MS / MS method for the analysis of narcotic analgesics in urine and whole blood in forensic context §. *Forensic Science International*, 215(1-3), p. 136–145, 2012.

VIEIRA, Fernando S. V.; REBOUÇAS, Márcio V.; DE ANDRADE Jailson B. Determinação de compostos carbonilados e carboxilados em derivados de petróleo. *Química Nova*, 35(8), p. 1644–1656, 2012.

WANG, Jixia; KONG, Song; YAN, Jingyu; JIN, Gaowa; GUO, Zhimou; SHEN, Aijin; XU, Junyan; ZHANG, Xiuli; ZOU, Lijuan; LIANG, Xinmiao. Hydrophilic interaction liquid chromatography-solid phase extraction directly combined with protein precipitation for the determination of triptorelin in plasma. *Journal of Chromatography B*, 960, p. 214–221, 2014.

WELKE, Juliane Elisa. *Uso da microextração em fase sólida e da cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente na caracterização de voláteis de vinhos gaúchos*, 2012. Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

XIA, Xi; DONG, Yichun; LUO, Pengjie; WANG, Xia; LI, Xiaowei; DING, Shuangyang; SHEN, Jianzhong. Determination of benzimidazole residues in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878(30), p. 3174–3180, 2010.

YADAV, Manish; TRIVEDI, Vikas; UPADHYAY, Vivek; SHAH, Gaurang; BAXI, Girin A; GOSWAMI, Sailendra; SHRIVASTAV, Pranav S. Comparison of extraction procedures for assessment of matrix effect for selective and reliable determination of atazanavir in human plasma by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 885-886, p. 138–149, 2012.